

UNIVERSIDAD DE CHILE



**Bases moleculares y estructurales de una nueva mutación
causante de *Maturity Onset Diabetes of the Young* (tipo 2) en
una paciente chilena.**

**Memoria
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al título de**

Bioquímico

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Por

Óscar Marcelo Aránguiz Pizarro

Mayo, 2020

Directores de memoria:

Dra. Daniela Joyce Seelenfreund Hirsch

Dr. Mauricio Andrés Baez Larach

MSc. Pilar Amaya Durruty Alfonso

*“Desde luego parece un juego pero no hay nada mejor que ser un señor, de aquellos que
vieron mis abuelos”*

- Margarita Durán, letra del vals peruano Amarraditos.

Agradecimientos

Al final de este viaje, se construye como mérito del trabajo de todos estos años, esta memoria y estas palabras. Acá quisiera dejar recuerdos de quienes estuvieron en este viaje. De aquellos que pasaron, que estuvieron y que estarán. Aquellos que quisiste, quieres y querrás por mucho tiempo más. Son personas y experiencias que no se deben olvidar, porque fueron el cimiento del futuro que construirás. Son aquellos que el tiempo deformará, moldeándolos caprichosamente a una forma diferente o quizá irreconocible de la que acá se conservará. Esta sección es una celebración al pasado y una lágrima melancólica para el presente. Mis cariños, admiración y agradecimientos para la gente de mi época de universidad, amigos y familiares, estarán acá.

Marcela Pizarro y Esteban Aránguiz, los pilares de quién fui, soy y seré. Durante este último tiempo, he empezado a entender/comprender/digerir el valor de ustedes, quienes siempre he amado, escuchado y respetado. Supongo que esto les pasa a todos, y es que la adquisición de madurez y experiencia lo hace a uno darse cuenta de detalles que hacen la diferencia. Cada vez entiendo mejor la metáfora de que la vida es tomar tu propia cruz del calvario, y llevarla voluntariamente hacia tu crucifixión. Al verlos a ustedes, y en perspectiva hacia el pasado, casi no me cabe en el corazón el orgullo y gratitud hacia ustedes. La vida los ha curtido en unos seres humanos excepcionales, y siento que el viaje que han llevado con su cruz no solo es un ejemplo para mí, sino un imperativo que empieza a calar en mis huesos. Yo soy porque ustedes existen, soy porque me ayudaron y ayudan a escalar hacia donde voy, soy porque lo han dado todo por nuestra familia. Soy porque me aman. Aprendo de ustedes, a cada rato y momento; de sus fortalezas y flaquezas, de sus historias, de su experiencia y su apoyo. Que afortunado que soy, espero que con todo esto que he logrado hasta ahora, haga algo de justicia a lo que ustedes son y han dado por mí. Muchas gracias, los amo.

Gabriela, amor de amores. He pensado qué escribir, con qué capturar algo de lo que fuiste durante esta época, y finalmente, se me ocurrió una analogía para colocar acá. Estuviste conmigo durante la última etapa de mi carrera universitaria (la más difícil desde el lado anímico y académico), y tu compañía y amor han sido como una lluvia en el desierto, de esas

precipitaciones que preceden el desierto florido. Tal como el aguacero, que llega sin aviso y rocía vida en el aparentemente muerto desierto, llegaste tú, con tu alegría, energía, madurez y amor, a rociar vida sobre mí. El agua que llega al desierto hace florecer una variedad de flora que no se ve en ninguna época del año, que es majestuosa y casi divina en su naturaleza; salvaguardando las proporciones, creo que esto describe tu influencia sobre mi vida. Desde que llegaste, todo ha ido mejor. Llegaste sin aviso, sin plegaria y sin sacrificio; eres ser que da vida, sin pedir nada a cambio. Las flores que poblaban mi ser han sido capaces de brotar, y van creciendo poco a poco, cariño tras cariño, experiencia tras experiencia. Los logros durante esta etapa de mi vida han sido, en buena parte, gracias a ti. Eres agua que rocía lo que toca con vida. Jamás podré agradecerte lo que has hecho por mí y mi familia; lo único que puedo hacer es dedicarte estas palabras, y mi cariño.

Los cabros del laboratorio, una vuelta a la comodidad. Me parece curioso que encajara tan bien en un lugar, como encajé con ustedes. En el trabajo y, sobre todo, en el humor y convivencia. Cada uno de ustedes es una gran persona y, con su distintiva personalidad, contribuyen a la excelente experiencia que ha sido estar en el laboratorio de bioquímica. La hostilidad y estupidez condensada que hay, es perfecta para mí, me recuerda al colegio y amigos de entonces, a la vez de lo bien que se pasa con gente absurdamente inteligente como ustedes. Rodri, el precioso boris, el coto y el hombre abeja. Que hombres más idiotas, ridículos y buenas personas. Son tremendos cabros, sé que en algún momento se va a disolver el equipo y cada uno irá por su camino. Espero nunca olvidar las experiencias que tuve en el laboratorio haciendo experimentos junto a ustedes. Desde las conversaciones tipo taller mecánico, las múltiples veces que nos fuimos “funaki”, los consejos de vida, los análisis de la academia y el rol de la ciencia en múltiples aspectos de la sociedad y vida, los gritos y sonidos que rozan la necesidad de medicación, el cariño expresado en acciones, la hostilidad y el reinado del cuidado por la palabra, además de muchas cosas que se me olvidan ahora mismo. Espero no olvidar, porque creo que esto es una experiencia de una vez en la vida, difícilmente encontraré un lugar como éste y, muchísimo menos, personas como ustedes.

Los amigos y conocidos de la universidad, oasis en medio del camino. Tuve la suerte de compartir con gente muy talentosa y que, conmigo, fueron excelentes personas. Digo que

fueron un oasis en medio del viaje porque, aunque cada uno estaba en su viaje personal y académico, siempre nos juntamos a beber de la desgracia del otro, de la rabia del otro y la miseria de un futuro incierto, con la absoluta certeza de que el momento de la ruptura de la burbuja en la que estábamos, estaba llegando. Si bien es cierto, esta carrera ha traído amargura a mi ser, y ha despertado la creatividad más miserable de la que he dado cuenta en toda mi vida; me alegro mucho de haber compartido esto con ustedes. Espero no olvidar a los cabros: Nico (absolutamente deleznable), Andrés (JAJAJAJA), Luka (chica gato en Alemania), Jota (empresario de stickers de What's app y emprendedor frustrado), Iván (no sé qué decir de ti), Jorge (“hermano, no”), Mati (la persona con más talento desperdiciado que conozco, ojalá todo vaya mejor papu), Mane (tengo tu medalla), Pancho (cahuinero N°1), Daniel (un genio), Consu (tremendo que un mal momento nos haya acercado, otra persona tremendamente talentosa e inteligente, en el lugar equivocado; muchas gracias por ayudarme con este escrito, por leerlo y por escuchar algunas ideas y tonteras de esto).

Finalmente, quisiera recordar a mis directores de memoria, Pilar, Daniela y Mauricio. Los tres cumplieron con ser parte de esta etapa final del viaje e hicieron de éste, una gran experiencia para mí. Ya sea por discusiones sobre el trabajo de la memoria, conversaciones en general y, obviamente, la confianza depositada. Comenzamos con el pie izquierdo, y siempre agradeceré que hayan tenido fe en mí y mis capacidades para llevar adelante este trabajo. Gracias a ustedes pude tener una de las mejores experiencias en mi vida universitaria y académica: el congreso de la SBBMCh en Iquique. Y sigo expandiendo mi experiencia como científico en el congreso de la SOCHED. Conmigo fueron unos buenos tutores y de eso les estoy agradecido.

Índice general

AGRADECIMIENTOS	III
FINANCIAMIENTO	X
PRESENTACIONES A CONGRESOS	XI
CONGRESOS NACIONALES	XI
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES	VIII
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUCCIÓN	I
1.1 VISIÓN GENERAL DE LA MEMORIA	1
1.2 DIABETES MELLITUS	2
1.3. DIABETES MONOGÉNICAS. SIN PUNTO.....	3
1.4. MUTACIONES MODY2 COMO FUENTE DE ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE SENSOR DE GLUCOSA QUE EJERCE GCK	4
1.5. ESTRUCTURA DE GCK, CAMBIOS CONFORMACIONALES INDUCIDOS POR GLUCOSA Y EFECTOS DE LAS MUTACIONES INACTIVANTES	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
2.1. HIPÓTESIS	12
2.2. OBJETIVO GENERAL	12
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2.3.1. DETERMINAR SI LA MUTACIÓN G448D, O G448A ALTERAN LA ESTABILIDAD Y ESTRUCTURA DEL ESTADO NATIVO DE LA GLUCOQUINASA PANCREÁTICA HUMANA SILVESTRE.	12
2.3.2. DETERMINAR SI LA MUTACIÓN G448D O G448A ALTERAN LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y LA REGULACIÓN INTRÍNSECA DE LA GLUCOQUINASA PANCREÁTICA HUMANA, EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS SUSTRATOS GLUCOSA Y ATP.	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. MATERIALES.....	13

3.1.1	Reactivos	13
3.1.2	Sistemas comerciales	14
3.1.3	Software	14
3.1.4	Equipos	15
3.1.5	Reactivos biológicos	15
3.2.	MÉTODOS	16
3.2.1.	Construcción del plásmido, clonamiento y mutagénesis.....	16
3.2.2.	Expresión y purificación de G6PDH, GCKWT, mutante G448D y G448A.....	17
3.2.3.	Ensayos de actividad y estimación de parámetros cinéticos	19
3.2.4.	Desplegamiento y replegamiento de GCK en presencia de urea.....	20
4.	RESULTADOS	24
4.1.	ESTABILIDAD DEL PLÁSMIDO pET-28A(+)-TEV-GCK EN LA CEPA DE EXPRESIÓN <i>E. COLI</i> BL21	24
4.2.	MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA Y TRANSFORMACIÓN	25
4.3.	PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS SILVESTRE, MUTANTE G448D Y G448A.....	31
4.4.	PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS ENZIMAS SILVESTRE, MUTANTE G448D Y G448A.....	34
4.5.	CURVAS DE ESTABILIDAD QUÍMICA PARA LAS ENZIMAS SILVESTRE, MUTANTE G448D Y MUTANTE G448A	38
5.	DISCUSIÓN.....	41
5.1.	CONTEXTO Y GENERALIDADES	41
5.2.	OBTENCIÓN DE LAS ENZIMAS GCK WT, Y MUTANTES RECOMBINANTES G448A Y G448D	41
5.3.	LA MUTACIÓN G448D ES UNA MUTANTE ACTIVADORA DE GCK CAUSANTE DE FENOTIPO MODY2 ...	42
5.4.	LA MUTACIÓN G448D PODRÍA ESTABILIZAR UNA CONFORMACIÓN DE ALTA AFINIDAD PARA GLUCOSA, INTERMEDIA A LA FORMA SÚPER-ABIERTA Y CERRADA	43
5.5.	LA MUTANTE G448A ES UNA MUTANTE ACTIVADORA DIFERENTE A G448D, PERO QUE ENTREGA INFORMACIÓN SOBRE LA FUNCIÓN DEL RESIDUO 448	45
5.5.	PROYECCIONES	47
6.	CONCLUSIONES.....	50
7.	REFERENCIAS.....	51

Índice de figuras, tablas y ecuaciones

Figura 1. Estructura de GCK pancreática humana.	7
Figura 2. Esquema de las rotaciones involucradas en el cambio de formas de GCK.	8
Figura 3. Equilibrios entre las conformaciones activas e inactiva de la GCK.	10
Figura 4. Vector de expresión pET-28a(+) y diseño del plásmido de expresión para la obtención de la enzima GCK-WT.	16
Figura 5. <i>E. coli</i> BL21 se puede transformar con el plásmido pET-28a(+)-TEV-GCK generando un plásmido estable tanto en integridad como secuencia.	25
Figura 6. Gradiente de temperatura para la reacción de mutagénesis G448D en ausencia y presencia de DMSO.	27
Figura 7. La reacción de mutagénesis sitio dirigida, en presencia de DMSO, es específica y genera un solo producto de reacción.	28
Figura 8. La mutagénesis sitio dirigida logra modificar el codón que codifica para el aminoácido 448, introduciendo el cambio missense G488D y G448A.	29
Figura 9. Los plásmidos codificantes para la enzima GCK-WT, GCK-G448A, GCK-G448D son estables en las cepas <i>E. coli</i> DH5 α , se pueden extraer y transformar en <i>E. coli</i> BL21.	30
Figura 10. GCK-WT, mutante GCK-G448D y mutante G448A se enriquecen al ser purificadas mediante cromatografía de afinidad a catión metálico inmovilizado.	32
Figura 11. Comparación entre las curvas cinéticas de las enzimas GCK-WT y mutantes G448D y G448A.	35
Figura 12. La mutante G448D es igual de estable químicamente que GCK-WT. Curvas de estabilidad química para las enzimas GCK-WT y mutantes G448D y G448A.	40

Tabla 1. Resumen de las purificaciones de las enzimas GCK-WT, GCK-G448D, GCK-G448A.	33
Tabla 2. Purificación de GCK-WT usando cromatografía de exclusión molecular.	34
Tabla 3. Parámetros cinéticos de las enzimas GCK-WT y mutantes G448D, G448A.	36
Tabla 4. Parámetros cinéticos de las enzimas WT y G448D al ser pre-incubadas con glucosa 30 mM.	37
Tabla 5. Parámetros cinéticos de las enzimas WT y G448D al ser pre-incubadas en glicerol 20%.	38
Ecuación 1. Ecuación de Hill ajustada a los datos de velocidad de reacción en estado estacionario y concentración de glucosa.	20
Ecuación 2. Cálculo del cambio de energía libre de Gibbs en condiciones de equilibrio. ..	21
Ecuación 3. Dependencia de ΔG con la concentración de urea.	22
Ecuación 4, 5 y 6. Relaciones entre las fracciones molares y las constantes de equilibrio. ..	22
Ecuación 7. Relación entre la fracción molar f_D y las señales de fluorescencia obtenidas. ..	23
Ecuación 8. Modelo que relaciona la fracción desplegada de proteína con la concentración de urea.	24

Financiamiento

Esta memoria fue desarrollada en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT n° 1191153 (investigador responsable: Mauricio Andrés Báez Larach).

Presentaciones a congresos

Los resultados de esta memoria de memoria dieron origen total a las siguientes presentaciones a congresos.

Congresos Nacionales

Aránguiz Óscar Marcelo, Rivera Rodrigo, Durruty Pilar, Seelenfreund Daniela, Báez Mauricio. Bases moleculares de una nueva mutación en el gen de glucoquinasa que causa Diabetes Tipo MODY 2 en una paciente chilena. Presentación oral, Sesión de discusión de casos clínicos (caso 2), XXX Congreso Chileno de Endocrinología y Diabetes 2020. **(Presentación ACEPTADA)** Chile.

Aránguiz Óscar Marcelo, Rivera Rodrigo, Durruty Pilar, Seelenfreund Daniela, Báez Mauricio. *Molecular basis of a novel Glucokinase mutation which causes Maturity-Onset Diabetes of the Young type 2 discovered in a Chilean patient.* Poster presentado en *XLII annual meeting of the SBBMCh*, 8 al 11 de octubre del 2019, Iquique, Chile.

Abreviaturas

ATP - Trifosfato de adenosina

BSA - Albúmina de suero bovino

DM - Diabetes mellitus

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTT - Ditioneitol

f_D - Fracción desplegada de proteína

GC - Guanina y Citosina

G6PDH - Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

G6P - Glucosa 6 fosfato

GCK - Glucoquinasa

GSIR - *Glucose stimulated insulin release*

IPTG - Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

K_M - Constante de Michaelis

k_{cat} - Constante catalítica

LB - Luria Bertani

MODY - Maturity Onset Diabetes of the Young

MODY2 - Maturity Onset Diabetes of the Young type 2

NAD⁺ - Nicotinamida adenina di nucleótido forma oxidada

NADH - Nicotinamida adenina di nucleótido forma reducida

n_H - Índice de Hill

PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

SDS - Dodecil Sulfato de Sodio

SDS-PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

S_{0,5} - Constante de afinidad aparente

T_m - Temperatura de *melting*

ΔG - Energía libre de Gibbs para el proceso de desplegamiento

RESUMEN

Introducción. La glucoquinasa es una enzima fundamental para la regulación de la secreción de insulina en las células β -pancreáticas. Sus características cinéticas, principalmente su baja afinidad aparente y cooperatividad positiva para glucosa, permiten que su actividad enzimática actúe como un sensor de la concentración de glucosa en el páncreas. Específicamente, los parámetros cinéticos de este sensor definen el umbral de secreción de insulina inducido por glucosa. Este umbral permite la regulación de la glucosa sistémica ~ 5 mM y es fundamental para la homeostasis de la glucosa. Se han descrito diversas mutaciones inactivantes que alteran los parámetros cinéticos de la glucoquinasa, las cuales causan un subtipo de diabetes monogénica llamada “*Maturity-Onset Diabetes of the Young type 2*” o MODY2 por sus siglas en inglés. Estas mutaciones inactivantes alteran el umbral de secreción de insulina inducido por glucosa, e introducen una desregulación de la homeostasis de la glucosa, lo cual explica el fenotipo clínico MODY2. Recientemente se descubrió una mutación no sinónima, no descrita, en la enzima glucoquinasa (G448A) de una paciente MODY2 chilena, y se desconoce cómo esta mutación afecta los parámetros cinéticos de la enzima. En esta memoria se propone que esta mutación altera los parámetros cinéticos de glucoquinasa, y el umbral de secreción de insulina inducida por glucosa, lo cual podría explicar la manifestación clínica de la paciente. **Hipótesis:** *La mutación G448D encontrada en la paciente chilena afecta la homeostasis de la glucosa, generando una alteración del umbral de secreción de insulina inducido por glucosa por cambios en los parámetros cinéticos y la estabilidad de la glucoquinasa pancreática humana silvestre.* **Objetivo general:** *Determinar el efecto de la mutación G448D en los parámetros cinéticos y estructurales de la glucoquinasa pancreática humana silvestre, con el fin de estimar el efecto molecular de la mutación sobre la homeostasis de la glucosa y explicar el fenotipo encontrado en la paciente chilena.* **Objetivos específicos:** (1) *Determinar si la mutación G448D, o G448A alteran la estabilidad y estructura del estado nativo de la glucoquinasa pancreática humana silvestre;* (2) *Determinar si la mutación G448D o G448A alteran los parámetros cinéticos y la regulación intrínseca de la glucoquinasa pancreática humana, en función de la concentración de los sustratos glucosa y ATP con el fin de explicar el fenotipo encontrado en la paciente chilena.* **Materiales y métodos:** para determinar el efecto de la mutación Gly448Asp sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa presente en células

β -pancreáticas humanas, se compararon los parámetros cinéticos de la enzima mutante y silvestre expresadas de manera recombinante en *Escherichia coli*. Las actividades enzimáticas de las enzimas purificadas se midieron usando un ensayo acoplado a NAD^+ , y los parámetros cinéticos se calcularon usando análisis de regresión no lineal. **Resultados:** La glucoquinasa mutante presentó una k_{cat} de $4,6 \pm 0,1 \text{ [s}^{-1}\text{]}$ cuyo valor es cercano al de la enzima silvestre. En contraste, la constante de afinidad aparente $S_{0,5}$ para glucosa fue tres veces menor en comparación con la enzima silvestre. Adicionalmente, la enzima mutante no presentó cooperatividad positiva para glucosa ($n_{\text{H}} = 1,1$) y mostró una ligera disminución de la K_{m} para ATP ($0,25 \pm 0,03 \text{ mM}$) respecto de la proteína silvestre. **Discusión:** La ausencia de cooperatividad positiva para glucosa implicaría que la actividad enzimática de esta mutante es poco sensible a los cambios fisiológicos en los niveles de glucosa. El valor de la constante aparente de disociación nos permite inferir que, a niveles fisiológicos de glucosa, esta mutante podría estar saturada en la célula. Estas dos posibles consecuencias indicarían que esta glucoquinasa no poseería la capacidad de modular su actividad en respuesta a los cambios en la glicemia. **Conclusión:** Proponemos así que la glucoquinasa mutante Gly448Asp es una enzima disfuncional que afecta la correcta secreción de insulina en las células β -pancreáticas. Esta alteración del proceso de secreción podría contribuir al fenotipo MODY2 observado clínicamente.

ABSTRACT: “Structural and molecular basis of a novel Glucokinase mutation which causes Maturity-Onset Diabetes of the Young type 2 discovered in a Chilean patient”

Introduction: Glucokinase is a key regulatory enzyme in the release of insulin from pancreatic β -cells. Its low apparent affinity and positive cooperativity for glucose modulate the increase in activity due to rises in glucose levels, therefore acting as the pancreatic glucose sensor. Specifically, the kinetic parameters of this sensor define the glucose stimulated insulin release, which allows tight regulation of glucose levels. Inactivating mutations in glucokinase cause Maturity-Onset Diabetes of the Young type 2 (MODY2), a subtype of monogenic diabetes. These inactivating mutations alter the glucose stimulated insulin release and introduce a dysregulation in the glucose homeostasis, which explains the MODY2 clinical phenotype. Recently, a novel glucokinase mutation (G448A) was discovered in a Chilean MODY2 patient and its effects on the kinetics are not known. In this work, we propose that this mutation alters the kinetics of glucokinase and the glucose stimulated insulin release, which could explain the clinical phenotype. **Hypothesis:** *the G448D mutant found in the Chilean patient affects glucose homeostasis, by an alteration of the glucose stimulated insulin release produced by changes in the kinetic parameters and the stability of the wild type human pancreatic glucokinase.* **General objective:** *to determine the effect of the G448D mutation on the kinetic and structural parameters of the wild type human pancreatic glucokinase, to estimate the molecular consequences on the glucose homeostasis and the clinical phenotype displayed by the Chilean patient.* **Specific objectives:** *(1) to determine if the G448D or G448A mutation alter the stability and structure of the native state of wild type human pancreatic glucokinase; (2) to determine if the G448D or G448A mutation alters the kinetic parameters and the intrinsic regulation of wild type human pancreatic glucokinase, for both glucose and $Mg-ATP^{-2}$ substrates to determine the phenotype found in the Chilean patient.* **Materials and Methods:** to determine the effect of the Gly448Asp mutation on the pancreatic glucokinase, the wild type and mutant enzymes were expressed in *Escherichia coli*, and their kinetic parameters were compared. Enzymatic activity of the purified enzymes was measured using an NAD^{+} -coupled assay, and kinetic parameters were calculated using non-linear regression analysis. **Results:** the Gly448Asp

mutant presented a k_{cat} value of 4.6 ± 0.1 [s^{-1}], which is similar to the k_{cat} of the wild type enzyme. It also displayed a three-fold lower value of apparent affinity constant for glucose, compared to the wild type glucokinase. The Gly448Asp mutant has no cooperativity for glucose ($n_{\text{H}}=1.1$) and presents a slightly lower K_{M} for ATP (0.25 ± 0.03 [mM]) in comparison with the wild type enzyme. **Discussion:** The absence of positive cooperativity for glucose may imply that the mutant has a lower sensibility to physiological changes in glucose levels. In addition, the low apparent affinity constant value suggests that, at physiological glucose levels, this glucokinase is saturated; therefore, it may not be able to modulate its enzymatic activity in response to physiological changes in glucose levels. **Conclusion:** Since the changes of enzymatic activity and sensitivity are crucial elements for the correct sensor function of glucokinase and insulin secretion, we propose that this mutant Gly448Asp, is a dysfunctional enzyme that contributes to impaired insulin secretion, explaining the observed MODY2 clinical phenotype.

1. Introducción

1.1 Visión general de la memoria

La glucosa es una de las principales fuentes de energía de la célula y es un metabolito esencial del metabolismo celular. Los niveles normales de glucosa en el organismo (~ 4 y 5 mM) mantienen el correcto funcionamiento de los tejidos¹. La regulación de la glicemia está sujeta a un funcionamiento adecuado de la célula β pancreática y la secreción de insulina, ambos dependientes de la función de la enzima glucoquinasa (GCK). GCK es la enzima que controla el metabolismo de glucosa en la célula β pancreática y, a través del control de la tasa de fosforilación de glucosa, regula la secreción de insulina. Esta regulación es dependiente de la glicemia, así aumentos de ésta provocan una activación de GCK y de la secreción de insulina, mientras que la disminución de la concentración de glucosa plasmática tienen el efecto contrario²³. En otras palabras, GCK es el sensor de glucosa de la célula β pancreática⁴.

Existen mutaciones naturales de GCK que causan desórdenes en la homeostasis de la glucosa⁵, generando hiperglicemia en los portadores de estas mutantes. La hiperglicemia daña progresiva e irreversiblemente los tejidos¹, y de no ser tratada puede llevar a la muerte del individuo afectado. Los fenotipos hiperglicémicos causados por mutaciones en GCK son conocidos como *Maturity Onset Diabetes of the Young type 2* (MODY2). El origen del desorden sobre el control de la glicemia se debe a que estas mutaciones inactivan total o parcialmente a GCK, lo cual afecta su rol como sensor de glucosa y, finalmente, la secreción de insulina. Se han descrito diferentes tipos de mutaciones, sin embargo, aquellas que generan cambios de aminoácidos en la cadena (mutaciones *missense* o sin sentido) agrupan la mayor cantidad de casos reportados, y son las más estudiadas (ClinVar; base de datos con ruta de acceso: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Los estudios cinéticos y estructurales de GCK, muestran que las mutaciones *missense*, mencionadas como inactivantes, afectan sus parámetros cinéticos: disminución de k_{cat} (por ejemplo: R337C⁶, S336L², R36W⁷, G72R⁶), aumento de la constante de afinidad aparente $S_{0,5}$ por glucosa (por ejemplo: G80A^{2,7},

L146R^{6,8}, R308W⁹, L420E¹⁰, V455E¹¹) y una ausencia de cooperatividad por glucosa (por ejemplo: S453L⁶, S383L⁸, L309P²). La alteración de uno o varios de estos parámetros cinéticos altera el umbral de glucosa que estimula la secreción de insulina, llamado también GSIR (por sus siglas en el inglés: *Glucose Stimulated Insulin Release*). Así, la comprensión de la conexión entre las propiedades moleculares de GCK, el rol de ésta como sensor y las consecuencias sistémicas sobre la homeostasis de la glicemia, son la base que motiva y fundamenta el trabajo desarrollado en esta memoria.

En 2018 se reportó una mutación *missense* de GCK (G448D) no descrita previamente, causante de MODY2 en una familia chilena. En esta memoria se pretende estudiar los parámetros cinéticos de esta nueva mutante. El objetivo es entender la génesis del fenotipo MODY2. Postulamos que esta nueva mutante altera los parámetros cinéticos de GCK, lo cual podría tener consecuencias sobre la homeostasis de la glicemia, explicando así el fenotipo MODY2 asociado a ésta.

1.2 Diabetes mellitus

Clasificada como la epidemia del siglo, la diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por una hiperglicemia crónica, resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, la cual de no ser tratada puede llevar a estados de coma o muerte¹. A nivel mundial, en adultos de 20 a 79 años de edad, la prevalencia de DM varía desde el 11% en regiones como América del Norte y el Caribe, hasta un 4,4% en África, mientras que en América del Sur y Central se calcula de un 7,6%¹². En Chile, 1 de cada 10 adultos padece la enfermedad¹³. Teniendo en cuenta que la diabetes está entre las primeras 10 causas de muerte a nivel mundial, y es parte del conjunto de enfermedades no transmisibles que representa al 80% de las muertes prematuras, las cifras anteriormente expuestas son alarmantes.

En la clasificación actual de la DM se distinguen cuatro tipos: Diabetes mellitus tipo 1, tipo 2, diabetes gestacional y otros tipos de DM; este último grupo representa el 1% del total de casos¹⁴ y considera varios subtipos de diabetes. Las diabetes monogénicas pertenecen a estos

subtipos de diabetes mellitus, y corresponden a un excelente modelo de estudio para comprender la función de algunos componentes claves en la homeostasis de la glicemia.

1.3. Diabetes monogénicas

Las diabetes monogénicas se definen como un defecto genético en un gen puntual expresado en la célula β pancreática, el cual genera una reducción del número celular y función celular¹. Existen dos grupos de diabetes monogénicas: diabetes mellitus neonatal y *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY). Las mutaciones más importantes asociadas al grupo MODY son el factor nuclear de hepatocitos HNF4 α (MODY1), HNF1 α (MODY3), HNF1 β (MODY5) y glucoquinasa-MODY (MODY2). Los pacientes MODY2 poseen un defecto leve en la secreción de insulina, generado por una respuesta reducida de la célula β pancreática a los cambios en los niveles de glucosa plasmática. Este defecto se asocia a la aparición de mutaciones que afectan los parámetros cinéticos de glucoquinasa, también llamadas mutaciones inactivantes, las cuales afectan su función de sensor de glucosa. Esto ha sido demostrado en estudios de mutaciones de este gen en humanos¹⁵⁻¹⁷ y estudios de eliminación (*knock-out*) del gen de GCK en modelos animales^{18,19}, donde la presencia de una mutación inactivante o la delección completa del gen, resulta en fenotipos MODY2. A nivel clínico, la consecuencia del fenotipo MODY2 es una hiperglicemia leve la cual, de no ser tratada, tiene efectos dañinos sobre órganos blancos²⁰.

Recientemente se publicó un caso clínico en el que se describe una nueva mutación de GCK, causante de MODY2, en una familia chilena²¹. Hasta ahora se desconoce cómo esta mutación afecta el funcionamiento de GCK a nivel molecular y determina el fenotipo MODY2. Es conocido que en Chile menos del 1% de los pacientes diabéticos son MODY²²; este fenotipo diabético es más común en Europa, donde se han estudiado múltiples mutaciones inactivantes de GCK causantes de MODY2⁵. Estos estudios han expandido el conocimiento sobre las bases moleculares y estructurales que regulan la función de GCK, su rol como sensor y los efectos que estas mutaciones pueden tener sobre éstos. Luego, para entender esta nueva mutante, se debe ahondar en lo que estos estudios han descubierto.

1.4. Mutaciones MODY2 como fuente de estudio de la función de sensor de glucosa que ejerce GCK

Se han descrito más de 700 mutaciones para GCK, las cuales se distribuyen a través de los 12 exones que componen el gen (GeneID: 2645, Genbank database). Entre las mutaciones descritas, se encuentran mutaciones de cambios de aminoácidos (mutaciones *missense*), de término prematuro (mutaciones *nonsense* o sin sentido), deleciones de una base, codón o regiones más extensas, corrimientos del marco de lectura y mutaciones que afectan su procesamiento transcripcional al igual que el procesamiento postraduccional^{5,23}. En el caso de la nueva mutante descubierta en la familia chilena, ésta se localiza en el exón 10 (1343 G>A), la cual genera un cambio *missense* en el aminoácido glicina por ácido aspártico en la posición 448 de la secuencia de GCK (G448D)²¹. De las mutantes publicadas, 80 han sido caracterizadas *in vitro*. Se ha reportado que a nivel funcional, estas mutaciones generan cambios en los parámetros cinéticos, la estabilidad, el correcto plegamiento de la proteína e interacciones proteína-proteína presentes en la célula^{9,24-28}. Estas alteraciones, sirven de base para explicar la génesis del fenotipo MODY2 a nivel molecular. Así, los estudios vinculan los efectos moleculares de la mutación y el fenotipo MODY2 asociado, y permiten comprender la función de sensor molecular de glucosa de esta enzima.

La GCK es el sensor de glucosa sistémico puesto que posee características cinéticas que le permiten cumplir este rol en la célula β pancreática²⁹. La GCK humana es una enzima citoplasmática de 52 kDa que cataliza la fosforilación de la glucosa (UniProtKB- P35557). A nivel celular, GCK es la enzima marcapasos de la glicolisis a niveles fisiológicos de glicemia (~ 5 mM), determinando la velocidad del metabolismo de glucosa en la célula β pancreática, lo cual es crucial para la secreción de insulina y la homeostasis de la glicemia. GCK es una enzima de baja afinidad por glucosa (con una constante de afinidad aparente $S_{0,5}$ de 7,5 - 10 mM, variando según la preparación de la enzima), presenta una baja inhibición por su producto de reacción, posee cooperatividad positiva para glucosa (con un índice de Hill, n_H dentro del rango de 1,5 a 1,8 dependiendo de la preparación) y un punto de inflexión de la curva de saturación de glucosa ~ 5 mM^{5,30,31}.

La relación entre los parámetros cinéticos de la enzima, su control sobre la actividad fosforilativa y la secreción de insulina, es la base de la función de sensor de glucosa que posee GCK⁸. Esta relación ha sido descrita a través del parámetro GSIR, el cual corresponde al umbral de glucosa sistémico, que activa el metabolismo de la célula β pancreática y gatilla la secreción de insulina⁸. GSIR puede ser estimado a través de un modelo matemático que usa los parámetros cinéticos de GCK^{8,32}, por lo cual es un parámetro que relaciona la funcionalidad de la proteína con el proceso celular de secreción de insulina.

Para la GCK de un humano sano el GSIR estimado es de ~ 5 mM de glucosa. Esto significa que el umbral de secreción de insulina está coordinado con los cambios en la actividad de GCK³³. Esto último dado que GSIR coincide con el punto de inflexión de la curva de saturación de GCK, el cual es la concentración de glucosa donde el cambio de la actividad enzimática (y por ende la tasa fosforilativa de la célula β pancreática) es máxima³². Así, ligeros cambios en la glucosa plasmática (producidos por la ingesta de alimentos o procesos fisiológicos) inducen cambios en el metabolismo de glucosa y, consecuentemente, la secreción de insulina. Esta capacidad de respuesta de la célula β pancreática a los cambios de glucosa corresponde al rol de sensor de GCK. En base a lo anterior, se pueden estudiar las consecuencias sistémicas de las mutaciones inactivantes de GCK a través del conocimiento de los efectos de éstas sobre los parámetros cinéticos de la enzima.

Las mutaciones inactivantes de GCK alteran los parámetros cinéticos de la enzima. Generalmente disminuyen la afinidad para glucosa (incremento del $S_{0,5}$ para glucosa) y disminuyen su constante catalítica (desde variaciones significativas de k_{cat} , hasta ausencia de actividad)⁵. También se ha observado cambios en la cooperatividad de la enzima, producto de estas mutaciones²³. A modo de ejemplo, el grupo de Sagen *et al.* (2006)⁶ demostró que la mutante inactivante S453L genera un aumento en la $S_{0,5}$ por glucosa (La GCK silvestre posee un $S_{0,5} = 7,55$ mM y la mutación lo aumentó a un $S_{0,5} = 16$ mM), un aumento en la K_m para ATP (la GCK silvestre posee una $K_m = 0,41$ mM y la mutación lo aumentó a una $K_m = 0,69$ mM), una disminución de la k_{cat} (La GCK silvestre posee una $k_{cat}=61,1$ y la mutación la disminuyó a $k_{cat}=8,17$ mM) y una pérdida de la cooperatividad ($n_H= 1,0$). Se describen resultados similares para la mutación A449T³⁴. Estos cambios en los parámetros cinéticos,

a nivel de la célula β pancreática, se traducen en un aumento del GSIR ^{2,15,31}. Un aumento en GSIR desplaza toda la regulación de la glicemia, desde valores fisiológicos hacia valores de hiperglicemia leve, lo cual explica el fenotipo MODY observado a nivel clínico ³³.

La nueva mutante de GCK, G448D, podría ser una mutación inactivadora de la enzima, lo que podría explicar el fenotipo MODY2 asociado a la paciente portadora. Lo anterior se sustenta en dos antecedentes: primero, esta mutante genera un fenotipo de hiperglicemia, el cual es característico de mutaciones inactivantes MODY2; segundo, existen otras mutaciones MODY2 localizadas en la misma región estructural que esta nueva G448D. Creemos que esta nueva mutación altera la cinética de GCK como lo hacen las mutantes S453L y A449T ya antes descritas, y que el fenotipo diabético se fundamenta en un aumento de GSIR causado por la inactivación de la enzima. Existe evidencia que muestra que las mutaciones en la zona estructural donde se ubica G448D, la cual se denomina hélice $\alpha 13$, tienen efectos inactivadores sobre la cinética de la enzima ⁵. Es por esto por lo que, para poder estimar los efectos de la mutación y entender el origen del fenotipo MODY2 asociado a esta mutante, se debe entender cómo la estructura de la enzima se relaciona con sus propiedades cinéticas y, ultimadamente, con la homeostasis de la glucosa.

1.5. Estructura de GCK, cambios conformacionales inducidos por glucosa y efectos de las mutaciones inactivantes

La GCK es un monómero que se compone de dos dominios de tamaño asimétrico (dominio grande y pequeño), con el sitio activo de fosforilación y unión de Mg-ATP y glucosa, localizado en la hendidura que separa ambos dominios. Aparte del sitio activo, GCK posee un sitio alostérico rodeado por la región de unión de los dominios (región de conexión I), el dominio grande (hoja $\beta 1$ y la hélice $\alpha 5$) y el pequeño (hélice $\alpha 13$). El sitio alostérico se caracteriza por ser una zona de alta flexibilidad, importante para los correctos intercambios conformacionales de la enzima ³⁵. En la figura 1 se muestra una representación visual de la estructura descrita. GCK posee tres conformaciones que se alternan en función de la concentración de glucosa: forma cerrada (activa), forma abierta (activa) ³⁶ y forma súper abierta (inactiva).

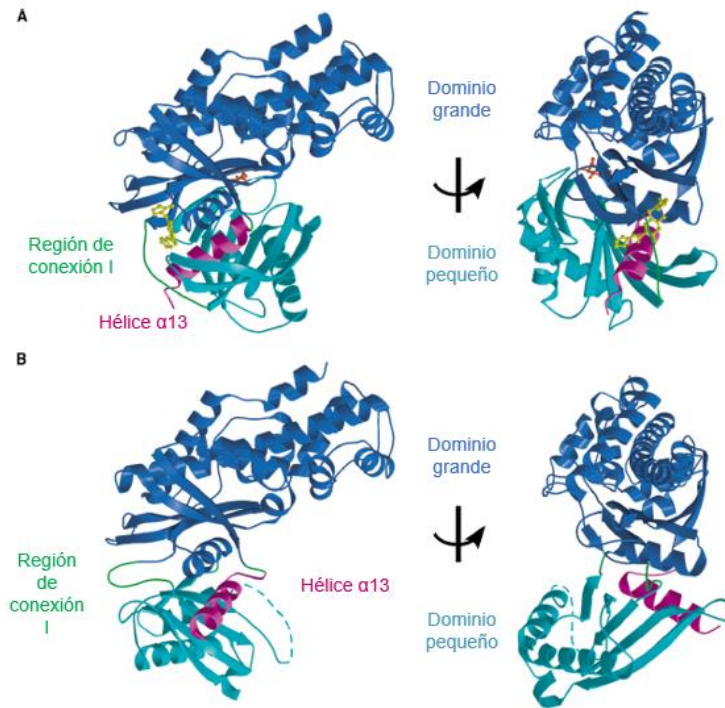


Figura 1. Estructura de GSK pancreática humana.

Representaciones de cinta para las conformaciones cerrada activa (A) y súper abierta inactiva (B). El dominio grande está representado por el color azul, mientras que el dominio pequeño, regiones de conexión I-III y la hélice $\alpha 13$ están marcados con los colores: turquesa, verde y magenta, respectivamente. Para una mejor vista de la estructura completa, cada conformación es mostrada usando imágenes que difieren en una rotación en 180° (representada por el eje y flecha que separa cada par de estructuras). Adaptada y traducida de Kamata *et al.* 2004 ³⁵.

La forma súper abierta es una conformación termodinámicamente favorable que se mantiene en equilibrio con la forma cerrada, sin embargo, no posee un sitio activo funcional; esta estructura es la conformación predominante a bajos niveles de glucosa. Un aumento en los niveles de glucosa desplaza el equilibrio hacia la conformación cerrada, comenzando el cambio lento desde la forma inactiva, a una activa ³⁵. En términos generales, el paso desde la conformación inactiva a la activa está definido por una serie de rotaciones de las capas que componen GSK (ver figura 2), donde uno de los movimientos más importantes lo realiza la hélice $\alpha 13$, la cual pasa de estar expuesta al solvente hacia el interior de la enzima. Estos movimientos permiten la formación y estabilización del sitio activo. El cambio entre conformaciones es lento, debido a que las rotaciones antes mencionadas están acompañadas

de la ruptura y formación de múltiples interacciones, por lo cual existe una barrera energética que separa los dos estados ³⁵.

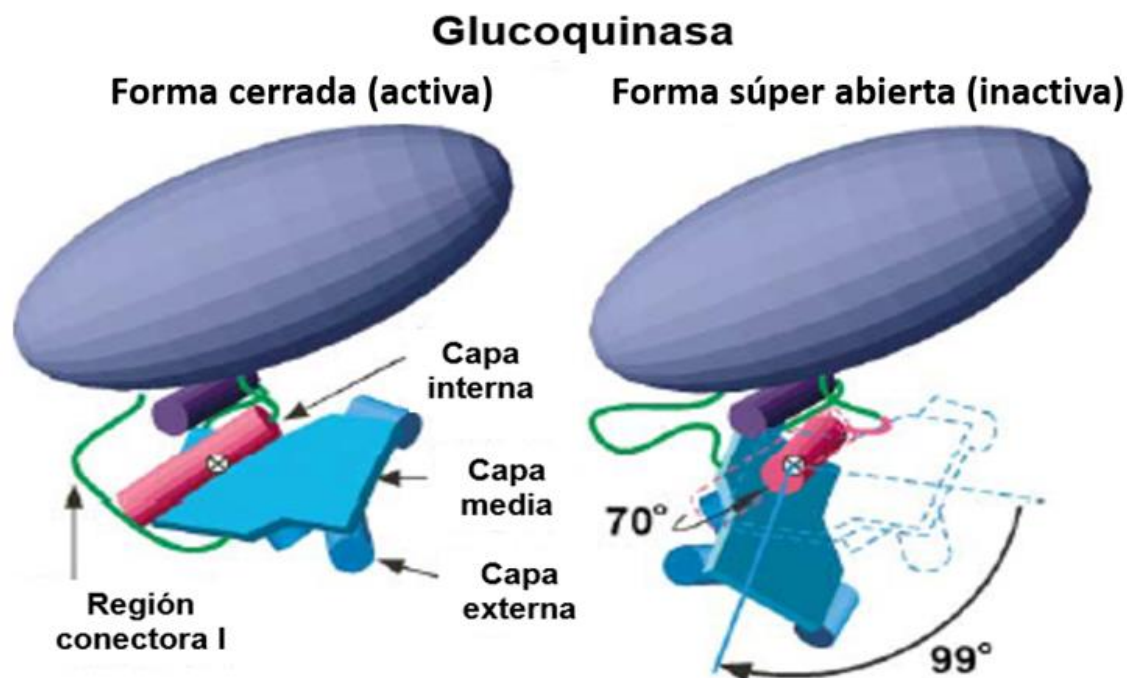


Figura 2. Esquema de las rotaciones involucradas en el cambio de formas de GCK.

En el dominio pequeño de GCK existen tres componentes claves: la capa interna de la hélice α_{13} (señalada en magenta), la capa media de la hoja β (señalada en turquesa) y la capa externa de las hélices $2'\alpha$, $3'\alpha$ y $4'\alpha$ (señaladas en turquesa). Durante los cambios conformacionales desde la forma súper abierta a cerrada, la capa media y externa rota 99° alrededor de un eje perpendicular al plano indicado por (X). La capa interna se mueve en dirección contraria a las otras dos debido a la región conectora I laxa. Adaptada y traducida de Kamata et al. 2004 ³⁵.

El cambio de conformación de GCK permite un aumento de afinidad por sus sustratos, donde la unión de glucosa gatilla el paso desde la forma súper-abierta a la cerrada, dando paso a la catálisis. Los aumentos de glucosa en el medio gatillan el inicio de un ciclo rápido, caracterizado por un equilibrio entre las conformaciones activas, mientras que la ausencia de glucosa desplaza el equilibrio desde la forma abierta (activa) a la súper-abierta (inactiva). Estos equilibrios de conformaciones con diferente afinidad por glucosa explican la cooperatividad positiva que presenta ³⁵. Lo anterior se resume e ilustra en la figura 3.

La literatura muestra que las mutaciones de la GCK afectan el equilibrio de conformaciones y la cinética de la enzima, a través de muchas variables. Por ejemplo, las mutantes H416R y D205H no intervienen directamente en el intercambio de conformaciones, sino en la formación del sitio activo, lo cual se traduce en una enzima completamente inactiva. Por otra parte, otros estudios muestran que mutantes como Y214C y W99L afectan el equilibrio de conformaciones, debido que estos cambios introducen alteraciones en la forma súper-abierta, esto tiene como consecuencia el desplazamiento del equilibrio hacia la forma cerrada, activando a la enzima^{37,38}. Más interesante aún son las mutaciones de la región hélice $\alpha 13$, como A449T, la cual aumenta la afinidad de GCK por glucosa mediante una estabilización de la hélice en la forma cerrada³⁴. Otro antecedente demostró que la delección e incluso el cambio en la secuencia aminoacídica de la región hélice $\alpha 13$, resulta en una GCK sin cooperatividad positiva para glucosa, la cual es un resultado del funcionamiento del equilibrio entre conformaciones^{39,40}. Adicionalmente, se ha mostrado que la hélice $\alpha 13$ es una zona fundamental para la interacción de GCK con activadores alostéricos, los cuales ejercen su efecto activador alterando el intercambio conformacional entre las formas súper-abierta y cerrada. Específicamente alteran la forma súper-abierta, transformándola en una especie más parecida a la forma cerrada, lo cual elimina el paso lento de transición entre los ciclos y atrapa a GCK en el ciclo rápido de catálisis, lo cual la activa⁴¹. Todo lo mencionado es importante para estudiar e inferir los efectos que G448D, la nueva mutante, podría tener sobre GCK.

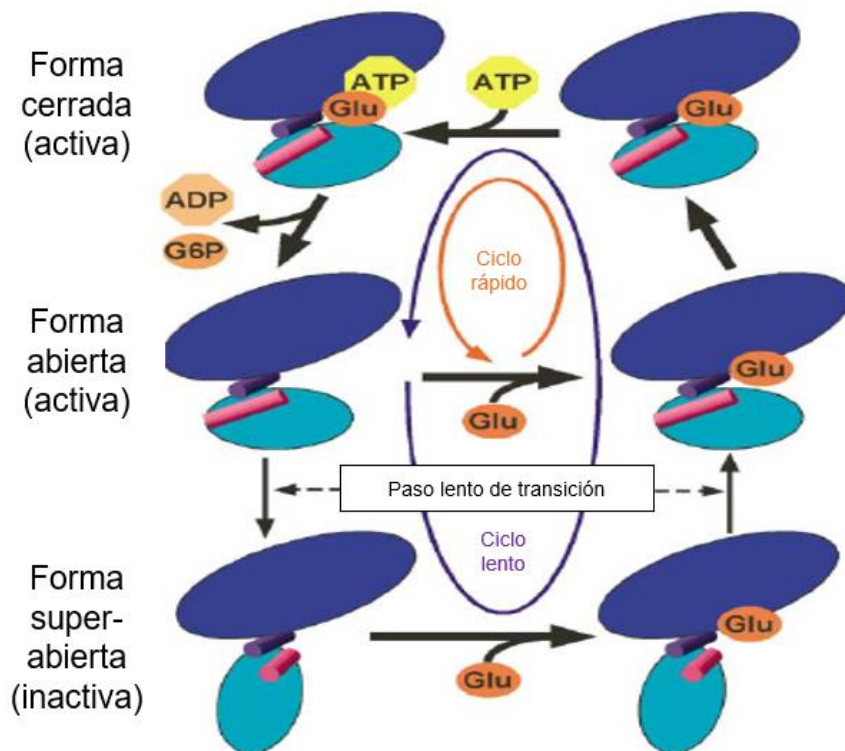


Figura 3. Equilibrios entre las conformaciones activa e inactiva de la GCK.

Representación esquemática de las tres conformaciones teóricas de la enzima glucoquinasa. El mecanismo de reacción es de tipo ordenado, con la entrada secuencial de glucosa y ATP, para luego dar salida a los productos ADP y glucosa-6-fosfato. La respuesta sigmoide de la enzima al sustrato glucosa, se explica por la existencia de dos ciclos de reacción (rápido y lento, como se aprecia en la imagen), donde un paso lento de transición (gatillado por la unión de glucosa) limita el intercambio de conformaciones, al igual que el paso de un ciclo de reacción al otro. Adaptada y traducida de Kamata *et al* 2004³⁵.

La mutación G448D se ubica en la hélice $\alpha 13$. Gracias a los antecedentes que se conocen de mutaciones en esta región, nos permite inferir, que esta mutación altera el intercambio conformacional de las formas cerrada y súper-abierta. Como ya se mencionó, el paso entre conformaciones está limitado por el movimiento de la hélice $\alpha 13$ desde una posición expuesta al solvente, al interior de la proteína. El cambio del aminoácido de glicina por ácido aspártico podría desestabilizar la hélice en la conformación cerrada, debido a que este cambio introduce un aumento de tamaño y carga, lo que podría alterar las interacciones de la región cuando se encuentra hundida en el interior de la enzima. Esta alteración desplazaría el equilibrio de conformaciones a la forma súper-abierta, lo cual se observaría en una

disminución de la afinidad por glucosa y una ausencia de cooperatividad positiva para ésta, consecuentemente, inactivando a la enzima. Esta inactivación, a su vez, llevaría consigo un aumento del GSIR, lo cual indicaría que esta GCK no posee una función de sensor y podría generar el fenotipo MODY2 observado. Así, el objetivo de esta memoria es conocer los efectos que tiene la mutación G448D, en los parámetros cinéticos de GCK, con el objetivo final de inferir el origen del fenotipo MODY2 observado en la paciente portadora y los miembros directos de su familia.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

La mutación G448D encontrada en la paciente chilena afecta la homeostasis de la glucosa, generando una alteración del umbral de secreción de insulina inducido por glucosa por cambios en los parámetros cinéticos y la estabilidad de la glucoquinasa pancreática humana silvestre.

2.2. Objetivo general

Determinar el efecto de la mutación G448D en los parámetros cinéticos y estructurales de la glucoquinasa pancreática humana silvestre, con el fin de estimar el efecto molecular de la mutación sobre el umbral de secreción de insulina inducido por glucosa y explicar el fenotipo encontrado en la paciente chilena.

2.3. Objetivos específicos

2.3.1. Determinar si la mutación G448D, o G448A alteran la estabilidad y estructura del estado nativo de la glucoquinasa pancreática humana silvestre.

2.3.2. Determinar si la mutación G448D o G448A alteran los parámetros cinéticos y la regulación intrínseca de la glucoquinasa pancreática humana, en función de la concentración de los sustratos glucosa y ATP con el fin de explicar el fenotipo encontrado en la paciente chilena.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1 Reactivos

N°	Reactivo	Marca	Número de catálogo
1	2-Propanol	Merck	1.01040.4000
2	2- Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	200-464-6
3	Ácido acético glacial	Merck	1.00063.2500
4	Ácido Clorhídrico (32%)	Merck	1.00317.2500
5	Acilamida	Amresco	341
6	Agar-Agar	Merck	1016141000
7	Agarosa	Bioline	BIO-41026
8	Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma-Aldrich	9048-46-8
9	Amortiguador de carga de ADN 6X	Thermo Scientific	R061
10	Adenosina trifosfato (ATP)	Sigma-Aldrich	34369-078
11	Bis-Acrlamida	Amresco	1725
12	Cloruro de Calcio	Merck	1023780500
13	Cloruro de magnesio heptahidratado	Merck	1058330250
14	Cloruro de Potasio	Merck	1.04936.1000
15	Cloruro de Sodio	Merck	7647-14-5
16	Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Merck	1.13760.0100
17	dNTP	Bioline	BIO-39025
18	Ditiotreitól (DTT)	Calbiochem	3860
19	Estándar de peso molecular de ADN (1 kb)	Thermo Scientific	SM0313
20	Estándar de peso molecular de proteínas, preteñido.	Thermo Scientific	26616
21	Etanol (100%)	Merck	1.00983.2500
22	Extracto de Levadura	Merck	1119261000
23	GelRed	Biotium	BI.41002

24	Glicerol (85%)	Merck	1.04094.1000
25	Glicina	USBiological	C13042598
26	Glucosa	Merck	1083375000
27	Glucosa 6 fosfato (G6P)	ROCHE	1012764700
28	Imidazol	USBiological	C9101551
29	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	Bioline	BIO-37036
30	Lisozima	Sigma-Aldrich	L6876
31	Kanamicina disulfato	Merck	1051770025
32	Membrana de diálisis (MW 12-14 kDa)	Spectrum Medical Industries®	-
33	Nicotinamida adenina dinucleótido	Roche	10127965001
34	Peptona	Merck	1070431000
35	Persulfato de amonio	Amresco	0486-25G
36	Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF)	Sigma-Aldrich	-
37	Reactivo de Bradford	Bio-Rad	500-0006
38	Sulfato de niquel hexahidratado	Merck	1067270250
39	Urea	Merck	1084875000
40	Tris base	Calbiochem	9210

3.1.2 Sistemas comerciales

Nº	Sistema comercial	Marca	Número de catálogo
1	E.Z.N.A. ® Plasmid ADN Mini Kit II	Omega Bio Tek	D69450107251836122 327
2	GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System.	Thermo Fisher Scientific	12397014

3.1.3 Software

Nº	Software	Marca	Número de catálogo
1	GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc.	-
2	SigmaPlot 10.0	Systat Software Inc.	-
3	Genious	Biomatters	-

3.1.4 Equipos

N°	Equipo	Marca	Número de catálogo/serie
1	Superdex™ 200 10/300 GL	GE Healthcare	28-9909-44
2	HisTrap™ FF	GE Healthcare	10281772
3	Agilent 1100 Series HPLC value system®	Agilent Technologies	DE43823141
4	Hewlett Packard 8453 (G1103A) diode-array	Agilent Technologies	US53400245
6	Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer	Agilent Technologies	-
7	Cubeta de fluorescencia 23-5.45/Q/5	STARNA	-
8	High precisión Cell SUPRASIL ®	Hellma Analytics	105-202-15-40
9	The MicroPulser Electroporator	Bio - Rad	-

3.1.5. Reactivos biológicos

N°	Reactivo	Marca	Número de catálogo
1	Polimerasa de ADN Pfu	Expresada de forma recombinante	-
2	pET28a(+)-TEV-GCK	Genscript	OHu18369C
3	Partidor mutagénico G448D sentido	Macrogen	OG190315-004
4	Partidor mutagénico G448A sentido	Macrogen	OG190315-004
5	Partidor mutagénico anti-sentido	Macrogen	OG190315-004

3.2. Métodos

3.2.1. Construcción del plásmido, clonamiento y mutagénesis

La secuencia codificante para la enzima glucoquinasa pancreática humana (código NCBI nucleotide database: NM_000162.4; en esta memoria se le referirá como GCK) fue obtenida en el vector pET-28a(+) de Genscript. Este es un vector de expresión bacteriano que permite fusionar un marcador de afinidad de hexa-histidina a la proteína de interés, lo cual es fundamental para el proceso de purificación. En la figura 1 se esquematizan las principales características del vector.

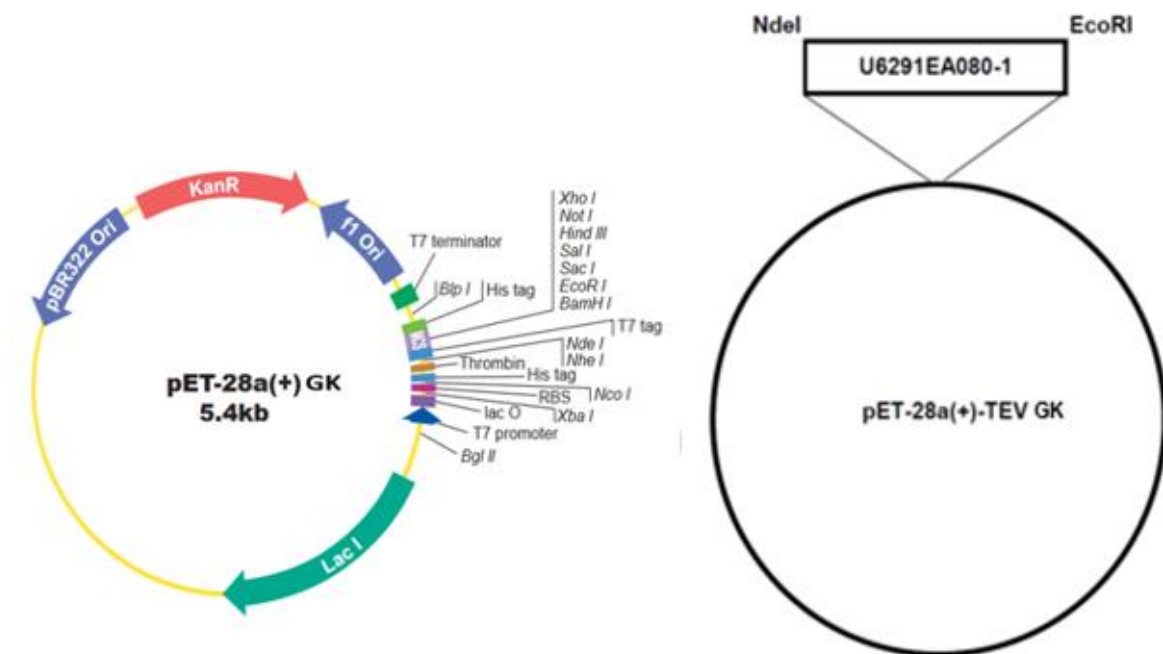


Figura 4. Vector de expresión pET-28a(+) y diseño del plásmido de expresión para la obtención de la enzima GCK-WT.

A la izquierda de la imagen se muestra el vector pET-28a(+) (Genscript®). A la derecha se muestra la secuencia codificante de GCK-WT: U6291EA080-1 (código NCBI nucleotide database: NM_000162.4), insertada en el vector pET-28a(+). Esta secuencia contiene dos sitios de restricción en sus extremos: NdeI y EcoRI. También se indica el nombre del plásmido que se usará en esta memoria: pET-28a(+)-TEV-GCK.

Para el clonamiento del plásmido, se transformó *E. coli* DH5 α electrocompetentes mediante electroporación, usando un voltaje de 1.5 kV aplicado durante 5 ms. Se recuperaron colonias

individuales resistentes a kanamicina en medio de cultivo Luria Bertani (LB), para luego extraer copias del plásmido usando el sistema comercial *E.Z.N.A.® Plasmid ADN Mini Kit II*. Se comprobó la integridad y pureza del ADN mediante la razón A_{260}/A_{280} y electroforesis en gel de agarosa. Para la generación de las GCK mutantes G448D y G448A, se realizó mutagénesis sitio dirigida al plásmido pET28a(+)-TEV-GCK, usando el sistema *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System*. Los partidores empleados fueron sintetizados por la empresa MacroGen: GCK_G_a_D 5'-CGGAGGAGGGCAGTGACCGGGGCGCGGCC-3', GCK_G_a_A: 5'-CGGAGGAGGGCAGTGCCCGGGGCGCGGCC-3', GCK_antisentido: 5'-CACTGCCCTCCTCCGACTCGATGAAGGTGATCTCGCAGC-3'. La efectividad de la mutagénesis fue evaluada por secuenciación del producto de PCR (Servicio de Secuenciación, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile), y la integridad de éste se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa.

3.2.2. Expresión y purificación de G6PDH, GCKWT, mutante G448D y G448A

La expresión y purificación de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides*, se realizó usando el protocolo de Olavarría *et al*⁴². Para la expresión de la enzima GCK WT y sus mutantes, se transformó *E. coli* BL21 quimiocompetentes usando un golpe de temperatura. Las bacterias se incubaron a 42°C durante 35 s en presencia de 100 ng de plásmido, luego se realizó un rápido cambio de temperatura a 4°C durante 120 s; por último, se recuperaron las transformantes en medio LB durante 1 hora.

Se seleccionaron las colonias individuales resistentes a kanamicina para la expresión de las proteínas recombinantes. Los cultivos transformantes se llevaron a densidad óptica a 600 nm entre valores de 0,5 – 0,7, y se indujo la expresión de GCK (o sus mutantes) durante 3 h a 37°C, usando IPTG 1 mM. Para la purificación de las enzimas las células bacterianas se sedimentaron por centrifugación a 4080g, durante 30 min a 4°C. El sedimento bacteriano se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 7,4 MgCl₂ 50 mM, PMSF 10 mM, 2-mercaptoetanol 8 mM, lisozima 20 mg/mL e imidazol 20 mM. Se lisó el resuspendido bacteriano mediante

sonicación, con posterior centrifugación a 14500 x g durante 15 min a 4°C, recuperando el sobrenadante.

Se purificó la enzima usando una modificación del protocolo de Palma *et al* 2001⁴³. Se realizó una purificación de un paso usando cromatografía de afinidad de catión níquel inmovilizado, usando la columna HisTrap™ FF. Se cargaron las columnas con NiSO₄ 100 mM y equilibraron con Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 20 mM, KCl 300 mM, 2-mercaptoetanol 8 mM e Imidazol 20 mM. El sobrenadante recuperado de la centrifugación del lisado bacteriano se cargó en la columna. Posterior a ello, para remover las impurezas de la columna de afinidad, se realizaron dos lavados con 20 volúmenes con un tampón de composición Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 20 mM, KCl 300 mM, 2-mercaptoetanol 8 mM e imidazol 20 mM para el primer lavado e imidazol 30 mM para el segundo. Finalmente se realizó la elución con un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 20 mM, KCl 300 mM, 2-mercaptoetanol 8 mM e imidazol 250 mM.

Con el fin de recuperar las enzimas, se colectaron fracciones de 1 mL y se les ensayó actividad GCK. Las fracciones con mayor actividad y concentración de proteína fueron recolectadas en un *pool*, el cual se suplementó con glicerol a concentración final de 50% v/v, y 2-mercaptoetanol hasta una concentración 8 mM. Las alícuotas de GCK pura fueron diluidas hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL de proteína y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se usó la técnica SDS-PAGE para verificar la pureza e integridad de los purificados, además de evaluar cada paso de la purificación.

Se realizaron pasos adicionales de cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex™ 200 10/300 GL equilibrada previamente con el tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM. La separación cromatográfica se realizó en el equipo *Agilent 1100 Series HPLC value system*® usando el tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 20 mM, KCl 300 mM y 2-mercaptoetanol 8 mM a un flujo de 0,7 mL/min. La señal de absorbancia a 280 nm se usó para detectar la enzima GCK. Las fracciones eluidas se analizaron inmediatamente.

3.2.3. Ensayos de actividad y estimación de parámetros cinéticos

Se midió la actividad de GCKWT y las mutantes G448D y G448A, usando el ensayo acoplado a la producción de NADH, por la enzima G6PDH, descrito por Xu *et al*²⁴. El espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 (G1103A) diode-array, se usó para detectar y cuantificar los cambios de absorbancia a 340 nm. Los ensayos de actividad se realizaron a 22°C, con una duración de 1 minuto. Los componentes del medio de ensayo fueron Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, MgCl₂ 6 mM, KCl 100 mM, BSA 0,8 %, DTT 1 mM, NAD⁺ 1 mM y G6PDH 0,2 U/mL y los sustratos ATP y glucosa. La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que fosforila 1 μmol de sustrato en 1 minuto a 22°C. Para medir la actividad de las fracciones de purificación se mantuvieron constantes las concentraciones de ATP y glucosa, correspondientes a 5 mM y 200 mM, respectivamente. Para la determinación de los parámetros cinéticos para glucosa se ensayaron 13 concentraciones de glucosa entre 0,25 y 100 mM, manteniendo constante la concentración de ATP en 5 mM. Para el segundo sustrato se usaron diez concentraciones de ATP entre 0,05 y 5 mM, manteniendo constante la concentración de glucosa en 100 mM. Se midieron las velocidades de reacción en la zona de estado estacionario de las curvas de progreso. Los ensayos de velocidad de reacción se realizaron en triplicado. Para los ensayos de pre-incubación con glucosa, un stock de GCK en 50% glicerol se diluyó a una concentración de 5% glicerol en el tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, MgCl₂ 6 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, con la adición de glucosa 30 mM; esta preparación se dejó en agitación durante 1 hora a 4°C antes de realizar los ensayos cinéticos. Para los ensayos de pre-incubación en glicerol, stocks de GCK recién purificada se llevaron a 20% glicerol en el tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, MgCl₂ 6 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM; esta preparación se dejó en agitación durante 1 hora a 4°C antes de realizar los ensayos cinéticos. Los ensayos cinéticos de pre-incubación con glucosa y glicerol se realizaron en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Para calcular los parámetros cinéticos k_{cat} y K_M para ATP de las GCKWT y mutantes, se realizó una regresión no lineal con un ajuste a un modelo Michaelis-Menten. Para estimar la k_{cat} , coeficiente de Hill (n_H) y el $S_{0.5}$ para glucosa, se realizó una regresión no lineal con un ajuste a un modelo alostérico-sigmoide (ecuación de Hill, ecuación 1). Todos los

procesamientos de datos anteriormente mencionados se realizaron usando el software GraphPad Prism 6.

$$v = \frac{V_{max} * [glucosa]^h}{S_{0,5}^h + [glucosa]^h}$$

Ecuación 1. Ecuación de Hill ajustada a los datos de velocidad de reacción en estado estacionario y concentración de glucosa.

v corresponde a velocidad de reacción en estado estacionario. V_{max} corresponde al valor de velocidad a concentración saturante de sustrato. h corresponde al índice de Hill. $[glucosa]$ corresponde a la concentración de sustrato.

3.2.4. Despliegamiento y replegamiento de GCK en presencia de urea

La fluorescencia intrínseca de triptófano se usó como sonda para medir el estado desplegado y nativo de GCK. Esto gracias a que el cambio en el ambiente del residuo, producto del proceso de despliegamiento, sea este químico o térmico, se puede observar en los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína. Se ha observado que en GCK los residuos de triptófano poseen un máximo de emisión de fluorescencia a 320 nm, cuando estos se encuentran en un ambiente hidrofóbico, en otras palabras, cuando la enzima se encuentra en su estado nativo. Mientras que la denaturación química y térmica, genera un corrimiento al rojo de la emisión de fluorescencia con un máximo a 360 nm. La razón de intensidades I_{320}/I_{360} es así una medida del corrimiento del espectro, al igual que un indicativo de las fracciones de enzima en estado nativo y desplegado.

Se utilizó el espectrofotómetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer y la cubeta de fluorescencia 23-5.45/Q/5. Para observar la fluorescencia de triptófano, se utilizó como longitud de onda de excitación 295 nm y se registraron las longitudes de emisión entre 300 nm y 500 nm. Para obtener los espectros de fluorescencia, se utilizaron anchos de hendidura para configurar un paso de banda de emisión y excitación de 5 nm y 10 nm, respectivamente. Las muestras se prepararon usando fracciones enriquecidas de GCK dializadas contra una solución de Na_2PO_4 20 mM y KCl 50 mM durante 2 horas. Para los ensayos de

desplegamiento, se prepararon 16 concentraciones de urea entre 0 y 8 M, con una concentración constante de GCK en 6 μ M y tampón Na₂PO₄ 20 mM y KCl 50 mM. Para asegurar condiciones de equilibrio, los preparados se incubaron durante la noche a temperatura ambiente (22 °C), para medir durante el otro día. Para los ensayos de replegamiento se incubó la fracción enriquecida de GCK en condiciones de desplegamiento (Urea 8 M) durante toda la noche y a temperatura ambiente. La evaluación de la transición de replegamiento se realizó mediante diluciones seriadas hasta la menor concentración de urea posible (~0,5 M), las cuales se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente previo a su medición. El tampón y las condiciones de medición fueron las mismas ya descritas.

Las curvas de desplegamiento/replegamiento químico obtenidas mediante fluorescencia intrínseca de triptófano fueron ajustadas a modelos de dos estados (N \rightleftharpoons D), ya que esta aproximación ha sido descrito para GCK^{44,45}. Mediante este ajuste se puede calcular el cambio en la energía libre de Gibbs para el proceso de desplegamiento ($\Delta G_{N \rightleftharpoons D}$) según la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{N \rightleftharpoons D} = -RT \ln(K_{N \rightleftharpoons D}) \quad (2)$$

Ecuación 2. Cálculo del cambio de energía libre de Gibbs en condiciones de equilibrio.

$\Delta G_{N \rightleftharpoons D}$ corresponde al cambio de energía libre asociado al equilibrio entre el estado nativo y el estado desplegado (kcal/mol). $K_{N \rightleftharpoons D}$ corresponde a la constante de equilibrio para el paso del estado nativo al estado desplegado; R es la constante de los gases ideales (kcal/mol K); T es la temperatura absoluta (K).

Considerando que $\Delta G_{N \rightarrow D}$ varía linealmente con la concentración de urea, se puede estimar la energía libre de desplegamiento en ausencia de agente caotrópico ($\Delta G_{N \rightleftharpoons D}^{H_2O}$)⁴⁰, mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{N \rightleftharpoons D} = \Delta G_{N \rightleftharpoons D}^{H_2O} + m[Urea] \quad (3)$$

Ecuación 3. Dependencia de ΔG con la concentración de urea.

$\Delta G_{N \rightleftharpoons D}$ corresponde al cambio de energía libre asociado al equilibrio entre el estado nativo y el estado desplegado (kcal/mol). $\Delta G_{N \rightleftharpoons D}^{H_2O}$ corresponde al valor de ΔG en ausencia de agente caotrópico, para el equilibrio entre el estado nativo y el estado desplegado; m corresponde a la dependencia de ΔG con la concentración de urea para el equilibrio entre el estado nativo y el estado desplegado.

El valor m se relaciona con el cambio de área accesible al solvente (ΔASA) entre los estados nativo y desplegado.

Las fracciones molares de proteína nativa (f_N) y proteína desplegada (f_D) se relacionan con la constante de equilibrio ($K_{N \rightleftharpoons D}$) de acuerdo con las ecuaciones 4, 7 y 8, respectivamente:

$$f_N = 1 - f_D \quad (4)$$

$$K_{N \rightleftharpoons D} = \frac{f_D}{f_N} = \frac{f_D}{1 - f_D} \quad (5)$$

$$f_D = \frac{K_{N \rightleftharpoons D}}{1 + K_{N \rightleftharpoons D}} \quad (6)$$

Ecuación 4, 5 y 6. Relaciones entre las fracciones molares y las constantes de equilibrio.

f_N y f_D corresponden a las fracciones molares de las especies nativa y desplegada, respectivamente. $K_{N \rightleftharpoons D}$ corresponde a la constante de equilibrio para el paso del estado nativo al estado desplegado.

Utilizando las intensidades de señal de fluorescencia obtenidas a 320 nm y 360 nm, se puede establecer una relación entre las ecuaciones 2, 3 y 6 para determinar $\Delta G_{N \rightleftharpoons D}^{H_2O}$ para cada una de las enzimas en estudio, usando la siguiente transformación:

$$f_D = \frac{\text{señal}_{\text{nativo}} - \text{señal}_{X M \text{ urea}}}{\text{señal}_{\text{nativo}} - \text{señal}_{\text{desplegado}}} = \frac{\left(\frac{I_{320}}{I_{360}}\right)_{0 M \text{ urea}} - \left(\frac{I_{320}}{I_{360}}\right)_{X M \text{ urea}}}{\left(\frac{I_{320}}{I_{360}}\right)_{0 M \text{ urea}} - \left(\frac{I_{320}}{I_{360}}\right)_{8 M \text{ urea}}} \quad (7)$$

Ecuación 7. Relación entre la fracción molar f_D y las señales de fluorescencia obtenidas.

f_D corresponde a la fracción molar de la especie nativa. Se muestra que f_D puede ser calculado a partir de señales de fluorescencia, donde los subíndices de cada señal se refieren a algún estado del proceso de desplegamiento: nativo-estado nativo, X M urea-estado en presencia de alguna concentración (X M) de urea, desplegado-estado desplegado. Por último, se muestra como las señales se traducen en las mediciones realizadas ya descritas. Los valores de I_{320}/I_{360} poseen subíndices donde se especifican las concentraciones de urea usadas para su obtención.

Así los datos de fluorescencia obtenidos, usando la transformación anterior, serán ajustados a la siguiente ecuación:

$$f_D([Urea]) = \frac{e^{\frac{-(\Delta G_{N \rightleftharpoons D}^{H_2O} + m[Urea])}{RT}}}{1 + e^{\frac{-(\Delta G_{N \rightleftharpoons D}^{H_2O} + m[Urea])}{RT}}} \quad (8)$$

Ecuación 8. Modelo que relaciona la fracción desplegada de proteína con la concentración de urea.

f_D corresponde a la fracción molar de la especie nativa, definida en la ecuación 7. Esta función permite ajustar los datos experimentales de fluorescencia intrínseca de W, a las concentraciones de urea usadas para realizar el desplegamiento químico. Esta ecuación proviene de igualar las ecuaciones 2 y 3, usar las ecuaciones 6 y 7 para definir f_D y reordenar los términos. Desde este modelo, ajustado a los datos experimentales, se puede determinar $\Delta G_{N \rightleftharpoons D}^{H_2O}$ y m.

El ajuste de los datos de f_D a diferentes concentraciones de urea, a la ecuación 8 y los cálculos de $\Delta G_{N \rightleftharpoons D}^{H_2O}$ y m, fueron realizados usando el software SigmaPlot 10.

4. Resultados

4.1. Estabilidad del plásmido pET-28a(+)-TEV-GCK en la cepa de expresión *E. coli* BL21

El plásmido pET-28a(+)-TEV-GCK se transformó en la cepa de expresión *E. coli* BL21 se extrajo para estudiar su integridad en la cepa. La extracción del plásmido se muestra en la figura 5. En la electroforesis de ADN en gel de agarosa se observa una banda en 8000 pb cuyo peso corresponde al tamaño del plasmidio pET-28a(+)-TEV-GCK. La digestión de éste con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI separa la secuencia codificante de GCK-WT del resto del vector, obteniendo dos productos de reacción: una banda a de 6000 pb, la cual da cuenta del vector sin la secuencia de GCK-WT, mientras que la otra se encuentra por debajo de 1500 pb coincidiendo con el tamaño de la secuencia de GCK-WT (tamaño estimado del inserto: 1410 bp). Como se muestra en la figura 5, la extracción del plásmido y los productos de digestión obtenidos, son consistentes con lo esperado e indicado por el fabricante. Estos resultados nos permitieron asegurar la pureza e integridad del plásmido en la cepa bacteriana.

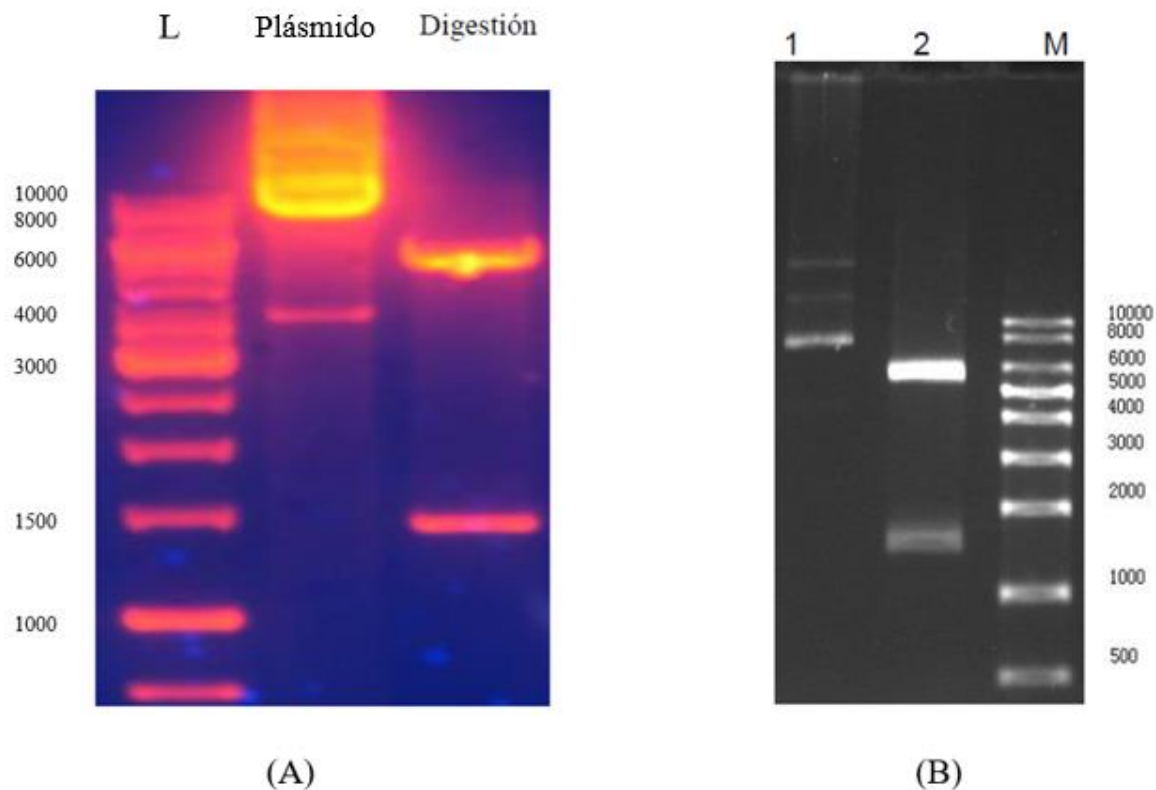


Figura 5. *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pET-28a(+)-TEV-GCK, generando un plásmido estable.

La figura corresponde a una electroforesis de ADN en gel de agarosa 1% de la extracción del plásmido de expresión pET-28a(+)-TEV-GCK de la cepa *E. coli* BL21 y digestión de éste con las enzimas de restricción NdeI/EcoRI. (A) L=Estándar de peso molecular de ADN; Plásmido=extracción del plásmido desde la cepa de *E. coli* BL21; Digestión=Reacción de digestión de “BL21” con las enzimas NdeI y EcoRI; también se muestran los tamaños moleculares correspondientes al estándar. (B) Extracción del plásmido pET-28a(+)-TEV-GCKy digestión del mismo proporcionado por la empresa Genscript®. Carril 1=Plásmido pET-28a(+)-TEV-GCK, Carril 2=Digestión de “1” con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI, M=Estándar de peso molecular de ADN.

4.2. Mutagénesis sitio dirigida y transformación

Aislado el plásmido se procedió con la reacción de mutagénesis sitio dirigida, la que tiene por objetivo el generar las GCK mutantes: G448D y G448A. Para lograr esto, se realizaron cambios de codón en el gen, los cuales producen mutaciones *missense* en el residuo 448 de la proteína. La secuencia codificante de la enzima GCK-WT posee una glicina en la posición 448, la mutagénesis buscó realizar los cambios G1340A y G1340C en la secuencia del gen,

para cambiar el residuo de glicina a residuos de ácido aspártico (correspondiente a la enzima mutante GCK-G448D) y alanina (correspondiente a la enzima mutante GCK-G448A).

Para realizar la mutagénesis se diseñaron partidores de 30 pb, los cuales poseen T_m altas. Para los partidores sentido de las reacciones G448D y G448A las T_m son 85,8 °C y 87,1 °C, respectivamente, mientras que para el partididor antisentido la T_m es 83,1 °C. Teniendo lo anterior en consideración, se estudió una gradiente de temperatura para el apareamiento de partidores. Como se observa en la figura 6, la gradiente de temperatura no amplifica un producto de reacción (mitad izquierda de la figura), debido a que los partidores tienen un alto porcentaje de GC y una T_m alta. Para resolver este problema, se ensayó la misma gradiente de temperatura en presencia de DMSO. Se recomienda el uso de DMSO en las reacciones de PCR que involucran templados con alto contenido de GC, o estructuras secundarias complejas, las cuales impiden el óptimo apareamiento entre los partidores y la secuencia templado. Este reactivo disminuye las interacciones entre las bases G y C, permitiendo un mejor apareamiento entre los partidores y secuencias. El resultado de la adición de 1% DMSO se muestra en la parte derecha de la figura 6, donde se observa una banda prominente en 8000 bp para casi todas las temperaturas estudiadas, coincidente con el tamaño del plásmido y el producto esperado. De la gradiente de temperatura anterior, se seleccionó la temperatura 77,1 °C para la reacción de cambio G448D y las temperaturas 59,1 °C, 71,8 °C y 77,1 °C para realizar la reacción de mutagénesis para el cambio G448A, debido a que a estas temperaturas presentan la mayor cantidad de producto.

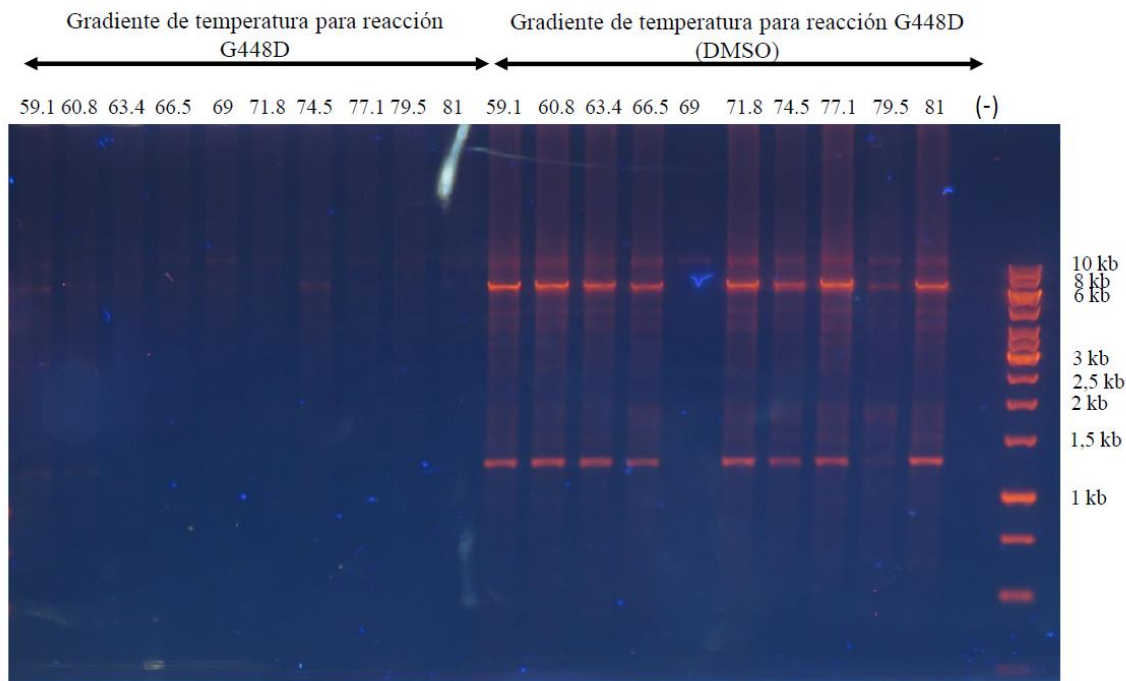


Figura 6. Gradiente de temperatura para la reacción de mutagénesis G448D en ausencia y presencia de DMSO.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1%, gradiente de temperatura de la reacción de mutagénesis sitio dirigida. Se muestra el gradiente de temperatura para la reacción de mutagénesis para conseguir el cambio G448D. La imagen muestra una reacción de mutagénesis por carril, la cual fue llevada a cabo a la temperatura indicada por los números en la parte superior de cada carril. Las dobles flechas por sobre las temperaturas separan los gradientes en dos condiciones: sin adición de DMSO (mitad izquierda de la imagen) y con adición de 1% DMSO (mitad derecha de la imagen). Los dos carriles del extremo derecho muestran un control negativo “(-)” y el estándar de peso molecular de ADN.

En la figura 7 se muestran los resultados del estudio de temperaturas para la reacción G448A; también se muestra la reacción G448D para la temperatura de 77,1 °C y los controles para estas reacciones. Respecto del estudio de temperaturas para la reacción G448A, se obtiene un producto de reacción en el peso molecular esperado (8000 bp) y, una mayor cantidad de producto cuando la reacción posee una temperatura de apareamiento de 77,1 °C. La reacción de mutagénesis G448D a 77,1 °C genera una gran cantidad de producto de reacción, demostrando ser una condición eficiente en la generación de plásmido mutante. Por último, esta figura muestra los controles para descartar inespecificidad de la reacción; la falta de uno de los partidores de la reacción, de ambos partidores o de la enzima impiden la generación

de producto, lo cual nos permite descartar inespecificidad de la reacción.

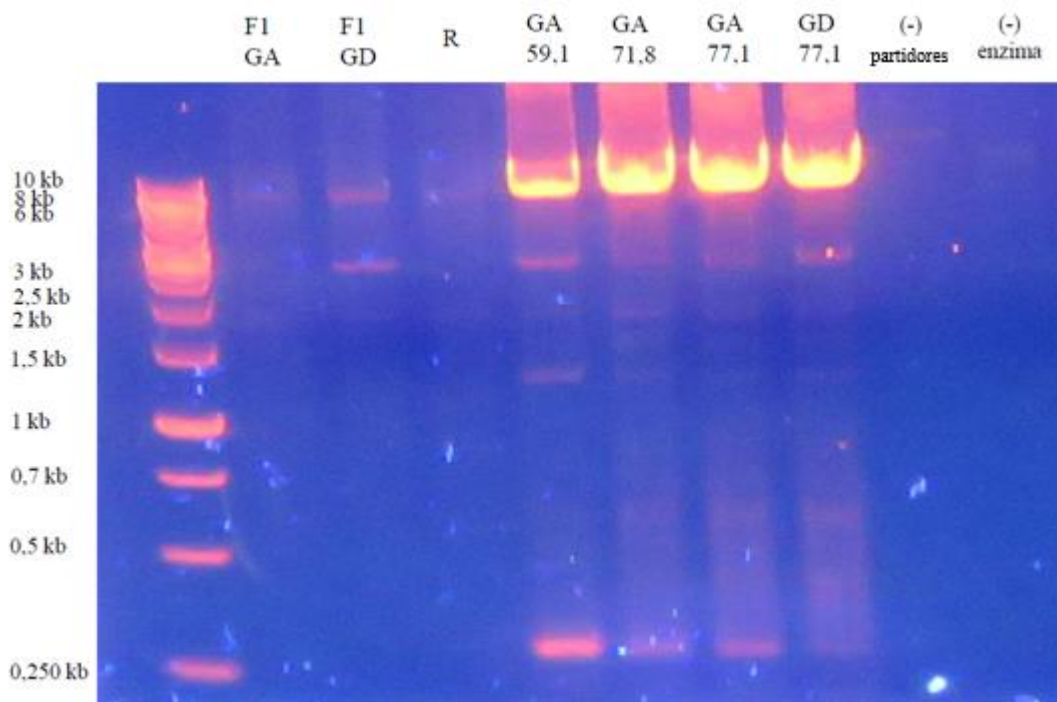


Figura 7. La reacción de mutagénesis sitio dirigida, en presencia de DMSO, es específica y genera un solo producto de reacción.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1% para la reacción de mutagénesis sitio dirigida G1340C y los controles de cada reacción. En la imagen se muestran una serie de reacciones de PCR como controles negativos y las temperaturas con mayor generación de producto observadas en la gradiente; de izquierda a derecha: Sin etiqueta=Estándar de peso molecular de ADN; F1 GA=Control negativo donde la reacción sólo posee el partidor sentido (F) de la reacción para generar la mutante GCK-G448A; F1 GD=Control negativo donde la reacción sólo posee el partidor sentido (F) de la reacción para generar la mutante GCK-G448D; R=Control negativo donde la reacción sólo posee el partidor antisentido (R) de las reacciones de mutagénesis; GA 59,1=Reacción de mutagénesis, GA 71,8=Reacción de mutagénesis; GA 77,1= Reacción de mutagénesis sitio; GD 77,1= Reacción de mutagénesis; (-) partidores=Control negativo en ausencia de los partidores de la reacción de mutagénesis sitio dirigida; (-) enzima=Control negativo donde la reacción no posee la polimerasa *Pfu* para la reacción de mutagénesis sitio dirigida.

Para corroborar que los productos de mutagénesis sitio dirigida portaran la mutación deseada, además de mantener completa fidelidad con el resto de la secuencia codificante de la enzima GCK, se procedió a secuenciar estos productos. En la figura 8 se observa que los productos

de mutagénesis portan los cambios G1340A, G1340C y codifican para los aminoácidos ácido aspártico y alanina respectivamente, mientras que el templado (secuencia codificante para GCK-WT) codifica para el aminoácido de glicina en la posición correspondiente a 448 en la enzima.



Figura 8. La mutagénesis sitio dirigida modifica el codón que codifica para el aminoácido 448, introduciendo los cambios *missense* G448D y G448A.

Secuenciación del plásmido codificante para GCK y los productos de la reacción de mutagénesis sitio dirigida para cada mutante. La imagen muestra las secuencias de ADN codificantes obtenidas mediante secuenciación de los productos de reacción de mutagénesis sitio dirigida (para las mutantes G448A y G448D) además del templado para la reacción (GCK-WT). Se muestra sólo la región de interés, la cual corresponde al sitio de mutación, y el electroferograma de la secuenciación. Se muestra enmarcado en un círculo el triplete que codifica para el aminoácido 448 de la enzima y se destaca el cambio de nucleótido en la secuencia. De arriba hacia abajo: en rojo se muestra la secuencia del producto de la reacción para generar la mutante G448D, en verde la secuencia del producto de la reacción para generar la mutante G448A y en azul la secuencia del templado que codifica para la enzima WT.

Una vez comprobado que los productos de mutagénesis sitio dirigida portaban la mutación, estos se transformaron en colonias de *E. coli* DH5 α para su posterior extracción. En la figura 9 se muestra la extracción de los plásmidos codificantes para las enzimas GCK-WT y las mutantes GCK-G448D y GCK-G448A. Se observa una banda a 8000 bp la cual corresponde a los plásmidos. Una vez confirmada las secuencias, se procedió a transformar cada plásmido

en la cepa de expresión *E. coli* BL21. La figura 9 muestra el resultado de una de estas transformaciones, en la cual se observan más de 50 colonias transformantes para la enzima mutante GCK-G448D, resultado que se replicó para el resto de las enzimas en estudio. La obtención de cepas de expresión portadoras de los plásmidos codificantes para las enzimas GCK-WT, GCK-G448D y GCK-G448A nos permitieron continuar con la siguiente etapa: expresión y purificación de las enzimas.

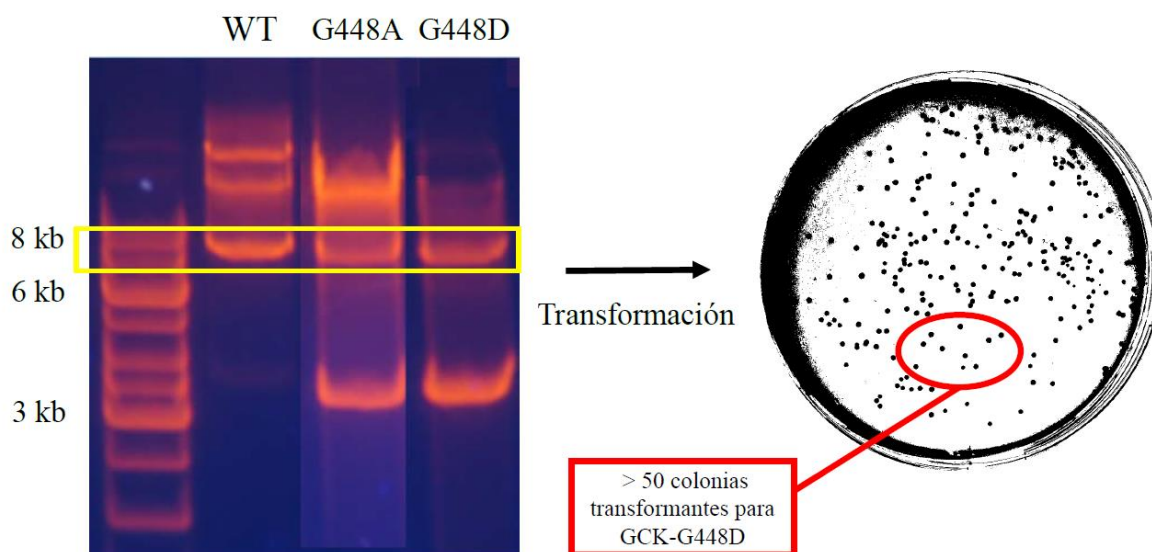


Figura 9. Los plásmidos codificantes para la enzima GCK-WT, GCK-G448A, GCK-G448D son estables en las cepas *E. coli* DH5 α , se pueden extraer y transformar en *E. coli* BL21.

Electroforesis en gel de agarosa 1% de la extracción de los plásmidos codificantes para la enzima GCK-WT, GCK-G448A, GCK-G448D y resultado de la transformación del plásmido codificante para GCK-G448D. A la izquierda de la figura, se observa la integridad de los plásmidos extraídos de la cepa de expresión *E. coli* DH5 α , correspondiente para cada enzima. Se enmarca en un cuadrado el peso molecular correspondiente con el plásmido superenrollado. De izquierda a derecha: Carril sin etiqueta=Estándar de peso molecular de ADN; WT=Plásmido codificante para la enzima WT; G448A=Plásmido codificante para la enzima mutante G448A; G448D=Plásmido codificante para la enzima mutante G448D. A la derecha de la figura se observa el resultado de una transformación exitosa en la cepa de expresión *E. coli* BL21.

4.3. Purificación de las enzimas silvestre, mutante G448D y G448A

Con el objetivo de facilitar la purificación de las enzimas GCK-WT, GCK-G448D y GCK-G448A, se las diseñó como proteínas de fusión con un hexa-péptido de histidina localizado en el extremo amino-terminal. Una vez expresadas, las enzimas se purificaron usando cromatografía de afinidad a catión níquel II inmovilizado.

Los resultados de estas purificaciones se muestran en la figura 10 y la tabla 1. En la figura 10 se muestra el resultado de cada etapa del protocolo de purificación. En todas las purificaciones se observa una sobreexpresión de la enzima GCK, indicada por una banda intensa a 55 kDa presente en el lisado bacteriano (peso molecular de GCK: 53 kDa). La presencia de esta misma banda en los sobrenadantes de la centrifugación de estos lisados, nos indica que la enzima se encuentra de forma soluble en la bacteria. Por otra parte, los frentes de carga indican que la enzima es retenida en la columna de níquel II inmovilizado, mientras que el resto de las proteínas no se retienen. El patrón de bandas en los frentes es similar a las de los lisados bacterianos, sin presentar la banda prominente a 55 kDa de peso molecular. Los lavados de columna muestran la elución de todas las proteínas bacterianas que interactuaron débilmente con la columna. Por último, se observan prominentes bandas a 55 kDa de peso molecular para la elución de las enzimas GCK-WT, GCK-G448D y GCK-G448A.

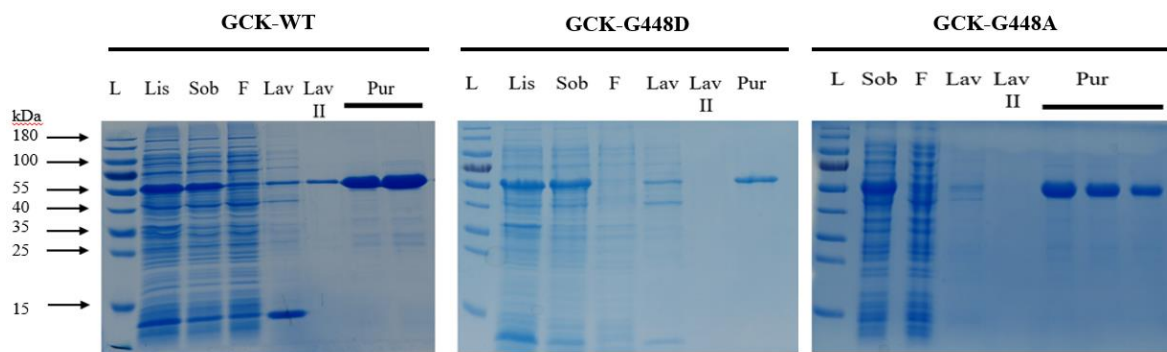


Figura 10. Purificación de GCK-WT, mutante GCK-G448D y mutante G448A mediante cromatografía de afinidad a catión metálico inmovilizado.

SDS-PAGE 12% de etapas de purificación de las enzimas GCK-WT, mutante GCK-G448D y GCK-G448A. En la imagen se muestran tres purificaciones, de izquierda a derecha: purificación de la enzima GCK-WT, de la enzima mutante GCK-G448D, y de la enzima mutante GCK-G448A. Se indican los pasos de la purificación mediante la etiqueta sobre cada carril. De izquierda a derecha: L=Estándar de peso molecular de proteínas; Lis=Lisado bacteriano; Sob=Sobrenadante de la centrifugación del lisado bacteriano; F=Frete de la columna para cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado (His-Trap); Lav=Lavado con solución a concentración 20 mM de imidazol; LavII=Lavado con solución a concentración 30 mM de imidazol; Pur=Conjunto de fracciones de enzima eluída de la columna para cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado (His-Trap).

En la tabla 1 se muestra una serie de parámetros asociados a la purificación. La cantidad de proteína obtenida por litro de cultivo concuerda con los resultados publicados por otros autores^{38,39,41}. La concentración de proteína obtenida, en conjunto con el rendimiento y las veces de purificación, indican que las enzimas de interés corresponden a la población mayoritaria de proteína presente en las fracciones eluídas. A pesar de lo anterior, la actividad específica mostrada es menor a la reportada por otros autores^{24,37,45}, lo cual indica que las enzimas no están suficientemente puras.

Tabla 1. Resumen de las purificaciones de las enzimas GCK-WT, GCK-G448D, GCK-G448A.

Enzima	Cantidad de GCK por litro de cultivo de <i>E. coli</i> mg/L	Concentración de proteína fracciones puras mg/mL	Actividad específica $\frac{\mu M}{s \cdot mg}$	Actividad total $\mu mol/s$	Veces de purificación respecto de lisado	Rendimiento %
GCKWT	18 ± 1	18 ± 1	0,6±0,1 (0,008±0,005)	10±3 (34±2)	74	31
GCK G448D	10,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5	1,31± 0,06 (0,011 ±0,007)	14,1±0,3 (42±3)	124	28
GCK G448A	14 ± 7	6,8 (*)	11,25 ± 0,01 (0,11 ± 0,03)	90±15 (324± 36)	106	28

Los valores se muestran como promedio \pm desviación estándar, de un triplicado de mediciones para cada parámetro mostrado en las columnas (n=3); a excepción del valor (*) el cual fue una medición individual (n=1). La primera columna, de izquierda a derecha, corresponde a la enzima que se purificó; de cada una de éstas, luego del paso de cromatografía de afinidad, se obtuvo una fracción de volumen total: 1 mL. La segunda columna, de izquierda a derecha, presenta la cantidad de proteína total (determinada mediante el método de Bradford) en las fracciones colectadas resultado del paso de cromatografía de afinidad, normalizado por los litros de cultivos de *E. coli* usados para la expresión de la enzima. La tercera columna muestra la concentración de proteína presente en estas fracciones puras. La cuarta y quinta columna muestran los valores de actividad total y específica para las fracciones puras y, entre paréntesis, los valores para el lisado bacteriano. Los valores para veces de purificación y rendimiento se muestran como la razón entre los promedios de los valores mostrados en las columnas 4 y 5 respectivamente, sin desviación estándar. Todos los valores presentes en esta tabla corresponden a una purificación de cada enzima.

En la tabla 2 se muestra un paso adicional de purificación, correspondiente a una cromatografía de exclusión molecular posterior al protocolo ya mostrado. En esta tabla se observa que las veces de purificación y la actividad específica aumentan más de 150 veces y 200 veces respectivamente, alcanzando los valores reportados por otros autores que han usado este método de expresión y purificación.

Tabla 2. Purificación de GCK-WT usando cromatografía de exclusión molecular.

Enzima	Concentración de proteína mg/mL	Actividad específica $\frac{\mu M}{s \cdot mg}$	Veces de purificación
GCKWT (His-Trap)	16,71	0,62 (0,008±0,005)	74
GCKWT (Exclusión molecular)	4,8	164,59 (0,008±0,005)	20573

Estos resultados corresponden a una medición puntual (n=1). GCKWT (His-Trap) corresponde a la fracción de enzima silvestre mostrada en la Tabla 1, resultado del paso de cromatografía de afinidad. GCKWT (Exclusión molecular) corresponde a la fracción obtenida al realizar el paso de cromatografía de exclusión molecular. Los valores de la segunda columna, de izquierda a derecha, corresponden a la concentración de proteína de las fracciones colectadas después de los pasos de cromatografía de afinidad (GCKWT His-Trap) y, la secuencia cromatografía de exclusión molecular (GCKWT exclusión molecular). La actividad específica se muestra como una medición única, y los valores entre paréntesis corresponden a la actividad del lisado bacteriano. Las veces de purificación corresponde a la razón entre los valores mostrados en la columna de actividad específica.

4.4. Parámetros cinéticos de las enzimas silvestre, mutante G448D y G448A

Para determinar los parámetros cinéticos de las mutantes GCK-G448D y GCK-G448A se realizaron por separado curvas de saturación a concentraciones variables de glucosa y ATP. En la figura 11 se muestran las curvas saturación de las distintas enzimas para los sustratos glucosa y ATP. En el panel A se muestra la curva de saturación para glucosa, donde se puede observar que las enzimas GCK-WT y GCK-G448A presentan una cinética sigmoide, mientras que GCK-G448D muestra una curva hiperbólica. También se observa que la mutante GCK-G448A alcanza una velocidad máxima mucho mayor que las enzimas GCK-WT y GCK-G448D. A su vez, las enzimas mutantes tienen una mayor afinidad por glucosa que la enzima WT. En el panel B se muestra la curva de saturación para ATP. En estas curvas se observa que la afinidad por ATP es similar para todas las enzimas ensayadas; también que todas se ajustan a un modelo hiperbólico (Michaelis-Menten). Por último, la mutante GCK-

G448A muestra una velocidad máxima mayor que las enzimas WT y mutante GCK-G448D.

Para cuantificar los parámetros cinéticos que definen las curvas mostradas en la figura 11, éstas se ajustaron a la ecuación de Hill (Ecuación 1, ver Materiales y Métodos) para los ensayos mostrados en el panel A, y al modelo de Michaelis-Menten para los mostrados en el panel B.

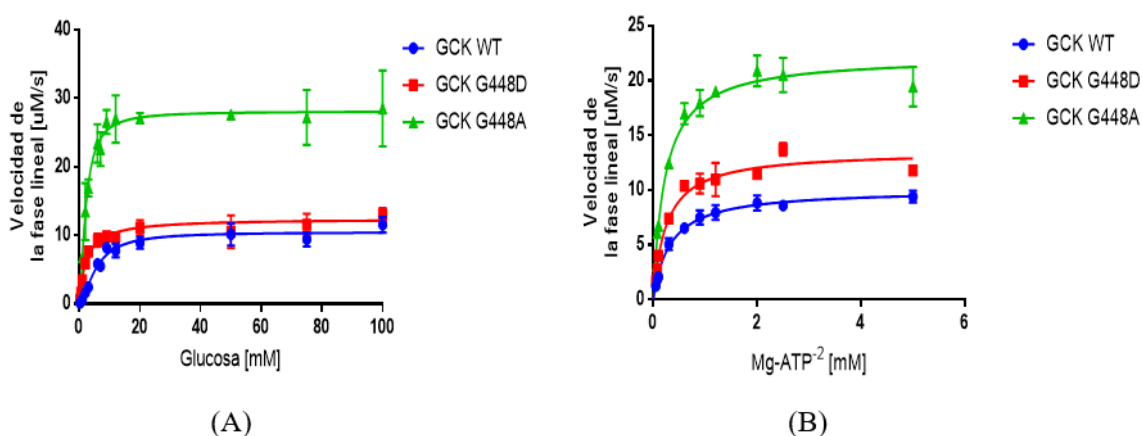


Figura 11. Comparación entre las curvas cinéticas de las enzimas GCK-WT y mutantes G448D y G448A.

Cada curva corresponde a la caracterización de una purificación, donde cada concentración de sustrato fue ensayada por triplicado. Las concentraciones ensayadas se presentan como promedio \pm desviación estándar. (A) Curvas cinéticas de las enzimas GCK-WT (azul), mutante GCK-G448D (rojo) y mutante GCK-G448A (verde), para el sustrato glucosa; la escala del eje X está en log₁₀. Todas las curvas fueron ajustadas a un modelo alostérico-sigmoide (con un parámetro de ajuste R^2 de valor 0,955, 0,926 y 0,962 para las enzimas WT, mutante G448D y mutante G448A respectivamente). (B) Curvas cinéticas de las enzimas GCK-WT (azul), mutante G448D (rojo) y mutante G448A (verde), para el sustrato ATP; la escala del eje X es lineal. Todas las curvas fueron ajustadas a un modelo hiperbólico (Michaelis-Menten) con un parámetro de ajuste R^2 de valor 0,981, 0,957 y 0,962 para las enzimas WT, mutante G448D y mutante G448A respectivamente.

La tabla 3 muestra los parámetros cinéticos calculados a partir de las cinéticas. Los valores de k_{cat} indican que la mutante GCK-G448D no cambia su valor respecto de la enzima silvestre, mientras que la mutación G448A aumenta el valor de ésta más de dos veces. Las mutantes GCK-G448D y GCK-G448A comparten la constante de afinidad aparente, $S_{0.5}$, para glucosa (2,3 mM y 2,2 mM para las mutantes G448D y G448A respectivamente) cuyo

valor es 2,4 veces menor que la $S_{0,5}$ de la enzima silvestre (5,6 mM). Los valores para el índice de Hill (n_H) varían entre las tres enzimas: GCK-WT y GCK-G448A mantienen la cooperatividad para glucosa con valores de $n_H = 1,6$ y $n_H = 1,5$ respectivamente, en cambio la mutante GCK-G448D presenta una curva de saturación hiperbólica, demostrado con un $n_H = 1.1$. Los valores de K_m aparente para ATP se mantienen en las tres enzimas.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de las enzimas GCK-WT y mutantes G448D y G448A.

Enzima	$k_{cat} s^{-1}$	$S_{0,5}$ glucosa mM	n_H (índice de Hill)	K_m mM Mg-ATP ²
GCKWT	4±0,1	5,6 ± 0,4	1,6 ± 0,2	0,33 ± 0,03
GCKG448D	4,6 ± 0,1	2,3 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,25 ± 0,03
GCKG448A	10,7 ± 3	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,23 ± 0,02

Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar, resultado del ajuste de regresión no lineal de la ecuación de Hill a las curvas de saturación para glucosa; mientras que para Mg-ATP² se usó el modelo de Michaelis-Menten. Las determinaciones se realizaron en triplicado (n=3) y corresponde al ensayo de una fracción pura (resultado de una purificación) de cada una de las enzimas.

La mutante GCK-G448D presenta una ausencia de cooperatividad positiva para glucosa y una gran afinidad por glucosa, que, podría ser consecuencia de una estabilización de la conformación altamente afín a glucosa. Para determinar si estos efectos son producto de la estabilización de una conformación de alta afinidad por glucosa, propia de la mutante G448D, se realizaron ensayos enzimáticos en presencia del osmolito glicerol y con preincubación en condiciones saturantes de glucosa.

Como se mostró en la figura 3 (ver Introducción), la cinética de GCK presenta dos ciclos de catálisis, donde el ciclo rápido es una interconversión entre dos estructuras compactas de alta afinidad por glucosa, y el lento corresponde al cierre de una estructura abierta, poco afín a glucosa, hacia una cerrada y compacta de alta afinidad por glucosa^{35,46,47}. Dado que el paso lento de transición entre la forma de baja afinidad por glucosa (súper-abierta) y la forma de alta afinidad por glucosa (abierta) es dependiente de la concentración de glucosa, la preincubación de la enzima a concentraciones saturantes del sustrato, debería desplazar el

equilibrio hacia la forma afín a glucosa. Esto atraparía a GCK en el ciclo rápido de reacción, por lo cual se debería observar una ausencia de cooperatividad y una alta afinidad por glucosa. Por otra parte, se ha demostrado que el osmolito glicerol ejerce un efecto estabiliza estructuras compactas y poco flexibles en las proteínas^{48,49}. Teniendo en cuenta que las conformaciones de alta afinidad por glucosa son estructuras más compactas que la forma súper-abierta (predominante en ausencia de glucosa), la preincubación con glicerol podría mostrar si los efectos en la mutante GCK-G448D, ocurren por una estabilización de la estructura compacta afín a glucosa o si es un efecto directo sobre los ciclos de catálisis. En la tabla 4 se muestran las cuantificaciones de los parámetros cinéticos derivados de los ensayos enzimáticos, de las enzimas GCK-WT y GCK-G448D preincubadas con 30 mM de glucosa. Se observa que la preincubación con glucosa elimina la cooperatividad en la enzima GCK-WT, mientras no genera un cambio en la mutante GCK-G448D. Por otra parte, no hay efecto sobre la afinidad por glucosa para las dos enzimas.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de las enzimas WT y G448D al ser pre-incubadas con glucosa 30 mM.

Enzima	S _{0,5} glucosa mM	n _H (índice de Hill)
GCKWT (sin pre-incubación)	5,6 ± 0,4	1,6 ± 0,2
GCKWT (pre-incubada con glucosa 30 mM)	6 ± 1	1,0 ± 0,2
GCKG448D (sin pre-incubación)	2,3 ± 0,3	1,1 ± 0,1
GCKG448D (pre-incubada con glucosa 30 mM)	2,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2

Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar, calculados mediante un ajuste de regresión no lineal a la ecuación de Hill. Cada medición se realizó en triplicado (n=3). Estos resultados corresponden al ensayo de una purificación de GCK WT y GCK G448D.

En la tabla 5 se muestran los parámetros cinéticos de las enzimas GCK-WT y GCK-G448D preincubadas con glicerol. Se observa que la pre-incubación con glicerol no tiene efecto sobre

el n_H de la enzima WT, mientras que en la enzima GCK-G448D provoca la aparición de cooperatividad positiva para glucosa. En ambos casos hay una ligera disminución del $S_{0,5}$ para glucosa, lo cual indica un aumento en la afinidad por glucosa.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de las enzimas WT y G448D al ser pre-incubadas en glicerol 20%.

Enzima	$S_{0,5}$ glucosa mM	n_H (índice de Hill)
GCKWT (sin pre-incubación)	$5.6 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$
GCKWT (pre-incubada en glicerol 20%)	$4,8 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,2$
GCKG448D (sin pre-incubación)	$2.3 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,1$
GCKG448D (pre-incubada en glicerol 20%)	$1,4 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$

Los valores se presentan como promedio \pm desviación estándar, calculados mediante un ajuste de regresión no lineal a la ecuación de Hill. Cada medición se realizó en triplicado ($n=3$). Estos resultados corresponden al ensayo de una purificación de GCK WT y GCK G448D.

4.5. Curvas de estabilidad química para las enzimas silvestre, mutante G448D y mutante G448A

Para estudiar los efectos de las mutaciones G448D y G448A en la estabilidad de GCK, se hicieron ensayos de desnaturación química. Se ha observado que la desnaturación química de GCK, mediante urea, produce un desplegamiento de una sola transición entre los estados termodinámicamente estables nativo y desplegado. Esta transición entre estados puede ser estudiada mediante los cambios en las intensidades de emisión de fluorescencia intrínseca de triptófano. GCK posee residuos de triptófano en las posiciones 99, 167 y 257, los cuales muestran una señal de emisión de fluorescencia característica en 320 nm, cuando la enzima se encuentra en el estado nativo. Esta señal de emisión se desplaza a mayores longitudes de onda (360 nm) cuando estos residuos se exponen al solvente, dando cuenta así de la población de moléculas en el estado desplegado. Utilizando estas señales, la razón de intensidades de emisión de fluorescencia a 320 nm y 360 nm (I_{320}/I_{360}) da cuenta de la población de enzimas en cada estado, para una concentración particular de urea. Mediante este método se pueden

estimar los cambios de energía libre de desplegamiento para cada enzima en estudio ^{44,45}.

En la figura 12 se muestran las curvas de desnaturación química y el cálculo de energía libre de Gibbs para el proceso de desplegamiento (ΔG), al igual que el cambio de área accesible al solvente (m). En el panel A se observan las curvas de desplegamiento de GCK-WT, GCK-G448D y GCK-G448A, con los respectivos ajustes de regresión no lineal para el cálculo de la energía libre de Gibbs. Se observa que las curvas son muy similares y casi se superponen, indicando que las mutaciones no tienen efecto sobre la estabilidad de GCK. Lo anterior se confirma en el panel D, donde se muestran los valores de ΔG y m calculados del ajuste mostrado en A, para cada una de las enzimas. Además, los cambios de área accesible al solvente están en el mismo orden de magnitud para todas las enzimas. Todo lo anterior indica que las mutaciones G448D y G448A no cambian la estabilidad química de la enzima, o que este método no permite observar los cambios que éstas podrían tener.

Se ha descrito que GCK toma una conformación más estable en presencia de condiciones saturantes de glucosa; basado en este antecedente y el cambio observado en la afinidad para glucosa en las cinéticas, se decidió investigar si las mutantes afectan la estabilidad de esta conformación intermedia en el ciclo de catálisis. En el panel B de la figura 12 se muestran las curvas de desplegamiento en condiciones saturantes de glucosa. Debido a que las curvas se superponen a todas las concentraciones de agente caotrópico, este resultado indica que no hay diferencia en el fenómeno de estabilización inducida por el sustrato, entre las enzimas GCK-WT y las mutantes G448D y G448A.

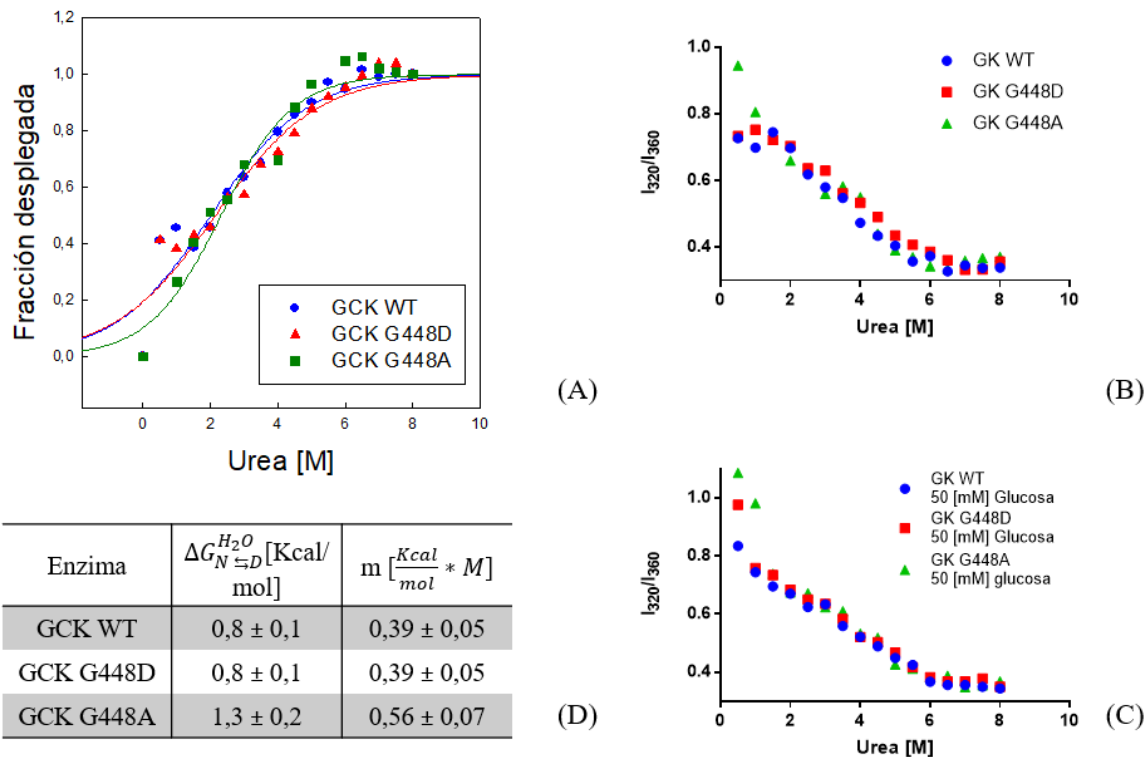


Figura 12. La mutante G448D es igual de estable químicamente que GCK-WT. Curvas de estabilidad química para las enzimas GCK-WT y mutantes G448D y G448A.

Todas las curvas fueron realizadas usando una preparación de cada enzima. Los valores de razón de intensidad de fluorescencia 320 nm/360 nm (I_{320}/I_{360}) y f_D (ver ecuación 7, sección métodos) mostrados corresponden a mediciones singulares. (A) Curvas de desplegamiento químico, a concentraciones crecientes de urea, observando el cambio en fracción desplegada. GCK-WT (azul), mutante G448D (rojo) y mutante G448A (verde). (B) Curvas de desplegamiento químico en presencia de concentraciones saturantes de glucosa (50 mM); los datos se muestran de la misma manera que en A. (C) Curvas de replegamiento químico, a concentraciones decrecientes de urea, observando el cambio en I_{320}/I_{360} ; se muestran las enzimas GCK-WT (azul) y mutante GCK-G448D (rojo) en ausencia de glucosa, y GCK-WT (verde), mutante GCK-G448D (púrpura) en presencia de glucosa; respectivamente. (D) Tabla donde se muestran la energía libre de Gibbs de desplegamiento (ΔG) y el cambio de área accesible al solvente (m) calculados. Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar calculados usando el modelo de desplegamiento en dos estados (ver ecuación 8, sección métodos).

Otro resultado importante corresponde a la reversibilidad del proceso, el cual se presenta en el panel C, donde la curva de replegamiento presenta la misma forma y señal que las de desplegamiento. Esta característica es la esperada para un proceso reversible y es fundamental para realizar las estimaciones de parámetros termodinámicos.

5. Discusión.

5.1. Contexto y generalidades

La glucoquinasa es el sensor de glucosa de la célula β pancreática y una proteína esencial para la homeostasis de glucosa. Debido al rol fundamental que GCK cumple en el control de la glucosa plasmática, las mutaciones que afecten su actividad, estabilidad o regulación en la célula causan trastornos en la glicemia. Los principales trastornos asociados a mutaciones en GCK, son MODY2 e hipoglicemias asociadas a hiperinsulinemias ²⁰. La caracterización funcional de las proteínas producto de dichas mutaciones permite comprender las bases moleculares de estos trastornos. Recientemente fue descrita, en una paciente MODY2 chilena, una nueva mutación en el gen de GCK, la cual genera un cambio no sinónimo *missense* en la secuencia de la proteína: G448D ²¹. Para entender cómo esta mutación afecta la funcionalidad de la GCK, en esta memoria se realizó una caracterización cinética de la enzima mutante y se estudió su estabilidad química.

5.2. Obtención de las enzimas GCK WT, y mutantes recombinantes G448A y G448D

La mutagénesis sitio dirigida de residuos clave es una estrategia utilizada para el estudio del rol de las interacciones no covalentes en las proteínas, las cuales son claves en procesos como: plegamiento de la proteína, mecanismo de reacción y cinética enzimática ⁵⁰. En nuestro caso, el estudio del residuo 448 vía mutagénesis sitio dirigida tiene por objetivo el entender el rol de éste en la cinética de la GCK.

La aproximación experimental para la producción y purificación de GCK fue planeada en base a lo publicado por otros autores. La expresión de una GCK fusionada con un hexapéptido de histidina (GCK-HIS₆) es uno de los dos métodos más utilizados para la obtención de la GCK. El otro método ampliamente utilizado para la producción de GCK es una fusión con la enzima Glutathion S-Transferasa (GCK-GST). La diferencia entre ambos métodos es que la GCK-HIS₆, requiere de un paso extra de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular, mientras que la GCK-GST es purificada usando un

paso de cromatografía de afinidad. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 2 (sección Resultados, tabla 2), la purificación en dos pasos entrega una GCK pura, comparable a las reportadas por otros autores, incluyendo aquellos que expresan y purifican usando el método GCK-GST.

5.3. La mutación G448D es una mutante activadora de GCK causante de fenotipo MODY2

La secreción de insulina es un proceso asociado directamente a la actividad catalítica de GCK. Una consecuencia de lo anterior es que se puede estimar el umbral de glucosa plasmática que induce la secreción fisiológica de insulina, GSIR, usando los parámetros cinéticos de GCK. El parámetro de GSIR es una variable crítica para la homeostasis de glucosa, relacionada directamente con el correcto funcionamiento de la célula β pancreática⁸. Se ha observado que las mutaciones que aumenten la $S_{0,5}$ para glucosa y disminuyan la k_{cat} (llamadas mutaciones inactivadoras), se asocian a una hiperglicemia debido a que desplazan GSIR a valores de glucosa plasmáticos más altos que el fisiológico normal (~5 mM). En el extremo contrario, las mutaciones que disminuyan la $S_{0,5}$ para glucosa, aumenten o no cambien la k_{cat} y/o disminuyan el n_H para glucosa (llamadas mutaciones activadoras), desplazan GSIR a valores de glucosa plasmática menores al fisiológico normal^{8,23,31,51}.

Los parámetros cinéticos de la mutante G448D la clasifican como una mutación activadora, debido a que presenta una $S_{0,5}$ para glucosa 2,4 veces menor respecto de la enzima silvestre o WT, presenta la misma k_{cat} y K_M para ATP que la enzima WT y una ausencia de cooperatividad para glucosa ($n_H = 0,9$) (sección Resultados, tabla 3). En algunas mutantes MODY ya descritas, se han observado parámetros cinéticos similares a los vistos en la mutante G448D; estas mutantes son: V62M, G72R, S336L, S411F y A449T. Sin embargo, todas las GCK anteriormente nombradas presentan una k_{cat} menor que la enzima WT, característica que la mutante G448D no comparte^{2,6,8,34,52}. Para determinar con certeza la k_{cat} y confirmar que G448D no presenta una disminución respecto de la enzima WT, se deberá usar el nuevo protocolo de purificación para obtener una enzima pura y con alta actividad específica (tabla 2). La confirmación es importante ya que permite calcular el GSIR y estimar el efecto que tiene la mutante sobre la homeostasis de la glucosa. Adicionalmente, la

mantención de la k_{cat} en valores iguales a la enzima WT, sugeriría que G448D es la primera mutante MODY en exhibir parámetros enzimáticos exclusivamente activadores.

5.4. La mutación G448D podría estabilizar una conformación de alta afinidad para glucosa, intermedia a la forma súper-abierta y cerrada

La mutación G448D es un cambio *missense* que se ubica en la zona estructural hélice $\alpha 13$. La hélice $\alpha 13$ es una región del extremo C terminal, fundamental para la formación y estabilización del sitio activo. En el paso entre las conformaciones súper-abierta y cerrada, esta hélice rota desde una posición expuesta al solvente hacia una zona hundida entre los dominios ³⁵. Existe evidencia empírica de que esta región es esencial para la cinética cooperativa para glucosa.

La delección completa de la hélice $\alpha 13$ de GCK, la cual resulta en una enzima truncada, exhibe cinética tipo Michaelis-Menten y una disminución de la k_{cat} de más de 160 veces ⁴⁰. En la misma línea de investigación, el cambio de la secuencia de la hélice $\alpha 13$, por una secuencia que estabilice la posición de ésta en la conformación activa, también resulta en una GCK con cinética tipo Michaelis-Menten, además de una disminución de $S_{0,5}$ para glucosa ³⁹. Por otra parte, los activadores alostéricos de GCK cuyo efecto es la estabilización la conformación activa, permitiendo un ciclo de reacción más rápido, interactúan con residuos de la hélice $\alpha 13$ ⁴¹.

Basados en los antecedentes anteriores, y los parámetros cinéticos observados en la mutante G448D (disminución de $S_{0,5}$ para glucosa y ausencia de cooperatividad positiva para este sustrato), se propone que el cambio G448D estabiliza la conformación abierta de la enzima. Los resultados de las cinéticas con pre-incubación con glucosa muestran que la mutante no presenta la transición de la enzima WT, donde ocurre un cambio desde una cinética cooperativa a una tipo Michaelis-Menten. En principio esto nos indica que la mutante no presenta el ciclo lento de intercambios conformacionales, dependiente de glucosa, que determinan la cooperatividad en la enzima WT.

La incubación previa con glicerol no tuvo efecto sobre los parámetros cinéticos de la enzima WT, mientras que en la enzima mutante generó la aparición de cooperatividad positiva para glucosa ($n_H = 1,7 \pm 2$) y disminuyó $S_{0.5}$ para glucosa a valores menores que los observados en los ensayos sin glicerol ($S_{0.5} = 1,5 \pm 0,1$), sin afectar las demás constantes cinéticas.

A modo general, el osmolito glicerol desplaza a las proteínas en su forma nativa a conformaciones más compactas y menos flexibles. Esta compactación es causada por los efectos que genera la orientación del osmolito hacia la superficie de la proteína^{48,49}. Debido a que la diferencia entre la enzima WT y la mutante G448D radica en el residuo 448, el cual está expuesto al solvente en condiciones de ausencia de glucosa, el efecto visto sobre la mutante en los ensayos de preincubación con glicerol, puede estar relacionado con una estabilización de la forma súper abierta vía interacción con el residuo de la hélice $\alpha 13$ expuesto. Esta estabilización podría dar origen a la cinética sigmoide observada, pues permitiría la existencia del ciclo lento que como se sabe, es la génesis de la cooperatividad positiva para glucosa.

La idea anterior es una explicación basada en el efecto estabilizador que glicerol ejerce sobre la gran mayoría de las proteínas, sin embargo, existen estudios del efecto de este osmolito sobre GCK. El efecto del glicerol sobre la cooperatividad de GCK es controversial. Existe evidencia de que el osmolito no tiene efecto sobre la cooperatividad de GCK^{45,53}, lo cual es concordante con nuestros resultados donde la preincubación con glicerol no afecta la cooperatividad positiva de GCK-WT. Sin embargo, Pollard-Knight demostró que a bajas concentraciones de glucosa (0,25 – 5 mM glucosa), el glicerol elimina la cooperatividad positiva para glucosa (reduce el n_H a valores de unidad). Estos resultados contradicen los obtenidos en esta memoria. Una explicación para esto es que Pollard-Knight realizó su estudio en condiciones de velocidad inicial, y sólo exploró el fenómeno de cooperatividad a bajas concentraciones de glucosa, mientras que en esta memoria se exploró concentraciones saturantes de glucosa, además de realizar las mediciones en estado estacionario. Pollard-Knight relaciona esta desaparición de la cooperatividad como una estabilización de la forma compacta unida a glucosa (forma de alta afinidad). Esto contradice la explicación planteada anteriormente, para el fenómeno de aparición de cooperatividad positiva resultado de la

preincubación con glicerol de la mutante G448D. Sin embargo, experimentos de fluorescencia intrínseca de triptófano muestran que el glicerol disminuye la velocidad de interconversión de la forma súper abierta unida a glucosa, a la forma compacta unida a glucosa. En otras palabras, retrasa el cambio conformacional que cierra la forma súper-abierta (para una referencia visual del cierre, véase la figura 2, sección introducción) ^{47,53,54}. Este antecedente muestra otra posibilidad para la aparición de cooperatividad positiva en la mutante G448D, donde la aparición de cooperatividad podría estar ligada al retraso del cierre de la forma súper-abierta, más que a una estabilización de la forma súper abierta. Sin embargo, nuestros datos no permiten asegurar alguna de estas explicaciones.

En forma complementaria a los experimentos cinéticos de la mutante G448D, también se estudió el rol del residuo glicina 448 sobre la cinética de GCK, mediante el análisis de la mutante G448A.

5.5. La mutante G448A es una mutante activadora diferente a G448D, pero que entrega información sobre la función del residuo 448

El cambio G448A propone modificar el largo de cadena lateral del residuo en la posición 448, sin cambiar su carga. Debido a que la hélice $\alpha 13$ es una región flexible, y el residuo glicina 448 (G448) entrega libertad rotacional a la cadena ⁵⁵, el cambio por alanina tiene por objetivo limitar esta libertad. El gráfico de Ramachandran de un péptido de poliglicina, en comparación a uno de polialanina, muestra una mayor cantidad de regiones permitidas. Esto significa que, para poliglicina, hay un número mayor de combinaciones de ángulos ϕ y ψ donde no hay impedimento estérico entre los residuos. En otras palabras, los residuos de glicina ejercen menos impedimento estérico entre ellos, que los de alanina. Proponemos entonces que el cambio de aminoácido, G448A, ejerce una restricción directa sobre la libertad rotacional y las configuraciones posibles para la hélice $\alpha 13$ ⁵⁶. Esto podría afectar los equilibrios conformacionales y la cinética enzimática, dado que ambos dependen de la rotación y movimiento de las diferentes partes de la enzima. Así, este cambio de aminoácido puede entregar información sobre la función del residuo 448.

Al igual que la mutante G448D, G448A es una GCK activada, pues presenta una alta afinidad por glucosa y una k_{cat} elevada. Sin embargo, a diferencia de la mutación G448D, la cooperatividad positiva para glucosa no se ve afectada. El incremento de la afinidad aparente, generado por el cambio G448A podría estar, asociado en parte, a un cambio en la libertad rotacional del aminoácido en la posición 448.

Por otra parte se ha descrito que el cambio de aminoácidos de glicina por alanina, localizada en hélices α , tiene un efecto estabilizador cuando estas regiones se encuentran en el interior de la proteína⁵⁷. Teniendo en cuenta que en la forma abierta la hélice $\alpha 13$ se encuentra en el interior de la proteína³⁵, la estabilización de esta forma podría dar cuenta del aumento de afinidad por glucosa. Sin embargo, esto no explica que no se afecte el comportamiento cooperativo para glucosa y tampoco explica el aumento de k_{cat} . Por otra parte, existen mutantes de GCK que presentan características cinéticas similares como: M191I y W99L donde se ve una disminución de $S_{0,5}$ para glucosa y un aumento de la k_{cat} , sin efecto sobre la cooperatividad para glucosa. La mutante M191I estabiliza la forma cerrada de la enzima, debido a que el residuo de metionina 191 se encuentra en un bolsillo hidrofóbico en esta conformación, por lo que se deduce que el cambio por un aminoácido hidrofóbico genera una activación de la enzima³⁸. La mutante W99L activa la enzima al acelerar la conversión del complejo GCK-glucosa de baja afinidad a uno de alta afinidad³⁷, lo cual permite el paso al ciclo rápido de catálisis. Ambos análisis abren la posibilidad de explorar la activación de la enzima por la mutación G448A, debido a que podría generar una estabilización inducida por el cambio glicina-alanina. Sin embargo, faltan datos experimentales para la mutante G448A para proponer un mecanismo de activación que explique los parámetros cinéticos que exhibe.

Basado en lo anterior, a pesar de que el cambio G448A replica uno de los parámetros cinéticos de la mutante G448D, es complejo comparar las mutantes G448D y G448A. Probablemente el cambio G448A genera una enzima nueva distinta a la enzima WT, a G448D y las otras mutantes de la hélice $\alpha 13$ ⁵.

5.5. Proyecciones

Algunas metodologías que nos permitirían indagar con mayor profundidad en la naturaleza y características de la estructura de la GCK mutante G448D son: i) la determinación de la constante de unión de glucosa a través del cambio de la fluorescencia intrínseca de W, ii) el cálculo de la estabilidad de la mutante, visualización del impacto de la mutación en la hélice $\alpha 13$ en las diferentes conformaciones de GCK y efectos de la mutación sobre la unión del ligando, mediante el uso de herramientas bioinformáticas; iii) la estimación de las propiedades elásticas de las estructuras de la mutante usando dinámicas moleculares e iv) estudios de dependencia de la k_{cat} con la viscosidad del medio de ensayo.

La determinación de la constante de unión a glucosa permitiría conocer la diferencia de afinidad por glucosa, si la hay, entre la mutante y la enzima WT. Esto es importante dado que los equilibrios conformacionales entre las formas súper-abierta y abierta son dependientes de la concentración de glucosa. El cambio en la afinidad aparente que muestra G448D, abre la posibilidad de que esta mutante presente una estructura súper-abierta con propiedades cercanas a la forma abierta (de alta afinidad por glucosa).

En la literatura se han utilizado herramientas bioinformáticas para el estudio de GCK y mutantes de ésta. Varios autores han usado métodos que, a partir de las estructuras cristalográficas ya conocidas, logran predecir y crear una estructura para las GCK mutantes. Usando estas estructuras teóricas, existen software que estiman los cambios en la estabilidad debido a la introducción de mutaciones^{58,59}; estas herramientas podrían complementar nuestros resultados de estabilidad química, además de ofrecer información estructural de las enzimas GCK-G448D y G448A. Otro uso de las estructuras teóricas son los métodos de *docking molecular* para estudiar las interacciones del sustrato glucosa y ligandos alostéricos, con las distintas conformaciones de GCK y sus mutantes⁶⁰⁻⁶⁴. Se ha demostrado que estas herramientas logran predecir y ajustarse a las interacciones que muestran las estructuras cristalográficas^{35,36}. Esto permite hacer uso de estos métodos para investigar la interacción entre la mutante G448D y G448A, con el sustrato glucosa, con el fin de averiguar el origen del aumento de afinidad observado en las cinéticas enzimáticas.

Las dinámicas moleculares se han utilizado para el estudio de la flexibilidad conformacional del estado nativo de la GCK tanto silvestre como sus mutantes. Las dinámicas moleculares permiten describir que algunas mutaciones presentan estructuras súper-abiertas más rígidas que la de la enzima silvestre. Se han encontrado enzimas que presentan una estructura más organizada, menos flexible y con limitada interacción con el solvente, lo que corresponde a características propias de las estructuras de mayor afinidad por glucosa ^{62,65-67}.

Por último, se ha estudiado la dependencia de la k_{cat} con la viscosidad del medio de ensayo. Se han descrito dos fenómenos de activación de GCK generados por cambios estructurales de la hélice $\alpha 13$, uno de ellos denominado tipo α , asociado a procesos de difusión como lo son la liberación de productos de reacción, mientras que el denominado tipo β es independiente de éstos. Los experimentos de determinación de la dependencia de k_{cat} de la viscosidad del medio de ensayo, permitirían distinguir el tipo de activación presente en la mutante G448D, y obtener información sobre la naturaleza de su estructura nativa ⁴⁶.

Durante esta memoria se ha desarrollado la idea de que como sensor de glucosa de la célula β pancreática, la GCK posee una complejidad asociada exclusivamente a sus regulaciones intrínsecas. También se ha propuesto que las bases moleculares de los fenotipos MODY se explican principalmente por los cambios que las mutaciones de GCK imponen sobre la cinética y estructura de la GCK. Sin embargo, se sabe que GCK además de su regulación intrínseca, tiene múltiples y complejas regulaciones a nivel celular. Estas regulaciones afectan la actividad fosforilativa de GCK y, consecuentemente, la liberación de vesículas de insulina. Esta limitación es importante porque se ha demostrado que las mutantes de GCK se comportan de manera diferente en un ambiente celular.

Es evidente que este trabajo no es concluyente sobre las consecuencias sistémicas que tiene la mutante G448D; tampoco lo es sobre el origen del fenotipo MODY asociado a ésta. Sin embargo, nuestros resultados muestran una anomalía en la regulación intrínseca de la enzima, uno de los pilares fundamentales para la correcta homeostasis de glucosa y función del sensor. El descubrimiento de estas anomalías, y la descripción de la cinética de la mutante,

indican que la posible consecuencia sistémica de ser portador de esta GCK, es una falla en la liberación de insulina.

6. Conclusiones

- La mutación G448D genera una GCK activada, cuyo estado nativo y estructura es tan estable como la de la enzima silvestre. Esto se demuestra en una enzima mutante que es 2,4 veces más afín a glucosa en comparación con la enzima WT, ligeramente más afín a ATP y no presenta cooperatividad positiva para glucosa.
- La mutante G448D podría estar atrapada en el ciclo rápido de catálisis, esto explicaría la ausencia de cooperatividad positiva para glucosa.
- La mutación del residuo 448, por otro residuo que no sea Gly, genera la disminución del $S_{0,5}$ visto en la mutante G448D; esto quiere decir que esta posición es altamente dependiente de la libertad rotacional que le confiere el residuo canónico.
- Los efectos de la mutación G448D sobre los parámetros cinéticos, sugieren una alteración del umbral de secreción de insulina inducida por glucosa, lo cual podría ser la clave de un mal funcionamiento de ésta en la célula β pancreática. Sin embargo, se requiere más estudio de la mutante para consolidar este análisis.
- Creemos que GCK G448D es una enzima defectuosa, cuyo fenotipo clínico tiene un origen en una anomalía en la regulación intrínseca de la enzima, fenómeno observado en la alteración de los parámetros cinéticos de ésta.

7. Referencias

1. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015;6(6):850-867. doi:10.4239/wjd.v6.i6.850
2. Davis EA, Cuesta-Muñoz A, Raoul M, et al. Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia*. 1999;42(10):1175-1186. doi:10.1007/s001250051289
3. Matschinsky FM. Perspectives in Diabetes Glucokinase as Glucose Sensor and Metabolic Signal Generator in Pancreatic P-Cells and Hepatocytes. *Integr Vlsi J*. 1990;39(June).
4. Meglasson MD, Matschinsky FM. New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol Metab*. 1984;246(1):E1-E13. doi:10.1152/ajpendo.1984.246.1.E1
5. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat*. 2009;30(11):1512-1526. doi:10.1002/humu.21110
6. Sagen J V, Odili S, Bjørkhaug L, et al. From clinicogenetic studies of maturity-onset diabetes of the young to unraveling complex mechanisms of glucokinase regulation. *Diabetes*. 2006;55(6):1713-1722. doi:10.2337/db05-1513
7. Miller SP, Anand GR, Karschnia EJ, Bell GI, LaPorte DC, Lange AJ. Characterization of glucokinase mutations associated with maturity- onset diabetes of the young type 2 (MODY-2): Different glucokinase defects lead to a common phenotype. *Diabetes*. 1999;48(8):1645-1651. doi:10.2337/diabetes.48.8.1645
8. Gloyn AL, Odili S, Buettger C, et al. Glucokinase and the Regulation of Blood Sugar. *Glucokinase Glycemic Dis From Basics to Nov Ther*. 2004;16:92-109. doi:10.1159/000079009
9. García-Herrero CM, Galán M, Vincent O, et al. Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia*. 2007;50(2):325-333. doi:10.1007/s00125-006-0542-7

10. Estalella I, Garcia-Gimeno MA, Marina A, Castaño L, Sanz P. Biochemical characterization of novel glucokinase mutations isolated from Spanish maturity-onset diabetes of the young (MODY2) patients. *J Hum Genet.* 2008;53(5):460-466. doi:10.1007/s10038-008-0271-5
11. Gloyn AL, Tribble ND, van de Bunt M, Barrett A, Johnson PR V. Glucokinase (GCK) and other susceptibility genes for beta-cell dysfunction: the candidate approach. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 3):306-311. doi:10.1042/BST0360306
12. Cristi Montero C, Celis Morales C, Ramírez Campillo R, et al. *Diabetes Atlas de La FID.* Vol 8.; 2017. doi:10.1016/j.diabres.2017.09.002
13. MINSAL. Día mundial de la diabetes. Ministerio de salud. <https://www.minsal.cl/dia-mundial-de-la-diabetes/>. Published 2017. Accessed March 20, 2019.
14. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetesd2019. *Diabetes Care.* 2019;42(January):S13-S28. doi:10.2337/dc19-S002
15. Shammas C, Neocleous V, Phelan MM, Lian L-Y, Skordis N, Phylactou LA. A report of 2 new cases of MODY2 and review of the literature: Implications in the search for type 2 Diabetes drugs. *Metabolism.* 2013;62(11):1535-1542. doi:10.1016/j.metabol.2013.06.007
16. Lopez AP, de Dios A, Chiesa I, Perez MS, Frechtel GD. Analysis of mutations in the glucokinase gene in people clinically characterized as MODY2 without a family history of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016;118:38-43. doi:10.1016/j.diabres.2016.04.057
17. Shoemaker AH, Zienkiewicz J, Moore DJ. Clinical assessment of HNF1A and GCK variants and identification of a novel mutation causing MODY2. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;96(2):e36-e39. doi:10.1016/j.diabres.2012.01.032
18. Bali D, Svetlanov A, Lee H-W, et al. Animal Model for Maturity-onset Diabetes of the Young Generated by Disruption of the Mouse Glucokinase Gene. *J Biol Chem.* 1995;270(37):21464-21467. doi:10.1074/jbc.270.37.21464
19. Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell.* 1995;83(1):69-78. doi:10.1016/0092-8674(95)90235-x

20. Steck AK, Winter WE. Review on monogenic diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011;18(4):252-258. doi:10.1097/MED.0b013e3283488275
21. Estica R. M, Seelenfreund H. D, Durruty A. P, Briones B. G. Hallazgo de una nueva mutación en una familia chilena con diabetes monogénica. Caso clínico. *Rev Med Chil.* 2018;146(7):929-932. doi:10.4067/s0034-98872018000700929
22. Durruty A. P, Muñoz S, García de los Ríos A. M. Frecuencia de diabetes mellitus y secreción beta pancreática en hijos de pacientes MODY. *Rev Med Chil.* 1987;115:404-410.
23. Thomson KL, Gloyn AL, Colclough K, et al. Identification of 21 novel glucokinase (GCK) mutations in UK and European Caucasians with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat.* 2003;22(5):417-417. doi:10.1002/humu.9186
24. Xu LZ, Harrison RW, Weber IT, Pilkis SJ. Human β -cell glucokinase: Dual role of Ser-151 in catalysis and hexose affinity. *J Biol Chem.* 1995;270(17):9939-9946. doi:10.1074/jbc.270.17.9939
25. Capuano M, Garcia-Herrero CM, Tinto N, et al. Glucokinase (GCK) Mutations and Their Characterization in MODY2 Children of Southern Italy. Szecsi PB, ed. *PLoS One.* 2012;7(6):e38906. doi:10.1371/journal.pone.0038906
26. Gutierrez-Nogués A, García-Herrero CM, Oriola J, Vincent O, Navas MA. Functional characterization of MODY2 mutations in the nuclear export signal of glucokinase. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2018;1864(7):2385-2394. doi:10.1016/j.bbadis.2018.04.020
27. Negahdar M, Aukrust I, Molnes J, et al. GCK-MODY diabetes as a protein misfolding disease: The mutation R275C promotes protein misfolding, self-association and cellular degradation. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(1):55-65. doi:10.1016/j.mce.2013.08.020
28. Negahdar M, Aukrust I, Johansson BB, et al. GCK-MODY diabetes associated with protein misfolding, cellular self-association and degradation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2012;1822(11):1705-1715. doi:10.1016/j.bbadis.2012.07.005
29. Matschinsky FM, Wilson DF. The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans. *Front Physiol.* 2019;10:148.

doi:10.3389/fphys.2019.00148

30. Niemeyer H, Cárdenas ML, Rabajille E, Ureta T, Clark-Turri L, Peñaranda J. Sigmoidal kinetics of glucokinase. *Enzyme*. 1975;20(6):321-333. doi:10.1159/000458957
31. Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT, Polonsky KS. Glucokinase Mutations, Insulin Secretion, and Diabetes Mellitus. *Annu Rev Physiol*. 1996;58(1):171-186. doi:10.1146/annurev.ph.58.030196.001131
32. Kesavan P, Wang L, Davis E, et al. Structural instability of mutant beta-cell glucokinase: implications for the molecular pathogenesis of maturity-onset diabetes of the young (type-2). *Biochem J*. 1997;322 (Pt 1):57-63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9078243>. Accessed April 9, 2019.
33. Sternisha SM, Miller BG. Molecular and cellular regulation of human glucokinase. *Arch Biochem Biophys*. 2019;663:199-213. doi:10.1016/j.abb.2019.01.011
34. García-Herrero C-M, Rubio-Cabezas O, Azriel S, et al. Functional characterization of MODY2 mutations highlights the importance of the fine-tuning of glucokinase and its role in glucose sensing. *PLoS One*. 2012;7(1):e30518. doi:10.1371/journal.pone.0030518
35. Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki JI, Nagata Y. Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure*. 2004;12(3):429-438. doi:10.1016/j.str.2004.02.005
36. Liu S, Ammirati MJ, Song X, et al. Insights into mechanism of glucokinase activation: Observation of multiple distinct protein conformations. *J Biol Chem*. 2012;287(17):13598-13610. doi:10.1074/jbc.M111.274126
37. Heredia V V., Thomson J, Nettleton D, Sun S. Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: Transient kinetic analysis. *Biochemistry*. 2006;45(24):7553-7562. doi:10.1021/bi060253q
38. Sayed S, Langdon DR, Odili S, et al. Extremes of clinical and enzymatic phenotypes in children with hyperinsulinism caused by glucokinase activating mutations. *Diabetes*. 2009;58(6):1419-1427. doi:10.2337/db08-1792
39. Whittington AC, Larion M, Bowler JM, Ramsey KM, Brüscheweiler R, Miller BG. Dual allosteric activation mechanisms in monomeric human glucokinase. *Proc Natl*

- Acad Sci.* 2015;112(37):11553-11558. doi:10.1073/pnas.1506664112
40. Larion M, Miller BG. 23-Residue C-terminal α -helix governs kinetic cooperativity in monomeric human glucokinase. *Biochemistry.* 2009;48(26):6157-6165. doi:10.1021/bi9007534
 41. Bowler JM, Hervert KL, Kearley ML, Miller BG. Small-molecule allosteric activation of human glucokinase in the absence of glucose. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4(7):580-584. doi:10.1021/ml400061x
 42. Olavarria K, De Ingeniis J, Zielinski DC, et al. Metabolic impact of an NADH-producing glucose-6-phosphate dehydrogenase in Escherichia coli. *Microbiol (United Kingdom).* 2014;160(2014):2780-2793. doi:10.1099/mic.0.082180-0
 43. Palma F, Longhi S, Agostini D, Stocchi V. One-step purification of a fully active hexahistidine-tagged human hexokinase type I overexpressed in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.* 2001;22(1):38-44. doi:10.1006/prev.2001.1404
 44. Shaw KL, Scholtz JM, Pace CN, Grimsley RG. Determining the Conformational Stability of a Protein Using Urea Denaturation Curves. In: Humana Press; 2009:41-55. doi:10.1007/978-1-59745-367-7_2
 45. Zelent B, Buettger C, Grimsby J, et al. Thermal stability of glucokinase (GK) as influenced by the substrate glucose, an allosteric glucokinase activator drug (GKA) and the osmolytes glycerol and urea. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824(5):769—784. doi:10.1016/j.bbapap.2012.03.003
 46. Sternisha SM, Liu P, Marshall AG, Miller BG. Mechanistic Origins of Enzyme Activation in Human Glucokinase Variants Associated with Congenital Hyperinsulinism. *Biochemistry.* 2018;57(10):1632-1639. doi:10.1021/acs.biochem.8b00022
 47. Neet KE, Keenan RP, Tippett PS. Observation of a kinetic slow transition in monomeric glucokinase. *Biochemistry.* 1990;29(3):770-777. doi:10.1021/bi00455a026
 48. Gekko K, Timasheff SN. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures. *Biochemistry.* 1981;20(16):4667-4676. doi:10.1021/bi00519a023
 49. Vagenende V, Yap MGS, Trout BL. Mechanisms of protein stabilization and

- prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. 2009;48(46):11084-11096. doi:10.1021/bi900649t
50. Fersht AR, Matouschek A, Serrano L. The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding. *J Mol Biol*. 1992;224(3):771-782. doi:10.1016/0022-2836(92)90561-W
 51. Matschinsky FM. Regulation of Pancreatic b-Cell Glucokinase. *Diabetes*. 2002;51 (Suppl(December):S394-S404. doi:10.2337/DIABETES.51.2007.S394
 52. Gloyn AL, Odili S, Zelent D, et al. Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young. *J Biol Chem*. 2005;280(14):14105-14113. doi:10.1074/jbc.M413146200
 53. Lin SX, Neet KE. Demonstration of a slow conformational change in liver glucokinase by fluorescence spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*. <https://www.jbc.org/content/265/17/9670.short>. Published 1990. Accessed May 1, 2020.
 54. Pollard-Knight D, Connolly BA, Cornish-Bowden A, Trayer IP. Effect of glycerol on glucokinase activity: Loss of cooperative behavior with respect to glucose. *Arch Biochem Biophys*. 1985;237(2):328-334. doi:10.1016/0003-9861(85)90284-X
 55. Yan BX, Sun Qing Y. Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3190-3194. doi:10.1074/jbc.272.6.3190
 56. Scott RA, Scheeaga HA. Conformational analysis of macromolecules. iii. helical structures of polyglycine and poly-l-alanine. *J Chem Phys*. 1966;45(6):2091-2101. doi:10.1063/1.1727894
 57. López-Llano J, Campos LA, Sancho J. α -helix stabilization by alanine relative to glycine: Roles of polar and apolar solvent exposures and of backbone entropy. *Proteins*. 2006;64(3):769-778. doi:10.1002/prot.21041
 58. Dehouck Y, Kwasigroch JM, Gilis D, Rooman M. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(1):151. doi:10.1186/1471-2105-12-151
 59. Quan L, Lv Q, Zhang Y. STRUM: structure-based prediction of protein stability changes upon single-point mutation. *Bioinformatics*. 2016;32(19):2936-2946. doi:10.1093/bioinformatics/btw361

60. Ermakova E. Structural insight into the glucokinase-ligands interactions. Molecular docking study. *Comput Biol Chem.* 2016;64:281-296. doi:10.1016/j.compbiolchem.2016.08.001
61. Kumari V, Li C. Comparative Docking Assessment of Glucokinase Interactions with its Allosteric Activators. *Curr Chem Genomics.* 2009;2:76-89. doi:10.2174/1875397300802010076
62. Yellapu NK, Kandlapalli K, Kandimalla R, Pradeepkiran JA. Conformational transition pathway of R308K mutant glucokinase in the presence of the glucokinase activator YNKGKA4. *FEBS Open Bio.* 2018;8(8):1202-1208. doi:10.1002/2211-5463.12255
63. Nanda Kumar Y, Kalpana K, Venkateswara Swamy K, Sarma PVGK, Bhaskar M. Molecular dynamics simulations of MODY2 mutated glucokinase structures revealed significant conformational variations explaining reasons for hyperglycemic condition. *Int J Pharma Bio Sci.* 2012;3(4):493-501.
64. Valentínová L, Beer NL, Staník J, et al. Identification and functional characterisation of novel glucokinase mutations causing maturity-onset diabetes of the young in Slovakia. *PLoS One.* 2012;7(4):e34541. doi:10.1371/journal.pone.0034541
65. Moritsugu K, Terada T, Kokubo H, Endo S, Tanaka T, Kidera A. Multiscale enhanced sampling of glucokinase: Regulation of the enzymatic reaction via a large scale domain motion. *J Chem Phys.* 2018;149(7). doi:10.1063/1.5027444
66. Li Q, Gakhar L, Ashley Spies M. Determinants of human glucokinase activation and implications for small molecule allosteric control. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2018;1862(9):1902-1912. doi:10.1016/j.bbagen.2018.06.001
67. Ermakova E, Kurbanov R. Molecular insight into conformational transformation of human glucokinase: conventional and targeted molecular dynamics. *J Biomol Struct Dyn.* 2019;0(0):000. doi:10.1080/07391102.2019.1652689