



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**IMPORTANCIA DE LAS INTERFACES
MONÓMERO-MONÓMERO Y DÍMERO-DÍMERO
EN LA ESTABILIDAD Y REGULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA
FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *ESCHERICHIA COLI*.**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado
Académico de Doctor en Bioquímica

Por:

MAURICIO ANDRÉS BAEZ LARACH

Directores de Tesis

Dr. Jorge Babul

Dra. Victoria Guixé.

Santiago, Chile

2008

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

MAURICIO ANDRES BAEZ LARACH

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el

Directores de Tesis:

- Dr. Jorge Babul
- Dra. Victoria Guixé

Comisión Informante de Tesis:

- Dr. Tito Ureta (Presidente)
- Dra. María Antonieta Valenzuela
- Dr. Romilio Espejo
- Dra. Bárbara Andrews
- Dr. Jaime Eyzaguirre

Para
Patricia, María Luisa
y Valentina.

Agradecimientos.

A mis tutores Dra. Victoria Guixé y Dr. Jorge Babul por su apoyo y preocupación. En especial quiero agradecer al Dr. Jorge Babul por la oportunidad de trabajar, estudiar y aprender en su laboratorio y por la ayuda brindada en los momentos adversos.

Al Dr. Ricardo Cabrera por el aporte de sus incansables discusiones, su generosidad para compartir sus conocimientos, ideas y amistad.

A los miembros y ex miembros del laboratorio de Bioquímica y Biología molecular, Andrés Caniuguir y Marcela Mancilla, Jazmín Flores, Felipe Merino y Guadalupe Astorga. Su colaboración en este trabajo fue fundamental.

Al personal del grupo de Cristalografía del Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, especialmente al Dr. Richard C. Garratt, por su generosidad y su constante preocupación durante mi estadía en Brasil. También quiero agradecer a los integrantes del grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas por las facilidades brindadas en el uso del equipamiento.

Al programa de becas de estadías cortas de investigación destinadas a estudiantes tesis de doctorado y magíster de la Universidad de Chile, Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Departamento de Postgrado y Postítulo

Al programa de becas de Doctorado de Conicyt.

Publicaciones derivadas de la tesis.

Baez, M., Cabrera, R., Guixé, V. y Babul, J. (2007). Unfolding pathway of the dimeric and tetrameric forms of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 46: 6141-6148.

Baez, M., Merino, F., Astorga, G., and Babul, J. (2008). Uncoupling the MgATP-induced inhibition and aggregation of *E. coli* phosphofructokinase-2 by C-terminal mutations. *FEBS Lett.* 582: 1907-1912

Colaboraciones en otras publicaciones realizadas durante el periodo de la tesis.

Caniuguir, A., Cabrera, R., Baez, M., Vasquez, C. C., Babul, J. y Guixé, V. (2005). Role of Cys-295 on subunit interactions and allosteric regulation of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. *FEBS. Lett.* 579: 2313-2318.

Parducci, R. E., Cabrera, R., Baez, M. y Guixé, V. (2006). Evidence for a catalytic Mg²⁺ ion and effect of phosphate on the activity of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2: regulatory properties of a ribokinase family member. *Biochemistry* 45: 9291-9299.

ÍNDICE DE MATERIAS

| | |
|--|-------|
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimientos..... | iii |
| Publicaciones derivadas de la tesis. | iv |
| Índice de materias | v |
| Listas de tablas | ix |
| Lista de figuras..... | x |
| Lista de abreviaturas | xii |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT | xviii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| HIPÓTESIS | 10 |
| OBJETIVOS | 10 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| MATERIALES | 11 |
| 1. Cepas bacterianas..... | 11 |
| 2. Partidores. | 11 |
| 3. Medio Luria Broth (LB)..... | 11 |
| 4. Reactivos..... | 11 |
| MÉTODOS | 12 |
| 1. Mutagénesis sitio dirigida. | 12 |
| 2. Sobreexpresión de Pfk-2 y de las proteínas mutantes..... | 12 |
| 3. Purificación de Pfk-2 y de las proteínas mutantes | 13 |
| 4. Desplegamiento y replegamiento de la Pfk-2 inducido por GdnHCl | 14 |
| 5. Desplegamiento de la Pfk-2 y la mutante L93A inducido por el aumento de la temperatura..... | 15 |
| 6. Determinación de la actividad enzimática | 15 |
| 7. Mediciones de fluorescencia intrínseca y extrínseca | 16 |
| 8. Mediciones de dicroísmo circular | 17 |
| 9. Cromatografía de exclusión molecular | 17 |
| 10. Dispersión dinámica de luz..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 11. Análisis de las transiciones obtenidas en presencia de GdnHCl..... | 19 |
| 12. Análisis de las transiciones obtenidas al aumentar la temperatura | 22 |
| RESULTADOS | 24 |
| I. DESPLEGAMIENTO Y DISOCIACIÓN DEL DÍMERO NATIVO INDUCIDO POR GdnHCl | 24 |
| 1. Cambios en la actividad enzimática, fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular de la Pfk-2 obtenidos en función de la concentración de GdnHCl | 25 |
| 2. Efecto de la concentración de proteína en las transiciones obtenidas en presencia de GdnHCl | 28 |
| 3. Cambios en el estado de compactación de las especies involucradas en el mecanismo de desplegamiento de la Pfk-2 | 35 |
| II. DESPLEGAMIENTO Y DISOCIACIÓN DEL TETRÁMERO INDUCIDO POR GdnHCl | 40 |
| 1. Cambios en la actividad enzimática, fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular de la Pfk-2 obtenidos en función de la concentración de GdnHCl | 40 |
| 2. Cambios en la compactación de las especies observadas mediante cromatografía de exclusión molecular en presencia de MgATP | 43 |
| 3. Cambios en el estado de agregación y compactación de las especies observadas mediante dispersión dinámica de luz en presencia de MgATP..... | 45 |
| III. PERTURBACIÓN DE LA INTERFAZ MONÓMERO-MONÓMERO (<i>β-clasp</i>) MEDIANTE MUTACIÓN SITIO DIRIGIDA..... | 49 |
| 1. Características cinéticas de la mutante L93A | 49 |
| 2. Efecto de la concentración de proteína en la k_{cat} y el radio hidrodinámico de la mutante L93A..... | 52 |
| 3. Reversibilidad de los cambios del estado de agregación de la mutante L93A inducida por ligando..... | 54 |
| 4. Fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular de la mutante L93A | 58 |
| 5. Desplegamiento de la mutante L93A por GdnHCl e incremento de la temperatura .. | 60 |

| | |
|--|-----|
| 6. Determinación de la estabilidad del dímero mutante L93A..... | 67 |
| | |
| IV. PERTURBACIÓN DE LA INTERFAZ DÍMERO-DÍMERO MEDIANTE MUTACIONES SITIO DIRIGIDAS | 72 |
| 1. Caracterización cinética de las mutantes obtenidas por remoción de aminoácidos del extremo carboxilo terminal | 73 |
| 2. Desacoplamiento de la formación de tetrámeros de la inhibición enzimática inducida por MgATP | 77 |
| 3. Unión de MgATP a la forma libre de las mutantes Y306A y L307A | 84 |
| | |
| DISCUSIÓN | 88 |
| I. INTERFAZ MONÓMERO-MONÓMERO DEL DÍMERO SILVESTRE | 88 |
| 1. Modelo termodinámico para el desplegamiento del dímero silvestre..... | 88 |
| 2. Características estructurales del monómero silvestre obtenido en presencia de GdnHCl. | 90 |
| | |
| II. PERTURBACIÓN DE LA INTERFAZ MONÓMERO-MONÓMERO (<i>β-clasp</i>) MEDIANTE MUTACIÓN SITIO DIRIGIDA..... | 93 |
| 1. Estabilidad del dímero obtenido mediante mutagénesis sitio dirigida. | 93 |
| 2. Características estructurales y estabilidad del monómero obtenido mediante mutagénesis sitio dirigida. | 96 |
| | |
| III. PERTURBACIÓN DE LA INTERFAZ DÍMERO-DÍMERO MEDIANTE MUTACIONES SITIO DIRIGIDAS..... | 104 |
| 1. Perturbación de la interfaz dímero-dímero mediante mutagénesis sitio dirigida y su efecto en la inhibición alostérica por MgATP..... | 104 |
| 2. Correlaciones estructura-función de las mutantes de la región carboxilo terminal .. | 107 |
| 3. Aspectos relevantes para la regulación alostérica de la Pfk-2 | 111 |
| 4. ¿Es compatible la estructura del complejo Pfk-2-MgATP con los antecedentes cinéticos de la Pfk-2? | 115 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| CONCLUSIONES..... | 119 |
| Proyecciones de la Tesis | 120 |
| REFERENCIAS | 122 |

Lista de tablas.

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Parámetros termodinámicos para el desplegamiento de la Pfk-2 obtenidos a partir del modelo de tres estados $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$ | 32 |
| Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos de la mutante L93A y la enzima silvestre a partir de varias condiciones experimentales | 51 |
| Tabla 3. Comparación de los parámetros termodinámicos de estabilidad obtenidos en función de la sal utilizada para estabilizar la mutante L93A | 69 |
| Tabla 4. Parámetros cinéticos de la enzima silvestre y las mutantes de remoción del extremo carboxilo terminal. | 74 |
| Tabla 5. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima silvestre y las mutantes Y396A y L307A | 81 |
| Tabla 6. Constantes de disociación y número de Hill (n_H) obtenidos a partir del cambio del área de emisión del Trp-88 inducido por MgATP..... | 86 |

Lista de figuras.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura del homodímero de la Pfk-2 correspondiente a la unidad asimétrica del cristal obtenido en presencia de MgATP..... | 5 |
| Figura 2. Desnaturación y replegamiento de la Pfk-2 inducido por GdnHCl..... | 26 |
| Figura 3. Efecto de la concentración de proteína sobre los cambios relativos de la elipticidad a 222 nm..... | 29 |
| Figura 4. Comparación entre los cambios de la fluorescencia extrínseca del ANS y la variación de las especies que participan en el desplegamiento de la Pfk-2 | 34 |
| Figura 5. Propiedades hidrodinámicas de la Pfk-2 en función de la concentración de GdnHCl..... | 36 |
| Figura 6. Efecto de la concentración de proteína en los volúmenes de elución del pico I y II obtenidos a 0,3 M de GdnHCl..... | 38 |
| Figura 7. Efecto MgATP en el desplegamiento de la Pfk-2 inducido por GdnHCl..... | 41 |
| Figura 8. Cambios en el volumen de elución de la Pfk-2 inducidos por GdnHCl en presencia de MgATP obtenidos por cromatografía de exclusión molecular | 44 |
| Figura 9. Cambios hidrodinámicos seguidos por dispersión dinámica de luz en presencia de GdnHCl | 46 |
| Figura 10. Alineamiento estructural del dominio menor de la Pfk-2 y ubicación de L93 en la estructura de la Pfk-2 | 50 |
| Figura 11. Efecto de la concentración de proteína en la k_{cat} y radio hidrodinámico de la enzima silvestre y mutante L93A..... | 53 |
| Figura 12 Efecto de los ligandos de la Pfk-2 en las propiedades hidrodinámicas de la mutante L93A y la enzima silvestre..... | 55 |
| Figura 13. Efecto de la concentración de proteína en la reactivación de la mutante L93A por fructosa-6-P | 57 |
| Figura 14. Comparación de las propiedades estructurales de la enzima silvestre y mutante L93A en condiciones que favorecen su estado disociado y asociado..... | 59 |
| Figura 15. Desplegamiento de la mutante L93A en su estado monomérico utilizando GdnHCl..... | 61 |
| Figura 16. Desplegamiento térmico de la Pfk-2 silvestre | 62 |

| | |
|---|-----|
| Figura 17. Efecto de la concentración de proteína en el desplegamiento térmico de la Pfk-2..... | 64 |
| Figura 18. Transiciones térmicas de la enzima silvestre y mutante L93A..... | 66 |
| Figura 19. Recuperación de la actividad de la mutante L93A en función de la concentración de varias sales | 68 |
| Figura 20. Diseño y expresión de las mutantes carboxilo terminal de la Pfk-2..... | 73 |
| Figura 21. Efecto de la concentración de MgATP en la K_{mapp} de fructosa-6-P de la enzima silvestre y las mutantes de remoción de segmentos del extremo carboxilo terminal.. | 76 |
| Figura 22. Efecto de la remoción de aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la Pfk-2 en la velocidad máxima y la K_m aparente de MgATP..... | 76 |
| Figura 23. Cambios en el estado de agregación de las mutantes carboxilo terminal inducidos por MgATP..... | 78 |
| Figura 24. Curvas de velocidad inicial en función de la concentración de MgATP para la enzima silvestre y mutantes Y306A y L307A..... | 80 |
| Figura 25. Efecto de la concentración de MgATP en la K_{mapp} de fructosa-6-P de la enzima silvestre y la mutante Y306A. | 80 |
| Figura 26. Efecto de MgATP en el radio hidrodinámico (Rh) de la Pfk-2 medido por dispersión dinámica de luz y cromatografía de exclusión en gel..... | 83 |
| Figura 27. Cambios en el estado de agregación de la mutante Y306A y la enzima silvestre inducidos por sus sustratos | 83 |
| Figura 28. Cambios de la fluorescencia intrínseca en estado estacionario del Trp-88 en función de la concentración de MgATP..... | 85 |
| Figura 29. Localización del Trp-88 en la estructura del dímero de la Pfk-2 obtenida en presencia de MgATP | 97 |
| Figura 30. Estructura tetramérica del complejo MgATP-Pfk-2..... | 108 |
| Figura 31. Ubicación del ATP y Mg^{2+} en la estructura de la Pfk-2 | 114 |

Lista de Abreviaturas.

| | |
|--------------|--|
| ANS | 1-anilino-8-naftaleno sulfonato |
| DTT | ditiotreitól |
| fructosa-6-P | D-fructosa-6-P |
| GdnHCl | cloruro de guanidinio |
| IPTG | isopropiltiogalactósido |
| MgATP | adenosina 5'-trifosfato acomplexada con magnesio |
| Pfk-2 | fosfofructoquinasa-2 |
| Tris | Tris-(hidroximetil)-aminometano |
| CD | dicroísmo circular |
| grad | grados |
| k_{cat} | constante catalítica |
| K_m | constante de Michaelis-Menten |
| K_{mapp} | constante de Michaelis-Menten aparente |
| Rh | radio hidrodinámico |
| UA | unidades arbitrarias de fluorescencia |
| DLS | dispersión dinámica de luz |
| U | unidad internacional de enzima, μ moles de sustrato consumido por minuto |
| R | Constante de universal de los gases |
| ΔH | diferencia de entalpía molar entre productos y reactantes |
| ΔG | diferencia de energía libre de Gibbs entre productos y reactantes |

RESUMEN

La fosfofructoquinsa-2 (Pfk-2) de *E. coli* transfiere eficientemente un grupo fosfato al hidroxilo 1 de fructosa-6-P utilizando MgATP, reacción cuya velocidad es regulada negativamente mediante un sitio alostérico para MgATP. Análisis filogenéticos y la reciente obtención de la estructura cristalográfica de la Pfk-2, sitúan a esta enzima entre un grupo de quinasas de azúcares y vitaminas denominado superfamilia de la riboquinasa. Las enzimas representantes de esta superfamilia comparten un dominio común tipo $\alpha/\beta/\alpha$ que contiene la mayoría de los determinantes estructurales que originan el sitio activo. Por otra parte, estudios cristalográficos, y en algunos casos bioquímicos, han descrito a los miembros de esta familia como tetrámeros, trímeros, dímeros y monómeros que presentan arreglos cuaternarios que ocurren a través de diferentes superficies de interacción.

En ausencia de sustratos o en presencia de fructosa-6-P, la Pfk-2 se ha descrito como un homodímero de 66 KDa, cuya interfaz se crea a través de elementos de estructura secundaria adicionales al dominio conservado $\alpha/\beta/\alpha$ de los representantes de la superfamilia de la riboquinasa. Sin embargo, en la Pfk-2 y en sus homólogos más cercanos, no se han determinado las características estructurales de sus subunidades aisladas y por ende se desconoce el papel de la estructura cuaternaria en cuanto a la función y estabilidad en estos tipos de dímeros.

Por otro lado, la unión de MgATP al sitio alostérico de la Pfk-2 tiene como resultado la asociación del dímero nativo en tetrámero, lo cual ha sido correlacionado con la inhibición de la actividad enzimática. La inhibición alostérica y el concomitante cambio de estado de agregación son características exclusivas para la Pfk-2 de *E. coli*,

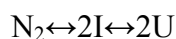
ya que homólogos cercanos capaces de fosforilar otros azúcares no presentan esta característica.

De esta forma, la Pfk-2 de *E. coli* presenta dos tipos de interfaz: una estructuralmente conservada, relacionada con la arquitectura del sitio activo y otra no conservada, relacionada con la regulación alostérica de su actividad catalítica.

En esta tesis se perturbó la estructura de la Pfk-2 mediante la utilización de agentes caotrópicos, temperatura y mutagénesis sitio dirigida, con el propósito de conocer el papel de las interacciones cuaternarias en la estabilidad de la enzima, catálisis enzimática y regulación alostérica.

El desplegamiento de la Pfk-2 inducido por GdnHCl se determinó mediante medidas de actividad enzimática, fluorescencia intrínseca, dicroísmo circular, cromatografía de exclusión y dispersión dinámica de luz, para caracterizar los cambios conformacionales involucrados en la disociación y desplegamiento de la enzima. El tratamiento con GdnHCl de la configuración dimérica de la Pfk-2 mostró la presencia de un intermediario inactivo con propiedades fluorescentes similares al estado desplegado, pero que retiene alrededor de un 30 % de la señal de dicroísmo circular correspondiente al dímero nativo. Para evaluar el estado de agregación del intermediario, se determinó el efecto de la concentración de proteína en las transiciones que lo originan, con el fin de detectar los cambios conformacionales acoplados a la disociación de las subunidades de la Pfk-2. Esta aproximación experimental, junto a experimentos de cromatografía de exclusión y dispersión dinámica de luz, indica que el intermediario corresponde a un monómero expandido con un radio hidrodinámico de $\sim 38 \text{ \AA}$, lo que equivale a un radio hidrodinámico 12 \AA mayor que el calculado para un monómero compacto de 33 KDa (el

tamaño de la subunidad de la Pfk-2). Estos resultados permitieron proponer un mecanismo mínimo para el desplegamiento de la Pfk-2 representado por el siguiente modelo,



donde N_2 representa el dímero nativo, I es el intermediario monomérico y U es el estado desplegado de la enzima. El ajuste de este modelo a las transiciones conformacionales observadas en presencia de GdnHCl, indicó que los cambios conformacionales que ocurren en la transición $N_2 \leftrightarrow 2I$ dan cuenta del 75 % de la estabilidad del dímero nativo N_2 respecto al estado desplegado. Por lo tanto, se postula que la pérdida de estructura cuaternaria inducida por GdnHCl, es un proceso que no puede diferenciarse de la pérdida de una parte importante de la estructura secundaria de las subunidades. Por otra parte, el desplegamiento de la Pfk-2 a partir de su configuración tetramérica, obtenida en presencia de MgATP, mostró la formación de un intermediario tetramérico que se caracterizó por presentar un espectro de fluorescencia alterado respecto al tetrámero nativo. La disociación del tetrámero transcurre en un estrecho intervalo de agente caotrópico sin una clara prueba de la acumulación de dímeros o monómeros compactos. Por el contrario, sólo se observa la acumulación de un intermediario monomérico desestructurado con propiedades similares al anteriormente descrito. Estos resultados indican que los monómeros aislados de la Pfk-2 no son estabilizados por la unión de MgATP al sitio alostérico

Con el fin de estudiar las propiedades estructurales del monómero en ausencia de GdnHCl, se perturbó la interfaz monómero-monómero de la Pfk-2 mediante el cambio

de L93 por alanina. La mutante se caracterizó como un monómero inactivo, con un mayor grado de estructura secundaria y 9 Å más compacto que el intermediario monomérico obtenido en presencia de GdnHCl. No obstante, en comparación con su conformación asociada la mutante presentó una importante pérdida de estructura secundaria. En condiciones donde la mutante se encuentra disociada, el aumento de la temperatura y el tratamiento con GdnHCl, mostraron que esta especie presenta una estabilidad marginal ya que la pérdida de su estructura secundaria no origina transiciones sigmoides como las obtenidas a partir de su configuración dimérica. En conjunto estos resultados indican que las subunidades aisladas de la Pfk-2 carecen de interacciones terciarias, las que solo se establecen cuando la enzima adquiere su estructura cuaternaria.

El papel de la interfaz dímero-dímero en la regulación alostérica de la Pfk-2 se analizó mediante la caracterización cinética y la capacidad de formar tetrámeros de una serie de mutantes originadas por la remoción sistemática de residuos y segmentos del extremo carboxilo terminal de la enzima. Estas mutantes se construyeron debido a que experimentos de proteólisis limitada sugerían que el extremo carboxilo terminal de la enzima podría contener residuos que participan en la formación del tetrámero. Se encontró que la remoción de segmentos del extremo carboxilo terminal de la Pfk-2, produce enzimas con una pseudo-afinidad disminuida (elevadas K_m aparentes) para MgATP y no forman tetrámeros en presencia del nucleótido. A partir de esta información se generaron dos mutantes puntuales del extremo carboxilo terminal, con el fin de afectar separadamente el aumento de la K_m aparente para MgATP de la falla en la formación de tetrámeros. La mutante Y306A mostró parámetros cinéticos y un patrón de

inhibición de la actividad enzimática idéntico a los de la enzima silvestre, pero no presentó cambios en el estado de agregación en presencia del nucleótido. Por otra parte, la mutante L307A presentó el mismo comportamiento cinético y estado de agregación en presencia del nucleótido que las mutantes que resultaron al remover segmentos del extremo carboxilo terminal. Estos resultados indican que la formación de tetrámeros no es requisito para la regulación alostérica de la Pfk-2.

ABSTRACT

Phosphofructokinase-2 (Pfk-2) from *E. coli* efficiently transfers a phosphate group to the 1 hydroxyl of fructose-6-P using MgATP, a reaction whose velocity is negatively regulated by an allosteric site for MgATP. Phylogenetic analysis and the recent resolution of the crystallographic structure of the Pfk-2, place this enzyme among a group of sugar and vitamins kinases known as the ribokinase superfamily. The representatives of this superfamily share a common $\alpha/\beta/\alpha$ type domain which contains most of the structural determinants that originate the active site. Moreover, crystallographic studies, and in some cases also biochemical studies, have described the members of this family as tetramers, trimers, dimers and monomers that present quaternary arrangements that occur through different areas of interaction.

In the absence of substrates or in the presence of fructose-6-P, Pfk-2 has been described as a homodimer of 66 KDa, whose interface is created through secondary structure elements that are, in addition to the conserved $\alpha/\beta/\alpha$ domain, representative of the ribokinase superfamily. However, in Pfk-2 and its closest homologues, the structural characteristics of its isolated subunits have not yet been determined and hence the role of the quaternary structure, in terms of function and stability in these types of dimers, is unknown.

On the other hand, binding of MgATP to the allosteric site of the Pfk-2 provokes the association of the native dimer into a tetramer, which has been correlated with the inhibition of the enzymatic activity. The allosteric inhibition and the concomitant change in the status of aggregation are unique characteristics of Pfk-2 from *E. coli*, since close homologues that phosphorylate other sugars do not present this feature.

Thus, Pfk-2 from *E. coli* presents two kinds of interfaces: a structurally conserved one, related to the architecture of the active site, and a non-conserved one related to the allosteric regulation of its catalytic activity.

In this thesis the structure of Pfk-2 was unfolded by using chaotropic agents, temperature and site directed mutagenesis, in order to find out the role of the quaternary interactions in the stability, enzymatic catalysis and allosteric regulation of the enzyme.

The unfolding of Pfk-2 induced by GdnHCl was determined by measurements of enzyme activity, intrinsic fluorescence, circular dichroism, size exclusion chromatography and dynamic light scattering in order to characterize the conformational changes involved in the unfolding and dissociation of Pfk-2. Treatment with GdnHCl of the dimeric configuration of Pfk-2 shows the presence of an inactive intermediary with fluorescent properties similar to the unfolded state, but retaining about 30% of the circular dichroism signal shown by the native dimer. To evaluate the state of aggregation of the intermediary, the effect of the protein concentrations in the transitions that originate this species was determined in order to detect the conformational changes coupled to the dissociation of the subunits of Pfk-2. This experimental approach, along with size exclusion chromatography and dynamic light scattering experiments, indicates that the intermediary is an expanded monomer with a hydrodynamic radius of $\sim 38 \text{ \AA}$, which is 12 \AA larger than the expected hydrodynamic radius calculated for a compact monomer of 33 KDa (the molecular size of the Pfk-2 subunit). These results prompted the proposition of a minimum mechanism for the unfolding and dissociation of Pfk-2 represented by the following model,



where N_2 represents the native dimer, I is the monomeric intermediate and U is the unfolded state of the enzyme. The adjustment of this model to the conformational transitions observed in the presence of GdnHCl, indicate that the conformational changes that occur during the $N_2 \leftrightarrow 2I$ transition accounts for 75% of the stability of the N_2 native dimer with regard to the unfolded state. Therefore, we postulate that the loss of quaternary structure induced by GdnHCl, is a process that cannot be distinguished from the loss of an important part of the secondary structure of the subunits. On the other hand, the unfolding of Pfk-2 from its tetrameric configuration obtained in the presence of MgATP, shows the formation of a tetrameric intermediate that is characterized by the presence of an altered fluorescence spectrum with respect to the native tetramer. The tetramer dissociation takes place in a narrow interval of chaotropic agent concentration without clear evidence of the accumulation of compact dimers or monomers. In contrast, the accumulation of a monomeric intermediate with similar structural properties to the one described above was observed only. These results indicate that the isolated subunits are not stabilized by the allosteric binding of MgATP.

In order to study the structural properties of the monomer in the absence of GdnHCl, the Pfk-2 monomer-monomer interface was disrupted by changing L93 by alanine. The mutant was characterized as an inactive monomer, with a greater degree of secondary structure and 9 Å more compact than the monomeric intermediate obtained in the presence of GdnHCl. Nevertheless, compared with its associated conformation, the mutant presented a significant loss of secondary structure. Under conditions where the mutant was found dissociated, the temperature increment and treatment with GdnHCl show that the mutant has a marginal stability, since the secondary structure loss does not

show sigmoid transitions as those obtained from its dimeric configuration. Together, these results indicate that the isolated subunits of Pfk-2 lack tertiary interactions, which are only established when the enzyme acquires its quaternary structure.

The role of the dimer-dimer interface in the allosteric regulation of Pfk-2 was tested by kinetic characterization and by the ability to form tetramers of several mutants created by systematic deletions of residues from the Pfk-2 C-terminal end. These mutants were constructed since limited proteolysis experiments had suggested that the C-terminal end could contain residues that participate in tetramer formation. It was found that the deletion of segments from the C-terminal end of Pfk-2 produces enzymes with a diminished pseudo-affinity (high apparent K_m) for MgATP and do not form tetramers in the presence of the nucleotide. From this information two puntual mutants in the C-terminal region were generated, in order to separately affect the increment of the apparent K_m for MgATP from the failure in tetramer formation. The mutant Y306A showed similar kinetic parameters and an inhibition pattern with respect the wild type enzyme, but did not show changes in the aggregation state in the presence of the nucleotide. Moreover, the mutant L307A had the same kinetic behavior and aggregation state in the presence of the nucleotide compared to those mutants that resulted from the successive deletion of the C-terminal residues. These results indicate that tetramer formation is not a requirement for the allosteric regulation of Pfk-2.

INTRODUCCIÓN

La estructura cuaternaria, el arreglo tridimensional de las subunidades, juega un papel crítico en la regulación, estabilidad y actividad catalítica de las enzimas oligoméricas. En algunos casos, los contactos interfaciales de las subunidades son completamente requeridos para la correcta función y estabilidad del oligómero. Tales tipos de complejos han sido referidos como *permanentes* debido a que la separación de las subunidades produce la pérdida de su actividad biológica (Jones y Thornton, 1996; Larsen y col., 1998; Tsai y Nussinov, 1997). Por otro lado, el estado de agregación puede ser modulado por interacciones proteína-ligando que favorezcan diferentes estados de agregación con propiedades diferentes (Nooren y Thornton, 2003).

En el caso de los complejos enzimáticos transitorios o no obligados, las subunidades aisladas son especies estables (Nooren y Thornton, 2003) y por ende los cambios conformacionales que dependen del estado de agregación son sutiles y se manifiestan a través de cambios estructurales a nivel del sitio activo. Los ejemplos más comunes corresponden a enzimas alostéricas, donde la unión del efector alostérico cambia el estado de agregación de la enzima. La glicerol quinasa de *E. coli* controla la utilización de glicerol en función de la concentración de glucosa (Holtman y col., 2001) mediante la inhibición alostérica inducida por fructosa-1,6-bisP (Zwaig y col., 1970). En ausencia de su efector alostérico, esta enzima presenta un equilibrio dímero-tetramero donde ambas especies son capaces de unir fructosa-1,6-bisP, pero con distintas afinidades. Dado que la especie tetramérica presenta una constante de afinidad por fructosa-1,6-bisP 4.000 veces superior a su contraparte dimérica, la presencia de

fructosa-1,6-bisP favorece la agregación del tetrámero (Yu y Pettigrew, 2003). Este ejemplo corresponde a un equilibrio de agregación facilitado por la unión del ligando, ya que desplaza el equilibrio hacia un estado de agregación en particular. En este caso, el cambio de estado de agregación es determinante para la inhibición alostérica de la enzima por fructosa-1,6-bisP, dado que la perturbación de la interfaz del tetrámero, mediante mutagénesis sitio dirigida, produce dímeros incapaces de agregar e insensibles a la inhibición por fructosa-1,6-bisP (Liu y col., 1994).

Por otro lado, en oligómeros cuya estructura cuaternaria ha evolucionado conjuntamente con su función biológica, la formación de la interfaz es crucial para la actividad y, en algunos casos, para la estabilidad de sus subunidades aisladas (Neet y Timm, 1994). En esos casos, las reacciones de disociación/asociación pueden estar acopladas a reacciones de desplegamiento de las cadenas polipeptídicas constituyentes ó a cambios conformacionales más sutiles que llevan a la pérdida de la función biológica.

Por ejemplo, el tratamiento del homotetrámero de la Pfk-1 de *E. coli*, con agentes caotrópicos como urea (Bras y col., 1989) o isotiocianato de sodio (Deville-Bonne y col., 1989), produce la disociación del tetrámero a lo largo de la interfaz donde se ubican los sitios activos. Esto genera dímeros inactivos que conservan la capacidad de unir efectores alostéricos, ya que los contactos dímero-dímero de la Pfk-1 no cooperan con las interacciones intermoleculares responsables de la integridad estructural del homodímero disociado, pero sí son necesarios para formar los sitios activos ubicados en el tetrámero. En el otro extremo, existen proteínas oligoméricas cuyas subunidades pierden casi toda su estructura terciaria y secundaria al ser disociadas; dicho de otra manera, sus subunidades pierden la habilidad de existir independientemente. Un ejemplo

es el represor Arc del fago P22. Esta proteína es un homodímero de 22 KDa cuyas subunidades se asocian a través del entrecruzamiento de dos hélices α y dos hebras β (Breg y col., 1990). La disociación de esta proteína, inducida por urea como agente desestabilizante, mostró que el desplegamiento y la disociación de sus cadenas polipeptídicas transcurre a través de una transición única, que resulta en la pérdida simultánea de toda la estructura terciaria y secundaria del homodímero nativo, estableciéndose que las únicas especies que pueblan el equilibrio son el homodímero nativo y el monómero desplegado (Bowie y Sauer, 1989). En este caso, las transiciones que dan cuenta del equilibrio entre ambos estados son dependientes de la concentración de proteína, postulándose que el plegamiento y asociación del homodímero nativo son equilibrios que están fuertemente acoplados. Por otro lado, mutaciones puntuales de algunos de los aminoácidos que participan en la interfaz monómero-monómero del represor Arc, producen monómeros con un contenido de estructura residual incapaz de sostener interacciones cooperativas (Milla y Sauer, 1995). Este ejemplo corresponde a un caso algo inusual, en donde el estado nativo de una proteína (dímero) es estabilizado por un centro hidrofóbico que se crea por la interacción de las cadenas polipeptídicas (Larsen y col., 1998). Así, la disociación de las cadenas polipeptídicas está condicionada a la hidratación de los residuos apolares que conforman el centro hidrofóbico del dímero, es decir al desplegamiento de las cadenas polipeptídicas que lo conforman.

Las dos enzimas que catalizan la fosforilación de fructosa-6-P dependiente de MgATP en *E. coli*, la fosfofructoquinasa-1 (Pfk-1) y la fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) (Babul, 1978), están compuestas por subunidades. Estas enzimas presentan propiedades regulatorias diferentes, aunque ambas son inhibidas por MgATP (Babul, 1978; Guixé y

Babul, 1985). Esta inhibición y la elevada especificidad por fructosa-6-P son propiedades que han sido adquiridas por caminos evolutivos diferentes ya que ambas proteínas han sido asignadas a familias no relacionadas filogenéticamente.

La Pfk-2 de *E. coli*, dímero conformado por subunidades idénticas de 33 KDa, pertenece a una extensa familia de quinasas de azúcares denominada como superfamilia de la riboquinasa (Ronimus y Morgan, 2001). Se han caracterizado miembros de esta familia en una variedad de configuraciones cuaternarias, incluyendo tetrámeros, trímeros, dímeros y monómeros, las que comparten un dominio conservado que contiene la mayoría de los contactos nativos de cada subunidad, denominado dominio $\alpha/\beta/\alpha$ o dominio mayor (Zhang y col., 2004). No obstante la gran variedad de estructuras cuaternarias descritas, la característica principal que diferencia la topología del sitio activo y la manera de formar los oligómeros, es la presencia de un elemento de estructura secundaria adicional que conforma una hoja β (Zhang y col., 2004). En la Pfk-2, cuya estructura ha sido recientemente obtenida por nuestro grupo (Cabrera y col., 2006; PDB ID: 3CQD¹) y en sus homólogos cercanos, este elemento adicional es creado por cuatro hebras tipo β que se insertan en el extremo N-terminal del dominio conservado $\alpha/\beta/\alpha$ que conforma cada subunidad (Figura 1). Como fue descrito inicialmente en la estructura de la riboquinasa (Sigrell y col., 1998), en la estructura de la Pfk-2 la interacción de ambas hojas- β crea una interfaz entrecruzada denominada como β -clasp, donde las interacciones hidrofóbicas predominan en la región central

¹ Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank = PDB # 3CQD. Ambrosio, A.L.B., Cabrera, R., Caniuguir, A., Garratt, R.C., Babul, J. Structure of the tetrameric inhibited form of phosphofructokinase-2 from Escherichia coli.

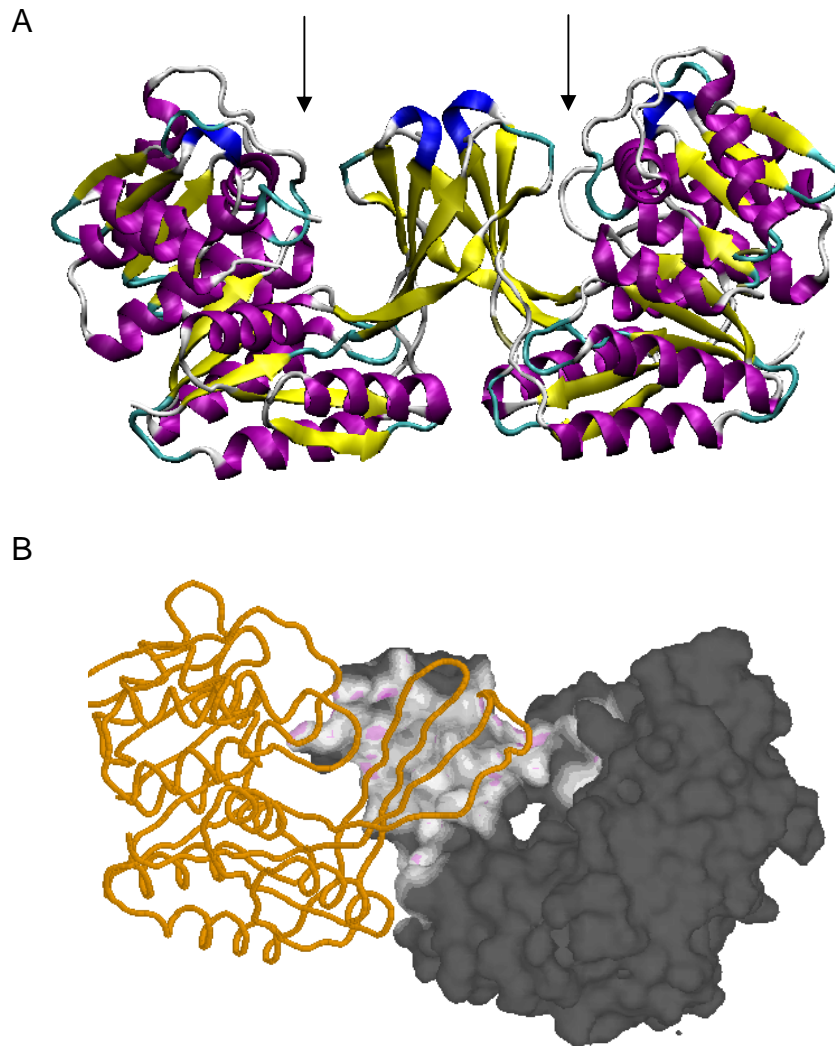


Figura 1. Estructura del homodímero de la Pfk-2, correspondiente a la unidad asimétrica del cristal obtenido en presencia de MgATP. A. La Pfk-2 se dibuja en diagrama de cintas coloreadas de acuerdo a los elementos de estructura secundaria presentes: hélice- α (morado), hebras- β (amarillo), hélice $_{3-10}$ (azul), giros- β (celeste) y lazos (gris). Las flechas indican la ubicación de cada sitio activo presente en el dímero. En el centro de la estructura resaltan las hebras β que cubren cada sitio activo y además forman la interfaz del homodímero. B. Superficie de interacción de los monómeros de la Pfk-2. En plomo se muestra los contactos apolares y en rosado los contactos polares representados por puentes de hidrógeno; en negro se muestra la superficie que no está en contacto con el monómero adyacente. La superficie escondida por cada subunidad corresponde a 1.440 \AA^2 , de los cuales unos 970 \AA^2 corresponden a contactos apolares (68 % de la superficie total). Los valores se calcularon mediante el servidor usando el servidor *pissa* (Krissinel y Henrick, 2007).

entre ambas hojas β (ver Figura 1). Estas características sugieren que la interfaz de asociación de la Pfk-2 constituye un dominio *per se* (un dominio creado por interacciones intermoleculares) el cual está separado del dominio conservado ($\alpha/\beta/\alpha$) a través de los sitios activos presentes en el homodímero, como se observa en la Figura 1. De esta forma, el dímero nativo de la Pfk-2 parece estar estabilizado por dos dominios: un dominio creado por un centro hidrofóbico bimolecular, conformado por la interacción de dos hojas β y el dominio conservado $\alpha/\beta/\alpha$, que da cuenta de la mayor parte de los contactos intramoleculares de cada subunidad. Sin embargo, para la Pfk-2 y sus homólogos más cercanos, se desconoce cómo la interacción de los monómeros coopera para lograr una enzima estable y biológicamente activa, ya que no existen estudios de plegamiento disponibles para este tipo de topologías de la superfamilia de la riboquinasa.

Por otra parte, en presencia de su sustrato MgATP, Pfk-2 cambia su estado de agregación de un dímero a un tetrámero formando una interfaz adicional a la interfaz β -*clasp* (Kotlarz y Buc, 1981; Guixé y Babul, 1988; Cabrera y col., 2002; Caniuguir y col., 2005). La formación del tetrámero de la Pfk-2 ha sido correlacionada con la regulación de su actividad enzimática ejercida por su sustrato MgATP. Pfk-2 es inhibida alostéricamente por MgATP lo que se observa como una disminución de la velocidad cuando la enzima se ensaya a elevadas concentraciones del nucleótido y bajas concentraciones de su co-sustrato fructosa-6-P (Kotlarz y Buc, 1981; Guixé y Babul, 1985). Esta característica es relevante para el metabolismo de *E. coli* ya que la expresión de una mutante incapaz de ser inhibida por MgATP resulta en una disminución de la velocidad de crecimiento de la bacteria en fuentes de carbono gluconeogénicas (Torres y

col., 1997). La correlación entre la inhibición enzimática y el cambio de estado de agregación inducido por MgATP, proviene de experimentos de sedimentación en gradiente de sacarosa, que indican que la formación del tetrámero se favorece cuando se utilizan mezclas de sustratos inhibitorias para la actividad enzimática (Kotlarz y Buc, 1981; Guixé y Babul, 1988). De esta manera, la especie activa de la enzima ha sido correlacionada con el dímero y la especie inactiva o inhibida con el tetrámero. Bajo esta hipótesis, nuestro grupo ha estudiado el mecanismo de formación del tetrámero para entender el mecanismo alostérico de la Pfk-2 que conduce a la inhibición de su actividad enzimática. Isotermas de unión de MgATP a la Pfk-2 indican que la formación del tetrámero no ocurre por un desplazamiento de un equilibrio preexistente entre dímeros y tetrámeros, sino más bien por un mecanismo secuencial que involucra la asociación de dos dímeros que previamente han unido MgATP en su sitio alostérico (Cabrera, 2004). Sin embargo, aún no se ha aislado ni caracterizado un dímero con MgATP unido al sitio alostérico en cuanto a sus propiedades regulatorias, por lo que se desconoce cuál es el aporte de la formación de la interfaz del dímero-dímero a la inhibición de la actividad enzimática.

Experimentos de proteólisis limitada de la Pfk-2 indican que la remoción del extremo carboxilo terminal de la enzima (~45 aminoácidos) genera un dímero inactivo, el que es incapaz de formar tetrámeros aunque preserva la capacidad de unir MgATP (Cabrera y col., 2002). Por lo tanto, se predice que esta región podría contener residuos claves para la formación de la interfaz dímero-dímero del tetrámero (como ha sido confirmado recientemente con la estructura de la Pfk-2 obtenida en presencia de MgATP).

En resumen, la Pfk-2 de *E. coli* presenta dos tipos de interfaz: una posiblemente relacionada con la estabilidad de la proteína y arquitectura del sitio activo y otra relacionada con la regulación alostérica de su actividad catalítica. Sin embargo, se desconoce el papel que cumple la *interfaz monómero-monómero* o dominio β -*clasp* en la estabilidad del homodímero, ni cómo su formación influye en la estructura y estabilidad del dominio conservado $\alpha/\beta/\alpha$ de cada subunidad. Tampoco se conoce el papel que juega la *interfaz dímero-dímero* en el mecanismo de inhibición de la actividad enzimática de la Pfk-2.

Para resolver estas interrogantes es necesario conocer las propiedades estructurales de las subunidades por separado y compararlas con las propiedades presentes en su configuración cuaternaria. Para cumplir con este objetivo se utilizaron dos aproximaciones experimentales diferentes pero complementarias: perturbación de los estados diméricos y tetraméricos nativos mediante GdnHCl y mutación sitio dirigida de aminoácidos claves presentes en la interfaz del dímero (*interfaz β -clasp*) y del tetrámero de la Pfk-2.

La perturbación de estructuras nativas por agentes caotrópicos, como GdnHCl, es una metodología que permite acceder a las especies que determinan los equilibrios responsables de la estabilidad de las proteínas, las que tienen una baja representación en condiciones nativas (Creighton, 1990; Dill y Shortle, 1991)

Para determinar en detalle las características estructurales de estas especies, se midieron los cambios conformacionales de la Pfk-2 inducidos por GdnHCl por actividad enzimática, fluorescencia intrínseca, dicroísmo circular, cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz. El análisis en conjunto de los resultados

permitió determinar los cambios a nivel de estructura terciaria, secundaria y las características hidrodinámicas que presenta la subunidad aislada de la Pfk-2 respecto a su conformación asociada. Adicionalmente, se propuso un modelo mínimo para cuantificar las diferencias de energía libre que separan las especies encontradas al desplegar la Pfk-2 con GdnHCl. Las diferencias de energía libre calculadas en presencia de GdnHCl se extrapolaron a las condiciones nativas utilizando relaciones lineales de energía libre (Santoro y Bolen, 1988).

También se analizaron las especies que resultan al desplegar el tetrámero de la Pfk-2, obtenido en presencia de MgATP, utilizando las mismas técnicas espectroscópicas e hidrodinámicas indicadas anteriormente. Esta aproximación permitió obtener, en conjunto con la estructura de la Pfk-2, información acerca del origen de la estabilidad del dímero silvestre y del papel que cumple la interfaz monómero-monómero en este particular tipo de plegamiento y estructura cuaternaria.

La perturbación de un equilibrio mediante cambios físicos del sistema (adición de agente caotrópicos, variación de pH o temperatura), cambia las poblaciones relativas de las especies involucradas pero también puede alterar sus conformaciones respecto a las condiciones no perturbadas (Dill y Shortle, 1991; Reed y col., 2006). Para obtener las subunidades separadas a elevadas concentraciones de proteína, sin recurrir a la acción de GdnHCl, la interfaz *β -clasp* de la Pfk-2 se perturbó mediante mutagénesis para poder determinar sus características estructurales y estabilidad. Esta aproximación también se utilizó para desestabilizar la interfaz del tetrámero y evaluar cómo la falla en su formación afecta la unión de MgATP al sitio alostérico y la inhibición de la actividad enzimática inducida por este nucleótido.

HIPÓTESIS.

- a) La interfaz *β -clasp* de la Pfk-2 se comporta como un centro hidrofóbico bimolecular cuya formación es requerida para la estabilidad y la estructura del dominio mayor que conforma cada subunidad.
- b) La interfaz dímero-dímero del tetrámero, no participa de los cambios conformacionales involucrados en la inhibición alostérica de la Pfk-2.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis son: i) Proponer un modelo para el desplegamiento y disociación de la Pfk-2 a partir de su forma dimérica y tetramérica. ii) Perturbar la interfaz *β -clasp* de la Pfk-2 mediante mutagénesis sitio dirigida para caracterizar la estructura de las subunidades disociadas en ausencia de GdnHCl. iii) Perturbar la interfaz dímero-dímero de la Pfk-2 para conocer el papel que juega la interfaz en el mecanismo de inhibición alostérica inducida por MgATP.

MATERIALES y MÉTODOS

MATERIALES

1. Cepas bacterianas.

La cepa de *E. coli* B121 (DE3), que posee en su genoma una copia del gen de la RNA polimerasa T7 inducible por IPTG, se transformó con el plásmido pET 21-d, que contiene el gen de la Pfk-2 para la sobreexpresión de la Pfk-2 silvestre. La cepa de *E. coli* DH5 α se utilizó para la transformación y extracción de los plásmidos mutados. Ambas cepas fueron adquiridas de INVITROGEN (California) como parte del kit de mutagénesis sitio-específica GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System.

2. Partidores.

Los partidores utilizados para introducir mutaciones en el gen Pfk-2 se diseñaron según las instrucciones del *kit* de mutagénesis sitio específica GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (California, USA) y sintetizados por INVITROGEN™.

3. Medio Luria (LB). Se pusieron 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura sobre 900 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7,0 antes de aforar a 1 l y esterilizar en autoclave.

4. Reactivos.

Las enzimas aldolasa, triosafosfato isomerasa, α -glicerofosfato deshidrogenasa y el NADH, se obtuvieron de SIGMA Chemical Co. (St Louis, MO, USA). El cloruro de

guanidinio fue obtenido de WINKLER (Santiago, Chile) y PIERCE (Rockford, IL USA).

METODOS

1. Mutagénesis sitio dirigida. Se utilizó como molde el plásmido pET 21-d de Novagen (Madison, WI, USA) el cual contiene el cDNA de la Pfk-2 silvestre bajo el promotor del fago T7. Este plásmido fue metilado mediante la DNA metilasa incluida como parte del Kit GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System y amplificado con los partidores que presentan la mutación(es) deseada utilizando DNA polimerasa Platinum taq Invitrogen® (California, USA). El producto de amplificación se transformó en bacterias DH5α (incluidas en el *kit* de mutagénesis) según instrucciones del fabricante, utilizando un pulso de calor. Las bacterias transformadas se seleccionaron mediante siembra en placas LB-agar preparadas con ampicilina.

2. Sobreexpresión de Pfk-2 y de las proteínas mutantes. Para obtener células en fase exponencial, se inocularon 20 ml de medio LB con una colonia de la cepa BL21(DE3) transformada con el plásmido pET 21-d que contiene el gen de la Pfk-2 y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se inocularon 1 ó 2 l de medio LB con el cultivo anterior y se incubó a 37 °C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,5 a 580 nm. Para inducir la expresión de la Pfk-2 se agregó IPTG a una concentración final de 0,8 mM y se continuó la incubación a 37 °C por 4 h (algunas pruebas de la inducción de proteínas realizadas con las mutantes carboxilo terminal mostraron una disminución de su expresión del contenido de proteína luego de 4 h). Las

bacterias inducidas se colectaron por centrifugación a 5.000 rpm por 10 min en una centrífuga Sorvall RC-5 usando un rotor GSA.

3. Purificación de la Pfk-2 y de las proteínas mutantes. El sedimento de las bacterias correspondiente a 1 litro de cultivo se obtuvo por centrifugación y se resuspendió en 100 ml de la solución A: amortiguador fosfato de potasio 20 mM, pH 7,0, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 28,6 mM y glicerol 5%. La suspensión de bacterias se lisó en un sonicador MicrosonTM XL (Misonic, USA) usando la sonda grande, mediante la aplicación de 12 pulsos de 30 s (40 watt de potencia) y 30 s de enfriamiento en hielo. Las bacterias lisadas se centrifugaron en una centrífuga Eppendorff modelo 5810-R, durante 30 min a 8.000 rpm a 4 °C. El líquido sobrenadante se aplicó sobre una columna de hidroxilapatita (3 x 10 cm) equilibrada en la solución A y la columna se lavó con 300 ml de la misma solución A. La Pfk-2 se eluyó con 600 ml de un gradiente lineal de 20 a 150 mM de fosfato de potasio en la solución A.

Las fracciones con actividad fosfofructoquinasa se concentraron por ultrafiltración, hasta un volumen final de 30 ml, mediante el uso de una membrana Amicon PM10 (Beverly, MA, USA). La enzima concentrada se dializó contra la solución B: amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 28,6 mM y glicerol 5%. La solución dializada se aplicó sobre una columna de Azul de Cibacron-Sepharose (3 x 10 cm) equilibrada en la solución B. Después de lavar la columna con 100 ml de solución B y luego con 200 ml de la solución B más KCl 50 mM, la enzima se eluyó con 150 ml de la solución B, KCl 50 mM y ATP 0,8 mM. El conjunto de las fracciones con actividad fosfofructoquinasa se

dializó contra la solución B y fue re-cromatografiado en una columna de Azul de Cibacron-Sepharose (3 x 10 cm) y eluido de la manera descrita. La actividad específica de la enzima fue entre 70 y 100 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Unidades/mg). La enzima se guardó a -20 °C en Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, β -mecaptoetanol 5 mM, KCl 50 mM y glicerol 50 %, a una concentración de proteína entre 5-10 mg/ml. El rendimiento de la purificación fue de aproximadamente 20 a 30 mg de enzima por 2 l de cultivo original y la pureza de la muestra fue evaluada por electroforesis en condiciones desnaturalantes, usando el método de Laemmli (1970). Las mutantes carboxilo terminales Q290 y T300 no fueron capaces de interactuar con la columna de Azul de Cibacron-Sepharose y por lo tanto no fueron purificadas a homogeneidad.

Antes de cada experimento el amortiguador de almacenamiento se cambió a las condiciones experimentales requeridas, sometiendo muestras de la enzima a diálisis y posterior cromatografía en una columna HiTrap Desalting (Amersham Biosciences), procediendo según las recomendaciones del fabricante. En casos de requerir concentraciones elevadas de la proteína, las muestras se concentraron utilizando un *centricon-60* (Amicon, Beverly, MA). La concentración de proteína se calculó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

4. Desplegamiento y replegamiento de la enzima silvestre inducidos por GdnHCl.

Para los experimentos de renaturación, la enzima fue expuesta a GdnHCl 3 M por al menos 5 h a 20 °C. Esta condición fue suficiente para desplegar a la Pfk-2 completamente, ya que concentraciones mayores del agente caotrópico no mostraron cambios en el espectro de dicroísmo circular de la enzima. Las curvas de estabilidad,

obtenidas en el sentido de replegamiento de la enzima, se realizaron diluyendo el GdnHCl hasta alcanzar las concentraciones requeridas del agente caotrópico. En estas condiciones, las curvas de estabilidad no mostraron cambios luego de 5 h de incubación a 20 °C. Las curvas de estabilidad obtenidas en el sentido del desplegamiento de la enzima, se obtuvieron diluyendo la Pfk-2 nativa en varias concentraciones de GdnHCl. En este caso, el equilibrio fue obtenido luego de 36 h a 20 °C en amortiguador Tris-HCl pH 8,2, DTT 10 mM, MgCl₂ 5mM. Las concentraciones de proteína utilizadas se indican en cada experimento. Las concentraciones de GdnHCl se prepararon y calcularon según lo descrito por Pace (1986).

5. Desplegamiento de la enzimas silvestre y mutante L93A inducido por el aumento de la temperatura. Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron entre 205 y 250 nm cada 5 °C calentando una muestra de proteína a una velocidad constante de 20 °C h⁻¹ utilizando un aparato de dicroísmo circular Jasco 715 con regulación térmica de tipo *peltier* y una celda de paso óptico de 1 mm. Luego que se alcanzó la temperatura deseada, las soluciones se equilibraron por 1,5 min antes de efectuar la medición. Las transiciones térmicas se obtuvieron en Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, MgCl₂ 5 mM y DTT 2 mM; la concentración de proteína ensayada se indica en cada experimento.

6. Determinación de la actividad enzimática. La actividad de la enzima fue medida espectrofotométricamente acoplando la producción de fructosa-1,6-bisP a la oxidación de NADH, mediante el uso de enzimas auxiliares (Babul, 1978). La mezcla de reacción contenía amortiguador Tris-HCl 25 mM, pH 8,2, MgCl₂ (en un exceso de 5 mM sobre la

concentración de ATP⁴⁻), NADH 0,2 mM, 40 µg de aldolasa, 3 µg de triosa fosfato isomerasa y 30 µg de glicerofosfato deshidrogenada (enzimas auxiliares). La concentración de sustratos y aditivos se indica en cada condición experimental. Se encontró que la disminución de la concentración de Tris-HCl de 100 mM a 25 mM y la eliminación de NH₄Cl del medio de ensayo, además del retiro de las sales residuales de las enzimas auxiliares, permite eliminar la fase lenta observada en los primeros 30 s de la curva de progreso, lo que facilita la medición de la actividad enzimática a bajas concentraciones de sustrato. Normalmente, el ensayo se comenzó diluyendo 1 µl de la enzima dentro de 700 µl de la mezcla de ensayo. Las mediciones de la actividad enzimática en función de la concentración de GdnHCl implican la dilución del agente caotrópico en la cubeta de ensayo, pudiendo ocurrir eventos de renaturación. Sin embargo, experimentos controles mostraron que la reactivación de la enzima durante el tiempo de medición de la actividad fue solo de un 3 % respecto a la actividad de la enzima totalmente replegada.

7. Mediciones de fluorescencia intrínseca y extrínseca. Las mediciones se realizaron usando un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 5 o, alternativamente, en un espectrofluorímetro Shimadzu PC-5031. Las muestras de proteína se excitaron a 295 nm para limitar la fluorescencia al único triptófano presente en cada monómero de la Pfk-2. El espectro de emisión fue obtenido entre 300 y 480 nm ajustando las ranuras de ambos monocromadores de manera de obtener una emisión adecuada para la concentración de proteína utilizada.

Las mediciones de la fluorescencia de la sonda extrínseca ANS se hicieron entre 400 y 580 nm excitando a la sonda a 360 nm. Las soluciones de ANS se prepararon en metanol y su concentración se determinó utilizando un coeficiente de extinción de $7.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a partir de su absorbancia a 372 nm. En las muestras preparadas con varias concentraciones de GdnHCl, el ANS fue agregado a una concentración final de 40 veces la concentración de proteína utilizada. La mezcla fue incubada por 3 h en la oscuridad previo a la determinación de la fluorescencia.

8. Mediciones de dicroísmo circular. Los espectros de dicroísmo circular se determinaron en un espectropolarímetro Jasco modelo J600 ó 715 (Essex, UK) empleando celdas de paso óptico de 1 y 10 mm de manera de obtener valores de CD entre 12 y 300 mgrad según la concentración de proteína utilizada. Cada espectro resultó de la acumulación de entre 3 y 8 barridos (20 nm min^{-1}) entre 210 y 260 nm. La elevada absorbancia derivada de la concentración de DTT empleada (2 a 10 mM), no permitió obtener espectros bajo 205 nm.

9. Cromatografía de exclusión molecular. Excepto en donde se indique, los experimentos se realizaron usando un sistema HPLC Water Breeze equipado con una columna Bio-Rad (Bio-Sil SEC 250, 300 x 78 mm). La columna se equilibró con 60 ml de fase móvil (Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, DTT 2 mM, KCl 0,2 M y MgCl_2 5 mM) que contenía KCl 0,2 M además de los componentes presentes en las muestras inyectadas. Los perfiles de elución de las muestras se detectaron a 220 y 295 nm. La temperatura de la columna se ajustó mediante una camisa de agua a 25 °C. La concentración de proteína

inyectada varió entre 2 y 20 μM . La columna se calibró con los siguientes marcadores de peso molecular: vitamina B-12 (1,35 KDa, 8,5 Å Rh), mioglobina de caballo (17 KDa, 19 Å Rh), ovalbúmina de pollo (44 KDa, 30,5 Å Rh), gamma globulina de bovino (158 KDa, 41,8 Å Rh) y tiroglobulina de bovino (670 kDa, 85 Å Rh). Los valores del volumen de la columna no disponible para moléculas muy grandes (V_o) y volumen total accesible de la columna (V_t), se determinaron usando los volúmenes de elución (ml) de azul de dextrano y DTT, respectivamente; la variación de V_o y V_t con la concentración de GdnHCl se ajustó a la ecuación: $V_o = 5,23 - 0,021 [\text{GdnHCl}]$ y $V_t = 12,21 - 0,176 [\text{GdnHCl}]$, respectivamente. El volumen de elución de las muestras (V_e) se expresó en términos de los parámetros de la columna según la ecuación,

$$K_{av} = \left(\frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \right)$$

y el radio hidrodinámico de las muestras se determinó de una curva de calibración obtenida por el ajuste lineal del radio hidrodinámico de los marcadores versus $(-\log K_{av})^{1/2}$.

10. Dispersión dinámica de luz. Se utilizó el aparato de dispersión dinámica de luz LS DynaPro MSTC014 (Protein Solutions Inc.-Bucks, England). Los datos se colectaron utilizando una celda de 12 μl luego de centrifugar las muestras por 10 min a 10.000 rpm para eliminar el material particulado. La intensidad de luz dispersada por la proteína se determinó a partir de un histograma de regularización usado para encontrar la contribución de las especies individuales a la dispersión total de luz, por medio del

programa DYNAMICS incluido en el instrumento. Las muestras para las mediciones de dispersión dinámica de luz contenían 0,5 mg/ml de la enzima silvestre o la mutante Y306A en Tris-HCl 25 mM, pH 8,2, MgCl₂, 5 mM y DTT 5 mM y se incubaron por 4 min a las concentraciones indicadas de MgATP. Para el caso de las muestras obtenidas en presencia de GdnHCl, las mediciones fueron tomadas luego de incubar la proteína silvestre a 20 °C durante 36 h utilizando una concentración de proteína de 15 µM.

11. Análisis de las transiciones obtenidas en presencia de GdnHCl. Las curvas de desplegamiento, obtenidas por dicroísmo circular, se analizaron de acuerdo a un modelo de tres estados:



donde N₂ representa el dímero nativo, I es el intermediario monomérico y U es el estado desplegado del polipéptido.

El cambio de la energía libre de Gibbs, expresado en el sentido de desplegamiento de la reacción, se define como: ΔG₁, para la diferencia de estabilidad entre el dímero y el intermediario; como ΔG₂, para la diferencia de estabilidad entre el intermediario y el estado desplegado. A su vez, estos valores son una expresión de las constantes de equilibrio para cada una de sus reacciones: ΔG₁ = -RT ln (K₁) y ΔG₂ = -RT ln (K₂) (R es la constante de los gases en kcal⁻¹ mol y T es la temperatura en grados Kelvin). El cambio de energía total entre el dímero y el estado desplegado es la suma de energía libre aportada por cada paso de la reacción (ΔG_t = ΔG₁ + 2 ΔG₂). La relación entre el

cambio de energía libre y la concentración molar del agente desnaturante (D) esta dada por,

$$\Delta G_1 = \Delta G^{\circ}_1 + m_1 D$$

$$\Delta G_2 = \Delta G^{\circ}_2 + m_2 D$$

Donde ΔG°_1 y ΔG°_2 es el cambio de energía libre extrapolado concentración a 0 M del agente desnaturante para el dímero nativo y el intermediario respectivamente, en tanto que m_1 y m_2 corresponden a la dependencia de la energía libre con la concentración del agente desnaturante observada para el dímero nativo y intermediario respectivamente. La fracción del dímero nativo (f_N), el intermediario (f_I) y el estado desplegado (f_U), están relacionadas con las constantes de equilibrio K_1 y K_2 según la siguiente expresión:

$$F_U = \frac{K_1 K_2 \left[-(1 + K_2) + \sqrt{(1 + K_2)^2 + 8xPt/K_1} \right]}{4 Pt}$$

$$F_N = 1 - F_I - F_U$$

$$F_I = F_U/K_2$$

La variable observada y_{obs} se supuso como la contribución aditiva de las señales de las especies (y_N , dímero, y_I intermediario e y_U , estado desplegado) ponderada por la fracción de las especies presentes ($y_{obs} = y_U f_U + y_I f_I + y_N f_N$). La dependencia de la señal de dicroísmo circular para el estado nativo (y_N), intermediario (y_I) y desplegado (y_U) con la concentración de GdnHCl (D) de la zona de pre y post transición fueron asumidas como lineales según:

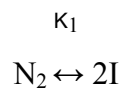
$$y_N = y_{N_0} + M_N D$$

$$y_I = y_{I_0} + M_I D$$

$$y_U = y_{U_0} + M_U D$$

en donde y_{N_0} , y_{I_0} e y_{U_0} corresponden a las señales para el estado nativo, intermediario y desplegado extrapoladas a 0 M de GdnHCl y M_N , M_I , M_U corresponde a las pendientes que describen su variación lineal en cada caso.

Los parámetros energéticos obtenidos de la actividad enzimática y la fluorescencia intrínseca se ajustaron al modelo:

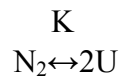


El procedimiento es similar al descrito anteriormente, sólo que las dependencias de las fracciones de dímero nativo e intermediario (f_N y f_I) están relacionadas con la constante de equilibrio según las ecuaciones:

$$f_I = \frac{(K_1^2 + 8K_1Pt)^{1/2} - K_1}{4Pt}$$

$$f_N = 1 - f_I$$

12. Análisis de las transiciones obtenidas al aumentar la temperatura. La señal de dicroísmo circular obtenida a 220 nm se analizó usando un modelo termodinámico de dos estados en el que el desplegamiento de la Pfk-2 está acoplado a la disociación de sus cadenas laterales,



donde N_2 representa el dímero nativo y U corresponde al monómero en el estado desplegado obtenido a elevadas temperaturas. La constante de equilibrio K para una determinada concentración de proteína (Pt , en términos de la concentración de las subunidades separadas) se expresó en función de la fracción del estado desplegado f_U según,

$$f_U = \frac{(K^2 + 8KPt)^{1/2} - K}{4Pt}$$

Suponiendo que la entalpía de la reacción ΔH se mantiene constante en el intervalo de temperatura en donde ocurre la transición térmica, la constante de equilibrio para cada temperatura ($K_{(T)}$) puede ser calculada según la relación de Van't Hoff,

$$K_{(T)} = Pt \exp\left(\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right)$$

en donde T_m corresponde a la temperatura a la cual la fracción del estado desplegado (f_U) corresponde a 0,5 y P_t es la concentración de proteína total en términos de monómeros.

La relación entre la señal de dicroísmo a 220 nm observada para cada temperatura ($CD_{(T)}$) y la fracción de cadenas polipeptídicas desplegadas (f_U) se establece según la siguiente relación,

$$CD_{(T)} = CD_{(N)} (1 - f_U) + CD_{(U)} f_U$$

donde $CD_{(N)}$ y $CD_{(U)}$ corresponde a la señal de dicroísmo a 220 nm del dímero nativo y del monómero desplegado respectivamente.

RESULTADOS

I. DESPLEGAMIENTO Y DISOCIACIÓN DEL DÍMERO NATIVO INDUCIDO POR GdnHCl

La descripción termodinámica de la estabilidad del estado nativo puede ser considerada como un equilibrio que en los casos más simples, se describe con sólo dos estados termodinámicamente estables; el estado nativo y el estado desplegado (Creighton, 1990). Este comportamiento, radica en la naturaleza cooperativa de las interacciones que estabilizan a las proteínas, lo que prohíbe la formación de una multitud de intermediarios estables que potencialmente pueden ser originados frente a una perturbación. Esto trae como consecuencia que las transiciones entre uno y otro estado sean observadas como la pérdida simultánea de todas las propiedades que los diferencian en forma macroscópica (actividad enzimática, estructura terciaria, secundaria, estado de agregación y otros). En condiciones de equilibrio, a temperatura y presión constantes, la diferencia de energía libre conformacional (ΔG) es una expresión de la constante de equilibrio dada por las poblaciones de las especies presentes en el sistema ($\Delta G = -RT \ln K_{eq}$). La perturbación de este sistema mediante el uso de agentes caotrópicos permite determinar la energía de estabilización de una proteína en una condición determinada, mediante la relación empírica $\Delta G = \Delta G^{\circ} - m [\text{agente caotrópico}]$ (Pace, 1986; Fersht, 1998), donde ΔG representa la energía libre obtenida de la constante de equilibrio ($\Delta G = -RT \ln K_{eq}$) derivada de las poblaciones de las especies encontradas durante la transición provocada por la acción del agente caotrópico y m (valor- m) representa la pendiente de la recta que define la variación de la energía libre con la concentración del agente

caotrópico utilizado. La extrapolación lineal a 0 M del agente caotrópico permite obtener ΔG° (el intercepto), la energía libre en ausencia del agente caotrópico (Pace, 1986; Fersht, 1998). Dado que estos principios son válidos sólo para sistemas reversibles, se determinó si la Pfk-2 puede ser replegada cuantitativamente luego de su desplegamiento por GdnHCl.

1. Cambios en la actividad enzimática, fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular de la Pfk-2 obtenidos en función de la concentración de GdnHCl.

En los insertos de la Figura 2, se muestra la recuperación del espectro de dicroísmo circular (Figura 2A, inserto) y el espectro fluorescencia intrínseca (Figura 2 B, inserto) de la Pfk-2 luego de replegarla a partir de su estado desplegado obtenido con 3 M de GdnHCl. Como se observa, estas propiedades pueden ser recuperadas cuantitativamente luego de retirar el agente caotrópico. Para determinar la reversibilidad de la reacción de replegamiento en función de la concentración de agente caotrópico utilizada para desplegar la proteína, se procedió a desplegar la Pfk-2 a varias concentraciones de GdnHCl para posteriormente diluir el GdnHCl hasta 0,1 M. Como se observa en el inserto de la Figura 2 C, la actividad enzimática recuperada a partir de varias concentraciones de GdnHCl fue mayor al 90 % de la actividad original. Estos resultados indican que la reacción de desplegamiento de la Pfk-2 es cuantitativamente reversible, lo que faculta el análisis termodinámico de las curvas de estabilidad de la enzima y la obtención de la energía asociada a cada transición observada.

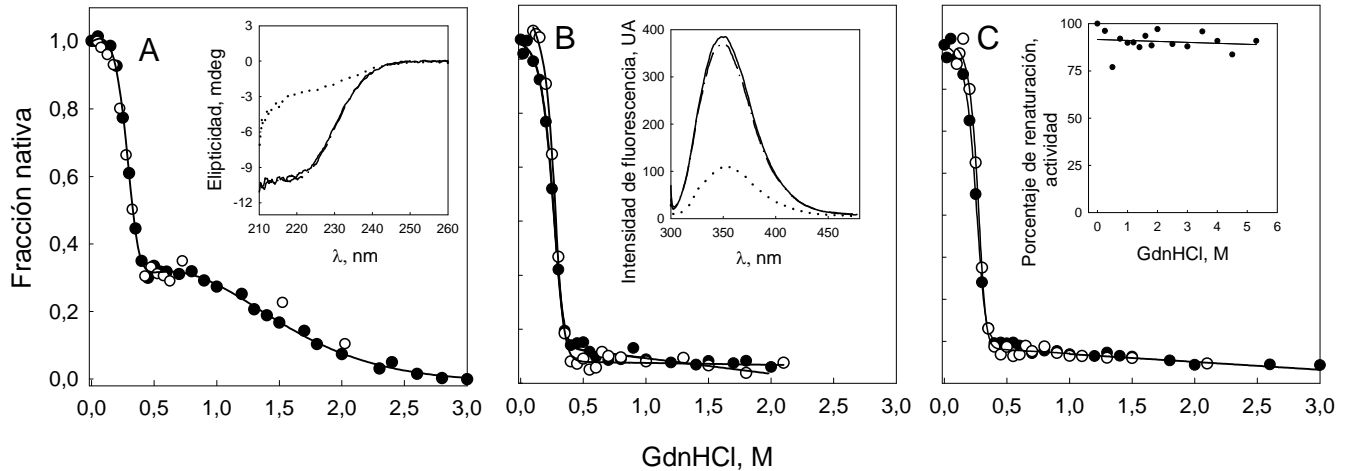


Figura 2. Desnaturación y replegamiento de la Pfk-2 inducido por GdnHCl. Curvas de desplegamiento y replegamiento de la Pfk-2 obtenidas a partir de los cambios relativos de la elipticidad a 222 nm (A), fluorescencia intrínseca a 350 nm (B) y actividad enzimática en función de la concentración de GdnHCl (C). Los símbolos blancos y negros corresponden a la reacción estudiada en el sentido del replegamiento y desplegamiento respectivamente. Las líneas sólidas en A, B y C provienen de los ajustes obtenidos a partir de los modelos $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$ (A) y $N_2 \leftrightarrow 2I$ (B y C) respectivamente. Insertos: A, espectro de dicroísmo circular de la proteína nativa (—), replegada (— · —) y desplegada (···). B, espectros de la fluorescencia intrínseca de la Pfk-2 obtenidos para la enzima nativa (—), replegada (— · —) y desplegada (···) con 3 M de GdnHCl. C, recuperación de la actividad enzimática a partir de varias concentraciones de GdnHCl luego de la dilución hasta 0,1 M del agente desnaturalante. La concentración de proteína fue de 3,3 μ M en términos de la concentración de monómeros.

En los paneles de la Figura 2, se muestran los cambios en el espectro de dicroísmo circular (Figura 2 A), fluorescencia intrínseca (Figura 2 B) y actividad enzimática (Figura 2 C), obtenidos en el sentido del desplegamiento o replegamiento de la enzima en función de la concentración de GdnHCl. En cada panel se observa que las transiciones obtenidas en ambos sentidos de la reacción son superponibles, lo que indica que la condición de equilibrio se ha alcanzado. El análisis de la fluorescencia intrínseca (Figura 2 B) de la Pfk-2 y la pérdida de la actividad enzimática (Figura 2 C), muestran sólo una transición, cuya amplitud abarca el 100 % de la pérdida de ambas propiedades. Sin embargo, el cambio en la estructura secundaria, calculado como la fracción de cambio de la elipticidad a 220 nm, muestra dos transiciones responsables del 100 % de la pérdida de la estructura secundaria de la Pfk-2 (Figura 2 A). La primera transición, responsable del 70 % de la pérdida de estructura secundaria de la enzima, fue superponible con las transiciones únicas obtenidas por fluorescencia intrínseca y actividad enzimática. La segunda transición, responsable del 30 % restante de la estructura secundaria de la enzima, abarca un intervalo de concentración de GdnHCl en el que la actividad enzimática y fluorescencia intrínseca de la Pfk-2 no muestran mayores cambios (Figura 2 B y C). En consecuencia, la segunda transición observada por dicroísmo circular, indica la presencia de un intermediario acumulado en la vía de desplegamiento/replegamiento de la Pfk-2. A juzgar por la extensa meseta que separa ambas transiciones, esta especie poseería cerca de un 30 % de estructura secundaria en relación al dímero nativo. En su conjunto, estos resultados indican la existencia de al menos tres especies altamente pobladas en el desplegamiento al equilibrio de la Pfk-2: el dímero nativo, un intermediario y el estado desplegado.

2. Efecto de la concentración de proteína en las transiciones obtenidas en presencia de GdnHCl.

Con el fin de determinar los cambios conformacionales acoplados a la disociación del dímero nativo y así poder definir el estado de agregación del intermediario observado por dicroísmo circular, se estudió el efecto de la concentración de proteína en el desplegamiento de la enzima. La Figura 3 A, muestra el efecto de la concentración de proteína en las transiciones de la estructura secundaria obtenidas por dicroísmo circular. Un aumento de 4 a 20 μM en la concentración de proteína produce un desplazamiento de la primera transición hacia concentraciones mayores de GdnHCl (Figura 3 A, inserto), pero no se observa un cambio apreciable en la segunda transición, que da cuenta del 30 % restante de la estructura secundaria. Este resultado indica que la disociación de las subunidades de la enzima ocurre simultáneamente con la pérdida de un 70 % de la estructura secundaria. Por lo tanto, las interacciones intercadena (cuaternarias) parecen cooperar fuertemente con las interacciones intracadena presentes en cada monómero. Consecuentemente, se produce un intermediario monomérico con estructura secundaria residual, como sugiere la insensibilidad de la segunda transición a un cambio en la concentración de proteína.

Debido a la buena superposición de las transiciones obtenidas por actividad enzimática y fluorescencia intrínseca de la Pfk-2 con la primera transición obtenida por dicroísmo circular, cabe esperar que la pérdida de ambas propiedades también sea sensible a la concentración de proteína, ya que estas tres propiedades parecen corresponder al mismo cambio estructural de la enzima. La Figura 3 B muestra los puntos medios de las transiciones ($C_{m1/2}$) calculados a partir de las curvas de estabilidad

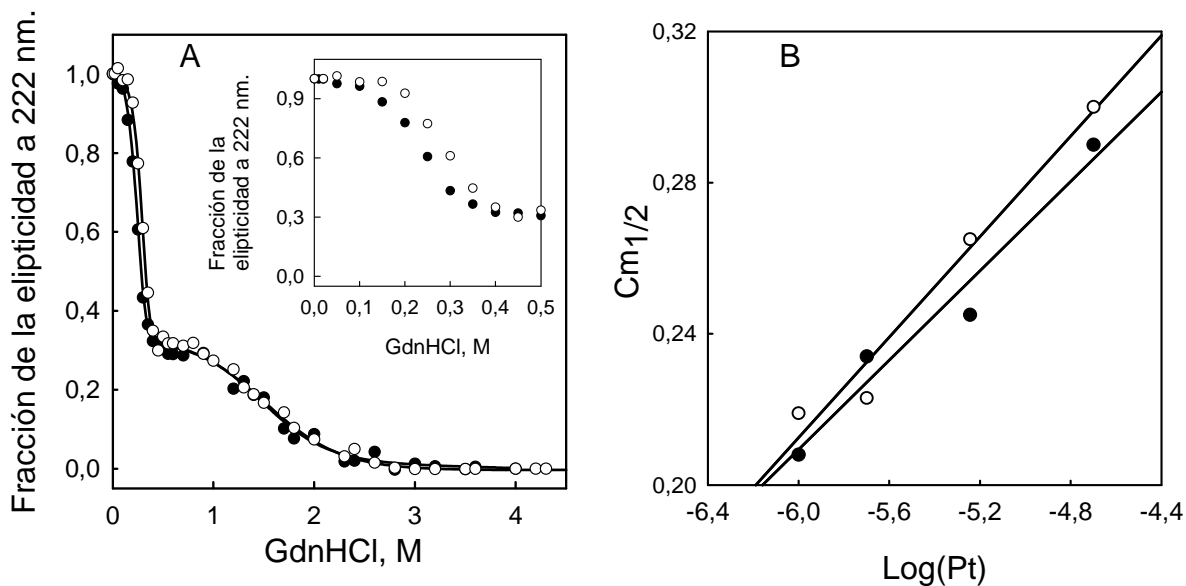


Figura 3. Efecto de la concentración de proteína sobre los cambios relativos de la elipticidad a 222 nm. A. Cambios en la elipticidad relativa de la proteína nativa en función de la concentración de GdnHCl registrados a 4,7 μM (●) y 19 μM (○) de proteína (en términos de concentración de monómeros). En el inserto se muestra el intervalo de concentración de GdnHCl en donde ocurre la primera transición. Las líneas representan el ajuste obtenido a partir de un mecanismo de desplegamiento de tres estados con un intermediario monomérico, $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$. B. Efecto de la concentración de proteína (Pt) sobre el punto medio de las transiciones ($C_{m1/2}$) obtenidos por actividad enzimática (●) y fluorescencia intrínseca (○). Las líneas indican el ajuste a la ecuación semilogarítmica 1 (pág. 28).

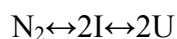
para la actividad enzimática y fluorescencia intrínseca, en función de la concentración de proteína. En el intervalo de concentración de proteína ensayado (1 y 20 μM) se observa una dependencia semi-logarítmica de los $C_{m1/2}$ obtenidos para las curvas de estabilidad obtenidas a partir de la actividad enzimática y la fluorescencia intrínseca de la proteína. Este resultado satisface la ecuación 1, la que predice una variación lineal del $C_{m1/2}$ con el logaritmo de la concentración de proteína (Pt) en un equilibrio que involucra una reacción bimolecular acoplada a una reacción de desplegamiento (Bowie y Sauer, 1989).

$$C_{m1/2} = \frac{2,3RT}{m} \log(Pt) + \frac{\Delta G^0}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

Cabe destacar que los valores correspondientes al valor- m (m) y la energía libre (ΔG^0), obtenidos a partir de la ecuación 1, concuerdan con los valores de energía obtenidos de los ajustes individuales de cada transición (ver más adelante). Debido a que la pérdida de actividad enzimática y fluorescencia intrínseca ocurre conjuntamente con la pérdida de buena parte de la estructura secundaria, no se postula la presencia de otros intermediarios aparte del intermediario monomérico observado.

En resumen, los datos experimentales para el desplegamiento reversible de la Pfk-2, estudiado por diversas técnicas, pueden ser descritos utilizando un modelo mínimo que involucra el desplegamiento y la simultánea disociación de las subunidades del dímero nativo, produciendo la acumulación de un intermediario monomérico que presenta el 30 % de la señal dicróica del homodímero nativo.

En base a estos resultados se propone un modelo para la reacción de desplegamiento de la enzima:



en donde N_2 es el dímero nativo, I el intermediario monomérico y U el estado desplegado de la enzima. La Tabla 1 muestra los parámetros energéticos obtenidos por ajuste del modelo propuesto a las curvas de estabilidad obtenidas por dicróismo circular, fluorescencia intrínseca y actividad enzimática (ver Materiales y Métodos). Como se espera de un cambio del 70 % de la estructura secundaria, la primera transición ($N_2 \leftrightarrow 2I$) contribuye con 12 kcal mol⁻¹ a la energía conformacional total del dímero nativo. Valores similares se obtuvieron a partir del cambio de la fluorescencia intrínseca y actividad enzimática (11,9±0.2 y 12,1±0.6 kcal mol⁻¹, respectivamente), reforzando la idea que estas tres propiedades reflejan el mismo paso en el desplegamiento de la Pfk-2. La segunda transición, observada como el desplegamiento del intermediario monomérico ($I \leftrightarrow U$), sólo contribuye con una estabilidad marginal de 2,6 kcal/mol.

El segundo parámetro energético que se obtiene de las curvas de estabilidad, es el valor m (la dependencia del cambio de la energía libre con la concentración de GdnHCl). Los valores m obtenidos por dicróismo circular para los pasos $N_2 \leftrightarrow 2I$ e $I \leftrightarrow U$ fueron 17 ± 2 y 1,66 kcal mol⁻¹ M⁻¹, respectivamente. Las curvas de estabilidad obtenidas por

Tabla 1. Parámetros termodinámicos para el desplegamiento de la Pfk-2 obtenidos a partir del modelo de tres estados $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$.

| | Actividad | Fluorescencia | CD | |
|--|------------|---------------|-----------|------|
| | N_2 -2I | N_2 -2I | N_2 -2I | I-U |
| ΔG° (kcal mol ⁻¹) | 12,1 ± 0.6 | 11,9 ± 0,2 | 12,2 ± 1 | 2,4 |
| (-m) (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) | 19 ± 2 | 19,5 ± 0,5 | 17,0 ± 3 | 1,66 |

Los valores de ΔG° y el valor m fueron obtenidos mediante un ajuste no lineal de los datos experimentales al mecanismo propuesto ($N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$). Se muestran los valores promedios y el error de tres experimentos independientes. La diferencia total de energía libre entre el estado desplegado y el nativo es de 17 kcal/mol.

actividad enzimática y fluorescencia intrínseca arrojaron valores m de 19 ± 2 y $19,5 \pm 0,5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ respectivamente (Tabla 1). Estos valores, concuerdan con el valor m obtenido para la primera transición ($N_2 \leftrightarrow 2I$) detectada por dicroísmo circular, reforzando la idea que estas tres propiedades están detectando el mismo cambio estructural.

Ya que el valor m está relacionado a la diferencia de área accesible al solvente entre los estados observados (Myers y col., 1995; Fersht, 1998), estos resultados indican que un 90% del cambio de área accesible al solvente ocurre con la formación del intermediario monomérico. Por lo tanto, a pesar de tener un 30 % de la señal dicroica observada en el desplegamiento completo de la enzima, la mayoría de los residuos de este intermediario parecen estar expuestos al solvente.

Con el objetivo de obtener una prueba independiente de la presencia de este intermediario, se utilizó una sonda hidrofóbica (ANS) cuya fluorescencia aumenta al unirse a regiones hidrofóbicas de las proteínas expuestas al solvente (Daniel y Weber, 1966). Este cambio se refleja en un aumento de su rendimiento cuántico y en el corrimiento de su máximo de emisión hacia longitudes de onda menores. Como se muestra en la Figura 4, al graficar el área de emisión de la sonda en función de la concentración de GdnHCl, se obtiene una curva en forma de campana asimétrica. Este comportamiento se correlaciona bien con el cambio en la población del intermediario obtenido utilizando los valores energéticos derivados del ajuste experimental de las curvas de dicroísmo circular al modelo de desplegamiento de la Pfk-2 (Figura 4).

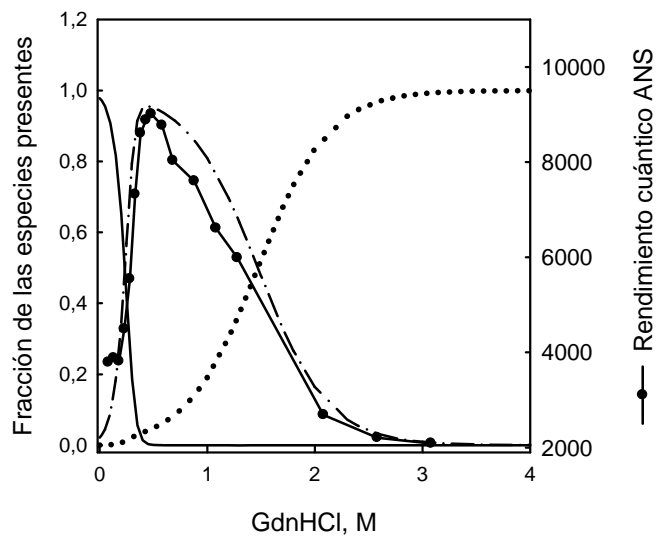


Figura 4. Comparación entre los cambios de la fluorescencia extrínseca del ANS y la variación de las especies que participan en el desplegamiento de la Pfk-2. La fracción de dímero nativo (—), intermediario monomérico (-.-.-) y estado desplegado (.....), se calculó a partir de los parámetros energéticos de la Tabla 1. El área de emisión de la sonda ANS fue obtenida entre 400 y 560 nm excitando con una longitud de onda de 380 nm y se muestra en función de la concentración de GdnHCl (●). El cambio en las poblaciones de las especies en función de la concentración de GdnHCl se calculó utilizando la concentración de proteína que fue utilizada para el experimento de ANS (2 μ M).

3. Cambios en el estado de compactación de las especies involucradas en el mecanismo de desplegamiento de la Pfk-2.

Para determinar el radio hidrodinámico (Rh) de las especies predichas por el mecanismo de desplegamiento de la Pfk-2 se utilizaron técnicas de cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz (DLS). La Figura 5A muestra el perfil de elución de la Pfk-2 obtenido con diferentes concentraciones de GdnHCl, luego de inyectar 50 µl de muestra de la enzima equilibrada en la misma concentración de agente caotrópico. El Rh calculado de la enzima a 0 M de GdnHCl fue 34,9 Å mediante cromatografía de exclusión molecular y 36,5 Å mediante DLS (Figura 5 A y B respectivamente). En el estrecho intervalo de concentraciones de GdnHCl previo a la primera transición (ver zona achurada, Figura 5 B), el volumen de elución de la Pfk-2 incrementa en la forma de un solo pico, denominado pico I (Figura 5 A). Sin embargo, en este mismo intervalo de concentración, el incremento en el volumen de elución no mostró correlación con los cambios de Rh medidos por DLS (Figura 5 B), sugiriendo que esta especie no es producto de la disociación del dímero de la Pfk-2. Esto es consistente con el efecto de la concentración de proteína sobre las curvas de estabilidad de la Pfk-2 obtenidas a partir de actividad enzimática y técnicas espectroscópicas, que indican que la disociación del dímero no ocurre a concentraciones menores a 0,15 M de GdnHCl. Por lo tanto, el incremento del volumen de elución obtenido por cromatografía de exclusión molecular en la región de la pre-transición no es debido a un evento de disociación. Es conocido que el incremento en la concentración de sales promueve las interacciones apolares (Baldwin, 1996). Para explicar cómo el incremento del volumen

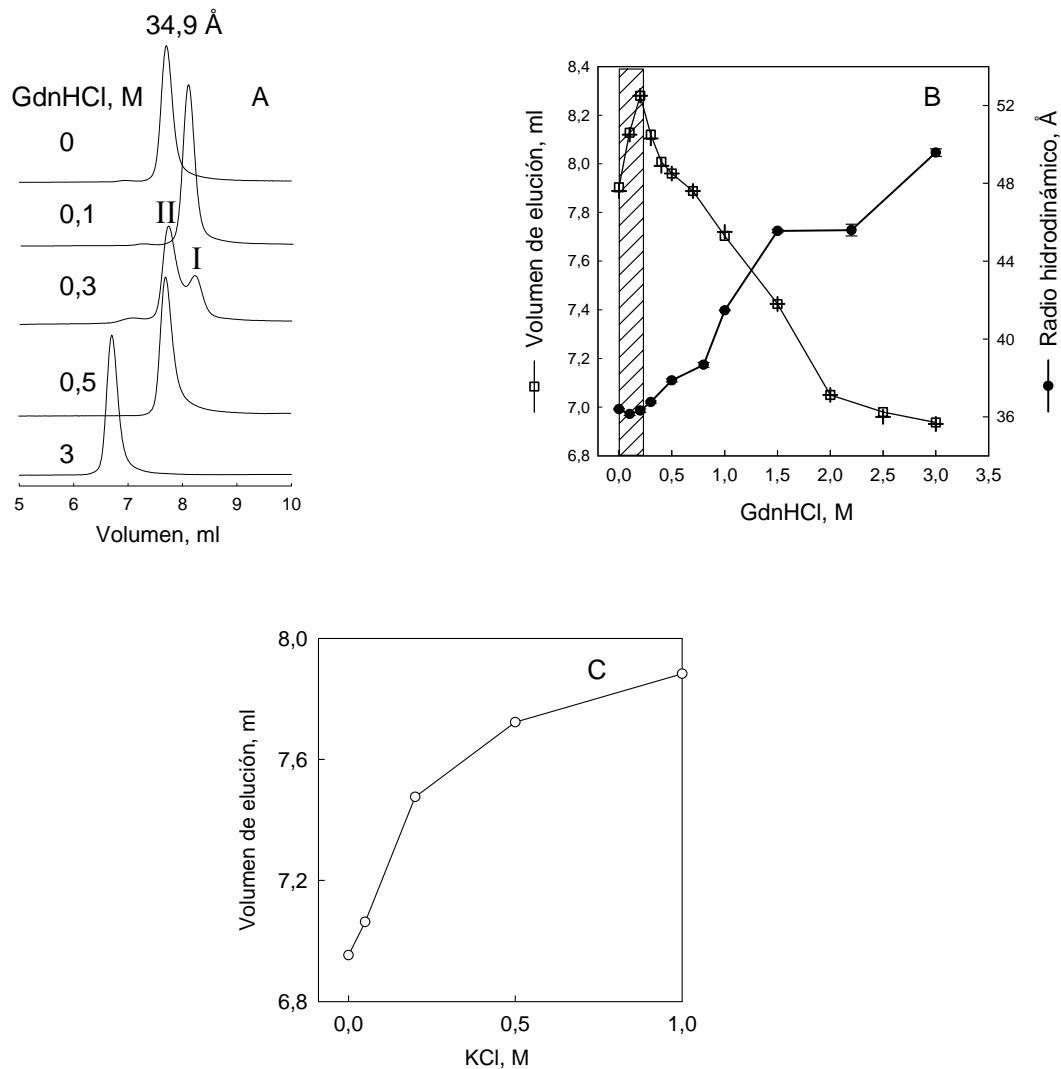


Figura 5. Propiedades hidrodinámicas de la Pfk-2 en función de la concentración de GdnHCl y KCl. A. Perfiles de elución de la Pfk-2 obtenidos a 220 nm mediante cromatografía de exclusión molecular. Las muestras se inyectaron en la columna equilibrada con Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, DTT 2 mM, KCl 0,2 M y MgCl₂ 5 mM y con las concentraciones de GdnHCl indicadas a la izquierda de la Figura. A 0,3 M de GdnHCl se indican las especies referidas como pico I y II. B. Comparación de los volúmenes de elución de la Pfk-2 obtenidos por cromatografía de exclusión molecular a partir de la proteína nativa (□) o desplegada (+). Además, se muestran las medidas de radio hidrodinámico obtenidos por dispersión dinámica de luz en función de la concentración de GdnHCl (●). La zona achurada indica el intervalo de concentración de GdnHCl en donde no ocurren cambios significativos en las propiedades nativas de la enzima. En el caso del experimento de exclusión molecular (A) la concentración de proteína inyectada fue de 0,2 mg/ml y en el caso del experimento de dispersión dinámica de luz (B) fue de 0,5 mg/ml. C. Efecto de la concentración de KCl en el volumen de elución de la Pfk-2. Muestras de Pfk-2 fueron cromatografiadas en una columna equilibrada con las concentraciones de KCl indicadas en el gráfico.

de elución puede ocurrir en ausencia de la disociación del dímero, se determinó el efecto de la concentración de KCl en el volumen de elución de la Pfk-2. En la figura 5 C se muestra que al incrementar la concentración de la sal ocurre un incremento en el volumen de elución de la Pfk-2. Experimentos controles realizados mediante DLS no mostraron cambios en el Rh de la proteína en el mismo intervalo de concentración de la sal (datos no mostrados). Por lo tanto, se postula que a bajas concentraciones de GdnHCl este actúa principalmente como una sal aumentando las interacciones hidrofóbicas entre la proteína y la matriz de la columna lo que se traduce en un retraso en la elución del dímero a través de la columna.

Entre 0,15 y 0,5 M de GdnHCl emerge un nuevo pico (pico II) el cual presenta un Rh aparente mayor al del pico I, como se desprende de su menor volumen de elución. La población de este pico incrementa de 0,15 a 0,5 M de GdnHCl y parece predominar a 0,5 M (Figura 5 A), coincidiendo con la máxima acumulación del intermediario monomérico predicho por el análisis de las transiciones que originan esta especie (Figura 4). De esta forma, si el pico I corresponde a la dímero de la Pfk-2 y el pico II al intermediario monomérico I (cuya formación es predicha por la dependencia de la concentración de proteína de las transiciones obtenidas mediante el cambio de la actividad enzimática, dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca (Figura 3)) sus poblaciones relativas pueden ser modificadas por la concentración de proteína. Con la columna y las muestras equilibradas a una concentración de GdnHCl en donde aparecen ambos picos (0,3 M de GdnHCl), se observó un incremento de la población del pico I por sobre la del pico II al aumentar la concentración de proteína inyectada (Figura 6). Por otra parte, al inyectar muestras a una columna equilibrada con 0,15 M sólo se

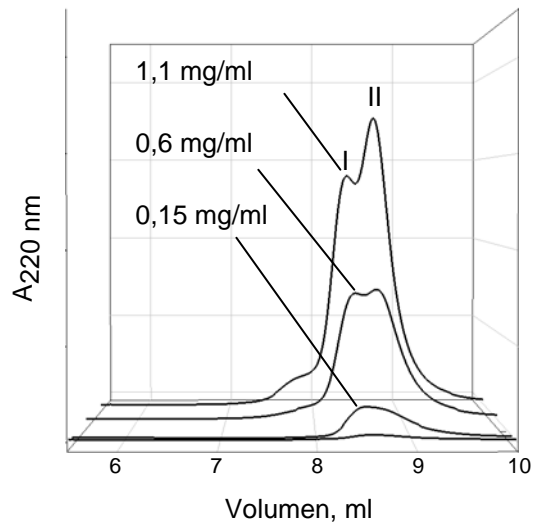


Figura 6. Efecto de la concentración de proteína en los volúmenes de elución del pico I y II obtenidos a 0,3 M de GdnHCl. La Pfk-2 equilibrada a 0,3 M de GdnHCl se inyectó a una concentración de proteína de 0,15, 0,6 y 1,1 mg/ml en una columna de exclusión molecular equilibrada con la misma concentración de agente caotrópico. Las concentraciones de amortiguador fueron las indicadas en la Figura 5. Se indican las especies denominadas como pico I y II. Los perfiles de elución fueron obtenidos a 220 nm.

observa un aumento proporcional del área del pico I con la concentración de proteína (observaciones del autor). Estos resultados confirman que la especie que da origen al pico II corresponde a una forma disociada de la Pfk-2 cuya aparición coincide con la formación del intermediario monomérico I. En el mismo intervalo de concentración de GdnHCl predicho para la transición de dímero a intermediario monomérico ($N_2 \leftrightarrow 2I$), se observa un cambio en el Rh obtenido por DLS de $36,1 \pm 0,8$ a $37,8 \pm 0,8$ Å (cambio de ~ 2 Å, Figura 5 B). Este valor coincide con la diferencia de $\sim 2,5$ Å determinada a partir de los volúmenes de elución del pico I y II. Debido a que a 0,5 M de GdnHCl las poblaciones del estado desplegado y nativo contribuyen marginalmente a la población del intermediario (ver Figura 4), el valor de Rh obtenido a esta concentración de GdnHCl debiera ser ~ 38 Å. Es necesario enfatizar que el Rh esperado para una subunidad compacta del dímero nativo es de ~ 25 Å (Uversky, 1993), por lo que la expansión sufrida por el intermediario respecto a la subunidad plegada sería de ~ 13 Å.

Como era de esperar, el desplegamiento del intermediario produce una disminución del volumen de elución del pico II (como un solo pico) y un incremento del Rh desde ~ 38 hasta 50 ± 2 Å (Figura 5 A y B). Este valor es semejante al esperado para un polipéptido completamente desplegado (53 Å; Uversky, 1993).

De los resultados obtenidos se concluye que la pérdida de estructura cuaternaria inducida por GdnHCl, es un proceso que no puede diferenciarse de la pérdida de una parte importante de la estructura secundaria de las subunidades de la Pfk-2. Esto genera una especie monomérica “I” con una estructura más semejante al estado desplegado “U” que a un monómero compacto.

II. DESPLEGAMIENTO Y DISOCIACIÓN DEL TETRÁMERO INDUCIDO POR GdnHCl

Con el objetivo de encontrar una especie dimérica capaz de unir MgATP, se desplegó la Pfk-2 en presencia de MgATP 1 mM para promover el desplegamiento de la enzima, su disociación a partir del tetrámero o ambos a la vez.

1. Cambios en la actividad enzimática, fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular de la Pfk-2 obtenidos en función de la concentración de GdnHCl.

En presencia de MgATP, el desplegamiento comienza con la forma homotetramérica de la Pfk-2. El complejo tetrámero-MgATP muestra una disminución del 30 % del área de emisión y un corrimiento de su máximo de emisión de 350 a 340 nm respecto a la enzima libre (Guixé y col., 1998). En la primera fase, de 0 a 0,4 M de GdnHCl, ocurre un corrimiento del máximo de intensidad de 340 hasta 350 nm (Figura 7 B, símbolos blancos) sin cambios significativos del área de emisión la fluorescencia (Figura 7 A, símbolos negros). Aunque esta complejidad no fue evidente de las mediciones de actividad enzimática (Figura 7 B, símbolos negros), no se puede descartar una rápida reconfiguración del sitio activo en la mezcla catalítica del ensayo de la actividad enzimática. Se observó un incremento del área de la fluorescencia hasta 0,5 M de GdnHCl, seguido por un abrupto descenso que termina alrededor de 0,8 M de GdnHCl (Figura 7 A, triángulos negros). Este abrupto descenso es también observado mediante las mediciones de actividad enzimática (Figura 7 B, círculos negros) y se correlaciona bien con una importante pérdida del contenido de estructura secundaria de

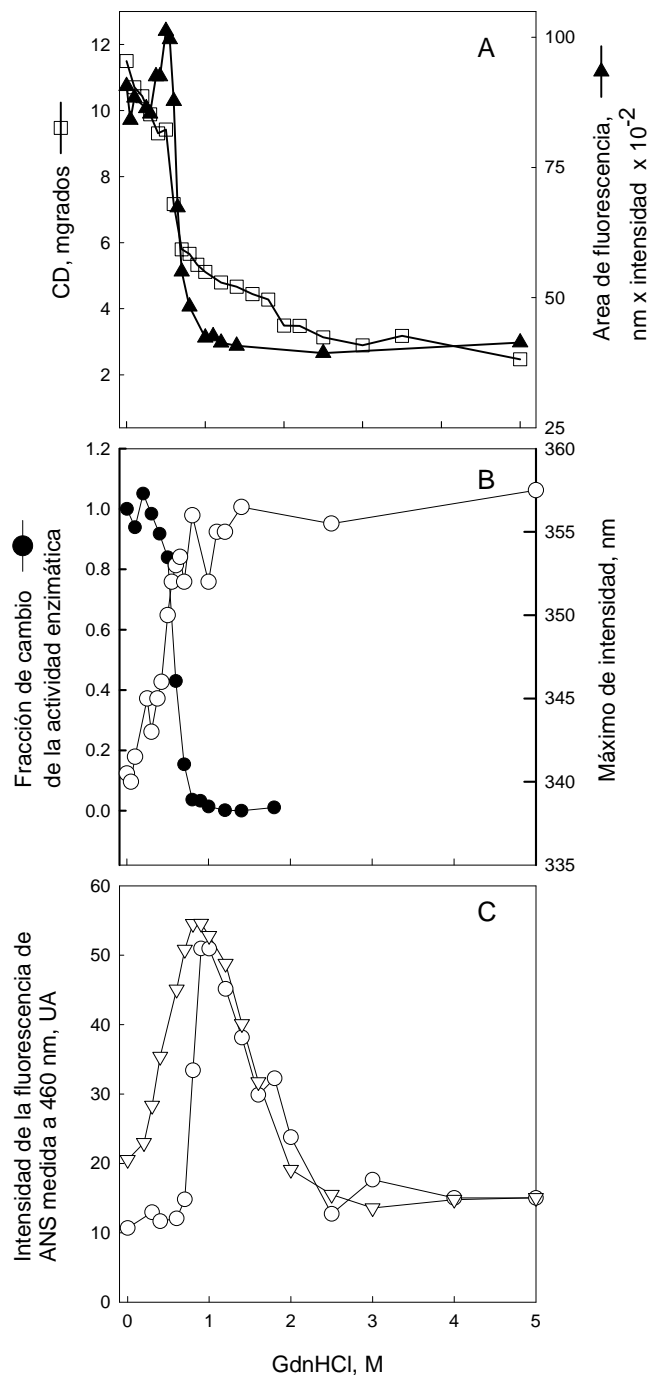


Figura 7. Efecto del MgATP en el desplegamiento de la Pfk-2 inducido por GdnHCl. A. El desplegamiento de la Pfk-2 fue seguido por mediciones de diámetro circular tomado a 222 nm (□) y área de la fluorescencia intrínseca (▲). En B se muestran las mediciones de actividad enzimática (●), comparadas con la variación del máximo de emisión de la fluorescencia intrínseca (○). En el panel C se muestran los cambios en la fluorescencia del ANS durante el desplegamiento de la Pfk-2. La intensidad de fluorescencia del ANS se muestra en unidades arbitrarias (UA) a 460 nm para las curvas de desplegamiento obtenidas en presencia de MgATP 1 mM (○) y se comparan con las obtenidas para la enzima libre (▽). Se utilizó una concentración de ANS 100 μM. En todos los casos, las muestras fueron incubadas por 20 h a 20 °C utilizando una concentración de proteína entre 2 y 3,3 μM.

la Pfk-2 (Figura 7 A cuadrados blancos). La señal de dicroísmo circular muestra una transición adicional sobre 0,7 M de GdnHCl (Figura 7 A, cuadrados blancos) indicando la presencia de un intermediario con bajo contenido de estructura secundaria, de manera similar al observado en el caso del desplegamiento de la enzima libre (Figura 2 A). Como se mostrará más adelante, la primera fase detectada como corrimiento hacia el rojo del máximo de emisión de la fluorescencia no fue acompañada por la disociación del complejo tetramero-MgATP, indicando la presencia de un intermediario tetramérico. En el panel C de la Figura 7 se muestra la variación de la fluorescencia del ANS en presencia de MgATP y se compara con la variación obtenida para la proteína libre. En presencia de MgATP, la fluorescencia de ANS alcanza un máximo a concentraciones de GdnHCl de ~0.8 M, lo cual coincide con la pérdida completa de la actividad enzimática de la Pfk-2 y su fluorescencia intrínseca. La máxima intensidad de la sonda en presencia de MgATP fue similar a la observada para el caso de la enzima libre y en ambos casos la intensidad de ANS decae de manera similar con el incremento de la concentración de GdnHCl.

Exceptuando la variación del máximo de emisión de la fluorescencia intrínseca, los cambios descritos en presencia de MgATP ocurren en un mismo intervalo de concentración de agente caotrópico y aparentemente suceden como una sola transición que da cuenta de la pérdida de la actividad enzimática, la fluorescencia intrínseca y un 75 % de la señal de dicroísmo circular. Estos cambios conformacionales, junto con el aumento de la fluorescencia de ANS, son similares a los cambios que dan cuenta de la formación del intermediario monomérico “I” observado para el

despliegamiento de la enzima libre. No obstante, el intervalo concentraciones de GdnHCl en donde ocurre la disociación del tetrámero se desconoce.

2. Cambios en la compactación de las especies observadas mediante cromatografía de exclusión molecular en presencia de MgATP.

Con el objetivo de determinar los cambios en el volumen hidrodinámico en función de la concentración de GdnHCl, se realizaron experimentos de cromatografía de exclusión con distintas concentraciones de GdnHCl. La Figura 8 A muestra los perfiles de elución de la enzima obtenidos con MgATP 1 mM a distintas concentraciones de GdnHCl. Se observa que entre 0 y ~0,7 M de GdnHCl ocurre un aumento de volumen de elución del tetrámero, lo que sucede sin cambios en la actividad de la enzima o en la emisión de la sonda extrínseca ANS (Figura 7). A concentraciones de GdnHCl mayores a 0,7 M, los perfiles de elución de la proteína libre y en presencia de MgATP se superponen observándose en ambos casos una disminución del volumen de elución la proteína. Este incremento en el radio hidrodinámico coincide con la disminución de la intensidad de la sonda ANS y la pérdida de la estructura residual observada en presencia o en ausencia de MgATP (Figura 7 C). Sin embargo, en todo el intervalo de concentración de GdnHCl los perfiles de elución obtenidos en presencia de MgATP no muestran la aparición de una especie discreta que pueda ser separada por la columna, como en el caso del intermediario monomérico “I” observado al desplegar la enzima libre. La zona achurada de la Figura 8 B, corresponde al intervalo de concentración GdnHCl en donde se observa el abrupto cambio de las propiedades espectroscópicas de la Pfk-2 que dan cuenta de la acumulación de una especie con características similares al

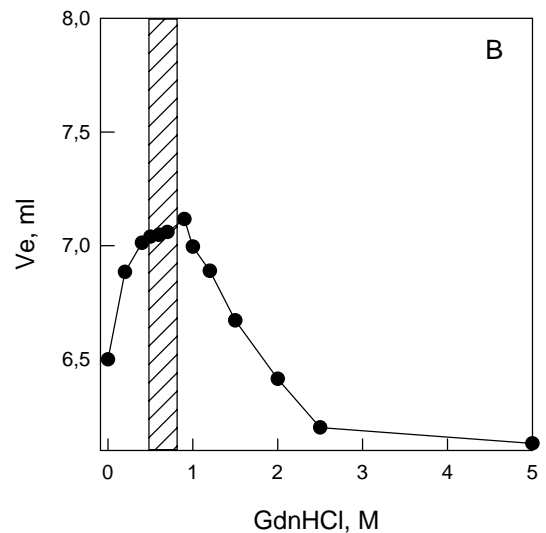
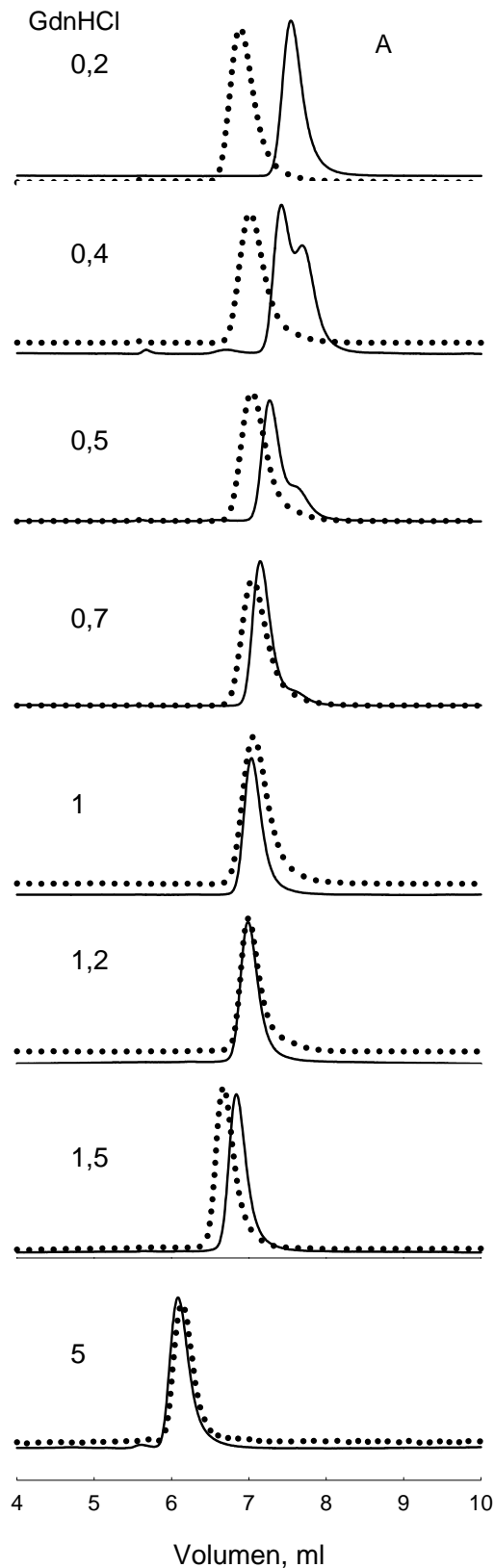


Figura 8. Cambios en el volumen de elución de la Pfk-2 inducidos por GdnHCl en presencia de MgATP obtenidos por cromatografía de exclusión molecular. A. Perfiles de elución de la Pfk-2 obtenidos luego de inyectar la enzima en una columna de exclusión molecular Supelco (TSKgel G2000 SWXL 300 x 78 mm) equilibrada a las mismas concentraciones de GdnHCl a las utilizadas para desplegar la enzima en ausencia de ligandos (línea continua) o en presencia de MgATP 1 mM (línea punteada). B. Cambios en los volúmenes de elución de la enzima en función de la concentración de GdnHCl obtenidos de los perfiles en A. La zona achurada corresponde al intervalo de concentración de GdnHCl en donde se observa una transición abrupta de las propiedades del tetrámero. Las muestras fueron incubadas por 20 h a 20 °C utilizando una concentración de proteína de 30 μ M y se inyectaron 20 μ l a la columna.

intermediario “I”. Como se observa, la abrupta transición de las propiedades estructurales observada en Figura la 7 no se puede correlacionar con cambios significativos en el volumen de elución obtenidos en presencia de MgATP (Figura 8 B). De esta forma, es difícil establecer correlaciones entre los cambios hidrodinámicos y los eventos de desplegamiento en presencia de MgATP mediante cromatografía de exclusión molecular.

3. Cambios en el estado de agregación y compactación de las especies observadas mediante dispersión dinámica de luz en presencia de MgATP.

Se usó dispersión dinámica de luz como metodología complementaria para determinar los cambios hidrodinámicos que ocurren junto al desplegamiento del tetrámero debido a la dificultad en la interpretación de los perfiles de elución obtenidos por cromatografía de exclusión molecular como función de la concentración de GdnHCl. Esta metodología permite la medición simultánea del peso molecular de la partícula y su radio hidrodinámico asociado con el proceso de disociación y desplegamiento (Asgeirsson y col., 2000; Sanyal y col., 2002). A 0 M de GdnHCl el complejo MgATP-Pfk-2 muestra un radio hidrodinámico de $43,1 \text{ \AA} \pm 0,2 \text{ \AA}$ (alrededor de 8 \AA más grande que el dímero, Figura 9). Este valor permanece constante hasta 0,4 M de GdnHCl indicando que la configuración tetramérica permanece intacta bajo las condiciones observadas y que el incremento del volumen de elución observado mediante cromatografía de exclusión molecular no es debido a la disociación del tetrámero. Sobre 0,4 M de GdnHCl el radio hidrodinámico mostró una disminución desde $43,1 \pm 0,2 \text{ \AA}$ hasta un valor mínimo de $37,6 \pm 0,74 \text{ \AA}$ medido a 0,7 M de GdnHCl. Mas allá de 0,7 M

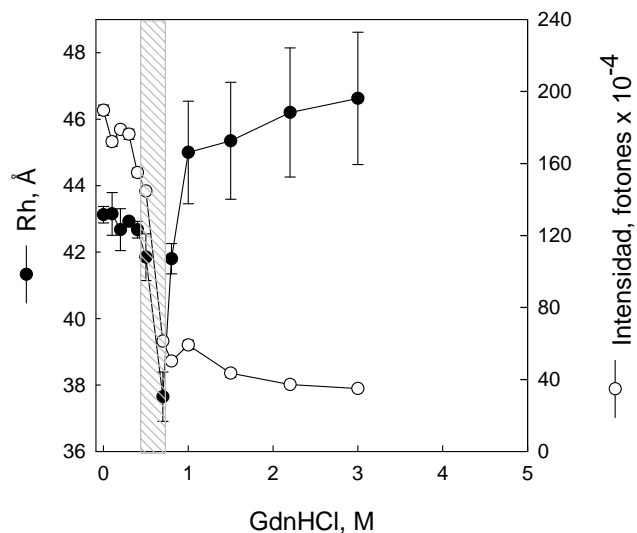
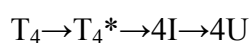


Figure 9. Cambios hidrodinámicos seguidos por dispersión dinámica de luz en presencia de GdnHCl. La enzima se desplegó en presencia de MgATP 1 mM y se determinó la intensidad de luz (○) y el radio hidrodinámico (Rh) (●). Las barras de error fueron calculadas de 4 mediciones utilizando una concentración de proteína de 14 μ M. Las muestras fueron equilibradas por 20 h a 20 °C en las concentraciones de GdnHCl indicadas. El área achurada corresponde al intervalo de concentración de GdnHCl en donde ocurre un cambio abrupto de la fluorescencia intrínseca, la actividad enzimática y buena parte de la señal de dicroísmo circular de la Pfk-2 en presencia de MgATP 1 mM.

de GdnHCl el valor del radio hidrodinámico incrementa alcanzando un valor de 46 ± 2 Å a 3 M de GdnHCl, lo que coincide con la disminución del volumen de elución observado por cromatografía de exclusión molecular (Figura 8 A y B). El cambio total de la intensidad de luz dispersada fue observado entre 0,4 y 0,7 M de GdnHCl indicando que la disociación a monómeros fue completa alrededor de 0,7 M de GdnHCl. Dado que un monómero globular plegado debería tener un radio hidrodinámico de 25 Å y el valor menor obtenido a 0,7 M de GdnHCl fue de $37,6 \pm 0.74$ Å, un monómero compacto no parece ser una especie altamente poblada a través de la disociación del tetrámero inducida por GdnHCl. Esta conjetura es avalada por la buena correlación entre la disociación del tetrámero, observada entre la disminución de la intensidad de la luz dispersada, y el abrupto cambio de las propiedades de la Pfk-2 mostradas en la Figura 7. El área achurada de la Figura 9 corresponde al intervalo de concentración de GdnHCl en donde ocurre un cambio abrupto de la fluorescencia intrínseca, la actividad enzimática y buena parte de la señal de dicroísmo circular de la Pfk-2 en presencia de MgATP 1 mM. Como se observa, la disociación del tetrámero, dada por la disminución de la intensidad de luz dispersada, coincide con el área achurada, indicando que la disociación transcurre sin la acumulación de especies diméricas o monoméricas que retengan alguna de las propiedades nativas ensayadas. El radio hidrodinámico encontrado al final de la transición de disociación del tetrámero ($37,6 \pm 0.74$ Å a 0.7 M de GdnHCl) es un valor muy similar al radio hidrodinámico encontrado para el intermediario monomérico “I” obtenido al desplegar la enzima en ausencia de ligandos (38 Å).

En su conjunto, estos resultados, indican que el tetrámero obtenido en presencia de MgATP sufre una reacción de disociación y desplegamiento concertada que origina

la acumulación de un intermediario monomérico expandido el cual se despliega completamente a mayores concentraciones de GdnHCl. Por otra parte y dado que entre 0 y 0,5 M de GdnHCl no ocurre la disociación del tetrámero pero sí un corrimiento del máximo de emisión de la fluorescencia, se infiere la formación de un intermediario tetramérico “T*”. El mecanismo de desplegamiento del tetrámero en presencia de MgATP se resume en el siguiente esquema,



donde T_4 corresponde al tetrámero en presencia de MgATP el cual cambia su configuración a un intermediario tetramérico compacto T_4^* e I es un intermediario monomérico similar al obtenido al desplegar el dímero libre. La ausencia de dímeros ó monómeros compactos no permiten identificar una especie dimérica que presente MgATP unido al sitio alostérico ya que el tetrámero en presencia de MgATP se comporta como un complejo obligado respecto a la disociación inducida por GdnHCl.

III. DESESTABILIZACIÓN DE LA INTERFAZ MONÓMERO-MONÓMERO (β -CLASP) MEDIANTE MUTACIÓN SITIO DIRIGIDA

Se ha informado que al reemplazar aminoácidos apolares voluminosos y altamente empacados en centros hidrofóbicos intermoleculares por aminoácidos apolares pequeños como alanina, la estabilidad de la proteína puede disminuir en alrededor de 6 kcal/mol (3 kcal/mol por subunidad) (Milla y Sauer, 1995). En la Figura 10 A se muestra un alineamiento estructural del dominio menor de la Pfk-2 con el dominio menor de sus homólogos más cercanos. Como se indica en la Figura 10 B, L93 ocupa una posición conservada y central en la interfaz β -clasp de la Pfk-2 por lo que fue cambiada por alanina para desestabilizar de manera reversible la interfaz monómero-monómero. Ensayos de expresión mostraron que L93A se expresa de manera soluble y con rendimientos similares a la enzima silvestre, siendo purificada a homogeneidad según Babul (1978).

1. Características cinéticas de la mutante L93A.

La actividad de la mutante fue cercana al 3 % de la actividad de la enzima silvestre cuando se midieron alícuotas de preparaciones de 3 μ M de proteína. Este valor alcanzó un 10 % al medir la actividad catalítica de la mutante desde soluciones de proteína más concentradas (15 μ M) y llegó a cerca del 70 % cuando la mutante fue preincubada en presencia de MgATP o fructosa-6-P 1 mM (Tabla 2). La Tabla 2 también muestra la K_{mapp} para MgATP y fructosa-6-P obtenidas en las condiciones anteriormente indicadas. Como se observa, los valores de K_m obtenidos para L93A fueron similares a los de la

A

```

1RDK : NPSIDYIVQVE--NFQQGV-V-NRSERDRKQPG
1VM7 : SSNIDIVLKVD--HFTKPGET-QKAIEMNVFPG
2F02 : NPSIDISYLLD--HLK-LD-TVNRTSQVTKTG
2AJR : PALDREIFIEDFQVNRLYRINDL--SKTQXSPG
2ABQ : NPSIDYIVQVE--NFQQGV-V-NRSERDRKQPG
3CQD : APSLESATITP--QIYPEG-K-LRCTAPVFEPG

1RDK : VEGDTRINVKIKG---KQ--ETEINGTAPLI---K
1VM7 : VSLPTGRAFIEVD---KTGQNRIIFPGANAELKK
2F02 : IKEETRDSIAILH---EG-NQTEILEAGPTV---S
2AJR : -NFVYVEGETRENIEIIDEKNKTTAINFPQPDVT
2ABQ : VEGDTRINVKIKG---KQ--ETEINGTAPLI---K
3CQD : AKDWTQRONLHVHVEASGE--QYRFVMPGAALNED-

```

↑
L93

B

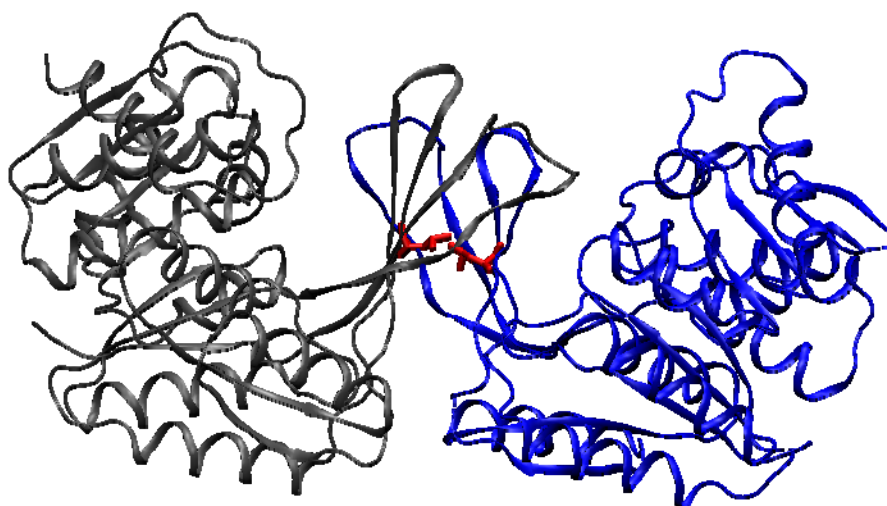


Figura 10. Alineamiento estructural del dominio menor de la Pfk-2 y ubicación de L93 en la estructura de la Pfk-2. A. Alineamiento estructural de homólogos que presentan el dominio menor utilizando el programa Deepview / Swiss-Pdbviewer. Cada bloque corresponde a las dos inserciones que configuran el dominio menor. Los nombres de las secuencias corresponden al código asignado para sus estructuras en la base de datos RCSB PDB (1RDK, riboquinasa de *E. coli*; 1VM7, riboquinasa de *Thermotoga maritima*; 1FO2, tagatosa-6-fosfato quinasa de *Enterococcus faecalis*; 2AJR, putativa 1-phosphofructoquinasa de *Thermotoga maritima*; 2ABQ fructosa-1-fosfato quinasa de *Bacillus halodurans* y 3CQD, fosfofructoquinasa-2 de *E. coli*). Las columnas negras indican bloques de secuencias conservados en todas las proteínas, las columnas gris oscuro indican más del 80 % de residuos conservados y las columnas grises entre 60 y 80 % de residuos conservados por columnas. En la secuencia correspondiente a la Pfk-2 (PDB ID:3CQD) se resaltan en rojo los residuos con cadenas laterales que establecen contacto con la subunidad adyacente y se indica con una flecha la posición de L93. B. Ubicación de L93 en la interfaz de la Pfk-2.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la mutante L93A y la enzima silvestre a partir de varias condiciones experimentales.

| | ^a K _{mapp} MgATP (μ M) | ^a K _{mapp} fructosa-6-P (μ M) | ^a k _{cat} (s ⁻¹) |
|--|--|---|---|
| ^b Silvestre (3 μ M) | 12-20 | 40-50 | 50-60 |
| ^b L93A (3,3 μ M) | SD | SD | ~2 |
| ^b L93A (15 μ M) | 20 | 34 | 10 |
| ^{b,c} L93A (3,3 μ M + 1mM de fructosa-6-P) | 18 | 43 | ~40 |

^a En todos los casos indicados la actividad enzimática se obtuvo mediante un ensayo continuo (ver Materiales y Métodos) utilizando una concentración de enzima de $4,3 \times 10^{-3}$ μ M y los parámetros se calcularon mediante ajuste no lineal de las curvas de velocidad obtenidas en función de ambos sustratos utilizando una función hiperbólica.

^bEl valor entre paréntesis indica la concentración de proteína de una solución a partir de la cual se obtuvieron las alícuotas para medir la actividad enzimática.

^cLa solución de proteína fue preincubada con 1 mM de fructosa-6-P durante 40 min a 20 °C SD; sin dato

enzima silvestre, independiente de la condición ensayada. Estos resultados sugieren que la mutante realiza la catálisis con la misma pseudo afinidad por los sustratos que la enzima silvestre y que la variación en k_{cat} se debe probablemente a un cambio en las poblaciones activas de la mutante, las que pueden ser modificadas por su concentración o la presencia de ligandos.

2. Efecto de la concentración de proteína en la k_{cat} y el radio hidrodinámico de la mutante L93A

A diferencia de una reacción de isomerización, la dilución de los componentes en equilibrio de una reacción bimolecular cambia las poblaciones relativas de los componentes en solución favoreciendo las especies disociadas (principio de acción de masas). Por lo tanto, se prepararon diluciones de proteína para someterlas a cromatografía de exclusión molecular y ensayos de actividad enzimática con el fin de determinar si estas propiedades responden a un equilibrio de asociación. En la Figura 11 A se compara la variación de la k_{cat} de la mutante L93A con la enzima silvestre en función de la concentración de proteína. La k_{cat} de la enzima mutante se incrementó desde $\sim 2 \text{ s}^{-1}$ hasta llegar a valores de 23 s^{-1} entre $5 \text{ }\mu\text{M}$ y $151 \text{ }\mu\text{M}$ de proteína (Figura 11 A, símbolos blancos). En cambio, la k_{cat} de la enzima silvestre se mantuvo constante en este intervalo de concentración de proteína y sólo disminuye su valor por debajo de $0,3 \text{ }\mu\text{M}$ (Figura 11 A, símbolos negros). La Figura 11 B muestra los perfiles de elución de la mutante L93A obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular y la Figura 11 C el valor del radio hidrodinámico (R_h) para cada concentración de proteína inyectada.

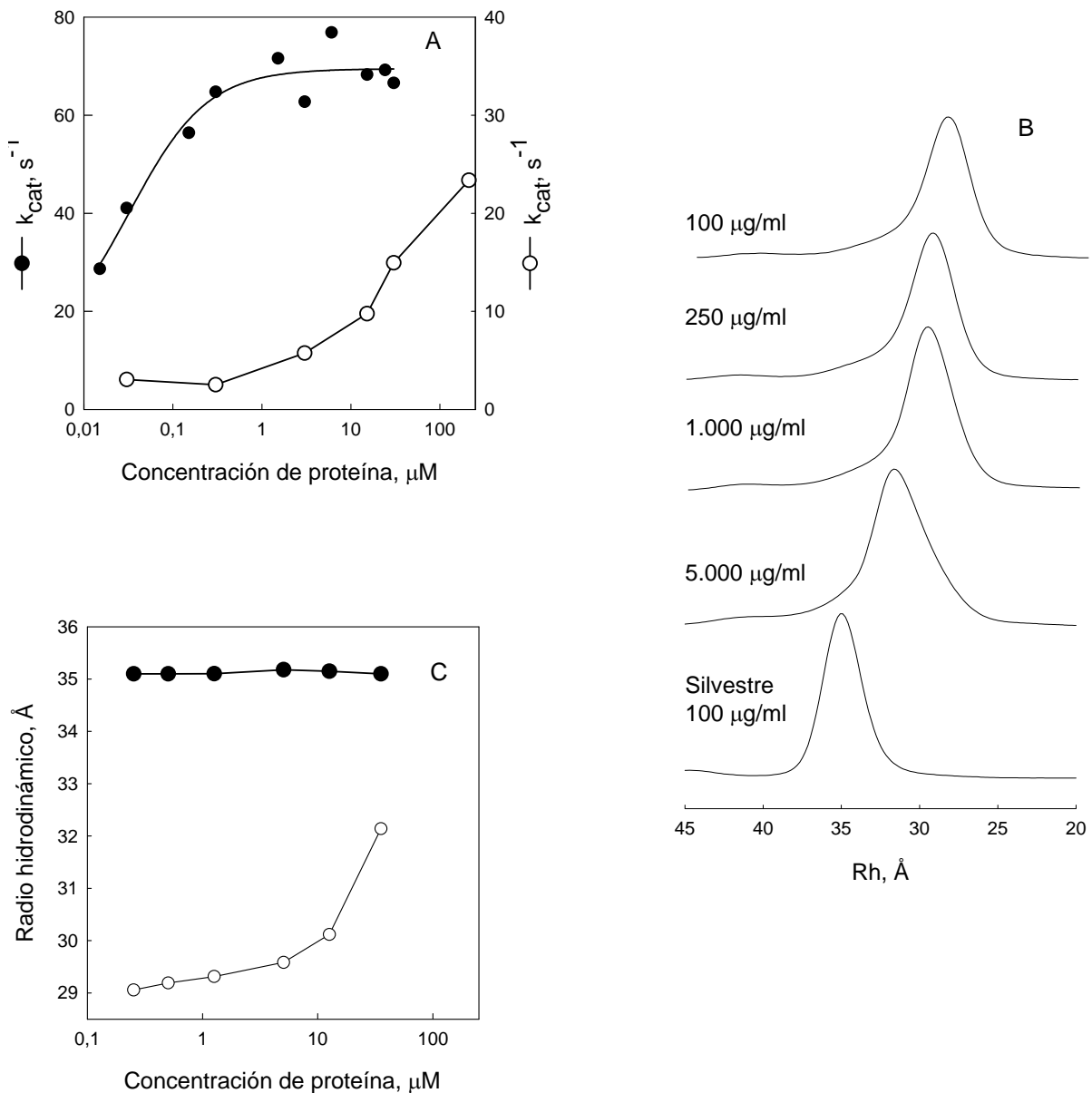


Figura 11. Efecto de la concentración de proteína en la k_{cat} y radio hidrodinámico (Rh) de la enzima silvestre y mutante L93A. A. Muestras de ambas proteínas se incubaron por 40 min a 20 °C y la actividad enzimática fue obtenida en condiciones saturantes de ambos sustratos mediante un ensayo continuo a 25 °C. Las alícuotas utilizadas para medir la actividad enzimática se ajustaron de manera tal que la concentración de proteína en el ensayo fue constante e igual a $4,3 \times 10^{-3} \mu\text{M}$. Experimentos controles no mostraron reactivación de la enzima durante la formación de producto. B. Perfiles de elución de la mutante L93A obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular inyectando muestras de proteína a las concentraciones indicadas en cada cromatograma. C. Comparación de los radios hidrodinámicos de la mutante L93A (○) y la enzima silvestre (●) en función de la concentración de proteína, corregida por la dilución de las muestras en la columna. La columna se calibró con proteínas de Rh conocido y las muestras se incubaron por 40 min a 20 °C antes de su inyección.

El Rh de la mutante, extrapolado a dilución infinita de proteína, fue de 29 Å (Figura 11 C). Este valor aumentó con la concentración de proteína hasta alcanzar 32 Å a 50 µM, lo cual coincide con el aumento de la actividad enzimática de la mutante (Figura 11 A). Estos resultados indican que tanto el volumen hidrodinámico de la mutante como su actividad enzimática son propiedades correlacionadas entre sí y a su vez se correlacionan con el aumento de la concentración total de proteína. Por lo tanto, se propone que el reemplazo de L93 por alanina promueve la disociación de la enzima cuyas subunidades están caracterizadas por una k_{cat} marginal y un Rh de 29 Å (valor extrapolado a dilución infinita, Figura 11 C). En contraste, el Rh de la enzima silvestre permanece constante e igual a 35 Å, no observándose una especie de menor tamaño como la descrita para la mutante (Figura 11 C).

3. Reversibilidad de los cambios del estado de agregación de la mutante L93A inducida por ligando.

La reversibilidad de los cambios en el Rh de la mutante fue puesta a prueba equilibrando la columna de exclusión molecular con fructosa-6-P 0,2 mM o MgATP 0,2 mM, inyectando muestras de la mutante equilibradas en estas condiciones (Figura 12). En presencia de fructosa-6-P la mutante L93A presentó un Rh idéntico al de la enzima silvestre (Figura 12 B). En presencia de MgATP (condiciones que favorecen la formación del tetrámero de la enzima silvestre) L93A aparece con el mismo volumen del tetrámero silvestre, aunque una población de la enzima mutante permanece con el volumen del monómero obtenido en ausencia de ligando (Figura 12 C). Estos resultados indican que la unión de los ligandos revierte los cambios de estado de agregación

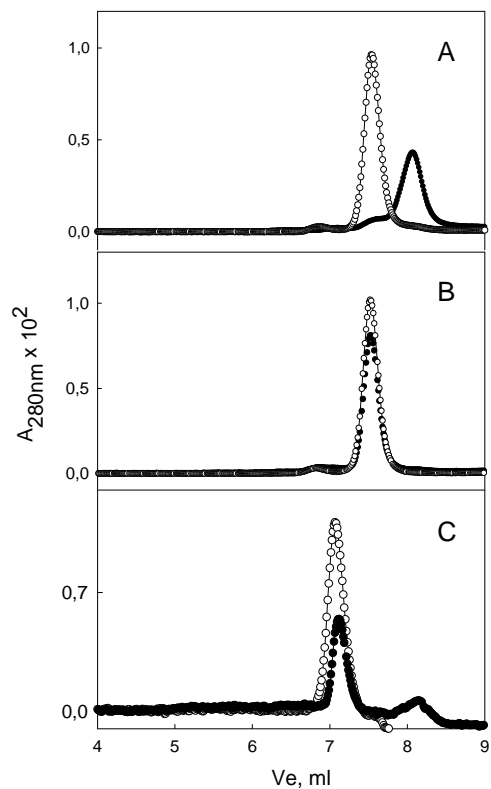


Figura 12 Efecto de los ligandos de la Pfk-2 en las propiedades hidrodinámicas de la mutante L93A y la enzima silvestre. Se inyectaron muestras de proteína silvestre (\circ) y mutante L93A (\bullet) preincubadas por 40 min a 20 °C en las condiciones utilizadas para equilibrar la columna de exclusión molecular. Panel A, columna equilibrada en ausencia de ligandos; panel B columna equilibrada en presencia de 0,2 mM de fructosa-6-P; panel C columna equilibrada en presencia de 0,2 mM de MgATP. La columna fue mantenida a 25 ° C y la concentración de enzima inyectada fue de 3 μM en todas las condiciones.

inducidos por dilución y por lo tanto la disociación de la mutante es un proceso reversible. También se evaluó la reasociación de la mutante L93A, inducida por fructosa-6-P, por cambios de la actividad enzimática. En la Figura 13 se muestra la actividad enzimática de preparaciones de L93A incubadas a varias concentraciones de fructosa-6-P y distintas concentraciones de proteína. Soluciones de 15 μM de L93A mostraron una recuperación de la k_{cat} de manera hiperbólica en función de la concentración de fructosa-6-P, obteniéndose un $K_{0,5}$ de 9 μM y un valor límite para la k_{cat} de fructosa-6-P de 43 s^{-1} . Es interesante el hecho que la $K_{0,5}$ de reasociación fue similar a la constante de disociación de fructosa-6-P obtenida para el dímero silvestre (6 μM ; Guixé y col., 1998). Al utilizar concentraciones menores de proteína (0,3 μM), la reactivación de la mutante presentó un $K_{0,5}$ de 119 μM y una k_{cat} de 15 s^{-1} . Cuando se usó una concentración de proteína de 0,03 μM no se observó la reactivación inducida por fructosa-6-P, incluso después de incubar la proteína por 24 h en presencia del ligando. Estos resultados indican que la reactivación de la mutante inducida por fructosa-6-P se favorece a mayores concentraciones de proteína de manera cualitativa, en cuanto a la concentración de fructosa-6-P necesaria para lograr el cambio máximo de la k_{cat} y también cuantitativamente, ya que no es posible observar reactivación a concentraciones muy pequeñas de proteína (0,03 μM).

Tomando en cuenta que es posible reactivar y reasociar esta mutante, se le puede utilizar como modelo para determinar las propiedades estructurales de las subunidades aisladas de la Pfk-2 sin recurrir a la utilización de agentes caotrópicos.

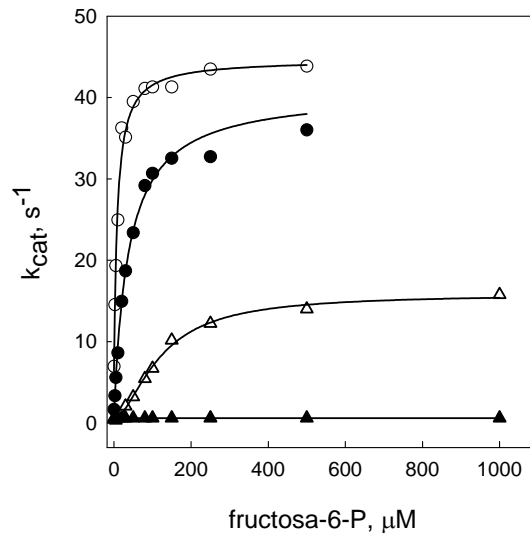


Figura 13. Efecto de la concentración de proteína en la reactivación de la mutante L93A por fructosa-6-P. La enzima se incubó por 40 min a 20 °C en presencia de las concentraciones indicadas de fructosa-6-P utilizando varias concentraciones de proteína: 15 μM (\circ), 3,3 μM (\bullet), 0,3 μM (\triangle) y 0,03 μM (\blacktriangle). El ensayo enzimático se realizó utilizando una concentración de proteína constante de 4×10^{-3} μM para todas las concentraciones de proteína utilizadas.

4. Fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular de la mutante L93A.

En la Figura 14 A se muestra el espectro de dicroísmo circular de la enzima silvestre comparado con el de la mutante L93A en condiciones que favorecen el monómero (3 μ M de proteína) y en condiciones que favorecen su estado activo y asociado (3 μ M de proteína más fructosa-6-P 1 mM). En condiciones que favorecen la separación de las subunidades de la enzima mutante, la señal de dicroísmo circular a 220 nm corresponde a un 60 % de la señal de la proteína silvestre nativa (porcentaje de cambio calculado de la variación total entre el estado nativo y el estado desplegado con GdnHCl 3 M). Esta diferencia se reduce a un 86 % cuando el espectro se compara con la mutante en condiciones que favorecen la forma asociada y activa de la mutante (Figura 14 A). Como se indicó anteriormente, experimentos de desplegamiento al equilibrio de la enzima silvestre indican que la fluorescencia intrínseca de la Pfk-2 (originada por un único Trp en cada subunidad) censa adecuadamente la formación del dímero en la Pfk-2. De acuerdo con esto, en condiciones que favorecen el estado monomérico de la mutante, la intensidad de su fluorescencia intrínseca corresponde a un 14 % de la intensidad máxima de la enzima silvestre y es similar a la intensidad de ambas proteínas obtenida en condiciones desplegadas (Figura 14 B). Al preincubar la mutante en presencia de fructosa-6-P este cambio conformacional es parcialmente revertido, alcanzando un valor del 85 % de la fluorescencia de la enzima silvestre medida en presencia de fructosa-6-P 1 mM. Por lo tanto, respecto al dímero silvestre y a la mutante en su forma asociada, la mutante en condiciones monoméricas muestra cambios conformacionales significativos tanto a nivel de su estructura secundaria (Figura 14 A) y terciaria (Figura 14 B).

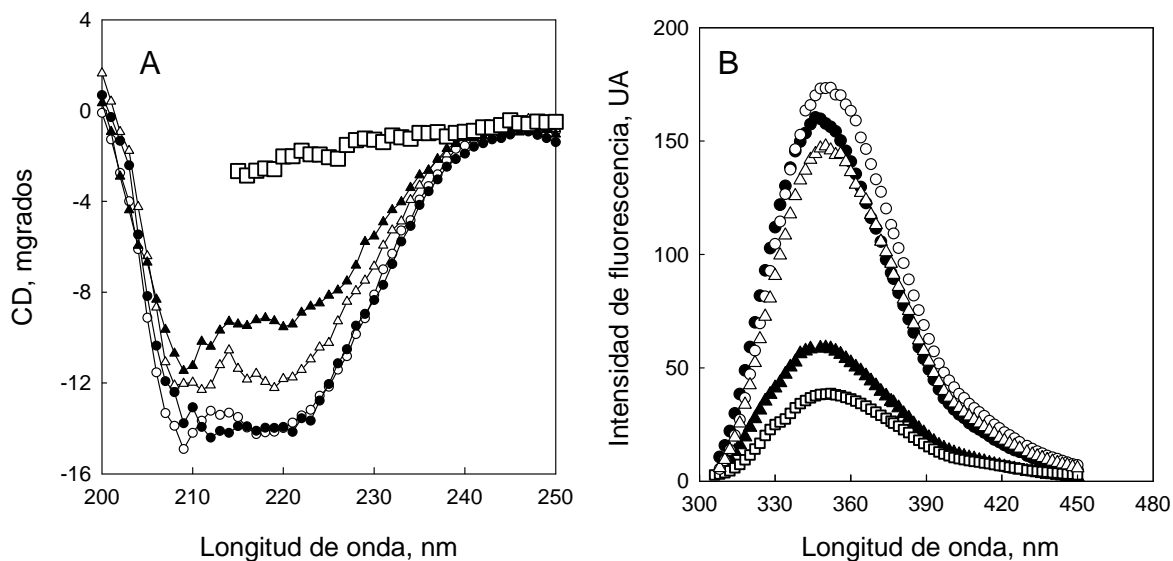


Figura 14. Comparación de las propiedades estructurales de la enzima silvestre y mutante L93A en condiciones favorecen su estado disociado y asociado. A. Espectros de dicroísmo circular de la enzima silvestre (●,○) y mutante L93A (▲,△) en ausencia (símbolos negros) y en presencia de fructosa-6-P 1 mM (símbolos blancos) y en presencia de GdnHCl 3 M (□). Cada espectro corresponde a una acumulación de tres mediciones realizadas en un espectro polarímetro Jasco 600 utilizando una velocidad de barrido de 20 nm min⁻¹ en una celda de 1mm de paso óptico. B. Espectros de emisión de fluorescencia del Trp-88 manteniendo el código de los símbolos correspondientes de la enzima silvestre (●,○) y mutante L93A (▲,△) en ausencia (símbolos negros) y en presencia de fructosa-6-P 1 mM (símbolos blancos) y en presencia de GdnHCl 3 M (□). Los espectros de fluorescencia se obtuvieron excitando a 295 nm. La concentración de proteína utilizada fue de 3 μM.

No obstante, en comparación con su forma asociada (obtenida en presencia de fructosa-6-P) estos cambios parecen de menor magnitud.

5. Desplegamiento de la mutante L93A por GdnHCl e incremento de la temperatura.

Los cambios conformacionales asociados al desplegamiento de la mutante obtenida en su estado disociado, fueron determinados en función de su contenido de estructura secundaria variando la concentración de GdnHCl (Figura 15) y la temperatura (Figura 16). En la Figura 15 se muestra que entre 0 y 0,4 M de GdnHCl la señal de dicroísmo a 220 nm disminuye para luego decrecer de manera menos pronunciada entre 0,5 y 3 M de GdnHCl. Esta última disminución se asemeja a la transición observada para el desplegamiento del intermediario monomérico “I” de la enzima silvestre que ocurre por sobre 0,5 M de GdnHCl, sugiriendo un intermediario común en la vía de desplegamiento de ambas enzimas. Sin embargo, la disminución de la señal de dicroísmo entre 0 y 0,4 M de GdnHCl es exclusiva para la mutante ya que, a diferencia de la enzima silvestre, esta transición ocurre a partir de una especie que presenta actividad enzimática marginal (Figura 11 A) y una reducida emisión del Trp-88 (Figura 14 B).

Las transiciones térmicas se obtuvieron midiendo el cambio de la estructura secundaria de la enzima silvestre (Figura 16 y 17) y la mutante L93A a 220 nm (Figura 18). En la Figura 16 se muestra que entre 40 y 50 °C la señal de dicroísmo a 220 nm del dímero silvestre disminuye de manera sigmoidea con un punto medio ($T_{m1/2}$) de 43 °C.

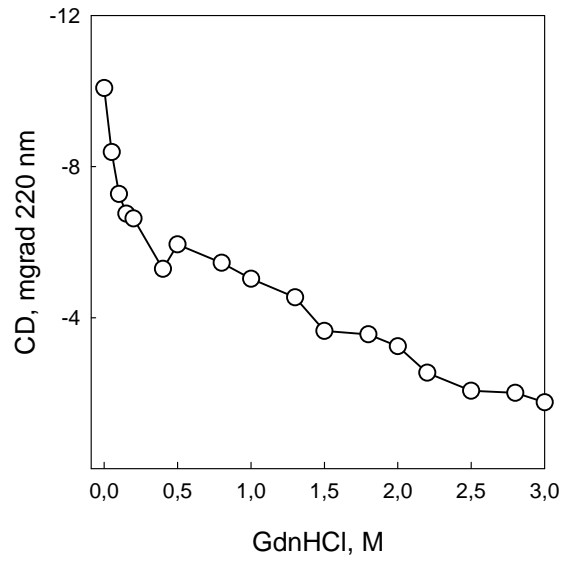


Figura 15. Desplegamiento de la mutante L93A en su estado monomérico utilizando GdnHCl. La proteína se incubó por 24 h a 20 °C a 3 μ M y se midieron los espectros de dicroísmo circular para cada concentración de GdnHCl en 50 mM Tris-HCl pH 8,2 DTT 2 mM y $MgCl_2$ 5 mM. Se muestran la señal de dicroísmo circular a 220 nm en función de la concentración del agente caotrópico.

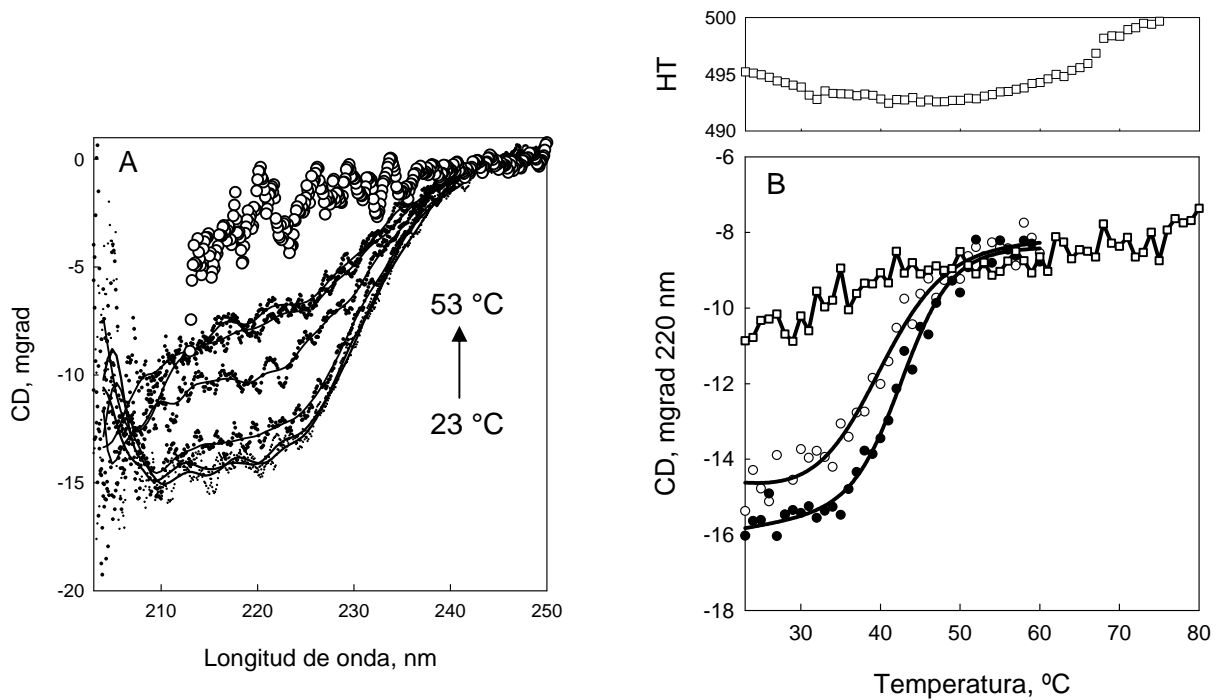


Figura 16. Desplegamiento térmico de la Pfk-2 silvestre. A. Espectros de dicroísmo circular en la región UV lejana medidos para la enzima silvestre cada 5 °C entre 23 y 53 °C. Cada espectro representa un promedio de 8 mediciones. Como comparación se muestra el estado desplegado de la enzima silvestre obtenido con GdnHCl 3 M a 20 °C (○) B. La señal de CD medida a 220 nm se grafica en función de la temperatura para una muestra calentada hasta 58 °C (●) e inmediatamente enfriada hasta 23 °C (○). Cambios en la señal a 220 nm al enfriar una muestra calentada hasta los 80 °C (□). El panel superior muestra la tensión del fotomultiplicador (HT) en función de la temperatura.

Esta transición fue reversible en un 80 % a juzgar por la recuperación de la señal de dicroísmo obtenida luego de enfriar inmediatamente una muestra calentada hasta 58 °C (Figura 16 B, (●)). No obstante, las condiciones de reversibilidad se pierden cuando la proteína es calentada por sobre 60 °C (Figura 16 B, (□)). La formación de agregados irreversibles es un fenómeno común en el desplegamiento térmico de las proteínas y puede ser observada como un cambio del voltaje del fotomultiplicador del instrumento (HT) (Benjwal y col., 2006).

En el panel superior de la Figura 16 B se observa que por sobre 60 °C ocurre una transición en el voltaje del fotomultiplicador sugiriendo la formación de agregados por sobre esa temperatura, lo que es coherente con la pérdida de reversibilidad de la muestra luego de ser calentada a temperaturas mayores de 60 °C. En consecuencia, la señal de dicroísmo circular obtenida por sobre la temperatura de transición del fotomultiplicador, se muestra como puntos en los experimentos de las Figuras 17 y 18. Estos datos no fueron tomados en cuenta, debido a que la señal de dicroísmo circular de la muestra puede no reflejar el desplegamiento de la proteína.

El efecto de la concentración total de proteína en la transición térmica se evalúa en la Figura 17. Como se observa, al aumentar la concentración de proteína el valor de $T_{m1/2}$ de cada transición se desplaza hacia temperaturas mayores, indicando que la disociación de las subunidades del dímero silvestre ocurre conjuntamente con la pérdida de estructura secundaria inducida por el calentamiento de la proteína. Los datos se ajustaron a un modelo de disociación concertado con el desplegamiento, $N_2 \leftrightarrow 2U$, lo que produce valores de entalpía de la transición de 83 kcal/mol y valores de $T_{m1/2}$ 37 °C (0,3 μ M); 42 °C (3 μ M); y 43 °C (6 μ M). Un comportamiento similar se obtuvo al desplegar

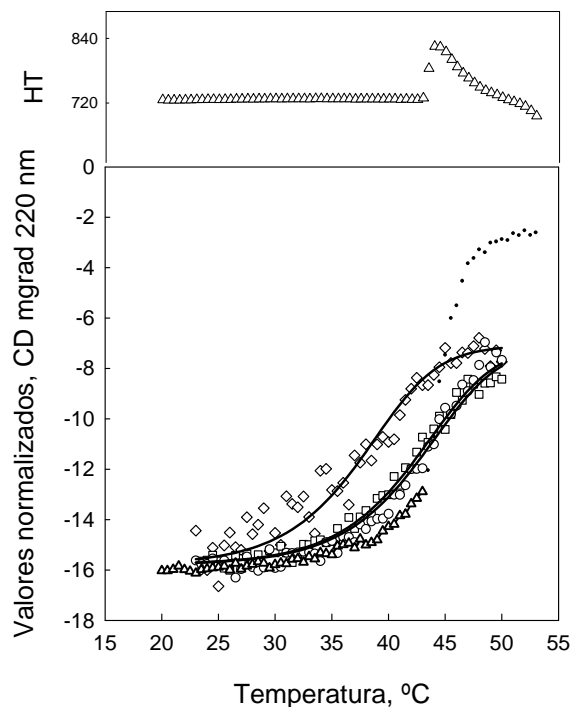


Figura 17. Efecto de la concentración de proteína en el desplegamiento térmico de la Pfk-2. Desplegamiento térmico de la Pfk-2 silvestre utilizando varias concentraciones de proteína: 0,3 μM (\diamond), 3 μM (\square), 6 μM (\circ) y 30 μM (\triangle). Para la concentración más baja de proteína se utilizó una celda con paso óptico de 10 mm. La señal de CD medida para la concentración de proteína más elevada (30 μM , \triangle) se muestra hasta 43 $^{\circ}\text{C}$, ya que por sobre este temperatura ocurre una ostensible variación en la tensión del fotomultiplicador (HT) (ver panel superior). La inspección visual de la muestra mostró la presencia de agregados. En virtud de la claridad, la señal de dicroísmo se muestra corregida por la concentración de proteína utilizada. Los datos se ajustaron a un modelo de disociación concertado con el desplegamiento, $\text{N}_2 \leftrightarrow 2\text{U}$ como se indica en Materiales y Métodos.

la Pfk-2 con GdnHCl utilizando distintas concentraciones de proteína (ver Figura 3), lo que indica que, independientemente de la perturbación, la disociación de la enzima silvestre está acoplada a cambios conformacionales que involucran la pérdida de elementos de estructura secundaria presentes en el dímero.

Cabe destacar que el espectro de dicroísmo circular correspondiente a la post-transición térmica presenta una mayor intensidad que el espectro de dicroísmo obtenido en presencia de GdnHCl 3 M (Figura 16 A, (□)). Estos resultados sugieren una conformación diferente para ambos estados no nativos de la Pfk-2. Lamentablemente, procesos de agregación u otros cambios conformacionales irreversibles, observados a temperaturas elevadas, no permiten determinar si la conformación obtenida en presencia de GdnHCl se puede obtener al elevar la temperatura.

En la Figura 18 se comparan las transiciones térmicas del dímero nativo con la mutante L93A en condiciones monoméricas. A diferencia de la transición sigmoidea observada para la enzima silvestre, la mutante en condiciones monoméricas muestra una disminución lineal de la señal de dicroísmo (Figura 18, (○)) que decrece hasta alcanzar valores similares a los obtenidos con la post-transición térmica del dímero silvestre entre 48 y 55 °C (Figura 18, (△)). Esta superposición indica que ambas proteínas presentan una conformación común entre 48 y 55 °C, lo que a su vez confirma la predicción de que la proteína silvestre está disociada a estas temperaturas.

Como se indicó anteriormente, en presencia de fructosa-6-P 1 mM se favorece el estado disociado y activo de la mutante monomérica (Figura 11 A y B). En estas condiciones, el contenido de estructura secundaria de la mutante disminuye de manera sigmoidea y no lineal como en la forma libre y disociada de la mutante, indicando que

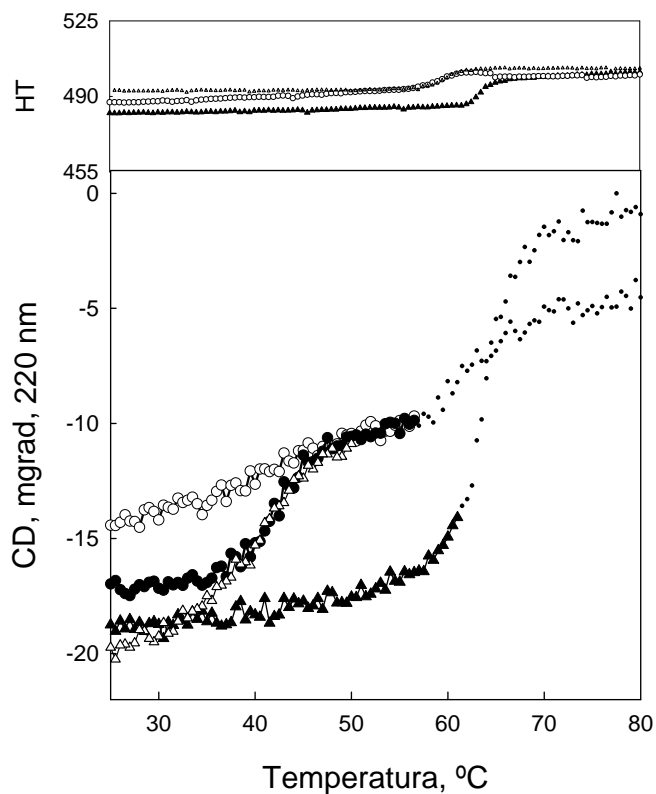


Figura 18. Transiciones térmicas de la enzimas silvestre y mutante L93A. La señal de CD a 220 nm correspondiente a la enzima silvestre (Δ , \blacktriangle) y mutante L93A (\circ , \bullet) es graficada como función de la temperatura en ausencia de ligandos (símbolos blancos) o en presencia de 1 mM de fructosa-6-P (símbolos negros). Los puntos representan la señal de CD medida por las temperaturas de las transiciones observadas en la tensión del fotomultiplicador (panel superior) de cada muestra. La concentración de proteína utilizada fue de 4 μ M.

los contactos nativos, capaces de originar transiciones cooperativas, están condicionados a la formación del dímero de la Pfk-2. Sin embargo, la transición sigmoidea de la mutante en presencia de fructosa-6-P (Figura 18, (●)) ocurre 20 °C por debajo del desplegamiento térmico del dímero silvestre realizado en presencia de fructosa-6-P (Figura 18, (▲)). Ya que la mutante y la enzima silvestre presentan la misma pseudo afinidad por fructosa-6-P (Tabla 2), se sugiere que la diferencia en los $T_{m1/2}$ de ambas proteínas expresa la diferencia de estabilidad entre el dímero mutado y el dímero silvestre.

6. Determinación de la estabilidad del dímero mutante L93A.

La aproximación más obvia para determinar la estabilidad del dímero mutante es desplegar esta especie utilizando GdnHCl y obtener la estabilidad como se procedió para la enzima silvestre. Sin embargo, esta aproximación implica obtener las curvas de estabilidad a partir del estado dimérico de la mutante, lo que requiere concentraciones de proteínas difíciles de acceder experimentalmente. Por ejemplo, para obtener la mutante como dímero se requieren concentraciones mayores 212 uM de proteína (Figura 11 A y B), lo cual favorece la agregación de la Pfk-2 al aumentar la temperatura (Figura 17) o al utilizar concentraciones intermedias de GdnHCl (observaciones del autor).

Por lo tanto, se utilizó una aproximación diferente que consiste en estabilizar el dímero mutante a partir de su estado monomérico (M) que se favorece a bajas concentraciones de proteína. La Figura 19 muestra la actividad enzimática de la mutante L93A en función de la concentración de diversas sales a pH 8,2. Como se observa, el incremento de la concentración de las sales induce un aumento de la actividad

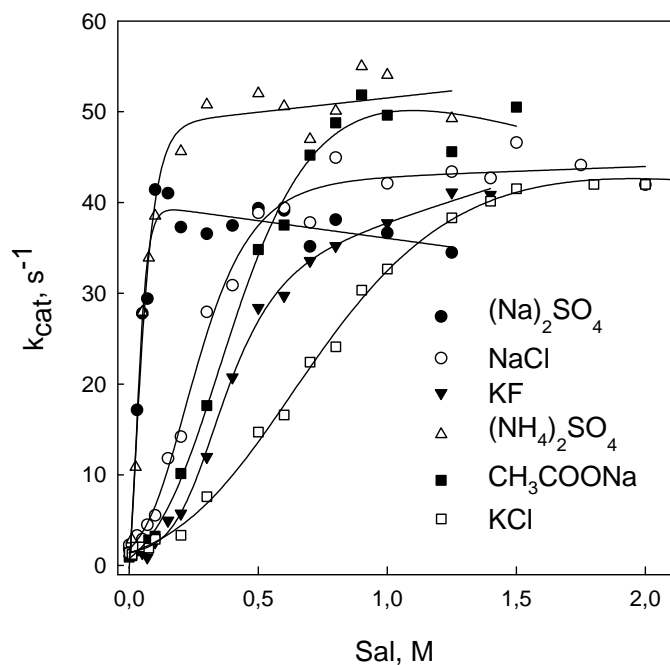


Figura 19. Recuperación de la actividad de la mutante L93A en función de la concentración de varias sales. La mutante se incubó por 2 h a 20°C en Tris-HCl pH 8,2, DTT 5 mM y MgCl₂ 5 mM utilizando las concentraciones de sales indicadas en la figura. Mayores tiempos de incubación no cambian las transiciones observadas, por lo que se suponen condiciones de equilibrio. Luego de este tiempo, la actividad de las muestras se midió utilizando concentraciones saturantes de ambos sustratos a 25 °C. Los símbolos correspondientes a las sales utilizadas se muestran en la figura y las líneas continuas representan el ajuste no lineal obtenido luego de aplicar un modelo de disociación $N_2 \leftrightarrow 2M$ a los datos experimentales, como se indica en Materiales y Métodos.

Tabla 3. Comparación de los parámetros termodinámicos de estabilidad obtenidos en función de la sal utilizada para estabilizar la mutante L93A.

| | ^c (NH ₄) ₂ SO ₄ | Na ₂ S0 ₄ | KF | NaCl | CH ₃ COONa | KCl |
|----------------------------------|--|---------------------------------|------|------|-----------------------|------|
| ^a ΔG _{N2→2M} | 6,9 | 6,0 | 4,7 | 5,68 | 5,6 | 5,6 |
| ^b _m | -27,0 | -48,9 | -8,7 | -8,2 | -5,2 | -2,9 |

^aValores en kcal mol⁻¹

^bValores en kcal mol⁻¹ M⁻¹

^cLos valores de estabilidad obtenidos con el sulfato de amonio no fueron considerados para el promedio de la estabilidad del dímero mutante debido a que el ajuste utilizado predice valores irreales de actividad enzimática.

enzimática alcanzando valores de k_{cat} entre 40 y 50 s^{-1} lo que indica que las sales utilizadas favorecen el estado activo de la mutante, es decir su conformación dimérica (N_2). Tomando en cuenta que la concentración de proteína utilizada (3 μM) favorece la configuración monomérica inactiva (M), el incremento de la actividad enzimática en función de la concentración de sal puede ser modelado como un desplazamiento de equilibrio de asociación hacia la formación del dímero. Suponiendo que este equilibrio se mantiene en todas las concentraciones de sal utilizadas, es posible calcular mediante el método de extrapolación lineal de energía libre (LEM) la diferencia de energía libre entre el monómero y el dímero mutante, $\Delta G_{\text{N}_2 \rightarrow 2\text{M}} = G_{\text{M}} - G_{\text{N}_2}$. Esta aproximación es idéntica a la utilizada para calcular la estabilidad de una proteína utilizando GdnHCl como agente caotrópico (ver análisis de las transiciones obtenidas en presencia de GdnHCl en Materiales y Métodos), solo que ahora se utiliza un estabilizador para obtener la forma activa y no un agente desestabilizador para obtener la forma desplegada o monomérica de la enzima. En la Tabla 3 se muestran los valores de $\Delta G_{\text{N}_2 \rightarrow 2\text{M}}$ y el valor m obtenido mediante el ajuste individual de cada curva al modelo asociativo $\text{N}_2 \leftrightarrow 2\text{M}$. Los valores de estabilidad fueron similares para las diversas sales utilizadas, excepto en el caso de sulfato de amonio, lo que indica que el mecanismo de asociación no es alterado significativamente por la naturaleza de la sal. El valor promedio obtenido para la estabilidad del dímero mutante respecto al monómero disociado en solución (sin considerar el caso del sulfato de amonio) fue de $5,5 \pm 0,4$ kcal/mol, lo que corresponde aproximadamente a 7 kcal/mol menos que la estabilidad del dímero silvestre calculada respecto al monómero inducido por GdnHCl. No obstante, el valor m obtenido para cada sal fue dependiente de la sal utilizada, lo cual puede ser explicado debido a que los

componentes de una cadena polipeptídica presentan energías de transferencias diferentes para cada sal utilizada según el modelo de transferencia de Tanford (Tanford, 1970).

IV PERTURBACION DE LA INTERFAZ DÍMERO-DÍMERO MEDIANTE MUTACIONES SITIO DIRIGIDAS

Al inicio de esta tesis no estaba disponible la estructura del tetrámero de la Pfk-2 y por ende se desconocía la ubicación de los aminoácidos involucrados en la formación de la interfaz de esta especie. Sin embargo, experimentos de proteólisis limitada sugerían que el extremo carboxilo terminal de la enzima podría contener residuos claves para la formación de la interfaz dímero-dímero en el tetrámero de la Pfk-2 (Cabrera y col., 2002). Por lo tanto, se realizaron remociones sistemáticas de aminoácidos del extremo carboxilo terminal con el objetivo de encontrar una mutación que afectara exclusivamente la interacción de los dímeros inducida por MgATP. A continuación se presentan las caracterizaciones cinéticas de estas mutantes en cuanto a sus K_m aparentes para MgATP y fructosa-6-P y su capacidad para formar tetrámeros en presencia de MgATP. Los resultados obtenidos con estas mutantes son coherentes con la ubicación de la interfaz del tetrámero observada en la estructura de la Pfk-2 cristalizada recientemente por nuestro grupo (Cabrera y col., 2006; PDB ID: 3CQD).

1. Caracterización cinética de las mutantes de remoción de aminoácidos del extremo carboxilo terminal.

Se caracterizaron cuatro mutantes, con remociones desde 2 hasta 10 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la Pfk-2 (Figura 20), en cuanto a sus K_m aparentes (K_{mapp}) para fructosa-6-P, MgATP y sus constantes catalíticas (k_{cat}). Todas las mutantes, a excepción de la mutante L307, incrementan su K_{mapp} para MgATP y sólo dos (Y306 y A305) presentan valores de k_{cat} similares a los obtenidos para enzima silvestre (Tabla 4).

A

| | |
|-------------------|---|
| (D299) | A A T L N Q G T R L C S H D D |
| (A305) | A A T L N Q G T R L C S H D D T Q K I Y A |
| (Y306) | A A T L N Q G T R L C S H D D T Q K I Y A Y |
| (L307) | A A T L N Q G T R L C S H D D T Q K I Y A Y L |
| (Pfk-2 silvestre) | A A T L N Q G T R L C S H D D T Q K I Y A Y L S R |

N269 G279 N289 D291 Q301 I303 A305 L307 Pfk-2

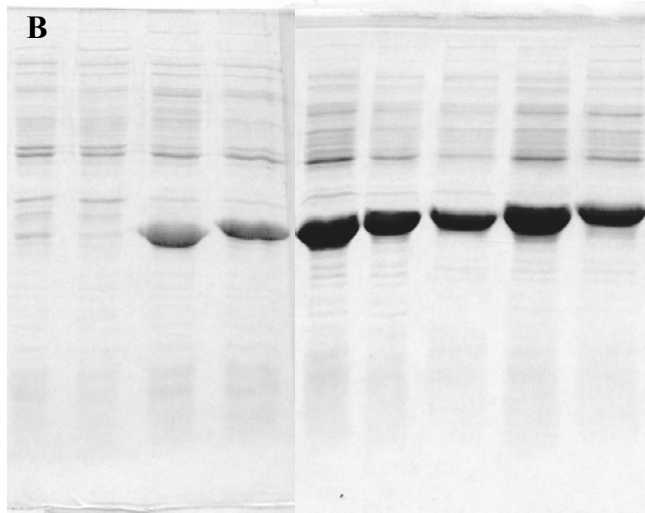


Figura 20. Diseño y expresión de las mutantes carboxilo terminales de la Pfk-2. A. Para generar las remociones de segmentos del carboxilo terminal se introdujeron codones de término de la traducción (TGA o TAG) en las posiciones requeridas para generar las secuencias indicadas en la figura. B. El nivel de expresión de las enzimas mutantes se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes. En cada carril se cargaron 15 μ g totales de proteína provenientes de un líquido sobrenadante de lisado de bacterias centrifugado por 10 min a 14.000 rpm. El lisado de bacterias se preparó por sonicación luego de resuspenderlas en amortiguador Tris 50 mM pH 7,6, glicerol 5%, $MgCl_2$ 5 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. La sobreexpresión de las mutantes se inició en fase exponencial utilizando una concentración de IPTG de 0,8 mM. El tiempo de sobreexpresión de cada mutante fue de 4 h a 37 °C. También se muestra la expresión de mutantes no caracterizadas (N269, G279 y N289). Las mutantes N269, G279 no fueron expresadas o no mostraron un nivel de expresión importante.

Tabla 4. Parámetros cinéticos medidos para la enzima silvestre y las mutantes de remoción del extremo carboxilo terminal.

| | Silvestre | L307 | Y306 | A305 | D299 |
|---|-----------|------|------|------|------|
| ^a K _{mapp} F6P, μM | 57± 3 | 60 | 45 | 36 | 20 |
| ^a K _{mapp} ATP, μM | 15 ± 3 | 10 | 880 | 800 | 2000 |
| ^b k _{cat} , s ⁻¹ | 58 ± 3 | 46 | 38 | 35 | 4 |

^aLos cambios en la Km aparente (K_{mapp}) de MgATP se obtuvieron utilizando una concentración de Mg⁺² libre de 5 mM y una concentración constante de fructosa-6-P, 1 mM. Los valores de K_{mapp} para fructosa-6-P se calcularon utilizando una concentración de 1mM de MgATP.

^bLos valores de velocidad máxima se obtuvieron mediante curvas de saturación en función de la concentración de MgATP utilizando concentraciones de su co-sustrato, fructosa-6-P de 1 mM.

Para determinar el efecto de las mutaciones carboxilo terminal en la integridad del sitio alostérico para MgATP y el sitio catalítico para fructosa-6-P, se evaluó la variación de la K_{mapp} para fructosa-6-P con la concentración de MgATP (figura 21). Como se observa, la enzima silvestre incrementa su K_{mapp} para fructosa-6-P al aumentar la concentración de MgATP, lo que indica que MgATP disminuye la pseudo afinidad de enzima por fructosa-6-P. Este efecto ha sido atribuido a la acción alostérica de MgATP sobre el sitio catalítico para fructosa-6-P (Cabrera, 2004). Las mutantes que presentan una elevada K_{mapp} para MgATP (Y306, A305 y D299), también sufren una disminución de la K_{mapp} para fructosa-6-P cuando se utilizan elevadas concentraciones del nucleótido. Por lo tanto, a pesar de que las mutantes Y306, A305 y D299 presentan una K_{mapp} para MgATP incrementada (Tabla 4), estas enzimas también son inhibidas alostéricamente por MgATP. Por otra parte, a bajas concentraciones del nucleótido (concentraciones menores a 1mM) la K_{mapp} para fructosa-6-P de las mutantes Y306, A305 y D299 muestran valores similares a los obtenidos para la enzima silvestre lo que sugiere que la afinidad por fructosa-6-P no es alterada significativamente por las mutaciones. En la tabla 4 se muestran los valores de K_{mapp} para fructosa-6-P obtenidos a 1 mM de MgATP. Claramente, la pseudo afinidad por fructosa-6-P no es un parámetro correlacionado con el incremento de la K_{mapp} para MgATP en las mutantes Y306, A305 y D299.

Clásicamente el efecto alostérico de MgATP se observa como una disminución de la velocidad de la enzima cuando se ensaya en función de la concentración de su sustrato nucleotídico (Kotlarz y Buc, 1981; Guixé y Babul 1985). La Figura 22 muestra la velocidad inicial de las mutante Y306 y A305 en función de la concentración de

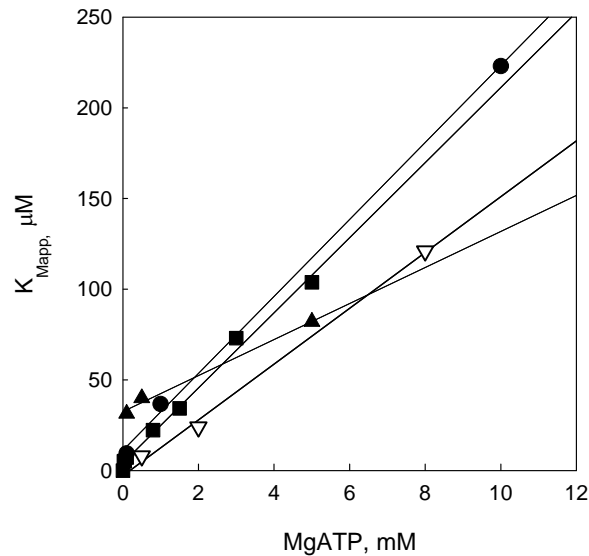


Figure 21. Efecto de la concentración de MgATP en la K_{Mapp} de fructosa-6-P de la enzima silvestre y las mutantes de remoción de segmentos del extremo carboxilo terminal. Se muestra la variación de los valores de K_{Mapp} de fructosa-6-P medidos para la enzima silvestre (■), Y306 (▲), A305 (●) y D299 (▽) con las concentraciones de MgATP indicadas.

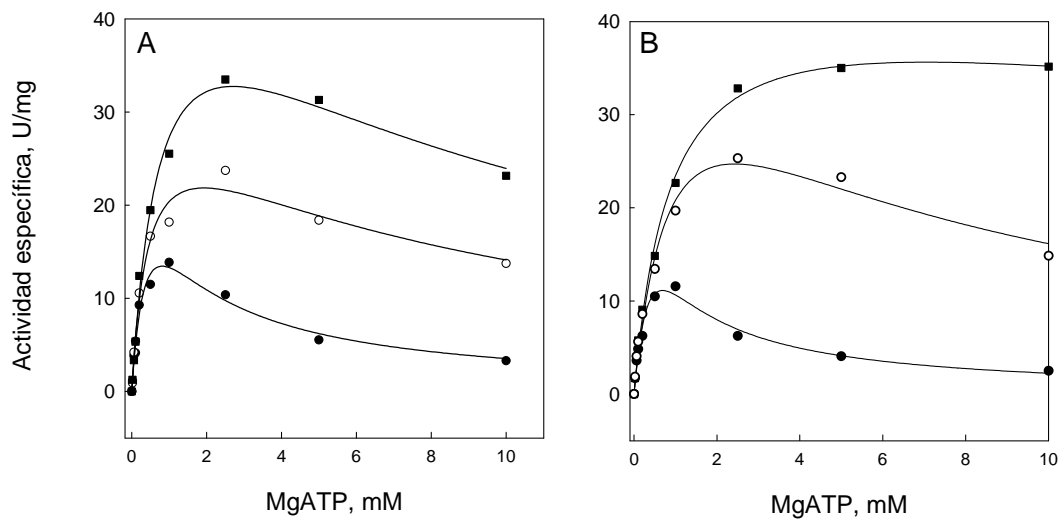


Figura 22. Dependencia de la velocidad inicial de las mutantes L307 e Y306 con la concentración de su sustrato MgATP. En cada panel se muestran los cambios de velocidad de la mutante Y306 (A) y A305 (B) en función de la concentración de MgATP utilizando concentraciones de 2 mM (■), 0,2 mM (○) y 0,05 mM (●) de fructosa-6-P.

MgATP utilizando varias concentraciones fijas de fructosa-6-P. Como se observa, la actividad enzimática de las mutantes pasa por un máximo y luego decae a concentraciones elevadas de MgATP indicando la inhibición por el nucleótido opera en estas mutantes. Concentraciones de fructosa-6-P por sobre 1 mM no modifican la máxima actividad obtenida en función de MgATP por lo que los valores de k_{cat} mostrados en la tabla 4 fueron obtenidos en función de la concentración de MgATP utilizando una concentración fija de fructosa-6-P de 1 mM.

En conjunto estos datos indican que las mutantes Y306, A305 y D299 presentan cambios conformacionales que afectan principalmente la K_{mapp} para el nucleótido (Tabla 4) ya que retienen la capacidad de ser inhibidas por MgATP (figura 21 y 22) y además presentan valores similares de K_{mapp} para fructosa-6-P respecto a la enzima silvestre (Tabla 4).

2. Desacoplamiento de la formación de tetrámeros de la inhibición enzimática inducida por MgATP.

Una de las características asociadas al mecanismo de inhibición alostérica de la Pfk-2 es que en presencia de MgATP el dímero nativo se asocia para formar un homotetrámero (Kotlarz y Buc., 1981; Guixé y Babul 1988; Cabrera y col., 2003). Notablemente, experimentos de cromatografía de exclusión molecular indican que las mutantes de remoción que presentan una elevada K_{mapp} para MgATP (Y306, A305 y D299) no forman tetrámeros en presencia de MgATP (Figura 23). Esta observación es notable, porque al menos las mutantes Y306 y A305 muestran inhibición de su actividad enzimática a elevadas concentraciones del nucleótido MgATP (Figura 21 y 22). No

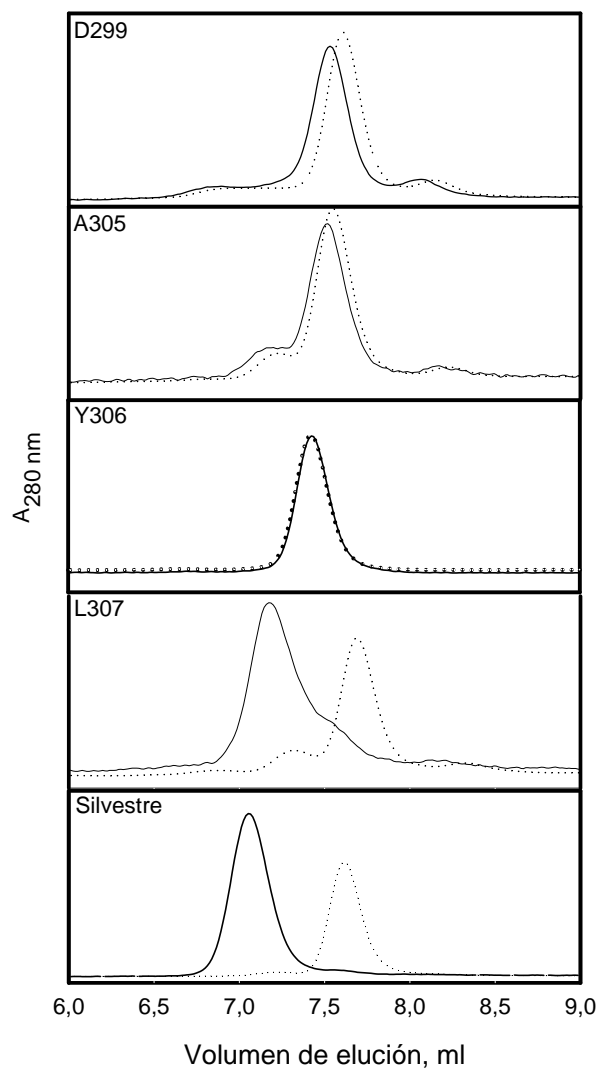


Figura 23. Cambios en el estado de agregación de las mutantes carboxilo terminales inducidos por MgATP. La cromatografía de exclusión molecular se realizó en una columna Bio-Rad Bio-Sil 250, equilibrada con Tris-HCl 25 mM pH 7,6, DTT 1mM y KCl 0,2 mM en presencia (línea continua) o en ausencia (línea punteada) de 0,2 mM de MgATP. Los perfiles de elución para cada mutante se indican en cada cromatograma. La elución de las mutantes se detectó a 280 nm y el flujo fue 0,8 ml/min.

obstante, la formación de tetrámeros en la Pfk-2 es dependiente de la concentración de MgATP y por lo tanto la comparación con la enzima silvestre no es directa, ya que la inhibición de estas mutantes ocurre a mayores concentraciones de MgATP respecto a la enzima silvestre (figura 22).

Con el propósito de estudiar la falla en la formación de tetrámeros observada en las mutantes carboxilo terminal, pero en un trasfondo cinético similar a la enzima silvestre, se generaron las mutantes puntuales Y306A y L307A. Las características cinéticas de la mutante puntual L307A reproducen las alteraciones de los parámetros obtenidos con las mutantes de remoción Y306 y A305, encontrándose una K_{mapp} para MgATP de 950 μ M cuando la enzima se ensaya en fructosa-6-P 1 mM (Figura 24 A, Tabla 5). Esta alteración también se observa a bajas concentraciones de fructosa-6-P (0,1 mM), donde la mutante preserva la capacidad de inhibición por MgATP observada para la enzima silvestre (Figura 24 B). Esta mutante, al igual que las mutantes de remoción L307 e Y306, no cambia su estado de agregación en presencia de MgATP 0,2 mM (observaciones del autor). Estas características indican que la sustitución de una cadena lateral hidrofóbica por una más pequeña reproduce el efecto observado a partir de la eliminación completa de un segmento que incluye el aminoácido (mutantes Y306 y A305).

Por otra parte, la substitución de la cadena lateral de Y306 por alanina generó una enzima con parámetros cinéticos idénticos a los de la enzima silvestre cuando se ensaya con concentraciones de 1 mM de ambos sustratos (tabla 5, Figura 24 A), un resultado coherente ya que la cadena lateral de L307 aún está presente en la mutante Y306A. De igual manera, la inhibición enzimática de la mutante Y306A, ensayada a

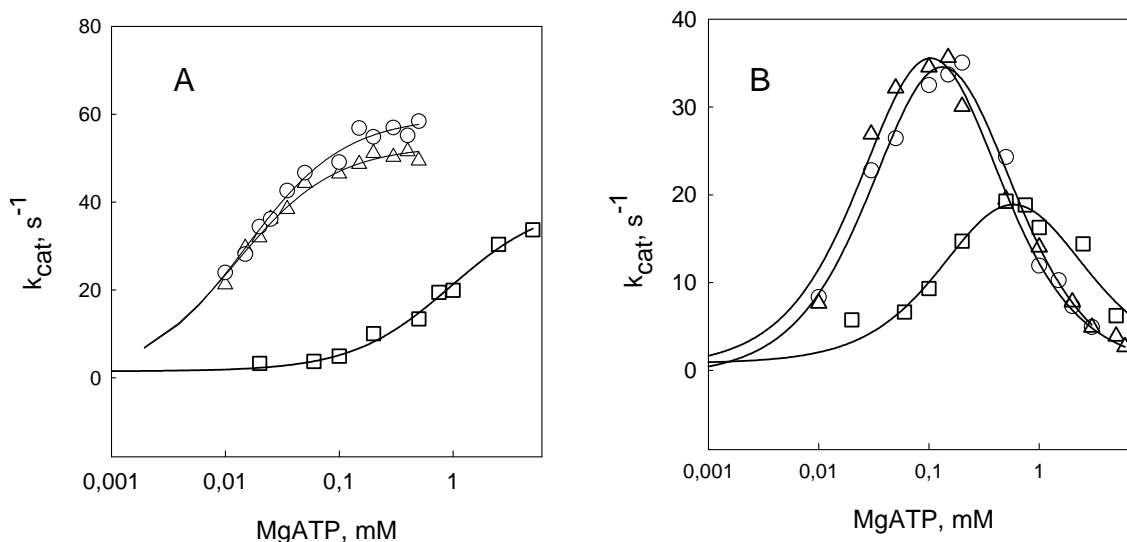


Figura 24. Curvas de velocidad inicial en función de la concentración de MgATP para la enzima silvestre y mutantes Y306A y L307A. Las velocidades de la enzima silvestre (\circ) y mutantes Y306A (\triangle) y L307A (\square) se obtuvieron en función de la concentración de MgATP utilizando una concentración constante 1 mM (panel izquierdo) ó 0,1 mM (panel derecho) de fructosa-6-P. El ensayo enzimático se realizó a 25 °C en Tris-HCl 50 mM pH 8,2 manteniendo un exceso constante de MgCl_2 de 5 mM para todas las concentraciones de ATP utilizadas. La concentración de MgATP se muestra en escala logarítmica.

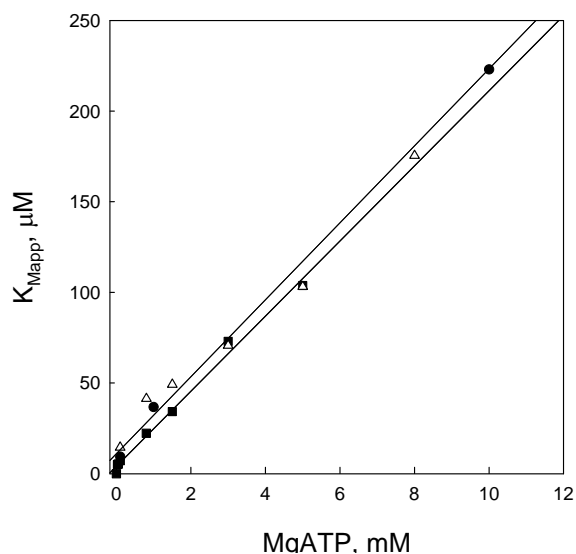


Figure 25. Efecto de la concentración de MgATP en la K_{Mapp} de fructosa-6-P de la enzima silvestre y la mutante Y306A. Se muestra la variación de los valores de K_{Mapp} de fructosa-6-P medidos para la enzima silvestre (\blacksquare) y mutante Y306A (\triangle) con las concentraciones de MgATP indicadas.

Tabla 5. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima silvestre y las mutantes Y396A y L307A.

| | Silvestre ^b | Y306A ^b | L307A ^c |
|--|------------------------|--------------------|--------------------|
| ^a K _{mapp} F6P, μM | 57 ± 3 | 62 ± 11 | 29 |
| ^a K _{mapp} ATP μM | 15 ± 3 | 13,7 ± 0,9 | 954 |
| k _{cat} S ⁻¹ | 58 ± 3 | 53 ± 3,7 | 59 |

^a Determinaciones realizadas con una concentración de 1 mM del co-sustrato.

^b Error calculado utilizando 3 ó 6 determinaciones.

^c Promedio de dos determinaciones.

bajas concentraciones de fructosa-6-P, no fue alterada respecto a la enzima silvestre, como se desprende de la superposición del comportamiento bifásico de ambas enzimas (Figura 24 B). Tampoco se observaron diferencias en el incremento de la K_{mapp} para fructosa-6-P inducido por el incremento de la concentración de MgATP respecto al observado en el caso de la enzima silvestre (Figura 25). De esta forma el patrón de inhibición alostérico de la mutante Y306A no parece ser alterado por la mutación puntual.

Notablemente, experimentos de dispersión dinámica de luz mostraron que el radio hidrodinámico de la mutante Y306A en función de MgATP permanece casi inalterado e igual al valor al dímero (36 Å) en el intervalo de concentración ensayado y, por el contrario, el radio hidrodinámico de la enzima silvestre se incrementa de manera sigmoidea hasta alcanzar un valor de 42 Å, el que se mantiene constante por sobre MgATP 0,2 mM (Figura 26 A). Una situación similar se observa cuando la mutante se inyecta en una columna de exclusión equilibrada con MgATP 1 mM (Figura 26 B). Tampoco se observaron cambios en el estado de agregación de la mutante Y306A en una columna equilibrada con una mezcla catalítica de sustratos que produce una disminución del 80 % de su actividad enzimática y de la actividad de la enzima silvestre (Figura 27). En consecuencia, el cambio de Y306 por alanina desacopla la inhibición de la actividad enzimática de la formación de tetrámeros inducida por MgATP.

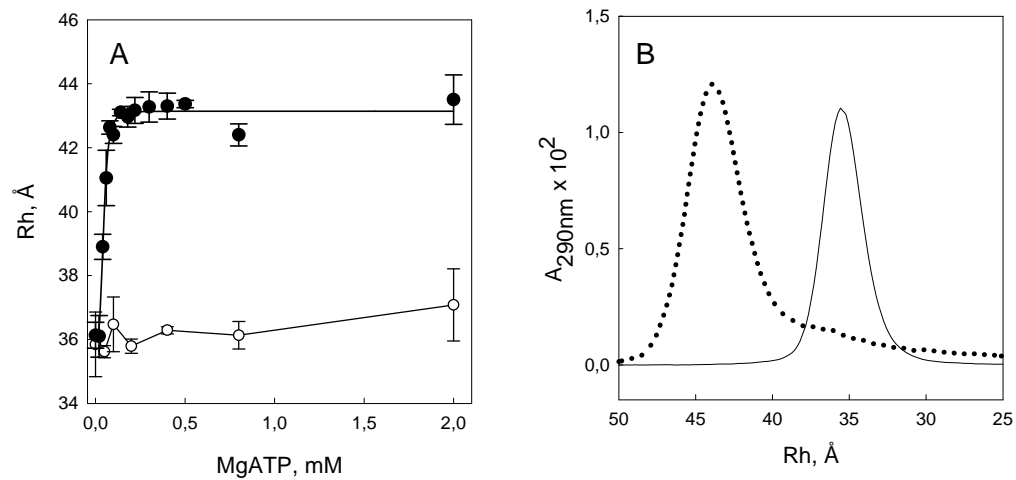


Figura 26. Efecto de MgATP en el radio hidrodinámico (Rh) de la Pfk-2 medido por dispersión dinámica de luz y cromatografía de exclusión en gel. A. El Rh de la enzima silvestre (●) o la mutante Y306A (○) se midió a diferentes concentraciones de MgATP usando una concentración de proteína de 15 μ M. Los experimentos se realizaron a 25° C. B. Perfiles de elución de la enzima silvestre (línea punteada) y la mutante Y306A (línea continua) obtenido es una columna equilibrada con MgATP 0,8 mM.

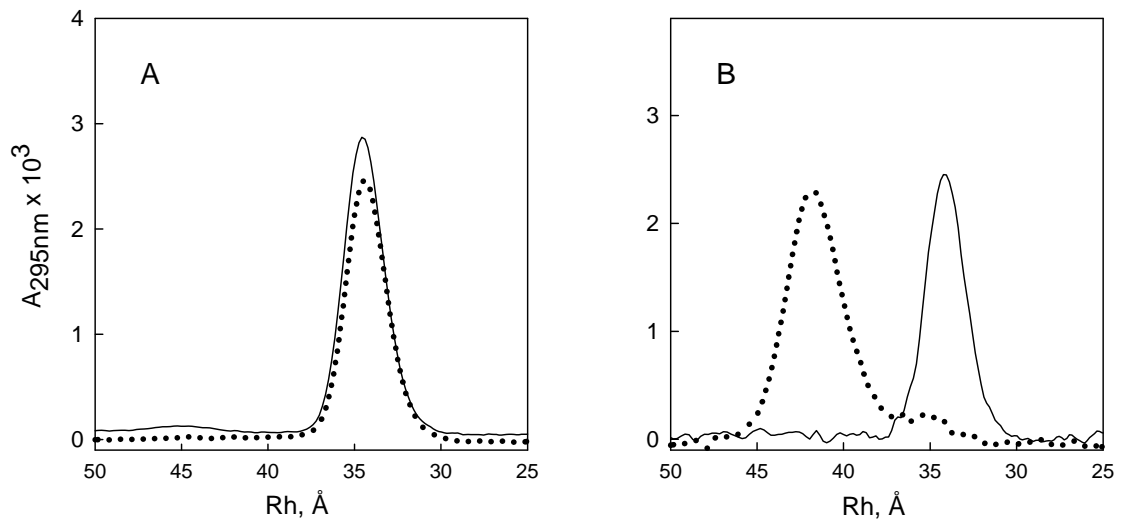


Figura 27. Cambios en el estado de agregación de la mutante Y306A y de la enzima silvestre inducidos por sus sustratos. Cromatografía de exclusión molecular de la enzima silvestre (línea punteada) y mutante Y306A (línea continua). Los perfiles de elución se obtuvieron de una columna equilibrada con fructosa-6-P 1 mM y MgATP 0,1 mM (condiciones no inhibitorias, panel A) o con fructosa-6-P 0,1 mM más MgATP 4 mM (condiciones inhibitorias, panel B).

3. Unión de MgATP a la forma libre de la mutante Y306A y L307A.

Guixé y col. (1998) han utilizado los cambios de la fluorescencia intrínseca originados del único Trp que presenta la Pfk-2 para describir la unión de MgATP a la enzima silvestre. En este caso y en condiciones saturantes de MgATP, el área de la fluorescencia de la enzima libre disminuye en un 35 % (Figura 28 A) y ocurre con un corrimiento del máximo de emisión de 6 nm hacia longitudes de onda menores (Figura 28 B). Para la mutante Y306A, los cambios conformacionales detectados por el Trp-88 fueron similares a los de la enzima silvestre, como se desprende de la disminución de la intensidad y el corrimiento del máximo de emisión obtenidos en condiciones saturantes de MgATP. No obstante, la mutante L307A muestra un cambio del máximo de emisión que es parcial respecto a la mutante Y306A y a la enzima silvestre (Figura 28 B). Por lo tanto, al menos desde punto de vista del ambiente del Trp-88, el reemplazo de Y306 por alanina no modifica los cambios conformacionales inducidos por MgATP en la Pfk-2 silvestre.

Tomando en cuenta que la mutante Y306A y L307A permanecen como dímeros en el intervalo de concentración usado para medir la unión de MgATP (Figura 26 y 27), se concluye que los cambios conformacionales detectados por el Trp-88 se explican exclusivamente por cambios en la estructura del dímero o el monómero de la enzima. La localización del Trp-88 es opuesta a la interfaz de interacción que forma al tetrámero, y los cambios conformacionales observados para cada subunidad del tetrámero (predichos por los experimentos de dispersión de rayos X, Cabrera y col., 2003) dan sustento estructural a estas observaciones. Por otra parte, el ajuste a la función de Hill de la disminución del área de la fluorescencia inducida por MgATP, muestra que las mutante Y306A y L307A presentan una saturación hiperbólica y no sigmoidea como ocurre en la enzima silvestre (Tabla-6). En consecuencia, se propone que la respuesta sigmoidea de

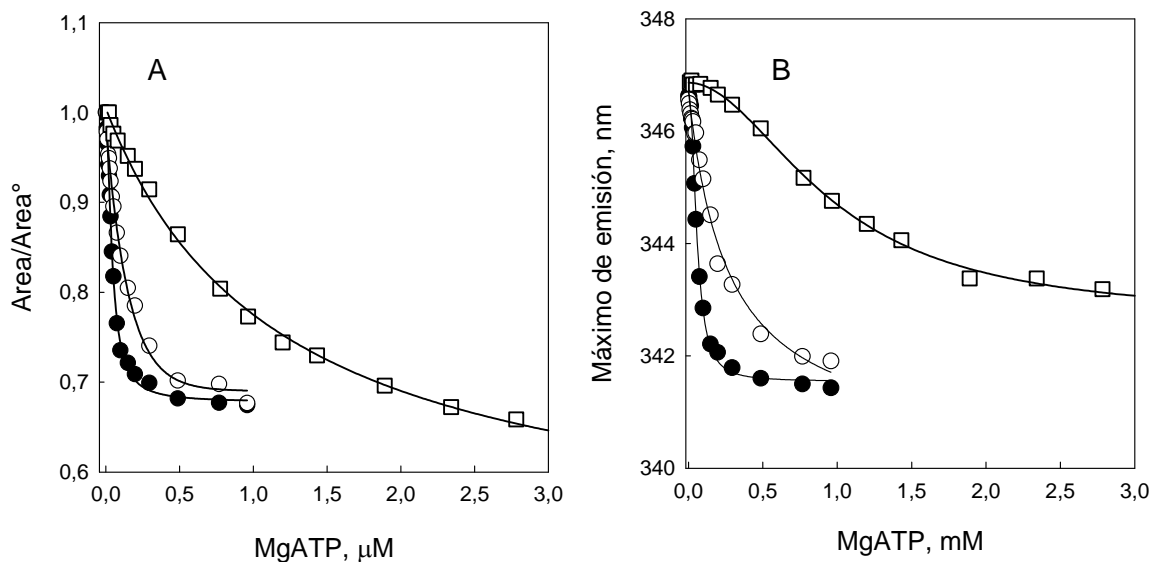


Figura 28. Cambios de la fluorescencia intrínseca en estado estacionario del Trp-88 en función de la concentración de MgATP. En el panel A se compara la disminución del área de emisión del Trp-88 en función de la concentración MgATP calculada entre 305 y 480 nm utilizando el programa Grams. Los resultados se expresan en relación al área de emisión obtenida en ausencia de MgATP (Área°) medidos para la enzima silvestre (●), mutante Y306A (○) y mutante L307A (□). En el panel B se muestran los cambios en el máximo de emisión calculados a partir de un ajuste a función de distribución (Log-normal) de los espectros de emisión obtenidos para cada concentración de MgATP. El código de símbolos corresponde al descrito en el panel A. Las mediciones se hicieron a 25 °C en un espectrofotómetro Shimadzu RF-5301 utilizando una concentración de proteína de 3.3 μM.

Tabla 6. Constantes de disociación y número de Hill (n_H) obtenidos a partir del cambio del área de emisión del Trp-88 inducido por MgATP.

| | Silvestre | Y306A | L307A |
|--------------------------|-----------|-------|-------|
| $^aK_{0,5}, \mu\text{M}$ | 43 | 127 | 1200 |
| an_H | 1,6 | 1,0 | 1,1 |

^aValores obtenidos ajustando la disminución del área de emisión en función de la concentración de MgATP a la ecuación de Hill.

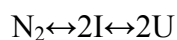
la enzima silvestre se debe a que la tetramerización previene la acumulación del dímero unido a MgATP.

DISCUSIÓN.

I. INTERFAZ MONÓMERO-MONÓMERO DEL DÍMERO SILVESTRE

1. Modelo termodinámico para el desplegamiento del dímero silvestre.

Experimentos de sedimentación en gradiente de sacarosa (Kotlarz y Buc, 1981; Guixé y Babul, 1988), exclusión molecular (Cabrera y col., 2002) y dispersión de rayos X en ángulo corto (Cabrera y col., 2003) indican que en ausencia de MgATP el estado nativo de la Pfk-2 de *E. coli* corresponde a un dímero en solución (N_2). El tratamiento con GdnHCl de esta especie produjo dos transiciones sigmoideas que se explican satisfactoriamente por el modelo



Los cambios conformacionales asignados a la transición $N_2 \leftrightarrow 2I$ involucran la disociación y la pérdida concertada de la actividad enzimática, el ambiente nativo alrededor del Trp-88 y cerca del 70 % de la estructura secundaria del dímero nativo. Por otra parte, experimentos de cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz permitieron determinar que el monómero disociado por la acción del GdnHCl presenta un radio hidrodinámico de 36 Å, es decir 2 Å mayor al calculado para el dímero nativo y ~ 12 Å mayor al calculado para un monómero globular de 33 KDa (25 Å, según Uversky, 1993). Dado que estos cambios conformacionales pueden ser descritos por una sola transición que es sensible a la concentración de proteína, la disociación de la enzima silvestre es un proceso del tipo “todo o nada” entre el dímero nativo y un intermediario que presenta un bajo contenido de estructura secundaria y un volumen hidrodinámico

similar al dímero. En consecuencia, monómeros disociados con características similares a los observados en la estructura del dímero son estructuras inestables y por tanto no pobladas en presencia de GdnHCl.

La estructura cristalográfica de la Pfk-2 muestra que el homodímero conforma la unidad asimétrica del cristal (Cabrera y col., 2006) el cual es creado a través de una interfaz estructuralmente conservada denominada β -*clasp* (Sigrell y col., 1998). Este plegamiento está formado por la interacción de hojas- β que se originan de cada subunidad y que se empaquetan casi ortogonalmente formando un barril aplanado en cuyo interior predominan interacciones hidrofóbicas. Estas características son similares a plegamientos tipo barril- β descritos en proteínas conformadas por una sola cadena polipeptídica como fue reconocido tempranamente para la interfaz de asociación β -*clasp* descrita para la riboquinasa (Sigrell y col., 1998). Estas observaciones sugieren que la interfaz de la Pfk-2 puede ser considerada como un dominio “*per se*” y por lo tanto su disociación debe estar acoplada al desplegamiento de las cadenas polipeptídicas que lo conforman. Esta situación ha sido estudiada en dímeros pequeños como el represor ARC y el factor de inversión FIS los cuales son creados por un único centro hidrofóbico conformado por ambas cadenas polipeptídicas (Bowie y Sauer, 1989; Topping y col., 2004). De igual manera que lo observado en proteínas monoméricas estabilizadas por un centro hidrofóbico, el desplegamiento de estos dímeros puede ser modelado con un mecanismo de dos estados, $N_2 \leftrightarrow 2U$, en donde el evento de disociación no pudo ser distinguido de la pérdida completa de la estructura secundaria de las subunidades (Neet y Timm, 1994; Tsai y Nussinov, 1997). La presencia de monómeros desestructurados y no compactos en el desplegamiento al equilibrio de la Pfk-2 concuerda con las

características estructurales descritas para este tipo de interfaz. Sin embargo, el bajo contenido de estructura residual que presenta el intermediario monomérico indica que la pérdida de la conformación nativa de cada subunidad no se restringe exclusivamente al dominio de asociación *β -clasp*.

Aparte del dominio de asociación *β -clasp*, cada subunidad de la Pfk-2 está compuesta por un dominio adicional formado por interacciones intramoleculares cuyo plegamiento tridimensional es común a todos los miembros de la superfamilia de la riboquinasa (Zhang y col., 2004). Esta organización estructural puede, potencialmente, dar origen a subunidades separadas que preserven sus contactos intramoleculares, siempre y cuando estos contactos conformen un dominio con estabilidad diferente e independiente del dominio de asociación o dominio *β -clasp* (Freire y col., 1992; Privalov, 1996).

2. Características estructurales del monómero silvestre obtenido en presencia de GdnHCl.

Dado que el intermediario se caracterizó utilizando técnicas espectroscópicas de baja resolución, no es posible determinar si su estructura residual corresponde a regiones o dominios del monómero que preserven una configuración nativa. En ciertas condiciones (GdnHCl, pH, temperatura) las proteínas pueden exhibir un estado colapsado conocido como glóbulo fundido (Kuwanjima, 1989) el cual ha sido descrito como una tercera fase en la cual un polipéptido en solución puede existir (Pande y Rokhsar, 1998) y por lo tanto su conformación no debe ser confundida con el desplegamiento de dominios independientes dentro de una proteína. Diversos estudios

han caracterizado al glóbulo fundido como una especie con contenido variable pero elevado de estructura secundaria (mayor al 70 %) y un empacamiento no nativo de las cadenas laterales. Estas características se traducen en un incremento moderado del volumen del polipéptido en relación al estado nativo pero manteniendo una “globularidad” y compactación similar al estado nativo (Uversky, 2002a y b; Uversky y Fink, 2002). De acuerdo a los experimentos de cromatografía de exclusión en gel y mediciones de dispersión dinámica de luz, el radio hidrodinámico del intermediario es de 36 Å, alrededor de 13 Å mayor que el predicho para un monómero compacto de 33 KDa (Uversky, 1993). Esta diferencia representa un incremento mayor al 15 % del volumen informado para un polipéptido en una configuración tipo glóbulo fundido (Uversky, 2002 a y b). El carácter desestructurado del intermediario monomérico también es reflejado por el valor m calculado para la transición $N_2 \leftrightarrow 2I$. El valor m es un valor experimental que corresponde a la variación de la energía libre con la concentración de agente caotrópico, lo cual es representado gráficamente por la pendiente que presentan las transiciones obtenidas en función de la concentración de GdnHCl. Teóricamente, según el modelo de transferencia de Tanford (Tanford, 1970), el cual ha sido actualizado por Auton y Bolen (2005), el valor m es proporcional al cambio de la superficie expuesta al solvente que ocurre producto de la reacción de desplegamiento. De esta forma, proteínas que exponen una mayor superficie al ser desplegadas presentan transiciones con mayor pendiente y valores m más elevados. Esta situación fue reconocida por Myers y col, (1995) reportando una correlación lineal entre el valor m y la superficie expuesta al solvente (ΔASA) de varias proteínas. Aplicando la correlación encontrada por Myers y suponiendo el completo desplegamiento del dímero

de la Pfk-2, el valor de ΔASA calculado a partir de la estructura de la enzima es 76.000 \AA^2 , lo que a su vez corresponde a un valor m de $\sim 18 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Los valores m experimentales encontrados para la transición $N_2 \leftrightarrow 2I$ e $I \leftrightarrow U$ fueron 17 ± 2 y $1,5 \text{ kcal x mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ respectivamente. Así, la comparación del valor m teórico con el valor experimental obtenido para la transición $N_2 \leftrightarrow 2I$ sugiere que casi toda la exposición al solvente esperada para el completo desplegamiento de la Pfk-2 ocurre en la transición $N_2 \leftrightarrow 2I$, ya que su valor m experimental es similar al valor teórico calculado para el desplegamiento total de la proteína.

Por lo tanto, el bajo contenido de estructura secundaria, la gran expansión del volumen hidrodinámico y la exposición casi completa al solvente de las cadenas laterales escondidas en el dímero, indican que una gran parte de los contactos nativos de cada monómero están en una conformación desestructurada en el estado intermediario. En consecuencia, la disociación de la Pfk-2 inducida por GdnHCl se caracteriza como un proceso concertado que ocurre con la pérdida de buena parte de los contactos intermoleculares e intramoleculares de las subunidades.

Estas características impiden asignar la transición $N_2 \leftrightarrow 2I$ exclusivamente al desplegamiento de la interfaz β -*clasp*, dificultando la evaluación de la contribución de los contactos monómero-monómero a la estructura del dímero a partir de las transiciones inducidas por GdnHCl. Por lo tanto se realizó una mutación puntual en el dominio de asociación de la Pfk-2 para desestabilizar selectivamente la interfaz β -*clasp* y evaluar la conformación del monómero en ausencia de GdnHCl.

II. PERTURBACIÓN DE LA INTERFAZ MONÓMERO-MONÓMERO (β -clasp) MEDIANTE MUTACIÓN SITIO DIRIGIDA.

1. Estabilidad del dímero obtenido mediante mutagénesis sitio dirigida.

El efecto hidrofóbico (el proceso de deshidratación de un compuesto apolar y su escondimiento en el interior hidrofóbico de una proteína) se consideran como la mayor contribución energética que maneja el plegamiento de las proteínas (Dill, 1990). Estudios de transferencia de compuestos apolares desde una fase acuosa hacia una fase que simula el ambiente hidrofóbico del centro de una proteína, predicen que el reemplazo de leucina por alanina (L→A) en centros hidrofóbicos desestabiliza el estado nativo en al menos 1,9 kcal/mol (ver referencias en Eriksson y col., 1992). En la Pfk-2, la cadena lateral de L93 es parte de un grupo de aminoácidos apolares que conforman el centro hidrofóbico de su interfaz. En consecuencia, se espera que su reemplazo por alanina disminuya la estabilidad del dímero nativo en alrededor de 4 kcal/mol (1,9 kcal/mol por cada subunidad).

El reemplazo de L93 por alanina produjo un dímero más inestable que el dímero silvestre ya que, comparadas con la enzima silvestre, las subunidades mutadas se observan como monómeros a concentraciones elevadas de proteína. En efecto, en el caso de la enzima silvestre sólo ha sido posible observar las subunidades separadas mediante la acción de agentes caotrópicos. Tomando la actividad enzimática de la mutante como un índice del estado dimérico (y su ausencia como un índice de la presencia de monómeros), y suponiendo un modelo de dos estados entre el dímero y el monómero mutante, la reactivación de la mutante obtenida en función de la concentración de varias

sales permitió un cálculo aproximado para la estabilidad del dímero mutante de $5,5 \pm 0,4$ kcal/mol.

Sin embargo este valor fue obtenido en base a algunas suposiciones que no han sido corroboradas experimentalmente y, por lo tanto, debe ser tomado con cautela. La estabilización de proteínas inducida por sales puede ser explicada por múltiples mecanismos que pueden operar combinadamente según el intervalo de la concentración de sal utilizada y la naturaleza del soluto (proteína) y la de la sal utilizada. Los mecanismos más comunes descritos para la estabilización de proteínas por sal incluyen: estabilización por unión específica a sitios presentes en la estructura, eliminación de interacciones electrostáticas desfavorables y efectos que cambian las propiedades del solvente.

Varias propiedades de las soluciones acuosas siguen la serie de Hofmeister, la cual se construye en términos de su capacidad para precipitar proteínas (efecto “salting out”, Hofmeister, 1888). En paralelo con la serie de Hofmeister, el incremento de la concentración de sales resulta en un incremento de la tensión superficial del agua (Jarvis y Scherman, 1968) y una disminución de la capacidad de solvatar compuestos apolares como el benceno (Baldwin, 1996). Esto ha sido interpretado como una modulación del efecto hidrofóbico, lo cual ha sido exitosamente explicado por algunos modelos de la estructura del agua (Hribar y col., 2002). De esta forma, el efecto Hofmeister o la capacidad de reducir la solubilidad de compuestos apolares puede distinguirse por dos propiedades: un incremento lineal de la energía de estabilización de las proteínas con la concentración de sal disuelta (Baldwin, 1996) y el ordenamiento de diversas sales de acuerdo a su “capacidad” de estabilizar las proteínas. La primera característica es una

condición inherente al modelo de variación lineal de energía libre (LEM) utilizado para calcular la estabilidad del dímero mutante en función de la concentración de sal. Esta aproximación produce valores de energía de estabilidad ($\Delta G_{N2 \rightarrow 2M}$) algo independientes de la sal utilizada (Na_2SO_4 , 6 kcal/mol y NaCl , CH_3COONa y KCl , 5,6 kcal/mol) sugiriendo que la estabilidad, independientemente de la sal utilizada, se logra por un incremento lineal de la estabilidad del dímero y por lo tanto a través de un mecanismo común para todas las sales. En el caso de obtener estabilidades diferentes para cada sal utilizada, podría indicar la presencia de sitios específicos para los iones utilizados o la acumulación de un intermediario a concentraciones intermedias de sal. En este sentido KF y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ producen valores de estabilidad substancialmente diferentes (4,7 kcal/mol y 6,9 kcal/mol respectivamente) y por lo tanto deben ser analizados en más detalle. El efecto de la modulación del efecto hidrofóbico debiera también predecir las sales que requieren menor concentración para estabilizar el dímero mutante. Entre las sales estudiadas en este trabajo, los aniones que desfavorecen más eficientemente la solubilidad de compuestos apolares son ordenados de mayor a menor efectividad, (Baldwin, 1996): $\text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^-$ y en los cationes $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$. Tomando como índice de eficiencia la concentración de sal a la cual se observa la recuperación de la mitad de la actividad enzimática, se obtiene el siguiente orden: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \sim \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{NaCl} > \text{CH}_3\text{COONa} > \text{KF} > \text{KCl}$. Así, entre las sales probadas, el orden de los aniones es predicho adecuadamente por la serie de solubilidad de compuestos apolares. No obstante, la excepción la constituye NaCl en donde el catión Na^+ parece ser dominante ya que este es más efectivo que K^+ . La buena correlación experimental que existe con la capacidad de las sales para disminuir la solubilidad de

compuestos apolares, conjuntamente con la variación lineal de la estabilidad predicha por el modelo utilizado, indican que el aumento de estabilidad del dímero puede ser explicado por un incremento del efecto hidrofóbico del solvente inducido por las diversas sales utilizadas. En este sentido, la estructura de la Pfk-2 predice que la disociación de la interfaz monómero-monómero debe exponer al menos una superficie apolar de 1.880 \AA^2 al solvente (980 \AA^2 por cada subunidad), evento desfavorecido al disminuir la capacidad de solvatación del agua inducida por las diversas sales utilizadas.

La estabilidad calculada para la mutante L93A, respecto a su subunidad disociada, corresponde a una disminución de 7 kcal/mol respecto a la estabilidad calculada para el dímero silvestre en relación al monómero obtenido en presencia de GdnHCl. En consecuencia, se deduce que cada subunidad es desestabilizada por 3,5 kcal/mol, un valor mayor en comparación a las 1,9 kcal/mol predichas por los estudios de transferencia de compuestos apolares (ver referencias en Eriksson y col., 1992). Cabe destacar, que las características estructurales de la mutante en condiciones monoméricas fueron diferentes a las características del intermediario monomérico obtenido en presencia de GdnHCl y por lo tanto la comparación se ha realizado con estados de referencia que presentan conformaciones diferentes.

2. Características estructurales y estabilidad del monómero obtenido mediante mutación sitio dirigida.

En la estructura de la Pfk-2 obtenida en presencia de MgATP, el único Trp (Trp-88) presente en cada subunidad está localizado en la interfaz monómero-monómero y forma una extensa red de contactos con átomos de su propia subunidad y de la

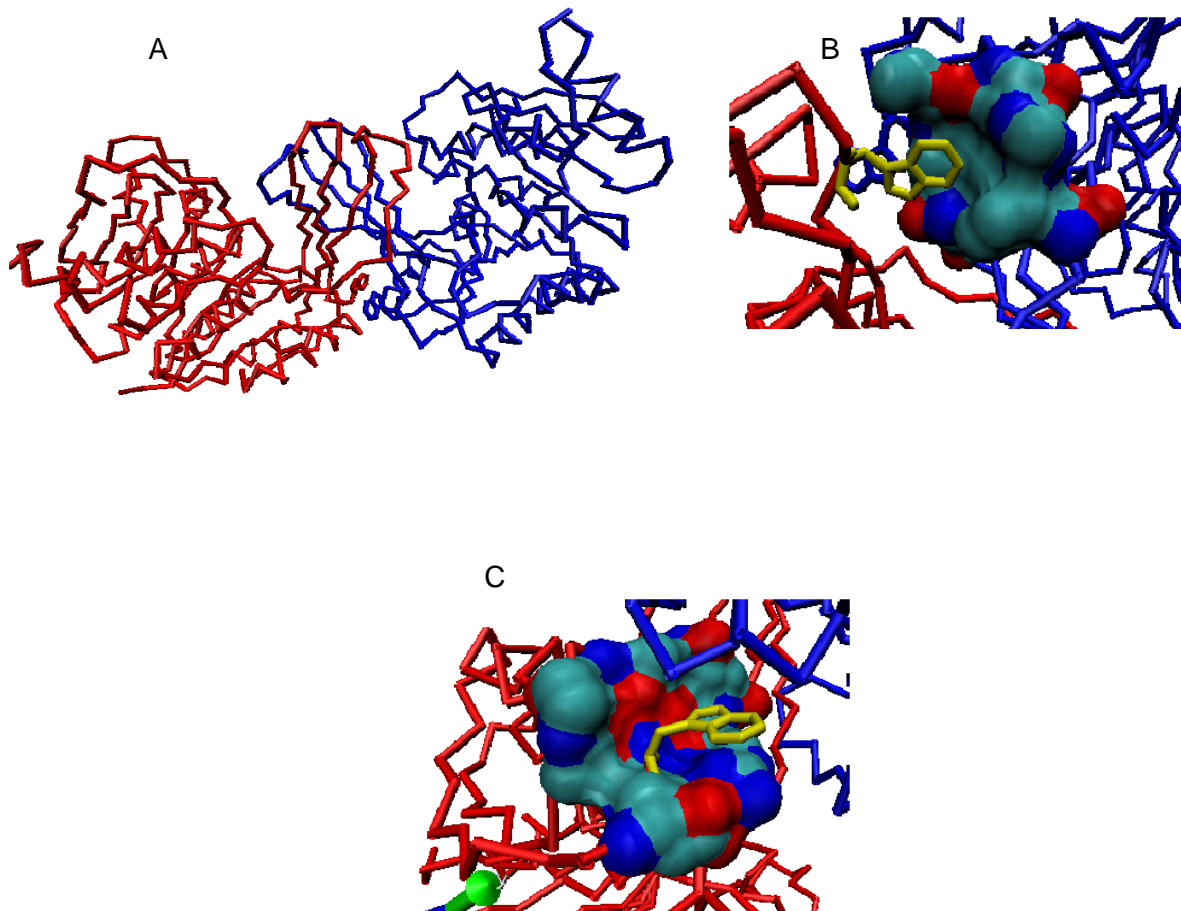


Figura 29. Localización del Trp-88 en la estructura del dímero de la Pfk-2 obtenida en presencia de MgATP. A. La estructura del dímero se muestra como el esqueleto carbonado (carbono α) y cada subunidad aparece en rojo y en azul. La cadena lateral del Trp-88 se ubica en el fondo de cada “bisagra” que conecta la cubierta del sitio activo con el dominio mayor de la enzima. B. Átomos de la subunidad adyacente, presentes a menos de 4 Å del anillo indólico del Trp-88. C. Átomos pertenecientes a la cadena a la subunidad del Trp-88 presentes a menos de 4 Å del anillo indólico. La superficie se coloreó según el tipo de átomos: carbono (verde), nitrógeno (rojo) y oxígeno (azul). El área escondida por el anillo indólico del Trp-88 se calculó con el servidor Pissa (Krissinel y Henrick, 2007).

subunidad adyacente (Figura 29). Cada anillo indólico esconde una superficie de 127 \AA^2 , principalmente a través de de cadenas laterales apolares presentes en la subunidad adyacente (Figura 29 B). En cambio, el entorno del anillo del Trp-88 con las cadenas laterales de su propia subunidad es principalmente polar (Figura 29 C). Este entorno sugiere que la mera disociación del dímero puede aumentar la polaridad del Trp-88 y por lo tanto disminuir la intensidad de su fluorescencia. Así, el apagamiento de la fluorescencia observado para el estado disociado de la mutante (80 % respecto al dímero silvestre), concuerda con el entorno y la ubicación del Trp-88 en la estructura de la Pfk-2. Sin embargo, el hecho de que exista sólo un Trp-88 con una ubicación restringida a la superficie de interacción de los monómeros, hace de esta cadena lateral una mala sonda para determinar cambios conformacionales globales producidos por la disociación de sus subunidades. Este argumento también puede ser aplicado a la disminución de la fluorescencia inducida por GdnHCl, pero confirma que durante el desplegamiento de la proteína ocurre la disociación del dímero ya que la fluorescencia decae junto con la disminución de la estructura secundaria de la proteína.

En condiciones en que la mutante L93A es un monómero, se observa una importante disminución de la estructura secundaria respecto al dímero silvestre (40 % de la intensidad a 220 nm), aunque al utilizar fructosa-6-P para estabilizar el estado dimérico de la mutante, la recuperación del contenido de estructura secundaria fue solo parcial respecto al dímero silvestre. Sin embargo y, a pesar que el contenido de estructura secundaria no puede ser estrictamente comparado con la enzima silvestre, es claro que el contenido de estructura secundaria del dímero mutante disminuye luego de su disociación. Esta observación es coherente con la hipótesis de que la interfaz *β -clasp*

de la Pfk-2 se comporta como un dominio con un centro hidrofóbico y, como tal, su disociación provoca al menos la pérdida de los elementos de estructura secundaria que lo conforman. En este escenario, es improbable que la actividad enzimática medida en condiciones que favorecen el estado disociado del dímero mutante (3 % de la actividad de la enzima silvestre) corresponda a las subunidades separadas debido que las cadenas constituyentes de la interfaz también representan la cubierta del sitio activo de la enzima.

Estos resultados indican que la conformación del monómero mutante obtenida en ausencia de GdnHCl se aproxima a las características descritas para el intermediario monomérico silvestre obtenido en presencia de GdnHCl, ya que este último presenta un bajo contenido de estructura secundaria y un pobre rendimiento cuántico del Trp-88. Sin embargo, la mutante en condiciones monoméricas es claramente más compacta que el monómero obtenido por la acción de GdnHCl, presentando un radio hidrodinámico 6 a 7 Å menor que el intermediario obtenido por la acción de agentes caotrópicos. Además, el tratamiento con GdnHCl de la mutante en condiciones que favorecen el monómero produjo una disminución del contenido de estructura secundaria en el mismo intervalo de concentración de GdnHCl en el que el dímero silvestre sufre la disociación y desplegamiento concertado que origina el intermediario monomérico de 36 Å. De esta forma, las características estructurales de la mutante monomérica se aproximan a la clásica descripción del glóbulo fundido, una especie relativamente compacta con un importante contenido de estructura secundaria respecto a su configuración desplegada (Arai y Kuwajima 2000; Uversky y Fink, 2002; Uversky, 2002_a). Como se mencionó anteriormente, un monómero tipo glóbulo fundido está ausente o pobremente

representado al desplegar el dímero silvestre con GdnHCl, lo que indica que este tipo de conformación es inestable y por lo tanto incapaz de originar transiciones sigmoides frente a una perturbación del sistema. En coherencia con esta predicción, la pérdida del contenido de estructura secundaria de la mutante en condiciones monoméricas no origina una transición sigmoidea frente a la acción del GdnHCl, lo que sí sucede con el dímero silvestre. Un comportamiento similar ocurre cuando se compara el desplegamiento térmico de ambas enzimas. El desplegamiento térmico de la mutante muestra una disminución lineal de la señal de dicroísmo que se superpone, a elevadas temperaturas, con la postransición correspondiente a la señal del monómero desplegado de la enzima silvestre. La transición sigmoidea de la mutante puede ser recuperada sólo en presencia de fructosa-6-P, condición en la cual ésta aparece como un dímero activo.

Transformaciones paulatinas o de baja sigmoidicidad, denominadas transiciones de segundo orden, se han atribuido a cambios continuos o graduales que se suceden entre conformaciones separadas por una pequeña o nula barrera energética (Dill, 2002). Este tipo de transiciones ha sido descrita para varios intermediarios obtenidos en diferentes condiciones de pH, temperatura y agentes caotrópicos. Los ejemplos más estudiados corresponden al intermediario ácido de la proteína α -LA, ApoMb, la subunidad α de la triptófano sintetasa y la deshidrofolato reductasa, casos que han sido revisados detalladamente por Arai y Kuwajima (2000). La caracterización de la estructura de estos intermediarios mediante técnicas de *NMR (Nuclear magnetic resonance)*, *FRET (Fluorescence resonance energy transfer)*, han mostrado que el contenido de estructura secundaria residual proviene de agrupaciones de aminoácidos hidrofóbicos en conformaciones no nativas y también de elementos de estructura

secundaria presentes en una topología nativa. No obstante, aunque los detalles estructurales de estos intermediarios son variables y dependen de la estructura de cada proteína estudiada, un tema común es la ausencia del empacamiento correcto de las cadenas laterales (estructura terciaria). Intermediarios que retienen un mayor grado de interacciones terciarias nativas tienden a mostrar un mayor grado de sigmoidicidad en su desplegamiento (Wu y Kim, 1998; Song y col., 1998)

Sin embargo, a diferencia de los intermediarios caracterizados en condiciones no nativas, la conformación del monómero mutante ha sido caracterizada en condiciones que favorecen el estado nativo del dímero silvestre. Condiciones fuertemente desnaturantes inducen conformaciones del polipéptido que no son necesariamente preferidas en las condiciones que se favorece el plegamiento. Estudios de *FRET* realizados con proteínas que muestran un desplegamiento de dos estados ($N \leftrightarrow U$), indican que el volumen del estado desplegado, extrapolado a condiciones nativas, puede ser solo un 10 % mayor que el estado nativo de la proteína (Sherman y Haran, 2006) y estudios de *NMR* muestran que esta compactación se debe a una cantidad significativa de estructura ordenada respecto al estado desplegado obtenido en condiciones fuertemente desnaturantes. Por ejemplo, el estado desplegado del dominio N-terminal de la proteína *Drosophila drk* en condiciones nativas puede ser considerado como un pequeño número de conformaciones que comparten una topología en común organizada en torno a agrupamientos hidrofóbicos de cadenas apolares y giros del esqueleto de la cadena principal (Mok y col., 1999). Mayor y col. (2003) han caracterizado una versión desestabilizada de la proteína HD (mutante HD-L16A) como modelo para estudiar en condiciones nativas la conformación de su estado desplegado. En este caso, el estado

desplegado se caracterizó como un número reducido de conformaciones que comparten varios elementos de estructura secundaria en conformación nativa (Reiliga y col., 2005). En este sentido el estado desplegado de una cadena polipeptídica obtenido en condiciones nativas (las cuales son las condiciones relevantes *in vivo*) puede ser comprendido como un estado colapsado del polipéptido, con algunos elementos de estructura secundaria presentes en topología nativa altamente fluctuantes, pero sin las interacciones “específicas” de las cadenas laterales observadas en su conformación nativa.

Estas configuraciones comparten la propiedad de sufrir transiciones no sigmoideas cuando sus conformaciones son perturbadas por la adición de agentes caotrópicos o el incremento de la temperatura. De forma análoga, el desplegamiento térmico de la mutante L93A en condiciones monoméricas no genera cambios sigmoideos durante la pérdida de su estructura residual a pesar de que esta mutante presenta una conformación compacta de 29 Å. En este caso, la variación lineal de la señal dicróica de la mutante monomérica con la temperatura se superpone con la señal de dicroísmo correspondiente al monómero silvestre desplegado térmicamente. Dicho de otra forma, el monómero mutante presenta una conformación compacta que parece representar el estado desnaturalado de la enzima silvestre inducido por el incremento de la temperatura.

Este resultado es importante porque indica que la mayor parte de la estabilidad de las subunidades se logra sólo luego de formar el dominio de asociación y pone de manifiesto que la subunidad aislada presenta una estabilidad marginal, ya sea en presencia o en ausencia de GdnHCl.

Fuera de este trabajo, la piridoxal quinasa es el único miembro de la familia de riboquinasa (Li y col., 2002) cuya estabilidad ha sido estudiada (Lee y col., 2000, Pineda y Churchich, 1993). Esta enzima es activa como un monómero (Kwok y col., 1987) y su estructura carece de los elementos que dan origen a la cubierta del sitio activo de la Pfk-2 ya que estos son remplazados por un “loop” que sufre cambios conformacionales sensibles a la unión de sus ligandos (Li y col., 2004). De esta forma, cada monómero de la piridoxal quinasa retiene la topología del dominio mayor de la Pfk-2, ya que la superposición estructural del monómero de la piridoxal quinasa con el dominio mayor de la subunidad de la Pfk-2 produce un R.M.S 1,8 Å. Es interesante que, los valores de estabilidad de 2,4 kcal/mol para la piridoxal quinasa de cerebro de oveja (Pineda y Churchich, 1993) y 1,2 kcal/mol para la humana (Lee y col., 2000) corresponden al límite inferior de la estabilidad informada para proteínas globulares. Es notable que aunque el dominio $\alpha/\beta/\alpha$ de la piridoxal quinasa ha evolucionado como un monómero, esta estructura, presente en cada subunidad de la Pfk-2, también presenta una estabilidad marginal cuando las subunidades de la Pfk-2 son aisladas. Para afirmar que esta propiedad es una característica intrínseca del dominio que define a la familia de la riboquinasa se requiere de una caracterización más amplia de sus representantes.

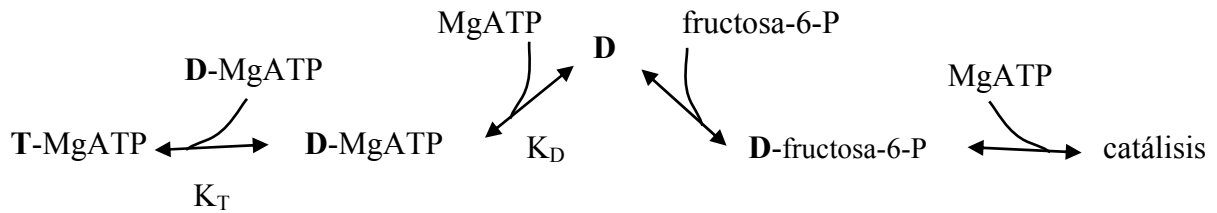
III PERTURBACIÓN DE LA INTERFAZ DÍMERO-DÍMERO MEDIANTE MUTACIONES SITIO DIRIGIDAS.

1. Perturbación de la interfaz dímero-dímero mediante mutagénesis sitio dirigida y su efecto en la inhibición alostérica por MgATP.

Se ha propuesto que la inhibición enzimática por MgATP opera a través de un mecanismo competitivo (Esquema 1, Cabrera, 2004). En este mecanismo, la unión de fructosa-6-P al sitio catalítico corresponde a un evento obligado en la ruta de catálisis ya que es requerida para la unión productiva de MgATP como lo dicta el mecanismo secuencial y ordenado predicho para la Pfk-2 (Campos y col., 1984). De esta forma, la unión anticipada de MgATP al sitio alostérico excluye la unión de fructosa-6-P al sitio activo (*y vice-versa*) impidiendo la formación del complejo catalítico. La prueba cinética detrás de este mecanismo es el aumento lineal de la K_{mapp} de fructosa-6-P que ocurre con una pequeña variación de velocidad máxima al incrementar la concentración MgATP (Cabrera, 2004). En este mecanismo, la transformación del dímero silvestre en tetrámero es una etapa que ha sido incluida en el mecanismo de inhibición de la Pfk-2 de *E. coli* debido que esta especie se observa en presencia del nucleótido y también en presencia de concentraciones de sustratos inhibitorias de la actividad enzimática (Guixé y Babul, 1988)

Experimentos de unión de MgATP, partiendo de la enzima libre, caracterizaron la formación del tetrámero como dos equilibrios secuenciales (Cabrera, 2004). En el Esquema 1 se muestra el primer equilibrio que depende de la constante K_d y describe la unión de MgATP al sitio alostérico. El segundo equilibrio corresponde a la asociación

de los dímeros que previamente han unido ATP y depende de la constante K_T . Sin embargo, los resultados de esta tesis indican que este último equilibrio es irrelevante para el mecanismo de inhibición de la actividad enzimática de la Pfk-2, al menos *in vitro*.



in vitro.

Esquema 1. Mecanismo de regulación alostérica propuesto para la Pfk-2.

MgATP y fructosa-6-P compiten por la unión al dímero (D). La unión anticipada de MgATP al sitio alostérico produce la formación del tetrámero T y evita la unión de fructosa-6-P y la catálisis. La constante de unión de ATP al sitio alostérico está comandada por la constante de disociación (K_D) y la formación de tetrámeros por la constante de disociación K_T .

Siguiendo el mecanismo competitivo (Esquema 1), la constante que lleva a la especie inactiva (el tetrámero) a partir del dímero corresponde al producto de las constantes microscópicas, K_D y K_T , y por ende una modificación de cualesquiera de estos eventos debiera modificar el patrón de inhibición de la Pfk-2. En oposición a esta hipótesis, los experimentos de cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz (Figura 26 y 27) mostraron que la mutante Y306A no es capaz de formar tetrámeros en presencia de MgATP aunque su caracterización cinética indica un

patrón de inhibición enzimática muy similar a la enzima silvestre (Figura 24 y 25). Es decir, a pesar de que la segunda parte del equilibrio está desfavorecida (K_T aumentada), la concentración de MgATP requerida para observar la inhibición enzimática no se modifica.

Por lo tanto, la unión de MgATP al sitio alostérico de la mutante Y306A puede ser descrita solo por el primer evento de unión del Esquema 1. Adicionalmente, y dado que los patrones cinéticos de inhibición de esta mutante son muy similares a la enzima silvestre, también se puede concluir que en esta última la formación de tetrámeros es un cambio conformacional desfavorecido en las condiciones de ensayo. Una explicación posible es que la constante de disociación K_T , que comanda la formación de tetrámeros en la enzima silvestre, es muy elevada respecto a la concentración de proteína total utilizada en el ensayo enzimático (concentraciones nanomolares). Así, la formación de tetrámeros presentes en las condiciones del ensayo enzimático de la enzima silvestre puede ser marginal, lo que resulta en un fenotipo muy similar cuando se compara con una enzima que no cambia su estado de agregación, como es el caso de la mutante Y306A. Bajo esta hipótesis, tanto en la enzima silvestre como la mutante, la inhibición alostérica está comandada principalmente por el primer equilibrio de unión del Esquema 1, es decir sólo por la constante de unión de MgATP al sitio alostérico, K_D .

Estos resultados indican que los cambios conformacionales responsables de la inhibición alostérica pueden ser explicados exclusivamente por cambios a nivel del dímero o a nivel de cada subunidad en esta mutante. Experimentos de dispersión de rayos X en ángulo corto, realizados con la enzima silvestre, mostraron que, aparte de la formación de tetrámeros, MgATP induce cambios conformacionales significativos en

cada subunidad que conforma el tetrámero. Estos cambios conformacionales fueron descritos como movimientos de cuerpo rígido que resultan en un cierre de la cubierta de cada sitio activo (Cabrera y col., 2003).

2. Correlaciones estructura-función de las mutantes de la región carboxilo terminal.

Durante el transcurso de esta tesis se obtuvo la estructura cristalográfica de la Pfk-2 en presencia de MgATP, que indica que la unidad biológica presente en el cristal corresponde a un homotetrámero. El análisis del cristal indicó la unidad asimétrica es un dímero (Cabrera y col., 2006) que interacciona con un homodímero adyacente a través de una interfaz que esconde una superficie de 2200 Å². Esta interacción genera un tetrámero cuyos sitios activos quedan enfrentados entre sí (Figura 30).

El extremo carboxilo terminal de cada subunidad corresponde a una hélice- α anfipática en la cual la cadena lateral de Y306 interactúa con el dímero adyacente escondiendo 110 Å² (Figura 30 A). Análisis sistemáticos realizados mediante el reemplazo por alanina de las cadenas laterales involucradas en la interfaz de diversos oligómeros, han mostrado que la energía de interacción de los oligómeros no está distribuida homogéneamente a lo largo de la interfaz, sino que se concentra en lugares específicos constituidos sólo por algunas cadenas laterales o “hot spot” (Clackson y Wells, 1995; DeLano, 2002). Para encontrar estos sitios en la interfaz del tetrámero se utilizó el servidor Robetta, del laboratorio de David Baker (Kortemme y col., 2004) el cual reemplaza sistemáticamente las cadenas laterales involucradas en la interfaz por

alanina y calcula la diferencia de energía libre entre la enzima silvestre y cada mutante generada *in silico*. Este análisis predice que el reemplazo de la cadena lateral de Y306

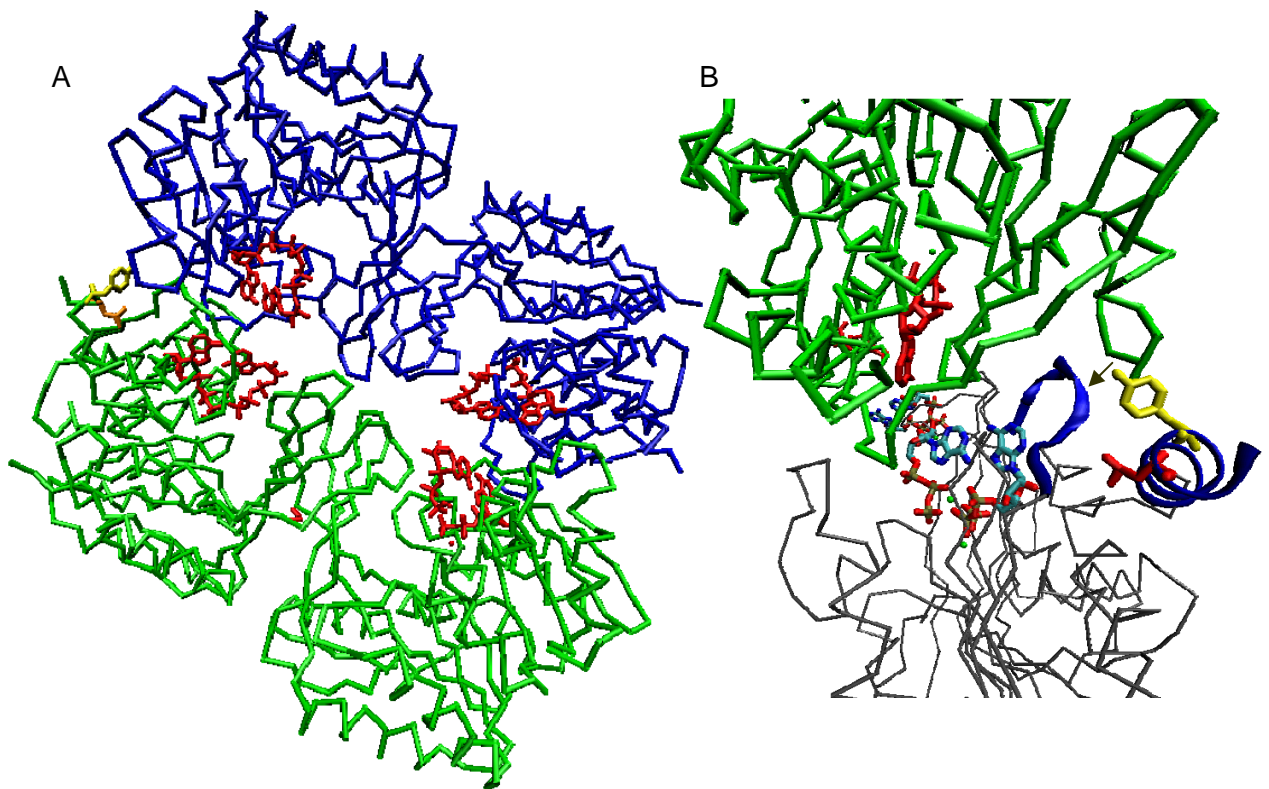


Figura 30. Estructura tetramérica del complejo MgATP-Pfk-2. A. La estructura del tetramero fue construida por operaciones de simetría de la subunidad asimétrica del cristal mediante el programa Swiss PdbViewer. En verde y en azul se muestra la cadena principal de ambos homodímeros, los cuales interactúan a través de una interfaz que resulta en el enfrentamiento de los cuatro sitios activos. En cada sitio activo se muestra la presencia de dos moléculas de ATP de un total de 8 moléculas dibujadas en rojo. La ubicación de las cadenas laterales correspondientes a Y306 y L307 se muestra en amarillo y naranja respectivamente. B. Detalle de la ubicación del extremo carboxilo terminal de la Pfk-2. En diagramas de cinta se muestra la hélice- α anfípática junto a sus cadenas laterales Y306 y L307 pintadas de amarillo y rojo respectivamente. Y306 se orienta hacia la interfaz del tetramero y contacta átomos del homodímero adyacente (en verde), en cambio L307 se orienta hacia el interior de la subunidad y se empaqueta con cadenas laterales de un “loop” conservado que posiciona la base del ATP catalítico indicada con una flecha.

por alanina desfavorece la formación de la interfaz dímero-dímero por más de 4,6 kcal/mol (1,15 kcal/mol subunidad). Dado que este análisis fue realizado a partir de la conformación de la Pfk-2 obtenida en presencia de MgATP, la disminución de 4,6 kcal/mol es equivalente a un aumento de más de tres órdenes de magnitud de K_T , la constante que comanda la asociación de dos dímeros que contienen ATP unido al sitio alostérico. Como este equilibrio corresponde a un proceso bimolecular, el aumento de K_T se traduce en un incremento en tres órdenes de magnitud en la concentración de proteína necesaria para observar la misma fracción de tetrámeros que en la enzima silvestre. Es notable que, aparte de Y306, el análisis *in silico* predice que sólo tres cadenas laterales de la interfaz dímero-dímero desfavorecen la formación de esta interfaz por más de 1 kcal/mol luego de su reemplazo por alanina (Q21, Q228 y V246).

La remoción de L307 (mutante Y306) o el reemplazo de su cadena lateral por una de menor volumen (mutante puntual L307A), también produce una falla en la formación del tetrámero y un incremento de la K_{mapp} para MgATP de tres órdenes de magnitud respecto a la enzima silvestre. Estas observaciones indican que esta región no sólo contiene determinantes estructurales para formación del tetrámero sino que además determinantes para la unión de MgATP al sitio catalítico.

La estructura de la Pfk-2 en presencia de MgATP muestra dos moléculas de ATP unidas a cada sitio activo en donde una de las moléculas de ATP aparece unida en una posición conservada que corresponde al sitio activo descrito para las quinasas de la familia de la Pfk-2 (Zhang y col., 2004). La hélice- α anfipática, que representa al carboxilo terminal de la Pfk-2, se ubica por detrás del bolsillo hidrofóbico estructuralmente conservado para la unión del nucleótido dador de fosfatos (Figura 30

B). La hélice- α anfipática finaliza con dos aminoácidos cuyas cadenas laterales están expuestas al solvente (S308 y R309) y su eliminación no afecta las características cinéticas de la Pfk-2 ni la capacidad para formar tetrámeros. En contraste, L307 es el primer residuo de aminoácido cuya cadena lateral se esconde y se empaca con cadenas laterales que conforman el sitio de unión del ATP catalítico. Específicamente, la cadena lateral de L307 se posiciona por detrás de las prolina 243 y 244, residuos que son parte de un lazo o “loop” encargado de formar el bolsillo hidrofóbico para la unión de la base del nucleótido (Figura 30 B). Se sabe que el reemplazo de cadenas laterales apolares voluminosas por cadenas de menor volumen genera reacomodos estructurales que tienden a cerrar la cavidad formada por la mutación (Eriksson y col., 1992). Por lo tanto se propone que el incremento de $\sim 2,5$ órdenes de magnitud en la K_{mapp} para MgATP ocurre por un reacomodo de aminoácidos que constituyen el bolsillo de unión de la base del ATP catalítico, en respuesta a la cavidad creada por la eliminación de L307 o el cambio de su cadena lateral por alanina (mutante L307A).

Estudios sistemáticos de remoción de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal también se han informado para adenosina quinasa de Hamster chino (Maj y col., 2000). La superposición estructural de la adenosina quinasa con la Pfk-2 muestra que la región C- terminal de la adenosina quinasa es observada como un lazo o “loop” y no como una estructura helicoidal, como en el caso de la Pfk-2. En este caso, la remoción de aminoácidos del extremo carboxilo terminal produce un incremento progresivo de K_{mapp} aparente para MgATP cuyo valor máximo reportado fue 0,5 órdenes de magnitud respecto a la enzima silvestre, un efecto moderado respecto a lo observado en la Pfk-2. Este cambio ocurre sin afectar mayormente la K_{mapp} para adenosina, el

sustrato aceptor de fosfato ubicado distante respecto al extremo final de la enzima. De forma análoga, la K_{mapp} para el aceptor de fosfato de la Pfk-2 (fructosa-6-P) tampoco se altera significativamente al remover aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la Pfk-2.

3. Aspectos relevantes para la regulación alostérica de la Pfk-2.

Debido a que la función catalítica de MgATP está condicionada a la unión previa de fructosa-6-P, Campos y col. (1984) y Guixé y col. (1998) han propuesto que la unión de MgATP al sitio alostérico de la Pfk-2 puede ser caracterizada mediante la disminución del área de fluorescencia del Trp-88 que se produce al titular la enzima libre con el nucleótido. Bajo esta hipótesis, la mutante Y306A puede ser utilizada como modelo para determinar la K_D de unión de MgATP al sitio alostérico en una enzima que presenta el mismo patrón de inhibición que la enzima silvestre pero sin la complicación del equilibrio adicional de formación de tetrámeros. A diferencia de la enzima silvestre, que muestra una saturación sigmoidea, la disminución del área de emisión del Trp-88 inducida por MgATP obedece a una función hiperbólica caracterizada por una K_D aparente de 130 μ M para MgATP la cual, según el mecanismo competitivo propuesto para la Pfk-2, debiera corresponder a la constante de disociación del MgATP que se une al sitio alostérico. Sin embargo, basándose en la estructura de la Pfk-2 obtenida en presencia de MgATP, la K_D obtenida por medidas de fluorescencia puede ser función de un equilibrio más complejo debido a que dos moléculas de MgATP aparecen unidas en la estructura de la Pfk-2 (Figura 31 A). Una de estas moléculas ha sido referida como el MgATP catalítico, ya que su ubicación se correlaciona con la posición conservada

respecto a los representantes de la familia de la riboquinasa (Zhang y col., 2004). Por otra parte, la disposición de la segunda molécula de MgATP sólo ha sido observada en el caso de la Pfk-2 y su ubicación puede ser correlacionada con la inhibición de la actividad enzimática inducida por MgATP. Como se muestra en la Figura 31A, la segunda molécula de MgATP aparece en dos conformaciones provocadas por la rotación de su base aromática. En una conformación la base forma puentes de hidrógeno con la base del MgATP presente en la posición catalítica y, en la posición alternativa, la base se apila contra el anillo aromático de Y23. En coherencia con el papel regulatorio de esta molécula de MgATP, estudios previos de este laboratorio muestran que el reemplazo de Y23 por aspártico produce una mutante insensible a la inhibición por MgATP con valores de K_{mapp} y k_{cat} similar a la enzima silvestre (Guixé y Babul, 1985). De esta forma, la ubicación del MgATP no conservado sugiere que su unión es necesaria para la inhibición enzimática y su presencia concuerda con un sitio alostérico propuesto para esta enzima.

La saturación hiperbólica obtenida para MgATP en el caso de Y306A indica *a priori* la presencia de un solo sitio para el nucleótido o varios sitios independientes caracterizados por una constante de disociación de 130 μ M. Este valor es elevado respecto a la K_{mapp} para MgATP obtenida en presencia de fructosa-6-P 1 mM (16 μ M) sugiriendo que la fluorescencia detecta un sitio diferente al sitio catalítico. Esta situación concuerda con el mecanismo de inhibición competitivo del Esquema 1, que predice la unión de ATP en un sitio diferente al catalítico en ausencia de fructosa-6-P.

Sin embargo, los grupos fosfato γ y β de ambos ATP interactúan entre sí a través de un átomo de Mg^{+2} lo cual implica que la unión del ATP inhibitorio no es

independiente de la unión del ATP catalítico (Figura 31 B). Esta situación sugiere que, en respuesta a la unión de ATP, el cambio en las propiedades fluorescentes del Trp-88 podría estar dada por dos eventos de unión: la unión del ATP catalítico y la unión del ATP alostérico. En este sentido, junto con la caída de la fluorescencia intrínseca, MgATP induce un corrimiento de 347 hasta 341 nm del máximo de emisión del Trp-88. Tomando este parámetro como índice para calcular la fracción de ATP unido, las constantes de disociación aparentes obtenidas para la enzima silvestre y las mutantes Y306A y L307A son más elevadas que las calculadas a partir de la variación del área de fluorescencia intrínseca medida en función de la concentración de MgATP (observaciones del autor). Incluso, en el caso de la mutante L307A, cuya función de saturación resulta ser hiperbólica al utilizar el área de fluorescencia, el corrimiento del máximo de emisión describe una función claramente sigmoidea. Estos resultados parecen indicar la presencia de un sitio adicional de MgATP que modifica el máximo de emisión del Trp-88, independientemente del apagamiento de la fluorescencia. Sin embargo, la utilización del máximo de emisión como parámetro para determinar la fracción de un ligando unido depende de los rendimientos cuánticos de las especies presentes. Dicho de otra manera, sólo en el caso de que la especie unida y la especie libre presenten rendimientos cuánticos similares, la utilización de este parámetro es válida para calcular la fracción unida (Eftink, 1997). Claramente esta situación no ocurre en la Pfk-2 ya que la especie unida presenta un rendimiento cuántico menor que la especie libre y por ende su formación contribuye en menor medida al máximo de emisión observado a bajas concentraciones de MgATP. Este efecto puede provocar un

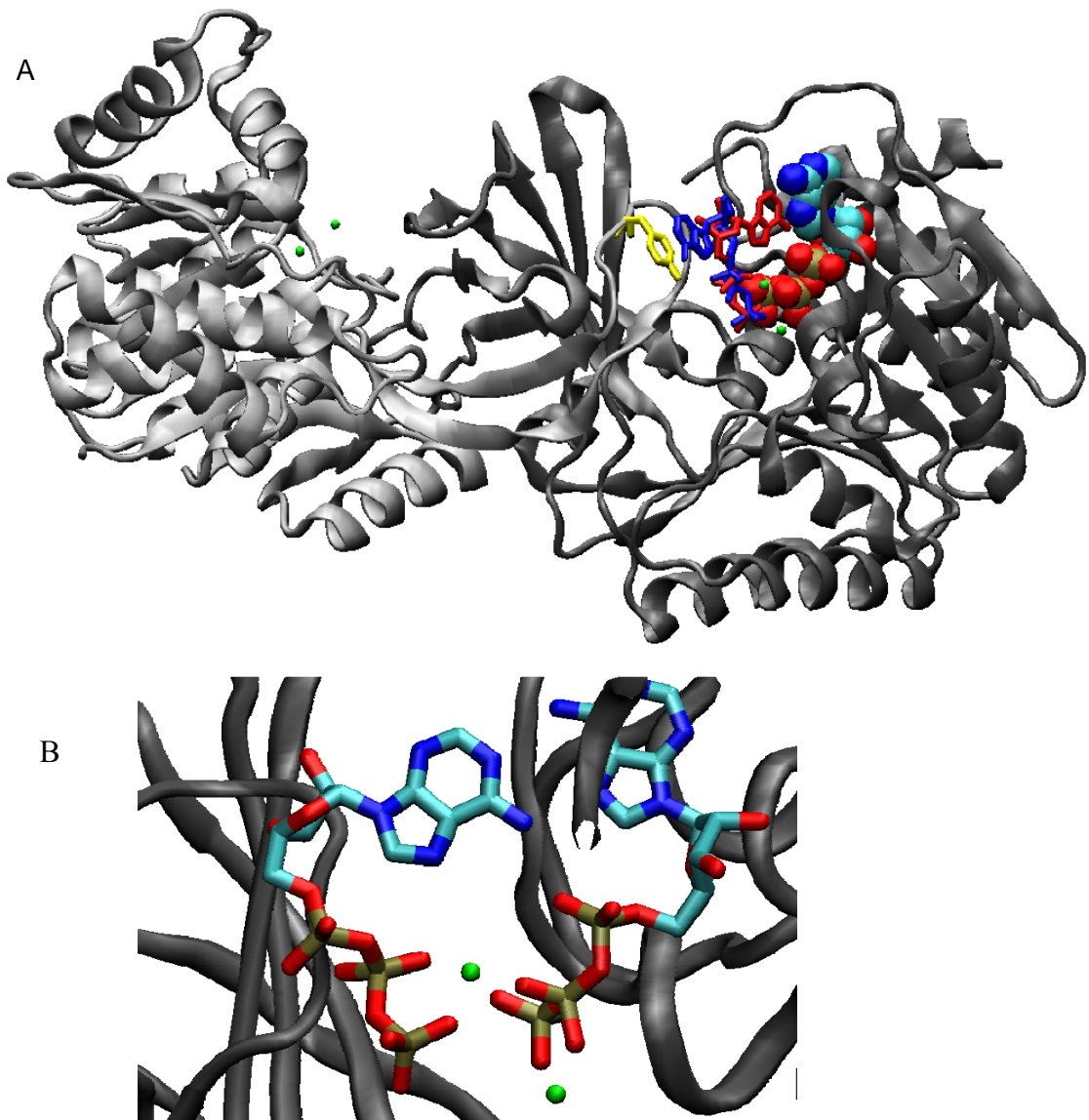


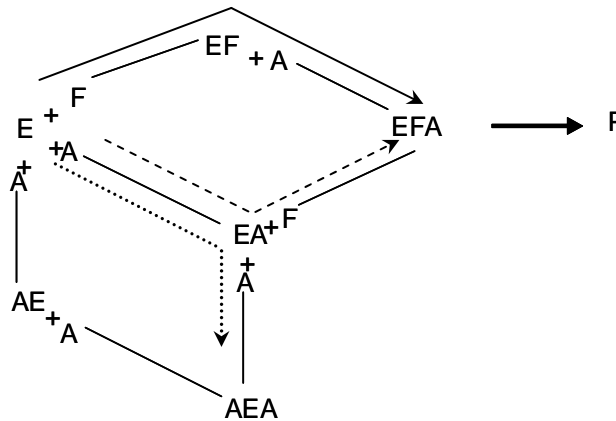
Figura 31. Ubicación del ATP y Mg^{+2} en la estructura de la Pfk-2. A. Se muestra el homodímero de la Pfk-2 dibujado en diagramas de cintas. En rojo y en azul se muestran las dos configuraciones descritas para las moléculas de ATP presentes en el cristal y que aparecen ubicadas en una posición no conservada respecto a la localización del ATP catalítico (mostrada como representación de sus radios de Van der Waals). La base de la molécula de ATP mostrada en rojo forma puentes de hidrógeno con la base del ATP catalítico y alternativamente puede ser encontrada en una interacción de apilamiento con la cadena lateral de tirosina 23 (en amarillo). B. Detalle de la coordinación entre los fosfatos γ y β del ATP catalítico (derecha) y el ATP que aparece en la posición no conservada (izquierda). Los átomos de Mg^{+2} se muestran en verde.

cambio menor en el cambio del máximo de emisión aparente y por lo tanto originar artefactos en la función de saturación observada. De esta forma, a partir de la función de saturación descrita por los estudios de fluorescencia, no es posible determinar si MgATP se une de manera secuencial como lo sugiere el cristal de la enzima. Esta situación debe ser dilucidada mediante técnicas que permitan cuantificar la estequiometría de unión del MgATP a la Pfk-2 debido a que la fluorescencia intrínseca depende la respuesta de la sonda a los distintos cambios conformacionales que puedan ocurrir en la enzima.

4. ¿Es compatible la estructura del complejo Pfk-2-MgATP con los antecedentes cinéticos de la Pfk-2?

Los resultados en esta tesis indican un papel secundario de la formación del tetrámero respecto a la inhibición enzimática inducida por MgATP. En coherencia con esta conclusión, los cambios conformacionales medidos por dispersión de rayos X en ángulo corto sugieren que la formación del tetrámero *per-se* no es suficiente para explicar la inhibición por sustrato ya que, aparte de la formación del tetrámero, cada subunidad sufre cambios conformacionales importantes en presencia de MgATP (Cabrera y col., 2003). De igual forma, los cambios conformacionales inducidos por MgATP y detectados por fluorescencia en estado estacionario, ocurren de igual forma si la formación del tetrámero es impedida (Figura 28). Por lo tanto, las interacciones relevantes para la inhibición enzimática podrían ocurrir a nivel del monómero o dímero. En relación a esto, la estructura cristalográfica muestra la presencia de dos moléculas de ATP en estrecho contacto entre sí (Figura 31 A), sugiriendo que interacciones locales en vez de las lejanas son las responsables de la inhibición de la actividad enzimática.

Suponiendo que la inhibición de la Pfk-2 ocurre a través de un mecanismo competitivo linear, se puede dibujar un mecanismo general considerando la especie ATP-ATP-Pfk-2 (observada en la estructura de la enzima) como un complejo de punto muerto que excluye la unión productiva de fructosa-6-P del sitio activo.



Esquema 2.

En el Esquema 2, la flecha continua representa un mecanismo secuencial ordenado reportado usando concentraciones de MgATP “no inhibitorias” (Campos y col., 1984). Aquí, el complejo fructosa-6-P-Pfk-2 (EF) es un intermediario obligatorio requerido para la formación del complejo catalítico EFA y la inhibición se origina por la unión equivocada de MgATP, la cual se representa por el complejo AEA. Sin embargo, la configuración de ambos ATP en la estructura sugiere que la formación del complejo AEA ocurre mediante un mecanismo secuencial y ordenado el cual involucra la unión previa de una molécula de ATP al sitio catalítico (flecha punteada en el Esquema 2). Esto es contradictorio con el mecanismo catalítico reportado para la Pfk-2 ya que la configuración observada en el cristal sugiere que MgATP puede unirse al sitio catalítico

en ausencia de fructosa-6-P. Junto con el mecanismo catalítico descrito para la enzima silvestre, Campos y col. (1984) también caracterizaron el mecanismo cinético de la mutante no inhibida Y23D. Aparte de la pérdida de la inhibición inducida por MgATP, el reemplazo de Y23 por Asp logra una inversión del mecanismo catalítico descrito para la enzima silvestre, ya que la mutante usa MgATP como primer sustrato. De esta forma, si la unión del ATP alostérico es impedida, el flujo catalítico es revertido a través de un complejo EA lo cual crea un potencial mecanismo al azar no descrito para la Pfk-2 (flecha segmentada y continua en Esquema 2). De acuerdo con esta hipótesis, experimentos de unión realizados mediante la determinación de cambios en la fluorescencia de la mutante no inhibida Y23D muestran que tanto fructosa-6-P como MgATP modifican el espectro de emisión de la proteína libre (observaciones del autor). Por lo tanto, es conveniente explicar la inhibición competitiva de MgATP en el contexto de un mecanismo al azar.

En un mecanismo al azar de adición de sustratos (en equilibrio rápido), la inhibición competitiva por un sustrato en particular (como la observada en la Pfk-2) requiere de la formación de un complejo entre la enzima y dos moléculas del sustrato inhibitorio (Segel, 1975^a). Dicho de otra forma, se requiere que la unión del sustrato inhibitorio al sitio catalítico no impida la subsecuente unión de una segunda molécula que produzca una conformación equivocada no competente con la catálisis. La generación de un complejo ternario inactivo con dos moléculas de sustratos unidas, es reminiscente de la inhibición por sustrato incompetitiva en enzimas de un solo sustrato (Cornish-Bowden, 1995).

En la Pfk-2, la observación de dos moléculas de ATP en cada sitio activo (complejo AEA), cumple con el requerimiento de un complejo ternario cuya formación es necesaria para la inhibición por sustrato en un mecanismo al azar.

Por otro lado, en un mecanismo ordenado y secuencial en donde fructosa-6-P es el primer sustrato en unirse a la enzima, no se requiere la unión de un segundo MgATP para explicar la inhibición competitiva inducida por MgATP. Si este fuera el caso, la unión equivocada de una molécula de ATP, ya sea en el sitio activo o alostérico, es suficiente para provocar el fenómeno de inhibición enzimática por elevadas concentraciones de MgATP (Segel, 1975^b).

CONCLUSIONES.

Interfaz monómero-monómero: La desestabilización del dímero con GdnHCl indica que el 70 % de la energía libre responsable de la estabilidad del homodímero (12 kcal/mol) está condicionada a la formación de la interfaz β -clasp entre sus subunidades. El 30 % restante corresponde a un valor de 2,6 kcal/mol asignado a la estabilidad de un monómero expandido con un contenido de estructura secundaria marginal respecto al dímero nativo. En ausencia de GdnHCl, las subunidades disociadas son más compactas y presentan un mayor contenido de estructura secundaria que el monómero expandido obtenido en presencia de GdnHCl, pero carecen de las interacciones cooperativas observadas luego de su asociación. Se concluye que la formación de la interfaz β -clasp es necesaria para establecer la mayoría de los contactos nativos que constituyen cada subunidad de la Pfk-2.

Interfaz dímero-dímero: Se concluye que los contactos que dan origen al tetrámero de la Pfk-2 no participan de los cambios conformacionales involucrados en la inhibición alostérica de la Pfk-2.

Proyecciones de la Tesis.

El modelo termodinámico obtenido para el desplegamiento de la Pfk-2 puede ser utilizado como base para estudios de estabilidad en otros miembros de la superfamilia de la riboquinasa. Estos estudios permitirán comprender cómo cambian o se conservan los determinantes estructurales que originan la estabilidad de un dominio conservado en el contexto de múltiples arquitecturas y estructuras cuaternarias.

Considerando el mecanismo de desplegamiento al equilibrio propuesto, es posible utilizarlo como un marco de trabajo para estudios cinéticos que, en conjunto con la estructura cristalográfica de la enzima, permitirán caracterizar las etapas limitantes y los intermediarios metaestables involucrados en la adquisición de la estructura nativa. También, el modelo de desplegamiento de la Pfk-2 puede ser utilizado como base experimental para llevar a cabo un análisis bioinformático de los determinantes estructurales de la estabilidad y el plegamiento de la enzima.

Durante la realización de los experimentos de desplegamiento inducidos por aumento de la temperatura, se observó que la Pfk-2 se despliega si ésta permanece a 3 °C por más de 24 h. Este fenómeno, predicho por las bases termodinámicas de la estabilidad de las proteínas, es raramente observado y por lo tanto poco estudiado. La caracterización de los estados no nativos obtenidos a bajas temperaturas y su comparación con los estados no nativos obtenidos a elevadas temperatura o en presencia de agentes caotrópicos, caracterizados en esta tesis, pueden ser útiles para comprender los estados no nativos que puede adoptar una cadena polipeptídica.

La mutante Y306A puede ser utilizada para derivar ecuaciones para modelar el mecanismo de inhibición alostérica de la Pfk-2 sin las complicaciones derivadas de la

formación del tetrámero y, además, para realizar estudios metabólicos con el fin de determinar si la formación de tetrámeros es relevante *in vivo*.

REFERENCIAS

Arai, M. y Kuwajima, K. (2000). Role of the molten globule state in protein folding. *Adv. Prot. Chem.* 53: 209-282.

Auton, M. y Bolen, D. W. (2005). Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 15065-15068.

Asgeirsson, B., Hauksson, J. B., y Gunnarsson, G. H. (2000) Dissociation and unfolding of cold-active alkaline phosphatase from atlantic cod in the presence of guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.* 267: 6403-6412.

Babul, J. (1978) Phosphofructokinases from *Escherichia coli*. Purification and characterization of the nonallosteric isozyme, *J. Biol. Chem.* 253: 4350-4355.

Baldwin, R. L. (1996). How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys. J.* 71: 2056-2063.

Benjwal, S., Verma, S., Rohm, K. H. y Gursky, O. (2006). Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. *Protein Sci.* 15: 635-639.

Bowie, J. U., y Sauer, R. T. (1989) Equilibrium dissociation and unfolding of the Arc repressor dimer, *Biochemistry* 28: 7139-7143.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bras, G. L., Teschner, W., Deville-Bonne, D. y Garel, J. R. (1989). Urea-induced inactivation, dissociation, and unfolding of the allosteric phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 28: 6836-6841.

Breg, J. N., van Opheusden, J. H., Burgering, M. J., Boelens, R. y Kaptein, R. (1990). Structure of Arc repressor in solution: evidence for a family of beta-sheet DNA-binding proteins. *Nature.* 346: 586-589.

Cabrera, R., Guixé, V., Alfaro, J., Rodríguez, P. H., y Babul, J. (2002) Ligand-dependent structural changes and limited proteolysis of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2, *Arch. Biochem. Biophys.* 406: 289-295.

Cabrera, R., Fischer, H., Trapani, S., Craievich, A. F., Garratt, R. C., Guixé, V., y Babul, J. (2003) Domain motions and quaternary packing of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli* studied by small angle x-ray scattering and homology modeling, *J. Biol. Chem.* 278: 12913-12919.

Cabrera, R. Control alostérico de la oligomerización y la inhibición de la actividad catalítica en la Fosfofructoquinasa-2 de *E. coli*. Consecuencias estructurales de la unión de ligandos. (Doctor en Ciencias, mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, 2004. 121 h.

Cabrera, R., Caniuguir, A., Ambrosio, A. L., Guixé, V., Garratt, R. C., y Babul, J. (2006) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the tetrameric form of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*, a member of the ribokinase family, *Acta. Cryst. F.* 62: 935-937.

Campos, G., Guixé, V. y Babul, J. (1984). Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme with a different mechanism. *J. Biol. Chem.* 259: 6147-6152.

Caniuguir, A., Cabrera, R., Baez, M., Vasquez, C. C., Babul, J. and Guixé, V. (2005). Role of Cys-295 on subunit interactions and allosteric regulation of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 579: 2313-2318.

Clackson, T. y Wells, J. A. (1995). A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* 267: 383-386.

Cornish-Bowden, A., (1995) Fundamentals of Enzyme Kinetics. Portland Press pp: 118.

Creighton, T. E. (1990). Protein folding. *Biochem. J.* 270: 1-16.

Daniel, E. y Weber, G. (1966). Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Fluorimetric titrations. *Biochemistry* 5: 1893-1900.

DeLano, W. L. (2002). Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 14-20.

Deville-Bonne, D., Le Bras, G., Teschner, W. y Garel, J. R. (1989). Ordered disruption of subunit interfaces during the stepwise reversible dissociation of *Escherichia coli* phosphofructokinase with KSCN. *Biochemistry* 28: 1917-1922.

Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29: 7133-7155.

Dill, K. A. y Shortle, D. (1991). Denatured states of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 795-825.

Dill, K. A.. (2002) Molecular driving forces. Oxford University Press pp:467-491

Eftink, M. R. (1997). Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods. Enzymol.* 278: 221-57.

Eriksson, A. E., Baase, W. A., Zhang, X. J., Heinz, D. W., Blaber, M., Baldwin, E. P. y Matthews, B. W. (1992). Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. *Science* 255: 178-183.

Fersht, A., (1998) Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding (Freeman, W. H., Ed) 2nd ed., pp 508-540.

Freire, E., Murphy, K. P., Sanchez-Ruiz, J. M., Galisteo, M. L. y Privalov, P. L. (1992). The molecular basis of cooperativity in protein folding. Thermodynamic dissection of interdomain interactions in phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 31: 250-256.

Guixé, V., y Babul, J. (1985) Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for MgATP, *J. Biol. Chem.* 260: 11001-11005.

Guixé, V., y Babul, J. (1988) Influence of ligands on the aggregation of the normal and mutant forms of phosphofructokinase-2 of *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.* 264: 519-524.

Guixé, V., Rodríguez, P. H., y Babul, J. (1998) Ligand-induced conformational transitions in *Escherichia coli* phosphofructokinase 2: evidence for an allosteric site for MgATP², *Biochemistry* 37: 13269-13275.

Hofmeister, F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. II, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24: 247-260.

Holtman, C. K., A. C. Pawlyk, N. D. Meadow y D. W. Pettigrew (2001). Reverse genetics of *Escherichia coli* glycerol kinase allosteric regulation and glucose control of glycerol utilization in vivo. *J. Bacteriol.* 183: 3336-44.

Hribar, B., Southall, N. T., Vlachy, V. y Dill, K. A. (2002). How ions affect the structure of water. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 12302-12311.

Jarvis, N. L., y M. A. Scheiman. 1968. Surface potentials of aqueous electrolyte solutions. *J. Phys. Chem.* 72:74-78.

Jones, S. y Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 13-20.

Kortemme, T., Kim, D. E. y Baker, D. (2004). Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Sci STKE.* 2004: pl2.

Kotlarz, D., y Buc, H. (1981) Regulatory properties of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 117: 569-574.

Krissinel, E., y Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372: 774-797.

Kuwajima, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* 6: 87-103.

Kwok, F., Scholz, G. y Churchich, J. E. (1987). Brain pyridoxal kinase dissociation of the dimeric structure and catalytic activity of the monomeric species. *Eur. J. Biochem.* 168: 577-583.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Larsen, T. A., Olson, A. J. y Goodsell, D. S. (1998). Morphology of protein-protein interfaces. *Structure* 6: 421-427.

Lee, H. S., Moon, B. J., Choi, S. Y. y Kwon, O. S. (2000). Human pyridoxal kinase: overexpression and properties of the recombinant enzyme. *Mol. Cells.* 10: 452-459.

Li, M. H., Kwok, F., Chang, W. R., Lau, C. K., Zhang, J. P., Lo, S. C., Jiang, T. y Liang, D. C. (2002). Crystal structure of brain pyridoxal kinase, a novel member of the ribokinase superfamily. *J. Biol. Chem.* 277: 46385-46390.

Li, M. H., Kwok, F., Chang, W. R., Liu, S. Q., Lo, S. C., Zhang, J. P., Jiang, T. y Liang, D. C. (2004). Conformational changes in the reaction of pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* 279: 17459-17465.

Liu, W. Z., Faber, R., Feese, M., Remington, S. J. y Pettigrew, D. W. (1994). Escherichia coli glycerol kinase: role of a tetramer interface in regulation by fructose 1,6-bisphosphate and phosphotransferase system regulatory protein III_{glc}. *Biochemistry* 33: 10120-10126.

Maj, M. C., Singh, B. y Gupta, R. S. (2000). Structure-activity studies on mammalian adenosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 386-393.

Mayor, U., Grossmann, J. G., Foster, N. W., Freund, S. M. y Fersht, A. R. (2003). The denatured state of Engrailed Homeodomain under denaturing and native conditions. *J. Mol. Biol.* 333: 977-991.

Milla, M. E., y Sauer, R. T. (1994) P22 Arc repressor: folding kinetics of a single-domain, dimeric protein. *Biochemistry* 33: 1125-1133.

Milla, M. E., y Sauer, R. T. (1995) Critical side-chain interactions at a subunit interface in the Arc repressor dimer. *Biochemistry* 34: 3344-3351

Mok, Y. K., Kay, C. M., Kay, L. E. y Forman-Kay, J. (1999). NOE data demonstrating a compact unfolded state for an SH3 domain under non-denaturing conditions. *J. Mol. Biol.* 289: 619-638.

Myers, J. K., Pace, C. N. y Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding.[erratum appears in Protein Sci 1996 May;5(5):981]. *Protein Sci.* 4: 2138-48.

Neet, K. E., y Timm, D. E. (1994) Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* 3: 2167-2174.

Nooren, I. M. y Thornton, J. M. (2003). Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 325: 991-1018.

Pace, C.N., (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Meth. Enzymol.* 131, pp. 266–280.

Pande, V. S. y Rokhsar, D. S. (1998). Is the molten globule a third phase of proteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1490-1494.

Pineda, T. y Churchich, J. E. (1993). Reversible unfolding of pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* 268: 20218-20222.

Privalov, P. L. (1996). Intermediate states in protein folding. *J. Mol. Biol.* 258: 707-725.

Reed, M. A., Jelinska, C., Syson, K., Cliff, M. J., Splevins, A., Alizadeh, T., Hounslow, A. M., Staniforth, R. A., Clarke, A. R., Craven, C. J. y Waltho, J. P. (2006). The denatured state under native conditions: a non-native-like collapsed state of N-PGK. *J. Mol. Biol.* 357: 365-372.

Religa, T. L., Markson, J. S., Mayor, U., Freund, S. M. y Fersht, A. R. (2005). Solution structure of a protein denatured state and folding intermediate. *Nature* 437: 1053-1056.

Ronimus, R. S., y Morgan, H. W. (2001) The biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinases from extremophiles. *Extremophiles* 5: 357-373.

Santoro, M.M., y Bolen, D.W. (1988) Unfolding free energy change determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using differ denaturants. *Biochemistry* 27: 8063-8068.

Sanyal, S. C., Bhattacharyya, D., y Das Gupta, C. (2002) The folding of dimeric cytoplasmic malate dehydrogenase. Equilibrium and kinetic studies. *Eur.. J.. Biochem.* 269: 3856-3866.

Segel, I. H. (1975)^a Enzyme Kinetics, p 309, Wiley, New York.

Segel, I. H. (1975)^b Enzyme Kinetics, p 818, Wiley, New York.

Sherman, E. y Haran, G. (2006). Coil-globule transition in the denatured state of a small protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103: 11539-11543.

Sigrell, J. A., Cameron, A. D., Jones, T. A. y Mowbray, S. L. (1998). Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure* 6: 183-193.

Song, J., Bai, P., Luo, L. y Peng, Z. Y. (1998). Contribution of individual residues to formation of the native-like tertiary topology in the alpha-lactalbumin molten globule. *J. Mol. Biol.* 280: 167-174.

Tanford, C. (1970). Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv. Prot. Chem.* 24: 1-95.

Topping, T. B., Hoch, D. A., y Gloss, L. M. (2004) Folding mechanism of FIS, the intertwined, dimeric factor for inversion stimulation, *J. Mol. Biol.* 335: 1065-1081.

Torres, J. C., Guixé, V. y Babul, J. (1997). A mutant phosphofructokinase produces a futile cycle during gluconeogenesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 327: 675-684.

Tsai, C. J. y Nussinov, R. (1997). Hydrophobic folding units at protein-protein interfaces: implications to protein folding and to protein-protein association. *Protein. Sci.* 6: 1426-1437.

Uversky, V. N. (1993). Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* 32: 13288-13298.

Uversky, V. N. (2002)^a. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* 11: 739-56.

Uversky, V. N. (2002)^b. What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* 269: 2-12.

Uversky, V. N. y Fink, A. L. (2002). The chicken-egg scenario of protein folding revisited. *FEBS Lett.* 515: 79-83.

Yu, P. y Pettigrew, D. W. (2003). Linkage between fructose 1,6-bisphosphate binding and the dimer-tetramer equilibrium of *Escherichia coli* glycerol kinase: critical behavior arising from change of ligand stoichiometry. *Biochemistry* 42: 4243-4252.

Wu, L. C. y Kim, P. S. (1998). A specific hydrophobic core in the alpha-lactalbumin molten globule. *J. Mol. Biol.* 280: 175-182.

Zhang, Y., Dougherty, M., Downs, D. M., y Ealick, S. E. (2004) Crystal structure of an aminoimidazole riboside kinase from *Salmonella enterica*: implications for the evolution of the ribokinase superfamily, *Structure (Camb)* 12: 1809-1821.

Zwaig, N., W. S. Kistler y E. C. Lin (1970). Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 102: 753-759.