

UCV-FC
Biotecnología
P226
C-1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



**IMPORTANCIA DE RESIDUOS CONSERVADOS EN LA FAMILIA
RIBOQUINASA: EFECTO DE Mg^{+2} Y PO_4^{-3} SOBRE LA CATÁLISIS Y
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE
FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *Escherichia coli*.**

**Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

RAFAEL EMMANUEL PARDUCCI BOFILL

Dra. Victoria Guixé Leguía
Directora de Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Osvaldo Alvarez Araya
Presidente Comisión

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector



Santiago de Chile, diciembre 2005

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**IMPORTANCIA DE RESIDUOS CONSERVADOS EN LA FAMILIA
RIBOQUINASA: EFECTO DE Mg^{+2} Y PO_4^{-3} SOBRE LA CATÁLISIS Y
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
DE FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *Escherichia coli*.**

Memoria de Título
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Rafael E. Parducci Bofill

Director de Tesis: Dra. Victoria Guixé

Diciembre, 2005

Este trabajo se lo dedico a la deriva,
la que ha soplado constantemente mi camino
y al mástil que soporta la vela que deja libre mi destino,
mi amada madre, *Teresa*



Agradecimientos



Quiero expresar mis agradecimientos a las siguientes personas:

A la Dra. Victoria Guixé, por su confianza, paciencia y devoto espíritu académico.

Al Dr. Jorge Babul por haberme brindado la oportunidad de confirmar mi espíritu científico.

Al Dr. Ricardo Cabrera, por haberme guiado en este camino con su gran intelecto, incentivo y amistad.

A Mauricio Báez, por ser un gran ejemplo de un gran científico.

Al Dr. Octavio Monasterio e integrantes del C.E.M. por la colaboración prestada durante el transcurso de la tesis.

Por el apoyo académico e intelectual y por su hospitalidad en mi estadía en el laboratorio, al Dr. Tito Ureta, Dra. Ana Preller, Dr. Eduardo Kessi, Dra. Erika Lang.

A Marcela Mancilla y Mauricio Arriagada, por su amistad y la contribución en el desarrollo de cada uno de mis experimentos.

A mi Ami, Paolo, tío Nico, que sin su amor, apoyo, guía y ejemplo, no hubiera sido posible lograr este objetivo.

A todas las personas que estuvieron conmigo durante este proceso de formación y crecimiento, dando mucho apoyo emocional: Paulina Pizarro, Felipe Opazo, Rodrigo Hess, Edgar Rozas, Claudio Aguayo, Francisco Olivari, Mónica Núñez, Luis Pouchuq y Andres Caniuguir.

Y finalmente a FONDECYT por su participación en el financiamiento de la investigación.

Índice de Contenido



Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de Contenido	iv
Lista de Tablas	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
1. Fosfofructoquinasas de <i>E. coli</i>	2
2. Motivos de secuencia conservados y estructura del sitio activo en la familia riboquinasa	4
2.1 Motivo GAGD y mecanismo catalítico en la familia riboquinasa	5
2.2 Efectos de Mg^{+2} y PO_4^{-3} en la actividad de las enzimas de la familia riboquinasa: La función del motivo NXXE	8
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
MATERIALES	14
1. Cepas Bacterianas	14
2. Vectores	14
3. Partidores	15
4. Reactivos	16
MÉTODOS	17
1. Medios de cultivo	17
1.1 Luria Bertani (LB)	17
1.2 NZY+	17
2. Mutagénesis sitio específica	17

2.1 Preparación de células competentes	18
2.2 Transformación por shock térmico	19
3. Purificación del DNA plasmidial en escala pequeña	19
4. Secuenciación de mutantes	19
5. Sobreexpresión de Pfk-2 y las proteínas mutantes	20
5.1 Caso de la Pfk-2 silvestre	20
5.2 Caso de las proteínas mutantes	20
6. Purificación de Pfk-2 silvestre y las proteínas mutantes	21
7. Determinación de la actividad enzimática de la Pfk-2	22
8. Mediciones de fluorescencia intrínseca	24
9. Mediciones de dicroísmo circular	24
10. Cromatografía de exclusión molecular	25
11. Dispersión dinámica de luz	26
11.1 Colección de datos	26
11.2 Procesamiento de datos	27
RESULTADOS	28
1. Mutagénesis sitio dirigida	28
2. Expresión y purificación de las proteínas mutantes Pfk-3 D256N, Pfk-2 E190Q y Pfk-2 silvestre.....	30
3. Caracterización de la mutante Pfk-2 D256N	35
4. Caracterización de la mutante Pfk-2 E190Q	39
4.1 Efecto del Mg^{+2} sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q	39
4.2 Efecto del Mg^{+2} sobre las propiedades del sitio alostérico de Pfk-2 E190Q y Pfk-2 silvestre	45
4.3 Efecto del PO_4^{-3} sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q	47
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS	64

Índice de Tablas

Tabla 1	Purificación Pfk-2 E190Q	32
Tabla 2	Purificación Pfk-2 D256N	33
Tabla 3	Purificación de Pfk-2 silvestre.....	34
Tabla 4	Parámetros cinéticos de Pfk-2 D256N	36
Tabla 5	Influencia de la concentración de Mg^{+2} libre sobre la k_{cat} de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q	40
Tabla 6	Cálculo de las concentraciones de las especies presentes en los ensayos de velocidad en función de Mg^{+2} libre	42
Tabla 7	Parámetros cinéticos de Pfk-2 E190Q	44
Tabla 8	Efecto del PO_4^{-3} sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q	52





Índice de Figuras

Figura 1	Modelo del sitio activo de Pfk-2 de <i>E. coli</i>	6
Figura 2	Conservación del motivo GAGD en la familia riboquinasa y su participación en la catálisis	7
Figura 3	Conservación del motivo NXXE en la familia riboquinasa y su participación en la unión de Mg^{+2}	10
Figura 4	Secuencia de nucleótidos del DNA de Pfk-2 silvestre y de las mutantes propuestas	29
Figura 5	Cinética de inducción de la proteína mutante Pfk-2 E190Q	31
Figura 6	Purificación de Pfk-2 E190Q	32
Figura 7	Purificación de Pfk-2 D256N	33
Figura 8	Purificación de Pfk-2 silvestre	34
Figura 9	Espectros de dicroísmo circular de la Pfk-2 silvestre y de las mutantes Pfk-2 E190Q y Pfk-2 D256N	36
Figura 10	Actividad de Pfk-2 D256N en función de la concentración de MgATP	38
Figura 11	Tetramerización inducida por MgATP para Pfk-2 y D256N	38
Figura 12	Dependencia de la velocidad máxima de la enzima silvestre y la mutante Pfk-2 E190Q en función de la concentración de Mg^{+2} libre	40
Figura 13	Unión de iones Mg^{+2} a Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q	42
Figura 14	Efecto de la mutación E190Q sobre las constantes de Michaelis en relación a Pfk-2 silvestre	44
Figura 15	Efecto de Mg^{+2} libre y fructosa-6-P en la inhibición inducida por MgATP en Pfk-2 silvestre	46
Figura 16	Efecto de la concentración de Mg^{+2} libre en la tetramerización inducida por MgATP en la Pfk-2 silvestre	46
Figura 17	Efecto de Mg^{+2} libre y fructosa-6-P en la inhibición inducida por MgATP en Pfk-2 E190Q	48
Figura 18	Efecto del MgATP sobre la tetramerización de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q	48

Figura 19	Efecto de la concentración de PO_4^{-3} sobre la actividad enzimática de Pfk-2 y Pfk-2 E190Q	50
Figura 20	Efecto del PO_4^{-3} sobre la velocidad inicial de Pfk-2 silvestre	53
Figura 21	Efecto del PO_4^{-3} sobre la inhibición inducida por MgATP en Pfk-2	53



Lista de Abreviaturas

Pfk	fosfofructoquinasa
AK	adenosina quinasa
RK	riboquinasa
fructosa-6-P	fructosa-6-fosfato
fructosa-1,6-bisP	fructosa-1,6-bisfosfato
EDTA	etilendiamina tetra acetato
IPTG	isopropiltiogalactósido
NADH	nicotinamida adenina dinucleotido reducido
DTT	ditiotreitol
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
AMP-PCP	5'-adenililmetilendifosfonato (análogo no hidrolizable de ATP)
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sódio
K_M	constante de Michaelis
$K_{0.5}$	concentración de ligando que produce la mitad del efecto observado
rpm	revoluciones por minuto
R_H	radio hidrodinámico

RESUMEN

Los miembros de la familia riboquinasa catalizan la fosforilación dependiente de ATP de sustratos que contienen un grupo hidroxilo secundario. A pesar de la diversidad estructural y de sustratos, es posible distinguir ciertos rasgos conservados que sugieren un modo de acción común en la reacción de fosforilación. La fosfofructoquinasa-2 de *Escherichia coli* (*E. coli*), que pertenece a la familia riboquinasa, cataliza la fosforilación de fructosa-6-P usando MgATP como cosustrato, para dar como productos fructosa-1,6-bisP y MgADP. Existen dos motivos conservados en los miembros de la familia, el motivo GAGD y el motivo NXXE, que se encuentran localizados en el sitio activo de las estructuras de los miembros de la familia. El primero de estos motivos contiene un ácido aspártico conservado, el que se ha propuesto que actúa como una base catalítica general, que desprotona el hidroxilo del sustrato a ser fosforilado. Por otra parte, por mutagénesis sitio dirigida se ha demostrado que los residuos asparragina y glutámico del motivo NXXE de la adenosina quinasa de hámster chino, afectan el uso de los iones Mg^{+2} y PO_4^{-3} por esta enzima.

En esta tesis evaluamos el efecto que tiene la remoción de la carga de los residuos E190 y D256 de los motivos NXXE y GAGD de Pfk-2 de *E. coli* sobre los parámetros cinéticos y estructurales de la enzima. Estos residuos fueron reemplazados por N y Q respectivamente bajo la hipótesis de que ellos corresponden a determinantes estructurales de la función catalítica. La enzima silvestre posee una k_{cat} 15.000 veces mayor que la de la enzima Pfk-2 D256N. La K_M aparente para fructosa-6-P se incrementa tres veces debido a la mutación, mientras que la K_M aparente para MgATP se

mantiene invariable, por lo que el efecto de la mutación D256N se restringe a la k_{cat} y a la unión del sustrato azúcar fosforilado. Por otra parte, al reemplazar E190 por glutamina se produce una disminución en la k_{cat} y se observa una dependencia de ésta al variar la concentración de iones Mg^{+2} . A bajas concentraciones de Mg^{+2} libre, la k_{cat} de la enzima silvestre es 400 veces mayor que la de la enzima Pfk-2 E190Q. Además, se observa una dependencia hiperbólica de la k_{cat} respecto de la concentración de Mg^{+2} libre, hasta una velocidad máxima que es 1/50 menor con respecto a la de la enzima silvestre, donde el 50% del efecto se observa a una concentración de 10 mM de Mg^{+2} libre. Estos resultados nos indican que existiría un sitio adicional para este catión divalente, distinto del que une MgATP en el sitio activo. Esta es la primera evidencia reportada para un segundo sitio de Mg^{+2} en Pfk-2 u otras fosfofructoquinasas. Considerado típicamente como un activador de la actividad de fosfofructoquinasas y de los miembros de la familia riboquinasa, el PO_4^{-3} actúa como un inhibidor en la Pfk-2, asemejándose a la inhibición alostérica inducida por MgATP, debido a que probablemente también actúa a nivel del sitio alostérico. La mutante Pfk-2 E190Q muestra mayor sensibilidad a la inhibición por PO_4^{-3} a concentraciones saturantes de sustratos. Una sensibilidad semejante se observa en esta enzima con la inhibición por MgATP, ya que aún a concentraciones saturantes de fructosa-6-P (1 mM) el complejo metal nucleótido inhibe la actividad de la enzima mutante. La mutación E190Q en el sitio activo de Pfk-2 afecta las propiedades del sitio alostérico, por lo que se sugiere que el motivo NXXE media la interacción entre ambos sitios.

ABSTRACT

The members of the ribokinase family catalyze the ATP-dependent phosphorylation of substrates that contain a secondary hydroxyl group. In spite of the structural and substrate diversity, it is possible to distinguish certain conserved features suggesting a common mode of action in the phosphorylation reaction. The phosphofructokinase-2 of *Escherichia coli* (*E. coli*), which belongs to the ribokinase family, catalyzes the phosphorylation of fructose-6-phosphate using MgATP as cosubstrate, producing fructose-1,6-bisphosphate and MgADP. There are two conserved motifs in the members of the ribokinase family, the NXXE and the GAGD motifs, located in the active site of the characterized structures of the family. The first of these motifs contains a highly conserved aspartic acid that was proposed as general catalytic base that causes the deprotonation of the hydroxyl group of the substrate to be phosphorylated. On the other hand, it has been demonstrated by site-directed mutagenesis that the residues asparagine and glutamic acid from the motif NXXE of Chinese hamster adenosine kinase are involved in the proper use of Mg^{+2} and PO_4^{-3} ions.

In this thesis we evaluated the effect of the remotion of the negative charge of residues E190 and D256 of the NXXE and GAGD motifs, on the kinetic and structural parameters of the *E. coli* Pfk-2. These residues were replaced by N and Q respectively, based on the hypothesis that they correspond to structural keys of the catalytic function. The Pfk-2 D256N mutation leads to a dramatical reduction of the k_{cat} value, which is only 1/15,000 times the k_{cat} of the wild type enzyme. The apparent K_M for fructose-6-P increases 3 times due to the mutation, while the apparent K_M for MgATP remains

invariable. The effect of the D256N mutation is restricted to k_{cat} and binding of the sugar phosphorylated substrate. On the other hand, when E190 was replaced by glutamine a decrease in the k_{cat} and its dependence with the concentration of Mg^{+2} ions was observed. At low concentrations of free Mg^{+2} , the k_{cat} of the mutant Pfk-2 E190Q is 1/400 times the k_{cat} of the wild type enzyme. Also, an hyperbolic dependence of the k_{cat} is observed regarding the concentration of free Mg^{+2} , until a maximum velocity 1/50 times minor than the maximum velocity of the wild type enzyme, with the 50% of the effect observed at a concentration of 10 mM of free Mg^{+2} . These results indicate the presence of an additional site for this divalent cation, different from the active site where MgATP binds. This is the first evidence reported for a second site for Mg^{+2} in Pfk-2 or other phosphofructokinases. Although typically considered as an activator of phosphofructokinases and ribokinase family members, PO_4^{-3} acts as an inhibitor in Pfk-2. The inhibition observed for the wild type enzyme by PO_4^{-3} resembles the allosteric inhibition induced by MgATP, because it also probably acts over the allosteric site described for this enzyme. The Pfk-2 E190Q mutant shows higher sensibility to the inhibition by PO_4^{-3} at saturating substrates concentrations. A similar sensibility is observed in this enzyme with the inhibition by MgATP, since even at saturating concentration of fructose-6-P (1 mM) the nucleotide-metal complex inhibits the activity of the mutant enzyme. The E190Q mutation in the active site of Pfk-2 affects the properties of the allosteric site, which suggests that the NXXE motif mediates the interaction between both sites.

INTRODUCCIÓN

La fosforilación de azúcares tiene gran importancia en el metabolismo de carbohidratos de la célula, facilitando el flujo de carbono y la formación de ATP. Durante el curso de la evolución, la química de esta secuencia de reacciones de fosforilación se ha conservado en una amplia variedad de organismos. A través de comparaciones de secuencia, estructura y función, en un conjunto de 60 quinasas con diferentes especificidades, Bork y colaboradores (1993) identificaron tres familias de quinasas de azúcares (hexoquinasa, riboquinasa y galactoquinasa). De acuerdo con este análisis, la función enzimática de fosforilación de azúcares ha evolucionado de manera independiente en tres módulos estructurales distintos, dando cuenta de una evolución convergente.

Desde los estudios de Bork, la familia riboquinasa es la familia de quinasas de carbohidratos de la cual se dispone mayor información estructural, ya que hasta el momento se han identificado 12 estructuras que representan a 9 miembros de la familia. Las comparaciones basadas en las estructuras tridimensionales muestran varios motivos conservados importantes para el plegamiento y la función. Los miembros de la familia riboquinasa catalizan la fosforilación dependiente de ATP de sustratos que contienen un hidroxilo secundario. La estructura cuaternaria dentro de la familia abarca monómeros, como adenosina quinasa y glucoquinasa dependiente de ADP (Mathews y col, 1998; Schumacher y col, 2000; Ito y col, 2001); dímeros, como riboquinasa y piridoxal quinasa (Sigrell y col, 1998; Li y col, 2002); trímeros, como 4-metil-5- β -hidroxy-etiltiazol quinasa (Campobasso y col, 2000); y tetrámeros, como la posible quinasa

YXKO de *B. subtilis* (Zhang y col, 2002). Todas estas enzimas comparten una similitud notable a nivel del plegamiento de la subunidad monomérica. El monómero puede presentar dominios adicionales involucrados en la oligomerización o en la formación del sitio activo. La disponibilidad de estas estructuras permite tener una visión más certera acerca de los mecanismos catalíticos y regulatorios que se manifiestan en la familia. El ejemplo mejor caracterizado de la familia riboquinasa, en cuanto a parámetros cinéticos y estructurales, es la fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *Escherichia coli* (Ronimus y Morgan, 2001), aunque su estructura tridimensional no ha sido determinada experimentalmente. El estudio de las propiedades estructurales de esta enzima es relevante también desde el punto de vista de la convergencia funcional en las enzimas, es decir, la catálisis de una misma reacción en el contexto de plegamientos globalmente distintos. Esto porque se sabe que la cepa silvestre de *E. coli* posee dos formas de la enzima, la fosfofructoquinasa-1 (Pfk-1) y Pfk-2, que pertenecen a familias no relacionadas filogenéticamente (Ronimus y Morgan, 2001).

1. Fosfofructoquinasas de *E. coli*.

La fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.11) cataliza la transferencia del fosfato y del ATP al grupo 1-OH de fructosa-6-fosfato (fructosa-6-P) para producir fructosa-1,6-bisfosfato (fructosa-1,6-bisP) y ADP. Esta etapa de la vía glicolítica está sujeta a múltiples mecanismos de regulación en una amplia variedad de organismos.

Pfk-1 pertenece a la familia PFKA, que incluye a la mayoría de fosfofructoquinasas dependientes de ATP y pirofosfato que se encuentran en los dominios *bacteria* y *eucarya* (Ronimus y Morgan, 2001) y su estructura ha sido determinada con resolución atómica

mediante cristalografía de proteínas (Shirakihara y Evans, 1988). Pfk-1 es un homotetrámero (35 kDa por monómero) que presenta una cinética sigmoidea con respecto a fructosa-6-P e hiperbólica con respecto a MgATP. Su actividad catalítica es incrementada por los efectores alostéricos ADP o GDP e inhibida por fosfoenolpiruvato (Blangy y col, 1968; Babul 1978).

Por su parte la Pfk-2, que pertenece a la familia riboquinasa, es un homodímero (33 kDa por monómero) y presenta una cinética hiperbólica con respecto a fructosa-6-P e inhibición por MgATP cuando el experimento se realiza en condiciones de bajas concentraciones de fructosa-6-P (Babul, 1978; Daldal, 1984; Guixé y Babul, 1985). La unión de ligandos a la Pfk-2, induce cambios en las propiedades de emisión de fluorescencia del único residuo triptofano presente en la proteína (W88). Estudios de fluorescencia intrínseca en la Pfk-2 permitieron proponer la presencia de un sitio alostérico para MgATP (Guixé y col, 1998). La unión de MgATP al sitio alostérico, responsable de la inhibición de la actividad enzimática, está asociada a un cambio en el estado de agregación de la enzima, la cual se asocia para formar tetrámeros (Guixé y Babul, 1988, Kotlarz y Buc, 1981).

Dado que Pfk-2 no presenta patrones de secuencia conservados que permitan asociarla con Pfk-1, ninguna propiedad puede ser inferida de la estructura tridimensional de esta última. Por lo tanto, es necesario usar como referencia las estructuras de las proteínas homólogas cristalografiadas y las alineaciones múltiples de miembros de la familia riboquinasa, con el propósito de encontrar patrones de secuencia que permitan identificar residuos cuya función sea importante en la catálisis y unión de sustratos y efectores.

2. Motivos de secuencia conservados y estructura del sitio activo en la familia riboquinasa.

Para poder relacionar la información estructural extraída de miembros de la familia riboquinasa con la Pfk-2, se construyó un modelo por homología usando como moldes las estructuras cristalinas de la riboquinasa (RK) de *E. coli* y la adenosina quinasa (AK) de humano, que presentan 21 y 15% de identidad de secuencia con la Pfk-2, respectivamente. Este modelo tuvo la intención de reflejar el plegamiento general más que los detalles finos de la estructura del sitio activo (Cabrera y col, 2003).

Las enzimas de la familia riboquinasa se encuentran clasificadas como proteínas de tipo alfa y beta (α/β) (Sigrell y col, 1998; Mathews y col, 1998; Cook y col, 2000). El monómero de los miembros de la familia consta de un dominio mayor α/β , y un dominio menor. El sitio activo está localizado en una hendidura poco profunda a lo largo del borde de una hoja beta central en el dominio mayor. En los miembros de esta familia el dominio menor consiste en una estructura tipo tapa que cubre el sitio activo, el que se ha sugerido constituye un marcador morfológico de la evolución dentro de esta superfamilia (Ohshima y col, 2004). En los miembros diméricos de la familia, incluida la Pfk-2, el dominio menor forma parte de la interfaz entre las subunidades.

Existen tres motivos altamente conservados en la mayoría de los miembros de la familia riboquinasa. El primero de estos motivos se encuentra cerca del N-terminal, y corresponde a un dipéptido de glicina (GG) (Bork y col, 1993; Wu y col, 1991). Este par de glicinas experimentan un cambio de torsión en sus ángulos diedros, como una especie de bisagra, que causa una rotación de cuerpo rígido entre los dominios mayor y menor, luego de la unión del sustrato azúcar (Schumacher y col, 2000). Los otros dos

motivos se encuentran hacia el C-terminal. El segundo motivo corresponde a la secuencia GAGD, que contiene un residuo ácido aspártico altamente conservado, el que se ha propuesto constituye la base catalítica general en la reacción de fosforilación (Maj y col, 2000; Mathews y col, 1998; Schumacher y col, 2000; Sigrell y col, 1998). Por último, el tercer motivo que corresponde a la secuencia NXXE, está involucrado en la unión de iones Mg^{+2} y PO_4^{-3} en AK de humano y RK de *E. coli*, lo que se cree es una propiedad que caracteriza a la familia riboquinasa (Maj y col, 2002).

En el sitio activo del modelo de la Pfk-2, se ubican los residuos E190 y D256, de los motivos conservados NXXE y GAGD, respectivamente (figura 1). El esquema que se presenta en la figura 1 fue extraído del modelo por homología de la Pfk-2 hecho por Cabrera (2004) y observado a través del programa DeepView/Swiss-PdbViewer. En esta tesis proponemos evaluar el papel de estos residuos en la catálisis y unión de sustratos y efectores, mediante la caracterización cinética de mutantes sitio-específicas.

2.1 Motivo GAGD y mecanismo catalítico en la familia riboquinasa.

Mediante alineación múltiple de secuencias de miembros de la familia riboquinasa (figura 2A) se destaca el motivo conservado GAGD (Cabrera, 2004). Dentro de este motivo se encuentra un ácido aspártico que se ha sido sugerido ser la base catalítica general que sustrae el protón del hidroxilo que va a ser fosforilado en el sustrato, incrementando su nucleofilicidad. En AK de humano se demostró que el residuo D300 corresponde a la base catalítica que desprotona la adenosina en el hidroxilo 5', lo cual inicia la transferencia del fosfato γ del ATP al sustrato azúcar (Mathews y col, 1998). Para RK de *E. coli*, el residuo ácido aspártico correspondiente (D255) ocupa una posición cercana al hidroxilo 5' de la ribosa en su estructura

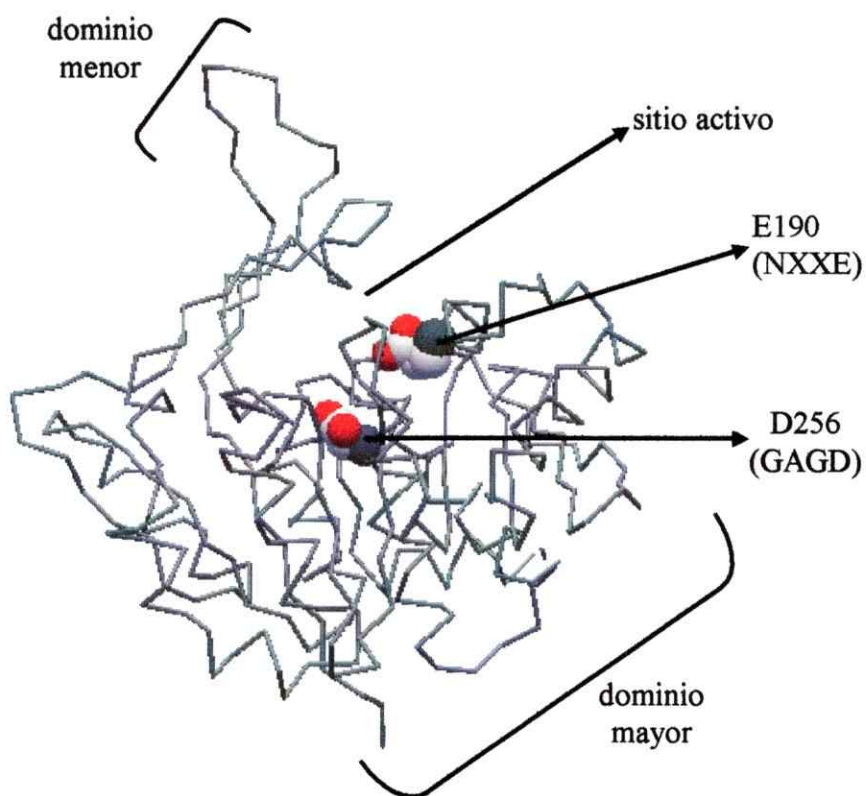


Figura 1. Modelo del sitio activo de Pfk-2 de *E. coli*. Este esquema está basado en el modelo por homología de la Pfk-2 (Cabrera, 2004) y observado con el programa DeepView/Swiss-PdbViewer. Se indican los dominios conservados en el plegamiento de los miembros de la familia riboquinasa y la ubicación de los residuos conservados de los motivos NXXE y GAGD. En rojo se muestran los oxígenos de los carboxilatos, en gris claro los carbonos de las cadenas laterales y en gris oscuro el carbono del esqueleto de la cadena principal.

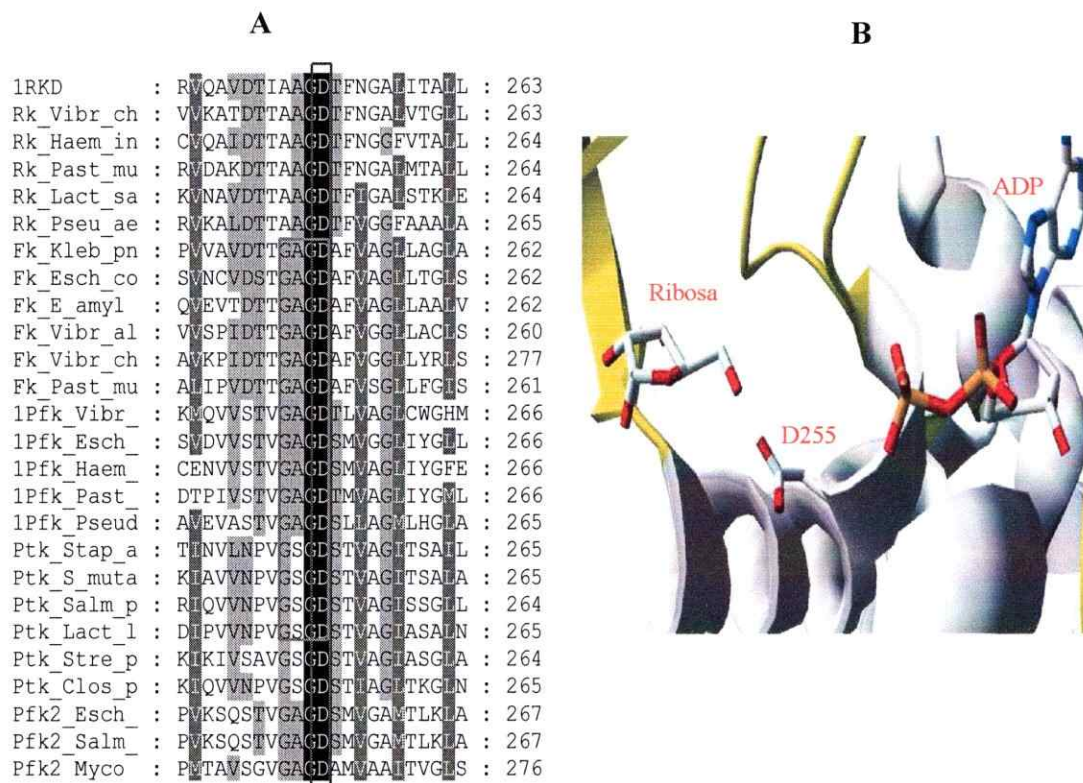


Figura 2. Conservación del motivo GAGD en la familia riboquinasa y su participación en la catálisis. (A) Alineación múltiple de varios miembros de la familia riboquinasa alrededor del motivo GAGD (Cabrera, 2004), donde se destaca la conservación absoluta del ácido aspártico en la columna negra.; las columnas gris oscuro indican más de 80% residuos conservados y las columnas grises indican entre 60 y 80% de residuos conservados. (B) Sitio activo de la riboquinasa de *E. coli*, visto con el programa DeepView/Swiss-PdbViewer. Nótese las posiciones relativas del carboxilato del ácido aspártico conservado (D255) y del hidroxilo-5 del sustrato ribosa y ADP ilustrados en forma de varilla: blanco el carbono, rojo el oxígeno, amarillo el fósforo, azul el nitrógeno (Sigrell y col, 1998).

tridimensional (Sigrell y col, 1998). Maj y col., 2000, observaron que el reemplazo, por mutagénesis sitio-dirigida, del residuo correspondiente en la adenosina quinasa de hámster chino (D316) resultó en una pérdida casi completa de la actividad enzimática. Todos los residuos de ácido aspártico mencionados anteriormente se encuentran en el motivo de secuencia GAGD. Ya que las estructuras cristalinas de miembros de la familia riboquinasa se encuentran disponibles en formato pdb, se utilizó el programa DeepView/Swiss-PdbViewer para visualizar las interacciones que tienen las proteínas con sus respectivos ligandos. En la figura 2B destacamos una vista del sitio activo de la AK de humano que nos muestra la ubicación de este ácido aspártico conservado (D255) y sus interacciones con el sustrato ribosa, y ADP (Sigrell y col, 1998). En este trabajo pretendemos evaluar la función del ácido aspártico 256 en Pfk-2, bajo la hipótesis de que el mecanismo de reacción de las enzimas de la familia implica una catálisis básica general en la que el ácido aspártico conservado corresponde al residuo catalítico.

2.2 Efectos de Mg^{+2} y PO_4^{-3} en la actividad de las enzimas de la familia riboquinasa: la función del motivo NXXE.

Hay dos clases de enzimas que requieren cationes divalentes para su actividad catalítica, las metaloenzimas, que contienen un ion metálico fuertemente unido que no se disocia, y las enzimas activadas por metal, las cuales son inactivas en la ausencia del catión. Uno de los grupos más importantes dentro de este último tipo de enzimas son las fosfotransferasas, cuyo estudio impone ciertas dificultades, como por ejemplo la forma iónica del sustrato nucleótido al pH de la mezcla de reacción, los complejos que se pueden formar entre la especie iónica del nucleótido y el metal, y si es que el nucleótido libre o el complejo nucleótido-metal es el verdadero sustrato de la

reacción. Todas estas consideraciones deben ser tomadas en cuenta al momento de hacer ensayos cinéticos con fosfotransferasas. Casi todas las fosfotransferasas, incluyendo la Pfk-2, utilizan el complejo nucleótido-metal como sustrato verdadero. También, se sabe que las fosfotransferasas pueden ser inhibidas por altas concentraciones de Mg^{+2} o de nucleótido libre, los cuales están presentes en conjunto con el complejo MgATP. En el caso de Pfk-2 se sabe que ATP^{-4} es un inhibidor competitivo con respecto a MgATP en el sitio activo de la enzima. Consecuentemente es de importancia diseñar condiciones experimentales que eliminen o minimicen el efecto inhibitorio ya sea del catión divalente o del nucleótido libre (Morrison, 1979; Guixé y Babul, 1985).

Alineaciones de secuencia de miembros de la familia riboquinasa (figura 3A), muestran el motivo NXXE, que tiene un residuo ácido glutámico completamente conservado y que en la secuencia de Pfk-2 de *E. coli* corresponde a E190 (Cabrera, 2004). Dentro de la familia riboquinasa, la estructura cristalográfica de AK de humano muestra dos adenosinas y un ion magnesio, el cual tiene una coordinación octaédrica con seis moléculas de agua ordenadas (MO_6) unidas a residuos del sitio activo, incluyendo contactos con las cadenas laterales del motivo NXXE, específicamente con E226 así como también con el residuo catalítico D300. En la figura 3B destacamos la interacción que tiene el residuo conservado E226 con un ion Mg^{+2} en el sitio activo de AK de humano (Matthews y col, 1998). En el sitio activo de AK de *Toxoplasma gondii*, el ion Mg^{+2} se encuentra en una posición diferente de la observada en AK de humano, ya que está coordinado entre los fosfatos α y β del análogo de ATP no hidrolizable, AMP-PCP (Matthews y col, 1998). Una de las estructuras tridimensionales de 4-metil-5- β -hidroxy-

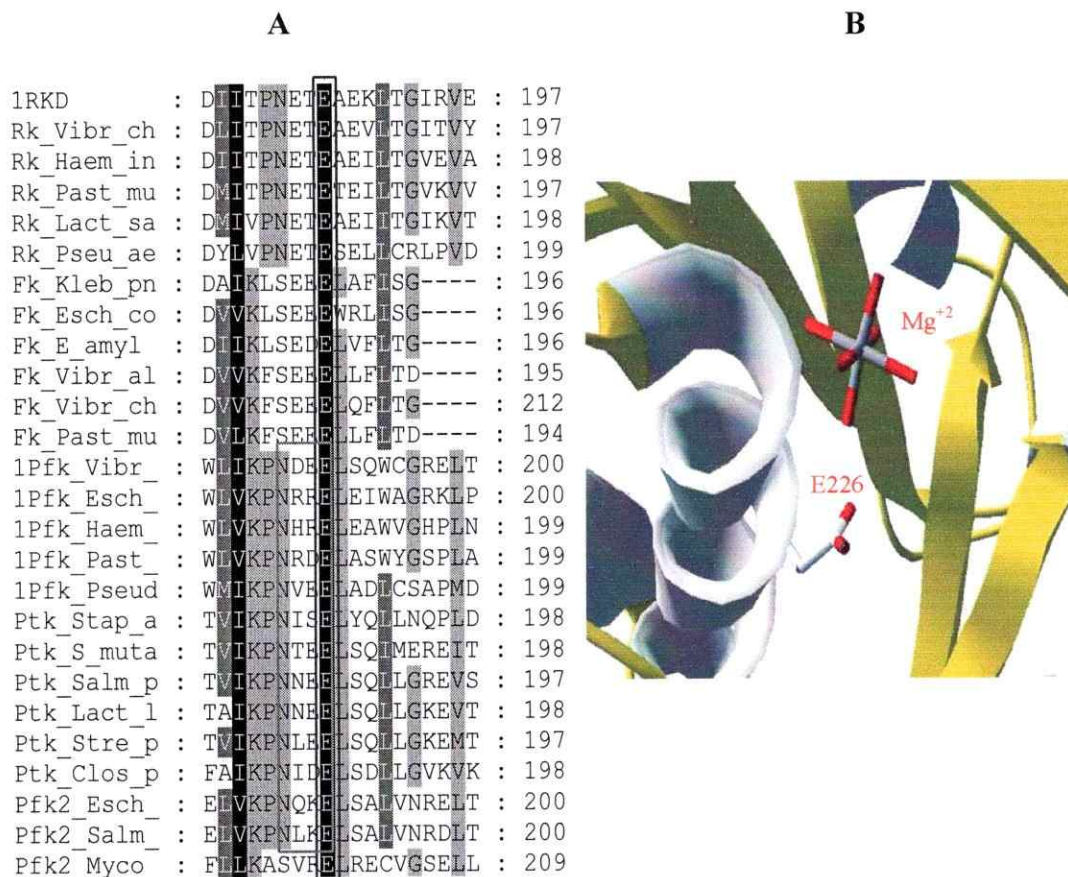


Figura 3. Conservación del motivo NXXE en la familia riboquinasa y su participación en la unión de Mg^{+2} . (A) Alineación múltiple de varios miembros de la familia riboquinasa alrededor del ácido glutámico conservado del motivo NXXE (Cabrera, 2004). Los colores de las columnas representan lo mismo que en la figura anterior. (B) Sitio activo de la adenosina quinasa de humano, visto con el programa DeepView/Swiss-PdbViewer. Nótese las posiciones relativas del carboxilato del ácido glutámico conservado y el ion Mg^{+2} ilustrados en forma de varilla: blanco el carbono, rojo el oxígeno, amarillo el fósforo, azul el nitrógeno (Mathews y col, 1998).

etiltiazol quinasa (THz), incorpora sustrato y producto simultáneamente, junto a dos iones Mg^{+2} en el sitio activo. Uno de estos iones Mg^{+2} se encuentra coordinado a través de dos moléculas de agua con el residuo E126, mientras que el otro está coordinado con el ATP (Campobasso y col, 2000). Además de estos datos estructurales, datos funcionales indican que la actividad de RK de *E. coli* y adenosina quinasa de distintas fuentes son inhibidas por altas concentraciones de Mg^{+2} (Maj y Gupta, 2001; Maj y col, 2002). Específicamente, en AK de humano Mg^{+2} libre actúa como un activador a bajas concentraciones, como un inhibidor a concentraciones del orden milimolar e incrementa la inhibición por sustrato inducida por adenosina (Fisher y Newsholme, 1984). En Pfk-2 no se ha establecido el mecanismo por el cual el Mg^{+2} participa en la catálisis, pero se sabe que un aumento en la concentración de Mg^{+2} libre disminuye parcialmente la inhibición inducida por MgATP, revelando un posible efecto de este ion sobre la regulación alostérica de la enzima (Guixé y Babul, 1985).

La importancia de PO_4^{-3} como efector alostérico en fosfofructoquinasas de distintas fuentes, ha sido ampliamente estudiada. En el caso de la Pfk de levadura, ocurre activación de la enzima en presencia de PO_4^{-3} principalmente debido a cambios en la afinidad aparente para fructosa-6-P (Bañuelos y col, 1977). En la familia riboquinasa, se ha reportado activación por PO_4^{-3} y otros iones en RK de *E. coli* y AK (Maj y Gupta, 2001). En el sitio activo de RK de *E. coli* podemos encontrar un ion fosfato en contacto cercano con un residuo N y un residuo E conservados en las posiciones 187 y 190 respectivamente, residuos que pertenecen al motivo NXXE (Sigrell y col, 1998). Con respecto a AK, se ha sido descrito que el PO_4^{-3} incrementa fuertemente la actividad en enzimas proveniente de distintas fuentes y se ha sugerido que esta dependencia es una

propiedad conservada dentro de la familia riboquinasa asociada al motivo conservado NXXE. En AK, pareciera ser que PO_4^{-3} antagoniza el efecto inhibitorio del Mg^{+2} dado que en la presencia de PO_4^{-3} es menor el efecto inhibitorio que produce el catión divalente en la actividad enzimática (Maj y col, 2002).

En conjunto, estas observaciones apoyan la participación de los residuos N y E del motivo NXXE en la unión de PO_4^{-3} y Mg^{+2} al sitio activo de ciertos miembros de la familia riboquinasa. Sin embargo, no se conoce el papel de estos residuos en la catálisis y regulación enzimática de la Pfk-2.

HIPÓTESIS

Los residuos conservados E190 y D256 participan en el mecanismo catalítico de Pfk-2 de E.coli, como determinantes de la unión de Mg^{+2} y PO_4^{-3} al sitio activo y como base catalítica general, respectivamente.

OBJETIVOS

Como objetivos generales nos planteamos:

1. Establecer la importancia del residuo D256 del motivo conservado GAGD en la catálisis y unión de los sustratos de Pfk-2.
2. Analizar el papel de la unión de Mg^{+2} y PO_4^{-3} en la actividad y regulación alostérica de Pfk-2 y determinar la participación de E190 del motivo conservado NXXE en la unión de estos ligandos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Cepas bacterianas

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) ($F^- ompT hsdSB (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)) que posee en su genoma una copia del gen de la RNA polimerasa T7 inducible por IPTG, fue transformada con el plásmido pET 21-d (que contiene el gen silvestre de Pfk-2) para la sobreexpresión de la Pfk-2 silvestre.

La cepa DF1020 (*pro82, Δpfb201, recA56, Δ-(rha-pfkA), endA1, hsdR17, supE44*) que presenta deleciones en los genes de ambas fosfofructoquinasas, *pfk-1* y *pfk-2*, fue co-transformada con los plásmidos pET 21-d (que contiene el gen mutante de Pfk-2) y pGP1-2 (que contiene el gen de la RNA polimerasa del fago T7), para la expresión de las mutantes de Pfk-2.

La cepa de *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^ZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]), fue utilizada para la transformación con los plásmidos mutados. Esta cepa fue adquirida como parte del kit de mutagénesis sitio-específica QuickChange[®] de Stratagene (La Jolla, CA, USA).

2. Vectores

El vector pET 21-d de Novagen (Madison, WI, USA) se utilizó para la sobreexpresión del gen de Pfk-2 silvestre y sus mutantes (927 pb). Este vector posee un tamaño aproximado de 5.400 pb y contiene un gen cuyo producto confiere resistencia a

ampicilina. El gen de Pfk-2 fue clonado entre los sitios de corte de las endonucleasas *NcoI* (que conserva el codón de inicio) y *BamHI*, conservándose el codón de término original del gen, de manera que el producto génico no contiene ninguna fusión. El gen clonado se encuentra bajo el control del promotor T7, y para su transcripción es necesario proveer de una fuente de RNA polimerasa del fago T7 en la bacteria hospedera.

El plásmido pGP1-2 (Tabor y Richardson, 1985) que contiene el gen de la RNA polimerasa T7 se utilizó para la sobreexpresión de las enzimas mutantes en la cepa DF1020 que no produce fosfofructoquinasa endógena. El gen de la RNA polimerasa T7 se encuentra bajo el control del promotor λ pL y su expresión puede ser inducida por temperatura (42° C por 20 min). Este plásmido contiene un gen cuyo producto confiere resistencia a kanamicina y es compatible con el pET 21-d.

3. Partidores

Los partidores utilizados para introducir las mutaciones en el gen de Pfk-2 fueron los siguientes:

ácido aspártico 256 por asparragina:

5'-ACCGTTGGCGCTGGTAACAGCATGGTCGGCGCG-3'

3'-TGGCAACCGCGACCATTGTTCGTACCAGCCGCGC-5'

ácido glutámico 190 por glutamina:

5'-GGTTAAGCCTAACCAAAAACAACTCAGTGCGCTGGTGAATCG-3'

3'-CCAATTCGGATTGGTTTTTGTTGAGTCACGCGACCACTTAGC-5'

El triplete de bases subrayado corresponde al codón del aminoácido reemplazado y la letra que aparece en “negrita” corresponde a la base sustituida. Los partidores para D256 fueron sintetizados por Keystone Labs (Camarillo, CA, USA) a través de Biosonda (Chile) y los partidores para E190 fueron sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) a través de Bios Chile (Chile).

4. Reactivos

Las enzimas aldolasa, triosa fosfato isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa, el NADH, los estándares de peso molecular para electroforesis en geles de poliacrilamida y los sustratos, fructosa-6-P y ATP, fueron adquiridos en SIGMA Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

MÉTODOS

1. Medios de Cultivo

1.1 *Luria Bertani (LB)*

Se adicionó 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura sobre 900 ml de H₂O desionizada. El pH se ajustó con NaOH a 7,0 antes de aforar a 1 l y esterilizar.

1.2 *NZY⁺*

Se adicionó 10 g de casaminoácidos, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl sobre 900 ml de H₂O desionizada. El pH se ajustó con NaOH a 7,5 antes de aforar a 1 l y esterilizar. Previo a su uso, se agregó 12,5 ml de MgCl₂ 1 M, 12,5 ml de MgSO₄ 1 M y 10 ml de glucosa 2 M.

2. Mutagénesis sitio específica

Para las mutaciones sitio-específicas se utilizó el sistema QuickChange[®] de Stratagene (La Joya, CA, USA). El procedimiento básico utiliza como plantilla el plásmido de doble hebra que contiene el gen silvestre de Pfk-2 y como partidores dos oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación deseada. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 µl. La mezcla de reacción contenía 5 µl de Quickchange Multi reaction buffer 10X, 10 ng de plásmido, 125 ng de ambos oligonucleótidos mutagénicos, 1 µl de la mezcla de deoxinucleótidos y 2,5 U de la enzima *PfuTurbo*[®] DNA polimerasa de Stratagene (La Joya, CA, USA). Las reacciones se realizaron en un termociclador TGradient de Biometra[®] (Goettingen, Germany). Para la amplificación del plásmido mutante se usó un protocolo que

consistía de 30 ciclos de 95° C por 1 min (desnaturación), 56° C por 1 min (alineación) y 68° C por 14 min (extensión). Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

La DNA polimerasa *PfuTurbo*[®] extiende e incorpora los oligonucleótidos mutagénicos generando un plásmido mutado que contiene un corte en cada hebra. El producto de amplificación es tratado directamente con 10 U de la endonucleasa *Dpn I* y luego se incubó a 37° C por una hora. La *Dpn I* degrada el plásmido parental metilado no mutado.

Se utilizó 1 µl del DNA tratado con *Dpn I* para transformar 50 µl de bacterias XL1-Blue (suministradas en el kit) que reparan los cortes. La mezcla se incubó por 30 min en hielo, se sometió a un pulso de calor de 42° C por 45 s y después se dejó en hielo por 2 min. Se agregó 0,5 ml de medio NZY+ precalentado a 42° C y se incubó a 37° C por una hora con agitación a 250 rpm. Finalmente, se sembró 100 µl de la reacción de transformación sobre placas de agar que contenían el antibiótico apropiado.

2.1 Preparación de células competentes

Un pre-inóculo de la bacteria receptora BL21(DE3) para la enzima silvestre y DF1020 para las enzimas mutantes, se incubó durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente se inoculó 50 ml de medio LB con 250 µl del pre-inóculo y se incubó a 37° C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,3 a 550 nm. Seguidamente se incubó en hielo por 10 min y después se centrifugó a 5.000 rpm a 4° C por 10 min en una centrifuga Sorvall usando el rotor SS34. El sedimento de bacterias fue resuspendido en 25 ml de una solución de CaCl₂ 0,1 M estéril y fría (en hielo). La

suspensión se incubó en hielo por 30 min y después se centrifugó a 5.000 rpm a 4° C por 10 min. El sedimento se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ 0,1 M estéril y fría y se incubó por 4 h antes de la transformación.

2.2 Transformación por shock térmico

A 100 µl de células competentes se agregó 1 µl de una solución de DNA plasmidial y se incubó en hielo por 30 min, para permitir que el DNA se adhiriera a las bacterias. Seguidamente, la mezcla fue sometida a un *shock* de temperatura a 42° C por 40 s y después se incubó en hielo por 1 min. Después se agregamos 400 µl de medio LB tibio (37° C) y se incubó a 37° C con agitación por 1 h para la recuperación de las bacterias. Finalmente se sembró 100 µl de células en placas que contenían el antibiótico apropiado, dependiendo del plásmido utilizado para la transformación. Las placas fueron incubadas a 37° C hasta la aparición de colonias.

3. Purificación del DNA plasmidial en escala pequeña

El DNA plasmidial de los clones recombinantes se purificó mediante el uso del kit E.Z.N.A[®] Plasmid Miniprep Kit I de Omega Bio-Tek (Doraville, GA, USA).

4. Secuenciación de las mutantes

La secuencia de nucleótidos para cada mutante fue determinada en el Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, mediante el método “dideoxi” de Sanger utilizando ddNTPs que tienen un fluoróforo unido, el cual es detectado por un secuenciador de fluorescencia automatizado y analizado por geles de poliacrilamida mediante electroforesis capilar.

5. Sobreexpresión de Pfk-2 silvestre y las proteínas mutantes

5.1 Caso de la Pfk-2 silvestre

Para obtener bacterias en fase exponencial, se inoculó 20 ml de LB con una colonia de la cepa BL21(DE3) transformada con el plásmido pET 21-d que contiene el clon de Pfk-2 silvestre, el medio contenía ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y se incubó durante toda la noche a 37° C (~14h). Al día siguiente se inoculó al 1% 2 l de medio LB + 100 µg/ml de ampicilina con el cultivo anterior y se incubó a 37° C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,5 a 580 nm. Para inducir la expresión de la Pfk-2 se adicionó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se continuó la incubación a 37° C por 4 h. Las bacterias inducidas se colectaron por centrifugación a 5.000 rpm por 10 min en una centrífuga Sorvall RC-5 usando un rotor GSA.

5.2 Caso de las proteínas mutantes

Se utilizó la cepa DF1020 co-transformada con los plásmidos pGP1-2 y pET 21-d con el gen mutante clonado, por lo que el pre-inóculo y el cultivo de 2 l mencionados arriba, fueron incubados a 30° C y las cepas transformantes seleccionadas con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (75 µg/ml) en el medio LB. Para la sobreexpresión de la proteína mutante el cultivo se incubó a 30° C hasta una absorbancia de 0,4 a 580 nm y luego se indujo la polimerasa T7 (que está bajo el control de un promotor termosensible) incubando a 42° C por 20 min. Luego, el cultivo se transfirió a 37° C por 4 h. Las bacterias se colectaron como se indicó anteriormente.

6. Purificación de la Pfk-2 silvestre y las proteínas mutantes

Las bacterias inducidas, colectadas por centrifugación, fueron resuspendidas en 100 ml de amortiguador de pH fosfato de potasio 20 mM pH 7,0, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 29 mM y glicerol 5% (amortiguador de pH A). La suspensión de bacterias fue lisada en un sonicador Sonifier modelo W185 (Heat Systems-Ultrasonics, INC. – Plainview, NY, USA), mediante la aplicación de pulsos de 30 s de ultrasonido (potencia 100 Watts) y 30 s de incubación en hielo. El lisado de bacterias se centrifugó en una centrífuga Beckman modelo L5-50B durante 30 min a 35.000 rpm, usando un rotor Ti50.2 a 4° C. El líquido sobrenadante se aplicó sobre una columna de hidroxilapatita (30 mm x 150 mm) equilibrada en amortiguador de pH A y después la columna se lavó con 300 ml del mismo amortiguador de pH. La Pfk-2 se eluyó con 600 ml de un gradiente lineal de 20 a 150 mM de concentración de fosfato de potasio en amortiguador de pH A.

Las fracciones con actividad fosfofructoquinasa fueron concentradas mediante ultrafiltración hasta un volumen final de 30 ml mediante el uso de una membrana Amicon PM10 (Beverly, MA, USA). La enzima concentrada se dializó contra amortiguador de pH Tris-HCl 20 mM pH 7,6, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 29 mM y glicerol 5% (amortiguador de pH B). El dializado se aplicó sobre una columna de azul de cibacron-sefarosa equilibrada en amortiguador de pH B. Después de lavar la columna con 150 ml de amortiguador de pH B y luego con 200 ml de amortiguador de pH B + KCl 100 mM, la enzima se recuperó de la columna lavando con ~100 ml de amortiguador de pH B + KCl 100 mM y ATP 1mM. El conjunto de las

fracciones con actividad fosfofructoquinasa fue dializado contra amortiguador de pH B y re-cromatografiado en una columna de azul de cibacron-sefarosa, los lavados y la recuperación de enzima se repite de la manera descrita anteriormente. La actividad específica de la enzima silvestre pura fue de aproximadamente 100 U/mg. La preparación enzimática se guardó en glicerol 50% a -20° C, condiciones en las cuales la actividad enzimática permanece estable por varios meses. El rendimiento fue de aproximadamente 10-15 mg de enzima por 1 l de cultivo original.

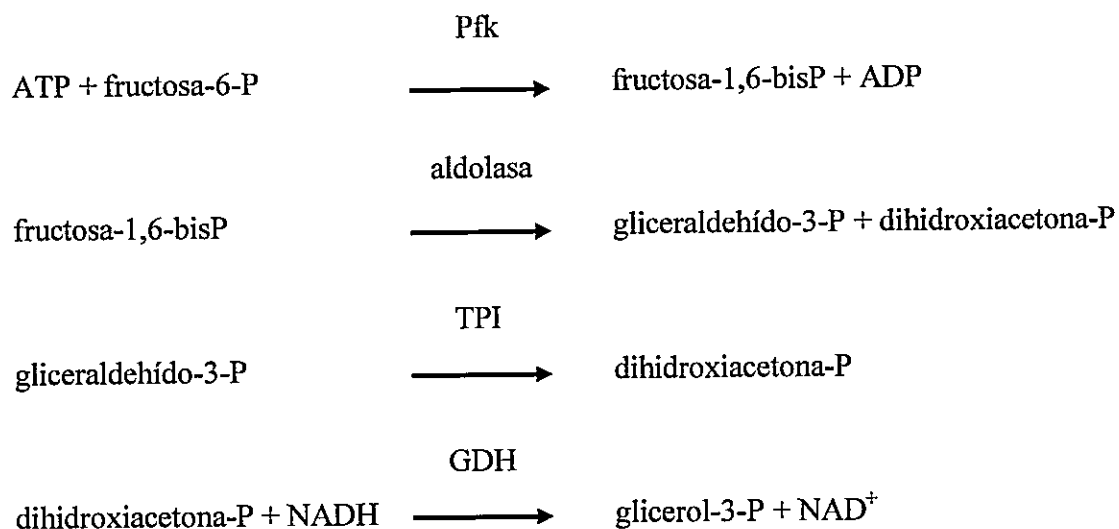
Previo a la realización de cada experimento, a la proteína purificada se le removió el glicerol, y otros componentes del amortiguador de pH mediante filtración molecular en el sistema HiTrap™ Desalting Column de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) equilibrado en el amortiguador de pH apropiado para el experimento.

Para la purificación de las enzimas mutantes, se usó el protocolo descrito para la enzima nativa, excepto que el proceso de la purificación fue seguido detectando la presencia de la proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida usando el método de Laemmli (1970), ya que su actividad enzimática era muy baja o despreciable. El grado de pureza obtenido para la enzima silvestre y las mutantes, determinado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes, fue superior a un 95%.

7. Determinación de la actividad enzimática de la Pfk-2

La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente a 25° C, acoplando la producción de fructosa-1,6-bisP a la oxidación de NADH, mediante el uso

de las enzimas auxiliares aldolasa, triosafosfato isomerasa (TPI) y α -glicerofosfato deshidrogenasa (GDH), según el esquema que se indica a continuación:



La cuantificación de fructosa-1,6-bisP se realizó midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH y calculando el número de μ moles de este compuesto, usando un coeficiente de extinción molar de $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kornberg y Pricer, 1953). La mezcla de reacción contenía amortiguador de pH Tris-HCl 100 mM pH 8,2, NADH 0,2 mM, y una mezcla de 40 μ g de aldolasa, 3 μ g de triosafosfato isomerasa y 30 μ g de α -glicerofosfato deshidrogenasa, en un volumen final de 0,7 ml. En los experimentos cinéticos, las concentraciones de fructosa-6-P, ATP y Mg^{+2} se variaron según se indica. La reacción se inició mediante la adición de enzima en cantidad suficiente para obtener una velocidad aproximada de consumo de 6 nmoles de NADH por minuto. Una unidad de enzima (U) se define como la cantidad que cataliza la formación de 1 μ moles de producto por minuto en condiciones experimentales definidas.

8. Mediciones de fluorescencia intrínseca

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro Perkin-Elmer LS 50. La longitud de onda para excitar al residuo triptofano fue de 295 nm y se colectaron espectros de emisión entre 300 y 500 nm, usando aperturas de excitación y emisión de 5 nm. A cada espectro se le substrajo el registro del amortiguador de pH en ausencia de proteína. Todas las mediciones se realizaron a 20° C. Los experimentos de titulación de iones Mg^{+2} fueron realizados adicionando pequeñas cantidades de soluciones stock de Mg^{+2} sobre la solución que contenía la enzima, corrigiendo después por el factor de dilución de la proteína. Los experimentos fueron realizados en amortiguador de pH Tris-HCl 50 mM pH 8,2 y DTT 5 mM y la concentración de proteína fue de 100 μ g/ml. El análisis de los datos fue realizado usando el programa Grams/386[®] de Galactic industries Corp (Main Street Salem, NH, USA).

La saturación fraccional de la unión de Mg^{+2} fue determinada a partir de la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de ligando adicionada mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$(F^0 - F) / (F^0 - F^\infty)$$

donde F^0 representa la intensidad de emisión en ausencia del ligando, F^∞ representa la intensidad de emisión a concentración saturante de ligando y F es la intensidad obtenida después de la adición de una cierta concentración de ligando.

9. Mediciones de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron determinados en un espectropolarímetro JASCO J-715. Se midió en la zona UV-lejano usando una celda

con 1 mm de paso óptico. Las muestras contenían amortiguador de pH Tris-HCl 25 mM, pH 8.2, MgCl₂ 5 mM, DTT 2 mM y una concentración de proteína de 250 µg/ml. Los espectros son el promedio de 16 barridos, para eliminar el ruido de la señal. Los datos son representados en términos de la elipticidad observada, en unidades de miligrados.

10. Cromatografía de exclusión molecular

Los experimentos se realizaron en una columna de filtración en gel Bio-Sil® SEC 250 de BioRad (Hercules, CA, USA) con dimensiones de 300 mm x 7.8 mm, usando un sistema de HPLC Waters 1525 con bombas binarias. La fase líquida móvil contenía Tris-HCl 25 mM pH 7,5, DTT, 2 mM, KCl 0,2 M en la presencia de 1 mM o 30 mM MgCl₂, a la concentración de MgATP indicadas. Se aplicó volúmenes de muestra de 50 µl con un flujo de 0.8 ml/min, a una concentración de proteína de 0.5 mg/ml. La absorbancia del líquido de lavado se registró continuamente a 280 y 260 nm con un detector de absorbancia dual Waters 2487. La columna fue calibrada con los siguientes marcadores moleculares: Vitamina B-12 (1,35 kDa, 8,5 Å R_s), mioglobina de caballo (17 kDa, 19 Å R_s), ovoalbúmina de pollo (44 kDa, 30,5 Å R_s), gamma globulina de bobino (158 kDa, 41,8 Å R_s) y tiroglobulina de bobino (670 kDa, 85 Å R_s). Los datos fueron analizados con el programa GRAMS/386®. Los estándares de calibración de peso molecular fueron adquiridos en BioRad (Hercules, CA, USA).

11. Dispersión dinámica de luz

11.1 Colección de datos

Se utilizó el aparato de DLS DynaPro MSTC014 (Protein Solutions Inc.) equipado con un generador de rayos láser (774,7 nm) y un auto-correlacionador de 248 canales con esquema *multi- τ* , con un tiempo mínimo de retraso de 0,48 μ s. El aparato utiliza una cubeta de cuarzo de 12 μ l para la muestra con un sistema de control de temperatura. La luz dispersada por la muestra a un ángulo de 90° es guiada por fibra óptica hacia un detector de fotones, tipo foto-diodo de “avalancha” (*avalanche photo diode*, APD).

Para encontrar la función de auto-correlación, se multiplica dos señales provenientes del APD con un tiempo de retraso, t , entre ellas y esta operación se repite a lo largo del tiempo de adquisición de datos, promediando los valores obtenidos. La función de auto-correlación corresponde al promedio de la multiplicación de dos señales en función del tiempo de retraso entre ellas. Se usó tiempos de retraso discretos, escogidos con un espaciamiento exponencial debido a la naturaleza de la información contenida en la señal. Los datos en la función se normalizan por el valor obtenido para la cuenta de fotones en el estado estacionario (denominado línea base), es decir, para tiempos de retraso muy grandes, cuando la correlación es mínima. La curva resultante corresponde a un decaimiento exponencial, cuya constante de tiempo es inversamente proporcional a D , el coeficiente de difusión de la partícula en solución, que está relacionado al radio hidrodinámico (R_H) según la ecuación de Stokes-Einstein:

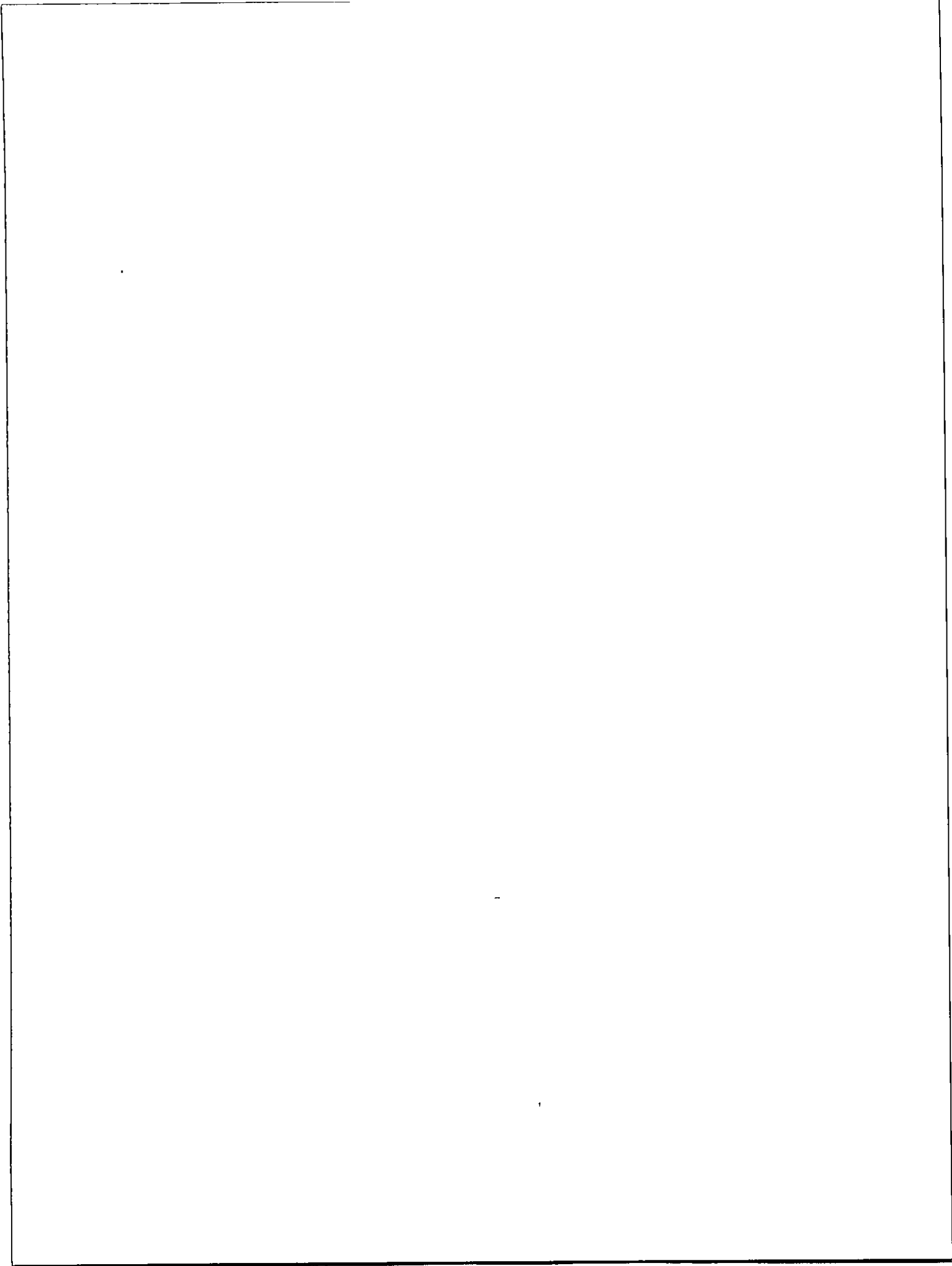
$$D = k_B T / 6\pi\eta R_H$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta en Kelvin y η es la viscosidad del solvente.

Las soluciones de Pfk-2 fueron preparadas en soluciones filtradas de amortiguador de pH Tris-HCl 50 mM pH 8,0, $MgCl_2$ 5 mM y DTT 2 mM a diferentes concentraciones de proteína según se especifica en cada caso. Se centrifugó un volumen de muestra de entre 50 y 100 μ l por 30 min a 13.600 x g previo a cada medición. Todas las mediciones fueron realizadas a 25° C.

11.2 *Procesamiento de datos*

Para cada muestra registramos 18 medidas de coeficiente de correlación con un tiempo de adquisición total de 5 s, por triplicado. Los datos fueron analizados mediante el algoritmo de regularización del programa DYNAMICS TM v.5.26.39 (Protein solutions Inc.). Este algoritmo invierte la función de correlación para encontrar el mejor ajuste de distribución de tamaños que resultan de la curva de auto-correlación observada. Los R_H son observados como picos en un histograma de regularización, con su porcentaje correspondiente respecto a la intensidad total. Para cada medida se obtiene también el promedio de fotones totales dispersados.



RESULTADOS

1. Mutagénesis sitio dirigida

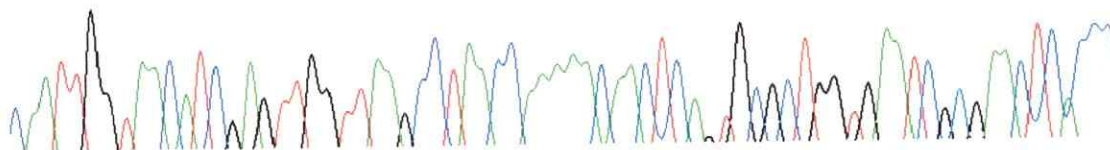
Para evaluar la importancia de los residuos D256 y E190 en la Pfk-2 de *E. coli* se construyeron las mutantes puntuales en las que el carboxilato correspondiente fue reemplazado por un grupo amida. Estas mutaciones cumplen el propósito de eliminar la carga sin afectar las dimensiones de la cadena lateral. Para esto, se utilizó el sistema Quickchange de Stratagene (ver métodos), que requiere del diseño de partidores sintéticos que contengan la mutación deseada. El plásmido pET 21-d que contiene el gen mutante se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* DF1020, a partir de la cual se purificó el plásmido para determinar la secuencia de nucleótidos de cada mutante. En la figura 4 podemos observar la secuencia de nucleótidos de la Pfk-2 silvestre y las mutaciones propuestas. Los resultados de la secuenciación obtenidos con el método de secuenciación automática de Sanger mediante fluorescencia (ver métodos), fueron analizados mediante el programa Chromas Lite v 2.01. Se muestra la comparación de las secuencias de los genes mutantes Pfk-2 D256N, Pfk-2 E190Q y del gen silvestre, lo cual nos permite confirmar las mutaciones nucleotídicas que resultan en el reemplazo de los residuos ácido glutámico 190 y ácido aspártico 256, por glutamina y asparragina, respectivamente.

ácido glutámico 190 por glutamina:

Pfk-2 silvestre 5'-GGTTAAGCCTAACCAAAAAGAACTCAGTGCGCTGGTGAA-3'

Pfk-2 E190Q 5'-GGTTAAGCCTAACCAAAACAAACTCAGTGCGCTGGTGAA-3'

C A A T T G G T A A C A T C G A G T T G G T T A A G C C T A A C C A A A A A C A A C T C A G T G C G C T G G T G A A T C G C G A A C T C A C C C



ácido aspártico 256 por asparragina:

Pfk-2 silvestre 5'-ACCGTTGGCGCTGGTGACAGCATGGTTCGGCGCG-3'

Pfk-2 D256N 5'-ACCGTTGGCGCTGGTTAACAGCATGGTTCGGCGCG-3'

; G T G A A A A G C C A G A G T A C C G T T G G C G C T G G T A A C A G C A T G G T C G G C G C G A T G A C C C T G A A A C T G G C A N A A

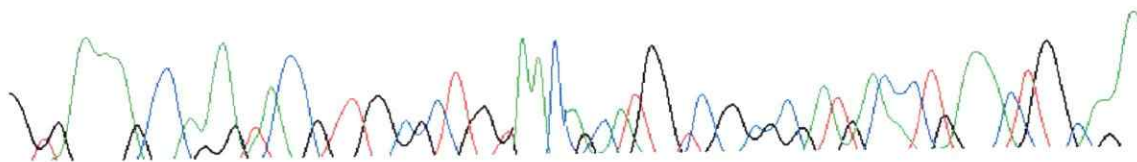


Figura 4. Secuencia de nucleótidos del DNA de Pfk-2 silvestre y de las mutantes propuestas. El triplete subrayado es el codón donde se inserta la mutación. Se destaca en negro el cambio de base propuesto. Se muestran las mutaciones; ácido aspártico por asparragina; ácido glutámico por glutamina. En colores se muestra la señal para cada nucleótido obtenida de la secuenciación con el programa Chromas Lite v 2.01.

2. Expresión y purificación de las proteínas mutantes Pfk-2 D256N, Pfk-2 E190Q y Pfk-2 silvestre.

La cepa DF1020 de *E. coli* presenta no produce fosfofructoquinasas endógenas. El sistema de expresión utilizado para la producción de las enzimas mutantes consiste en una cotransformación de esta cepa con los plásmidos pET-21d (que contiene el gen mutante de Pfk-2) y pGP1-2 (que contiene el gen de la RNA polimerasa del fago T7, inducible por temperatura).

La expresión de las proteínas mutantes a distintos tiempos de cultivo post inducción, se cuantificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, teñidos con azul de Coomasie. En este ensayo se determinó el tiempo óptimo para la expresión de la proteína mutante Pfk-2 E190Q, el que fue de 6 h (figura 5). La cinética de inducción para la proteína mutante Pfk-2 D256N fue semejante a la de la mutante Pfk-2 E190Q, por lo que se usó el mismo tiempo de expresión (6 h). Las enzimas mutantes fueron purificadas a homogeneidad de acuerdo al protocolo usado para Pfk-2 silvestre (ver métodos), excepto que la presencia y el porcentaje de pureza de las enzimas fue determinada por SDS-PAGE (figuras 6-8). La tabla 1 a 3, resume las etapas de la purificación de las enzimas mutantes y de la enzima silvestre.

Para las enzimas mutantes Pfk-2 E190Q y Pfk-2 D256N, se obtuvo un 63 y un 42% de rendimiento con una actividad específica de 1.4 y 0.0063 U/mg respectivamente. Para la enzima silvestre se obtuvo un 47% de rendimiento con una actividad específica de 114 U/mg.

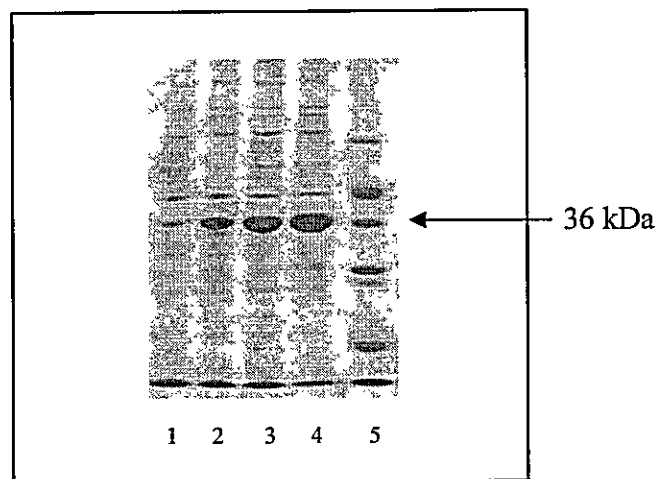


Figura 5. Cinética de inducción de la proteína mutante Pfk-2 E190Q. Para determinar el tiempo óptimo de expresión se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalantes de muestras de extracto crudo de bacterias transformadas, inducidas a distintos tiempos. Los tiempos de inducción corresponden a carril 1: 0h; carril 2: 2h; carril 3: 4h; carril 4: 6h; carril 7: marcadores de peso molecular.

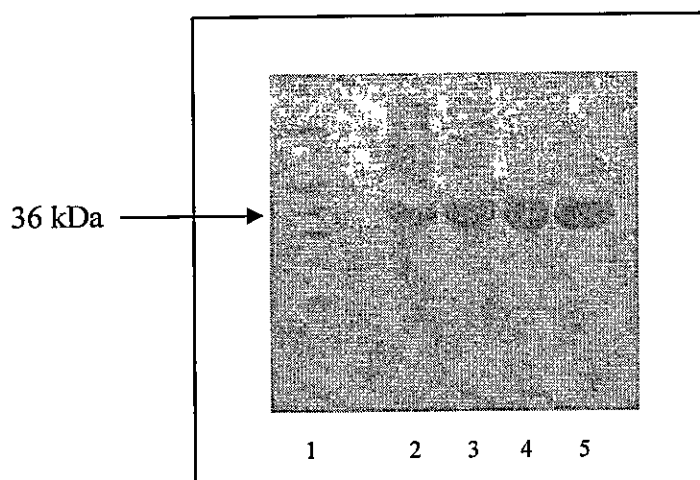


Figura 6. Purificación de Pfk-2 E190Q. Electroforesis en condiciones desnaturalantes de las diferentes etapas de la purificación de la enzima mutante. (1) marcadores de peso molecular; (2) extracto crudo; (3) hidroxilapatita; (4) azul de cibacron; (5) Re-cromatografía en azul de cibacron, ésta corresponde a la enzima homogénea.

Tabla 1
Purificación de Pfk-2 E190Q.

Fracción	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	80	211	0,4	100
Hidroxilapatita	104	103	1,0	130*
Azul de cibacron	56	30	1,9	70
Azul de cibacron	51	21	2,4	63

*Rendimiento mayor al 100% indica posible presencia de inhibidores en el extracto crudo.

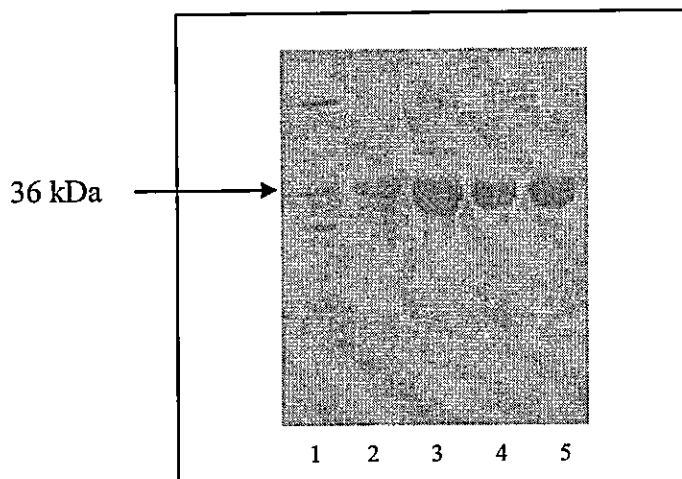


Figura 7. Purificación de Pfk-2 D256N. Electroforesis en condiciones desnaturalantes de las diferentes etapas de la purificación de la enzima mutante. (1) marcadores de peso molecular; (2) extracto crudo; (3) hidroxilapatita; (4) azul de cibacron; (5) Re-cromatografía en azul de cibacron, ésta corresponde a la enzima homogénea.

Tabla 2
Purificación de Pfk-2 D256N.

Fracción	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	0,5	210	0,0026	100
Hidroxilapatita	0,7	121	0,0055	124*
Azul de cibacron	0,3	43	0,0059	47
Azul de cibacron	0.2	36	0,0063	42

*Rendimiento mayor al 100% indica posible presencia de inhibidores en el extracto crudo.

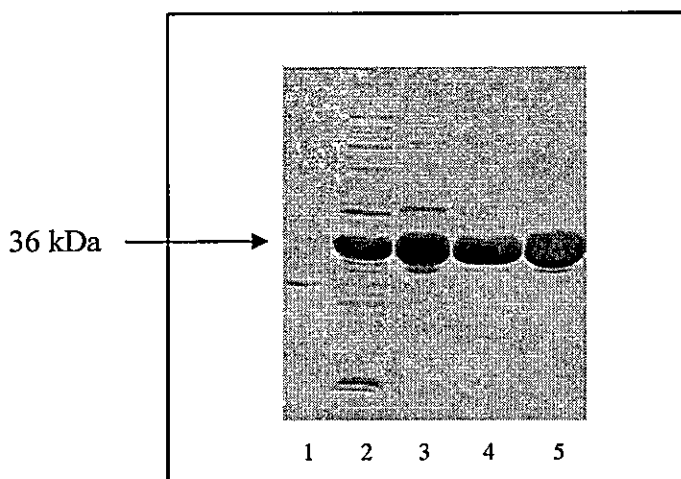


Figura 8. Purificación de Pfk-2 silvestre. Electroforesis en condiciones desnaturalantes de las diferentes etapas de la purificación de la enzima silvestre. (1) marcadores de peso molecular; (2) extracto crudo; (3) hidroxilapatita; (4) azul de cibacron; (5) Re-cromatografía en azul de cibacron, ésta corresponde a la enzima homogénea.

Tabla 3
Purificación de Pfk-2 silvestre.

Fracción	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	20.200	293	69	100
Hidroxilapatita	17.800	221	81	82
Azul de cibacron	11.300	106	107	52
Azul de cibacron	9.600	84	114	44

Con el propósito de determinar el posible efecto de las mutaciones sobre la estructura secundaria de la enzima, realizamos estudios de dicroísmo circular para la enzima silvestre y enzimas mutantes, a una misma concentración de proteína. Esta técnica es sensible al contenido de estructura secundaria debido a que estos motivos estructurales absorben luz circularmente polarizada y generan una señal de dicroísmo entre los 190 y 200 nm. El espectro de dicroísmo (figura 9) obtenido para las enzimas mutantes es prácticamente indistinguible del espectro de la enzima silvestre, lo cual nos indica que el impacto de las mutaciones es poco significativo a nivel de los cambios en el contenido de estructura secundaria de las enzimas.

3. Caracterización de la mutante Pfk-2 D256N.

El efecto de la mutación del ácido aspártico 256 por asparragina sobre los parámetros cinéticos k_{cat} y K_M aparentes para los sustratos, se presenta en la tabla 4. La enzima silvestre presenta una constante catalítica que es 15.000 veces mayor a la de la enzima mutante, resultado consecuente con la función propuesta para este ácido aspártico como residuo catalítico. La K_M aparente para MgATP no es significativamente diferente entre las enzimas silvestre y mutante, mientras que la K_M aparente para fructosa-6-P aumenta tres veces. Este incremento en la K_M para fructosa-6-P puede explicarse tomando en cuenta lo observado en la estructura cristalográfica de la riboquinasa, donde el ácido aspártico homólogo se encuentra formando un puente de hidrógeno con el hidroxilo que será fosforilado en la ribosa. Esto indica que este aminoácido no sólo es determinante para la catálisis, sino que además interactúa con el sustrato a ser fosforilado en el sitio activo de la enzima.

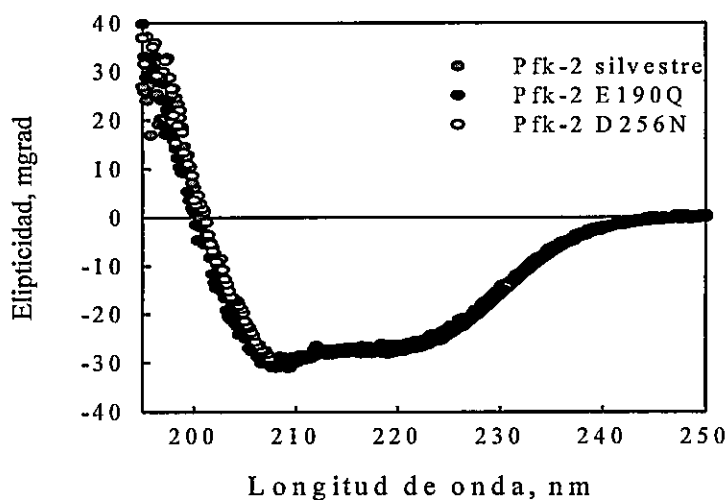


Figura 9. Espectros de dicroísmo circular de la Pfk-2 silvestre y de las mutantes Pfk-2 E190Q y Pfk-2 D256N. La concentración de proteína usada fue de 250 $\mu\text{g/ml}$ para la Pfk-2 y las mutantes. Se grafica la elipticidad observada en miligrados en función de la longitud de onda.

Tabla 4
Parámetros cinéticos de Pfk-2 D256N

Al ensayar la actividad vs. fructosa-6-P, el MgATP se mantuvo constante a 1 y 2 mM, para la enzima silvestre y la mutante Pfk-2 D256N respectivamente; la actividad vs. MgATP se ensayó con una concentración constante de fructosa-6-P 1 mM, en ambas enzimas.

	Pfk-2 D256N	Pfk-2
$k_{\text{cat}}, \text{s}^{-1}$	0,0028 \pm 0,0007	53 \pm 2,4
$K_M \text{ MgATP}, \mu\text{M}$	29 \pm 6	20 \pm 2,3
$K_M \text{ fructosa-6-P}, \mu\text{M}$	96 \pm 2	28 \pm 3,3

Es necesario tomar en cuenta que debido a la baja constante catalítica se debía utilizar una alta concentración de enzima en la cubeta por ensayo (105 μg), lo que implica un gran requerimiento de la cantidad de esta enzima para los ensayos cinéticos.

La enzima silvestre presenta inhibición por MgATP cuando el experimento se realiza a bajas concentraciones de fructosa-6-P, por lo que decidimos determinar si la mutación por asparragina tenía algún efecto sobre la regulación alostérica (Guixé y col, 1998). En la figura 10 se puede observar que el complejo metal-nucleótido produce en la mutante Pfk-2 D256N una disminución de la actividad enzimática a concentraciones milimolares. Este efecto inhibitorio es atenuado a altas concentraciones de Mg^{+2} libre o a concentraciones de fructosa-6-P mayores que 1mM. Por su parte, la tetramerización inducida por la unión de MgATP al sitio alostérico de la enzima no se ve afectada en la enzima mutante, como se determinó mediante experimentos de dispersión dinámica de luz (figura 11). Este método es sensible a los cambios en el radio hidrodinámico de las proteínas, es decir, da cuenta de cambios en el tamaño y la forma de las proteínas. Esta técnica registra la variación en el tiempo de la intensidad de fotones dispersados por una muestra en solución, la cual contiene información acerca del coeficiente de difusión de la partícula observada. Esta información se obtiene mediante el análisis estadístico denominado “función de auto-correlación” (materiales y métodos). Para ambas enzimas, silvestre y mutante, se observa una transición sigmoidea en el R_H en respuesta al incremento de la concentración de MgATP. La enzima nativa presenta una $K_{0.5}$ de 46 μM MgATP y un coeficiente de Hill de 3,5 (Cabrera, 2004), mientras que la mutante Pfk-2 D256N muestra una $K_{0.5}$ de 55 μM de MgATP y un coeficiente de Hill de 3,1.

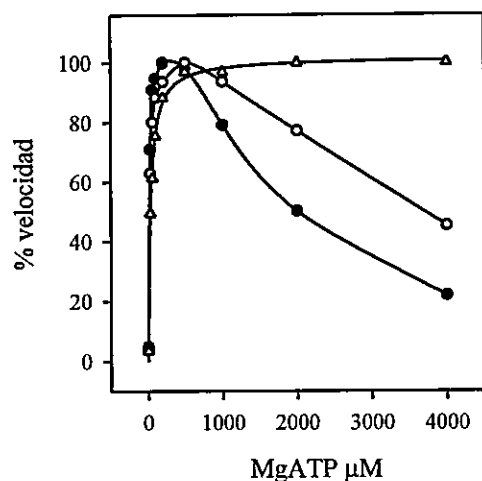


Figura 10. Actividad de Pfk-2 D256N en función de la concentración de MgATP. El ensayo se realizó a distintas concentraciones de Mg^{+2} libre y fructosa-6-P: Mg^{+2} libre 1 mM y fructosa-6-P 0,1 mM (●); Mg^{+2} libre 30 mM y fructosa-6-P 0,1 mM (○); Mg^{+2} libre 30 mM y fructosa-6-P 1 mM (▲).

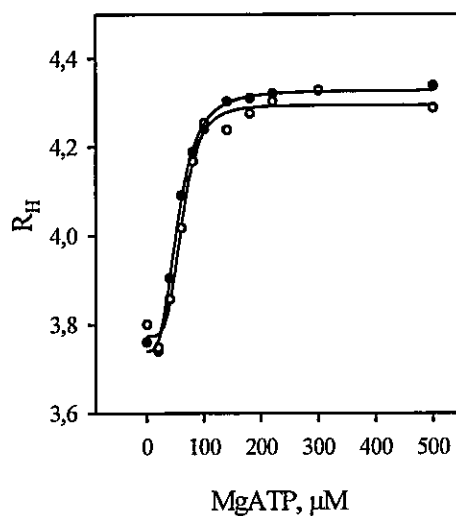


Figura 11. Tetramerización inducida por MgATP para Pfk-2 y Pfk-2 D256N. El efecto de la concentración de MgATP sobre la tetramerización de ambas enzimas se determinó mediante dispersión dinámica de luz. Los datos muestran el radio hidrodinámico (R_H) en función de la concentración de MgATP a una misma concentración de proteína, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, para ambas enzimas. Las curvas representan el ajuste a la ecuación de Hill, para el cual se obtuvo una $K_{0,5}$ de 55 μM y un n_h de 3,1 en la enzima mutante (●), y una $K_{0,5}$ de 46 μM y un n_h de 3,5 en la enzima silvestre (○).

Esto indica que la mutación no tiene efecto sobre la tetramerización, por lo que se infiere que la alteración funcional queda circunscrita al sitio activo.

4. Caracterización de la mutante Pfk-2 E190Q.

4.1. Efecto del Mg^{+2} sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q.

El efecto de la mutación del residuo ácido glutámico del motivo NXXE por glutamina sobre la k_{cat} , se presenta en la tabla 5. A una concentración de Mg^{+2} libre de 1 mM, la enzima silvestre tiene una k_{cat} 400 veces mayor a la de la enzima mutante. Además, la k_{cat} de la enzima mutante aumenta 10 veces al subir la concentración de iones Mg^{+2} libre de 1 a 30 mM (ion Mg^{+2} extra al que viene formando complejo con el ATP^{-4}). Esto demuestra que la k_{cat} de la mutante Pfk-2 E190Q es dependiente de la concentración de iones Mg^{+2} libre. La figura 12 muestra la velocidad de reacción en función de la concentración de Mg^{+2} libre, a condiciones saturantes de ambos sustratos. Para la enzima silvestre, la velocidad es independiente de la concentración de Mg^{+2} libre, en el intervalo de concentración estudiado, mientras que para la mutante Pfk-2 E190Q, la velocidad muestra una dependencia hiperbólica con una constante de activación para Mg^{+2} libre de 10 mM. Sin embargo, es necesario considerar dos puntos al interpretar este tipo de experimentos cinéticos. Primero, experimentalmente no se puede lograr la combinación de 1 mM de $MgATP$ y cero Mg^{+2} libre en la cubeta de ensayo. Segundo, cuando se trata de ensayar la velocidad de reacción a concentraciones bajas de Mg^{+2} libre, la concentración de la especie aniónica del nucleótido aumenta en la solución, y ha sido demostrado que ATP^{-4} es un inhibidor competitivo de Pfk-2 (Guixé y Babul, 1985) y de otras quinasas (Morrison, 1979).

Tabla 5

Influencia de la concentración de Mg^{+2} libre sobre la k_{cat} de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q.
 La actividad se ensayó a concentraciones saturantes de ambos sustratos; fructosa-6-P 1 mM, MgATP 1 mM para la enzima silvestre y fructosa-6-P 1 mM, MgATP 2 mM para la mutante Pfk-2 E190Q.

	Pfk-2 silvestre		Pfk-2 E190Q	
	Mg^{+2} 1mM	Mg^{+2} 30mM	Mg^{+2} 1mM	Mg^{+2} 30mM
k_{cat} , s^{-1}	$53 \pm 2,4$	$53 \pm 2,4$	$0,14 \pm 0,04$	$1,43 \pm 0,3$

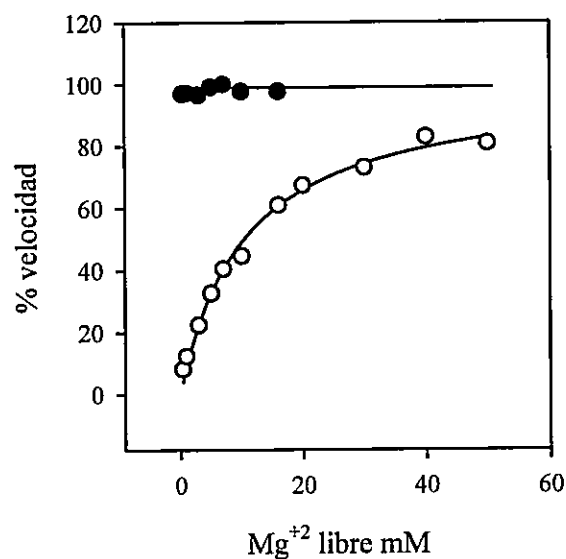


Figura 12. Dependencia de la velocidad máxima de la enzima silvestre y la mutante Pfk-2 E190Q en función de la concentración de Mg^{+2} libre. Este ensayo fue realizado a concentraciones saturantes de ambos sustratos: fructosa-6-P 1 mM, MgATP 1 mM para la enzima silvestre (●) y fructosa-6-P 1 mM y MgATP 2 mM para la enzima mutante E190Q (○), la cual tiene una constante de activación de 10 mM para el catión divalente.

Por lo tanto, nuestros experimentos fueron diseñados con la intención de obtener la menor concentración de iones Mg^{+2} libre que permitiera descartar el efecto inhibitorio que provoca ATP^{-4} en la actividad de Pfk-2, cálculo que se puede observar en la tabla 6.

La clasificación del ion Mg^{+2} libre como un activador esencial o no esencial depende de si la reacción puede proceder o no en su ausencia. Considerando que la actividad de Pfk-2 E190Q disminuye al disminuir la concentración de iones Mg^{+2} libre, y que la tendencia de esta cinética se aproxima a cero actividad cuando la concentración de Mg^{+2} libre se aproxima a cero (figura 12), nosotros inferimos que el catión divalente en exceso al que forma complejo con el ATP^{-4} es necesario para la activación de la enzima mutante Pfk-2 E190Q. Al ajustar los datos cinéticos a funciones hiperbólicas con dos o tres parámetros, se observan diferencias no significativas en las distribuciones residuales y r^2 , lo cual indica que la actividad residual a cero Mg^{+2} libre, suponiendo que hubiera alguna, no sería mayor al 5-6% en el caso de la enzima mutante. Por consiguiente, aunque no podamos descartar la posibilidad de una activación no esencial por Mg^{+2} , este resultado sugiere que otro ion Mg^{+2} diferente del que forma complejo con el ATP^{-4} , es requerido en el sitio activo de la enzima para su actividad máxima. En la enzima silvestre no se detecta este efecto activador por iones Mg^{+2} . Una explicación posible para esta observación, es que la enzima silvestre tiene una baja constante de disociación para este Mg^{+2} y debido a las restricciones experimentales mencionadas anteriormente (tabla 6), no podemos observar efecto alguno. Así, con el propósito de evaluar la constante de unión para Mg^{+2} en la enzima silvestre, realizamos experimentos de fluorescencia intrínseca (figura 13), donde se determinó el cambio en la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de Mg^{+2} .

Tabla 6
Cálculo de las concentraciones de las especies presentes en los ensayos de velocidad en función de Mg^{+2} libre.

El cálculo de la concentración de cada especie presente en el ensayo se realizó con el programa Gepasi v 3.3, utilizando cinética de acción de masas reversible con una constante de $17.000 M^{-1}$ (Guixé y Babul, 1985). i, concentraciones de especies al inicio; ss, concentraciones de especies en equilibrio.

$[ATP^{4-}]_i$ mM	$[Mg^{+2}]_i$ mM	$[MgATP^{2-}]_{ss}$ mM	$[ATP^{4-}]_{ss}$ mM	$[Mg^{+2}]_{ss}$ mM
1	1,2	0,855	0,145	0,345

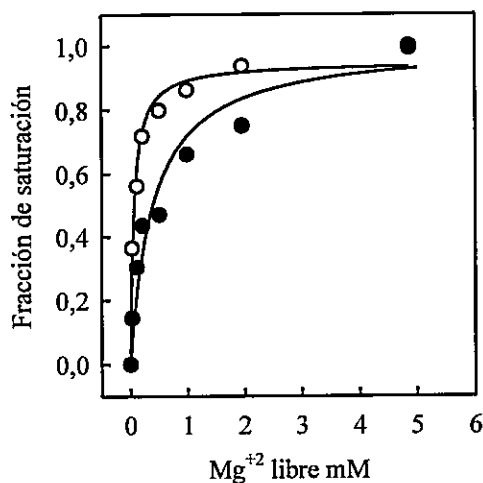


Figura 13. Unión de iones Mg^{+2} a Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q. La unión de Mg^{+2} en ambas enzimas se determinó por cambios en las propiedades de fluorescencia intrínseca. La fracción de saturación en función de la concentración de Mg^{+2} para la enzima silvestre (\circ) y para la enzima mutante E190Q (\bullet), se ajusta a una función hiperbólica con constantes de disociación de 41 y 390 μM , respectivamente. El experimento fue realizado en ausencia de sustratos.

La fracción de saturación de las enzimas es función hiperbólica de la concentración de Mg^{+2} , donde se observa el 50% de saturación a una concentración de 41 μM . La concentración mínima de Mg^{+2} libre que se usa en el ensayo de actividad, 0,4 mM, está 10 veces por encima de la constante de unión, por lo que bajo las condiciones experimentales diseñadas no es posible ver la activación por Mg^{+2} en la enzima silvestre, ya que el sitio de unión para este catión estaría saturado en un 90%. En la figura 13, la enzima mutante Pfk-2 E190Q necesita una concentración de Mg^{+2} 10 veces mayor para llegar al 50% de saturación. Tomando en cuenta este resultado y que la mutación E190Q se encuentra en el sitio activo de Pfk-2, una de las posibilidades que permite explicar este cambio en las propiedades de emisión del único triptofano de esta enzima, es que Mg^{+2} se esté uniendo al sitio activo.

Por otro lado, se determinó el efecto que tiene la mutación en la dependencia por Mg^{+2} de las constantes de Michaelis aparentes para ambos sustratos (tabla 7). En el caso de la Pfk-2 silvestre sólo se observa un efecto sobre la K_M aparente para fructosa-6-P, la que disminuye cuando aumentamos la concentración de Mg^{+2} libre, mientras que la K_M aparente para MgATP permanece invariable. Al contrario, para la enzima mutante, la K_M aparente para MgATP aumenta al doble cuando se varía la concentración de Mg^{+2} libre, mientras la K_M aparente para fructosa-6-P permanece invariable. En la figura 14A se muestra la actividad en función de MgATP a concentraciones saturantes del catión divalente, donde la mutante muestra un incremento de 15 veces en la K_M aparente para MgATP en relación a la enzima silvestre. En la figura 14B se muestra la actividad en función de fructosa-6-P, donde observamos que la diferencia entre la K_M aparente de fructosa-6-P de la enzima silvestre y la enzima mutante es más bien discreta.

Tabla 7
Parámetros cinéticos de Pfk-2 E190Q.

Al ensayar la actividad vs. fructosa-6-P, la concentración de MgATP se mantuvo constante a 1 y 2 mM, para la enzima silvestre y la mutante Pfk-2 E190Q respectivamente; la actividad vs. MgATP se ensayo con una concentración constante de fructosa-6-P de 1 mM.

	Pfk-2 silvestre		Pfk-2 E190Q	
	Mg ⁺² 1mM	Mg ⁺² 30mM	Mg ⁺² 1mM	Mg ⁺² 30mM
K _M MgATP, μM	20±3	22±5	149±29	320±12
K _M F6P, μM	100±19	28±2	10±0,7	9,4±0,5

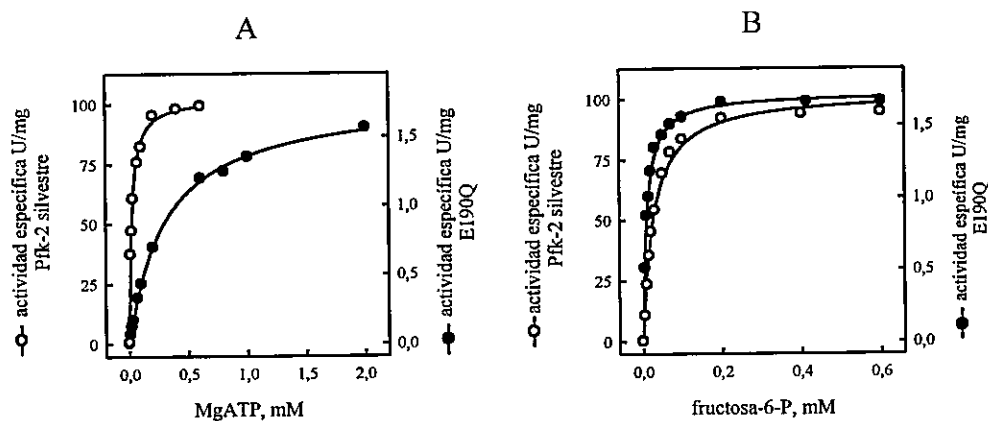
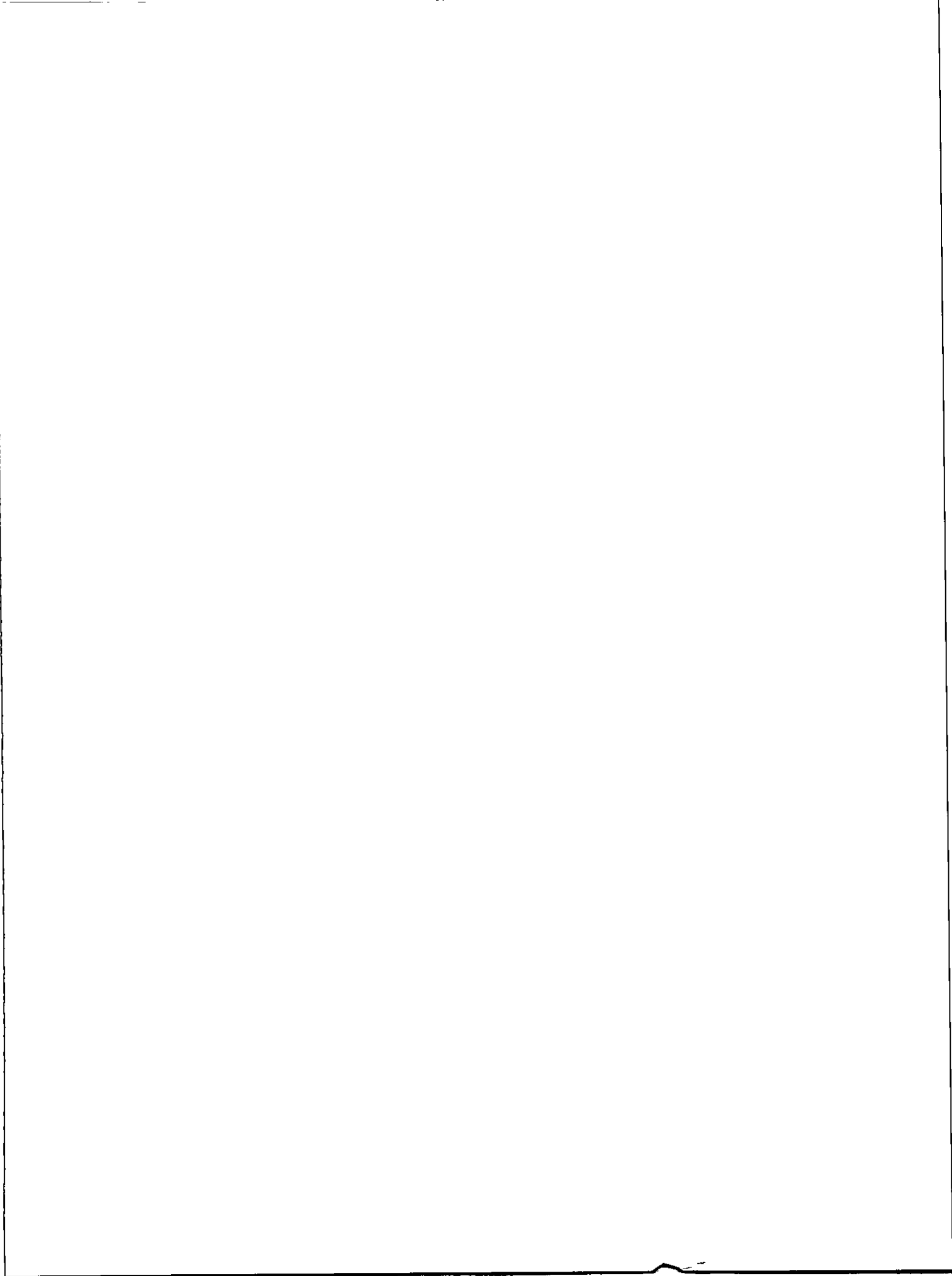


Figura 14. Efecto de la mutación E190Q sobre las constantes de Michaelis en relación a Pfk-2 silvestre. La velocidad de reacción para la enzima silvestre (○) y la mutante E190Q (●) fue medida en función de la concentración de MgATP (A) y fructosa-6-P (B), a 30 mM de Mg⁺² libre. La concentración del cosustrato fue 1 mM en (A) y 2 mM (B).



Estas observaciones sugieren que el residuo ácido glutámico interactúa con el sustrato MgATP, además de unir un ion Mg^{+2} en el sitio activo de la enzima necesario para la catálisis.

4.2. Efecto del Mg^{+2} sobre las propiedades del sitio alostérico de Pfk-2 E190Q y Pfk-2 silvestre.

En Pfk-2 silvestre, la unión alostérica de MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P (0,1 mM), produce inhibición de la actividad enzimática y formación de tetrámeros; esta inhibición puede ser revertida al incrementar la concentración del sustrato azúcar fosforilado (Kotlarz y Buc, 1981, Guixé y Babul, 1985; Guixé y Babul, 1988). La inhibición causada por MgATP en Pfk-2 es parcialmente revertida cuando se incrementa la concentración de Mg^{+2} libre, como se puede ver en la figura 15A. Esta conducta representa un rasgo notable dentro de la familia riboquinasa, ya que las actividades de AK y RK de *E. coli*, son inhibidas a altas concentraciones del catión divalente. Con el propósito de evaluar el efecto que tiene Mg^{+2} libre sobre la reversión de la inhibición alostérica, ensayamos la actividad de Pfk-2 en condiciones inhibitorias (fructosa-6-P 0,1 mM y MgATP 4 mM), en función de la concentración de Mg^{+2} libre (figura 15B). La actividad de Pfk-2 incrementa y manifiesta una dependencia hiperbólica con la concentración de iones Mg^{+2} libre. ¿El efecto que tiene Mg^{+2} libre revirtiendo la inhibición alostérica afectará también la formación de tetrámeros? Para responder esta pregunta, nos propusimos ensayar la tetramerización inducida por MgATP de la Pfk-2 silvestre, utilizando cromatografía de exclusión molecular, donde variamos la concentración de Mg^{+2} libre de 1 a 30 mM (figura 16). Debido a que altas concentraciones de $MgCl_2$ incrementan la fuerza iónica y ésta causa un desplazamiento en los volúmenes de

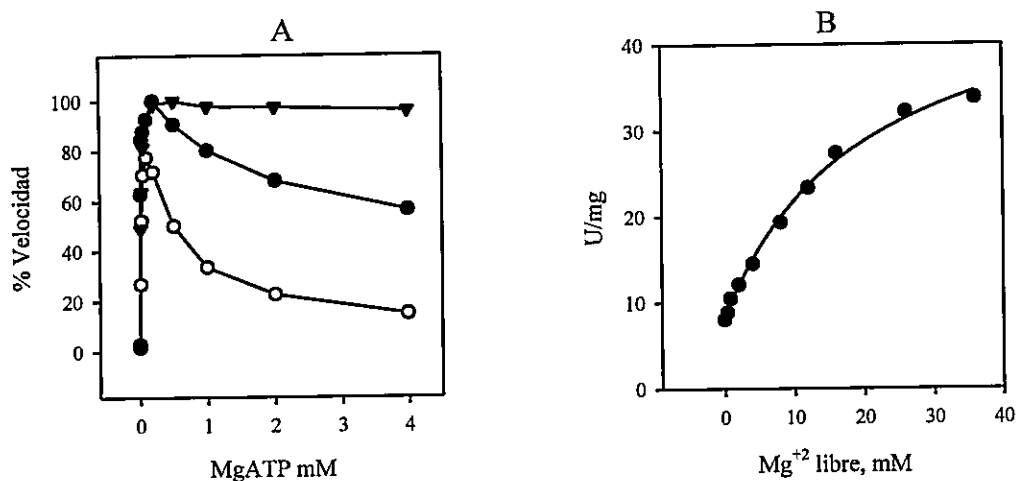


Figura 15. Efecto de Mg^{+2} libre y fructosa-6-P en la inhibición inducida por MgATP en Pfk-2 silvestre. (A) La actividad enzimática se midió a fructosa-6-P 0,1 mM y Mg^{+2} libre 1 mM (○), fructosa-6-P 0,1 mM y Mg^{+2} libre 30 mM (●), fructosa-6-P 1 mM y Mg^{+2} libre 30 mM (▲). (B) Efecto de la concentración de Mg^{+2} libre en la reversión de la inhibición inducida por MgATP. Las condiciones inhibitorias en las que se realizó el ensayo fueron: fructosa-6-P 0,1 mM y MgATP 4 mM.

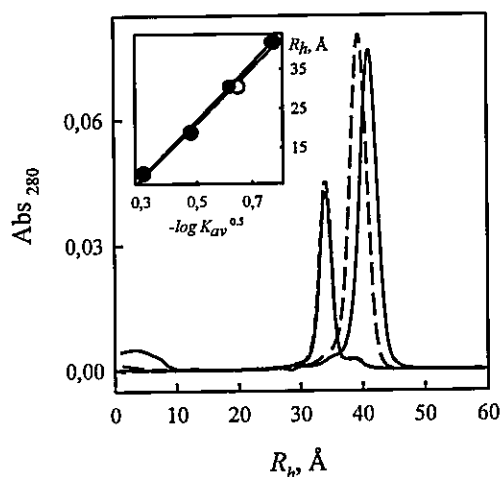


Figura 16. Efecto de la concentración de Mg^{+2} libre en la tetramerización inducida por MgATP en la Pfk-2 silvestre. El estado de agregación (radio hidrodinámico) de Pfk-2, fue determinado por cromatografía de exclusión molecular en ausencia y en presencia de MgATP 0,1 mM, a 1 mM (—) y 30 mM (---) de Mg^{+2} libre.

elución de los estándares de peso molecular, el perfil de elución de Pfk-2 fue expresado en función del R_H de las especies en solución. La figura 16 muestra que al variar la concentración de Mg^{+2} de 1 a 30 mM, en ausencia de MgATP, el R_H de dímero no varía y se mantiene en 31 Å, radio que está de acuerdo con experimentos previos utilizando dispersión dinámica de luz (Cabrera y cols, 2002). Sin embargo, en presencia de 0,1 mM de MgATP, la especie con mayor volumen hidrodinámico disminuye su radio cuando la muestra es cromatografiada con Mg^{+2} 30 mM. Estos resultados muestran que altas concentraciones de Mg^{+2} libre afectan no sólo la inhibición de la actividad enzimática por MgATP sino también la tetramerización, ya que este ion produce cambios en las propiedades hidrodinámicas del tetrámero.

Al comparar la inhibición alostérica de la enzima mutante Pfk-2 E190Q por MgATP con la de la enzima silvestre, observamos que ésta ocurre a mayores concentraciones de MgATP (figura 17) y que también es parcialmente revertida al incrementar la concentración de Mg^{+2} libre de 1 a 30 mM. Sin embargo, a concentraciones saturantes de fructosa-6-P (1 mM) MgATP aún inhibe la actividad de la mutante Pfk-2 E190Q. Por otra parte, experimentos de exclusión molecular en presencia de MgATP 0,2 mM (figura 18), muestran que la unión de MgATP al sitio alostérico de Pfk-2 E190Q induce la tetramerización, lo que indica que la mutación no afecta la formación de tetrámeros.

4.3. Efecto del PO_4^{-3} sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 y Pfk-2 E190Q.

La importancia de PO_4^{-3} como un efector alostérico de fosfofructoquinasas de distintas fuentes ha sido ampliamente estudiada. Este ion incrementa la actividad de la

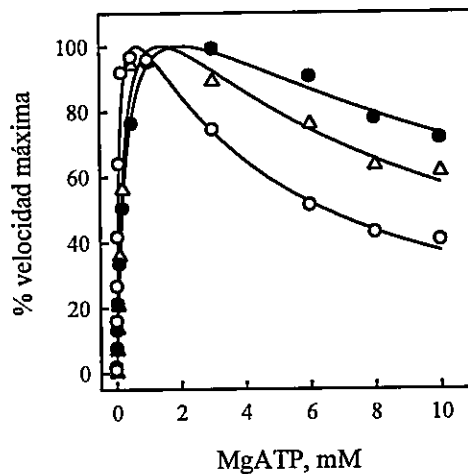


Figura 17. Efecto de Mg^{+2} libre y fructosa-6-P en la inhibición inducida por MgATP en Pfk-2 E190Q. La actividad enzimática se midió a fructosa-6-P 0,1 mM y Mg^{+2} libre 1 mM (○), fructosa-6-P 0,1 mM y Mg^{+2} libre 30 mM (△), fructosa-6-P 1 mM y Mg^{+2} libre 30 mM (●).

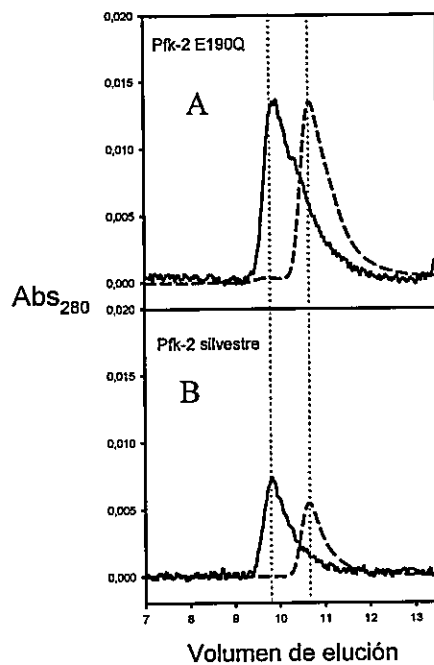


Figura 18. Efecto del MgATP sobre la tetramerización de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q. El cambio en el estado de agregación se determinó por cromatografía de exclusión molecular, midiendo la absorbancia a 280 nm del volumen de elución de la mutante Pfk-2 E190Q (A) y de Pfk-2 silvestre (B), en ausencia (---) y presencia (—) de MgATP. El estado de agregación se determina a partir de los corrimientos de los picos en los volúmenes de elución, siendo la especie tetramérica la que eluye a menor volumen.

fosfofructoquinasa de levadura, *Ascaris suum*, eritrocito, tejidos musculares y nerviosos de vertebrados e invertebrados, así como la actividad de la 6-fosfofructo-2-quinasa de hígado (Bañuelos y col, 1977; Hofer y col, 1982; Kuhn y col, 1974; Sugden y Newsholme, 1975; Lalloué y col, 1985). Entre los miembros de la familia riboquinasa, se sabe que la actividad de adenosina quinasa de distintas fuentes, así como la actividad de la riboquinasa de bacteria es afectada por iones, como PO_4^{-3} , arsenato y vanadato (Maj y col, 2000; Maj y Gupta, 2001; Hao y col, 1996). En la presencia de estos iones la velocidad máxima aumenta y la K_M para el sustrato que acepta el fosfato disminuye. También ha sido establecido que mutaciones en los residuos N y E del motivo NXXE de AK, afectan significativamente el efecto activador de PO_4^{-3} sobre la actividad enzimática, lo que permite sugerir a este motivo como determinante de la unión de PO_4^{-3} al sitio activo de esta enzima.

Con el propósito de comparar el efecto que tiene el ion PO_4^{-3} en la Pfk-2 con respecto a otros miembros de la familia riboquinasa, se realizaron experimentos donde se mide la actividad específica de la Pfk-2 silvestre en función de la concentración de este ion. Para la enzima silvestre se observa que un aumento en la concentración de PO_4^{-3} produce una disminución de la actividad específica a concentraciones saturantes de sustratos (figura 19A). Esta tendencia es mucho más marcada en la mutante Pfk-2 E190Q (figura 19B), ya que tenemos un mayor porcentaje de inhibición a menores concentraciones de PO_4^{-3} . Dado que Mg^{+2} puede formar complejos con el PO_4^{-3} y que a altas concentraciones de ambos iones ocurre la precipitación de éste, determinamos la concentración máxima de Mg^{+2} libre sin que ocurra precipitación, la que fue de 5 mM.

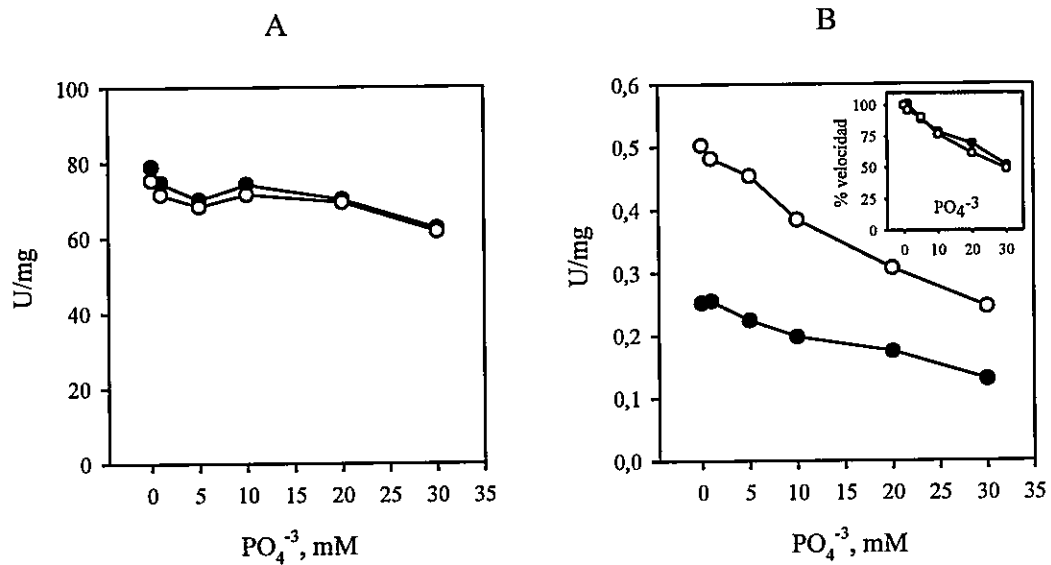


Figura 19. Efecto de la concentración de PO_4^{-3} sobre la actividad enzimática de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q. (A) La actividad enzimática de Pfk-2 silvestre fue medida con MgATP 1 mM y fructosa-6-P 1 mM. (B) La actividad enzimática de Pfk-2 E190Q fue medida con MgATP 2 mM y fructosa-6-P 1 mM. El gráfico en el recuadro inserto en B, representa el porcentaje de velocidad en función de la concentración de PO_4^{-3} . Para ambos gráficos (A y B), se ensayaron dos concentraciones de Mg^{+2} libre, donde (●) corresponde a Mg^{+2} libre 1mM y (○) a Mg^{+2} libre 5mM.

Por lo tanto, se determinó el efecto de fosfato a dos concentraciones de Mg^{+2} libre, con el propósito de descartar un posible efecto de la concentración de Mg^{+2} libre de 1 a 5 mM no hay cambios significativos en la tendencia inhibitoria causada por PO_4^{-3} (figura 19A), mientras que la enzima mutante parte con mayor actividad cuando se incrementa la concentración de Mg^{+2} (figura 19B). Este efecto se puede explicar si recordamos que la constante catalítica de la mutante Pfk-2 E190Q tiene asociada una dependencia por este catión divalente (figura 12). El gráfico del recuadro inserto en la figura 19B representa el porcentaje de velocidad en función de la concentración de PO_4^{-3} , donde se puede ver que a las dos concentraciones de Mg^{+2} libre ensayadas, la tendencia inhibitoria de PO_4^{-3} es equivalente. Con esto demostramos que la inhibición por PO_4^{-3} no es dependiente de la concentración de Mg^{+2} libre.

La tabla 8 muestra el efecto de PO_4^{-3} sobre los parámetros cinéticos de la Pfk-2 silvestre y la mutante Pfk-2 E190Q. La k_{cat} en la enzima silvestre disminuye en un 25% cuando se incrementa la concentración de PO_4^{-3} hasta 30 mM, mientras que en la k_{cat} de la enzima mutante la magnitud del efecto de PO_4^{-3} es mayor, ya que ésta disminuye en un 60% a altas concentraciones del ion. Por otra parte, la K_M aparente para MgATP no se modifica en ninguna de las enzimas al variar la concentración de PO_4^{-3} , mientras que la K_M aparente para fructosa-6-P aumenta en la misma proporción en ambas enzimas. Sorprendentemente en la enzima mutante a 10 mM de PO_4^{-3} , la curva de saturación para fructosa-6-P se vuelve sigmoidea, con una $K_{0,5}$ tres veces mayor que la K_M aparente para este sustrato determinada en ausencia de PO_4^{-3} . De manera general, el efecto que tiene el PO_4^{-3} en la Pfk-2 silvestre y la mutante Pfk-2 E190Q es muy parecido, pero contrasta con lo que se ha descrito para otros miembros de la familia riboquinasa.

Tabla 8

Efecto del PO_4^{-3} sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 E190Q.
 Al ensayar la actividad vs. fructosa-6-P, la concentración de MgATP se mantuvo constante a 1 mM para la enzima silvestre y 2 mM para la mutante E190Q; la actividad vs. MgATP se ensayo con una concentración constante de fructosa-6-P 1 mM para ambas enzimas.

	Pfk-2 silvestre		Pfk-2 E190Q	
	Sin PO_4^{-3}	30mM PO_4^{-3}	Sin PO_4^{-3}	30mM PO_4^{-3}
$k_{\text{cat}}, \text{s}^{-1}$	53	40	0,46	0,18

	Pfk-2 silvestre		Pfk-2 E190Q	
	Sin PO_4^{-3}	10mM PO_4^{-3}	Sin PO_4^{-3}	10mM PO_4^{-3}
$K_M \text{ MgATP}, \mu\text{M}$	15	16	170	199
$K_M \text{ F6P}, \mu\text{M}$	52	145*	18	69

* corresponde al valor de $K_{0,5}$ con un n_h de 1,9

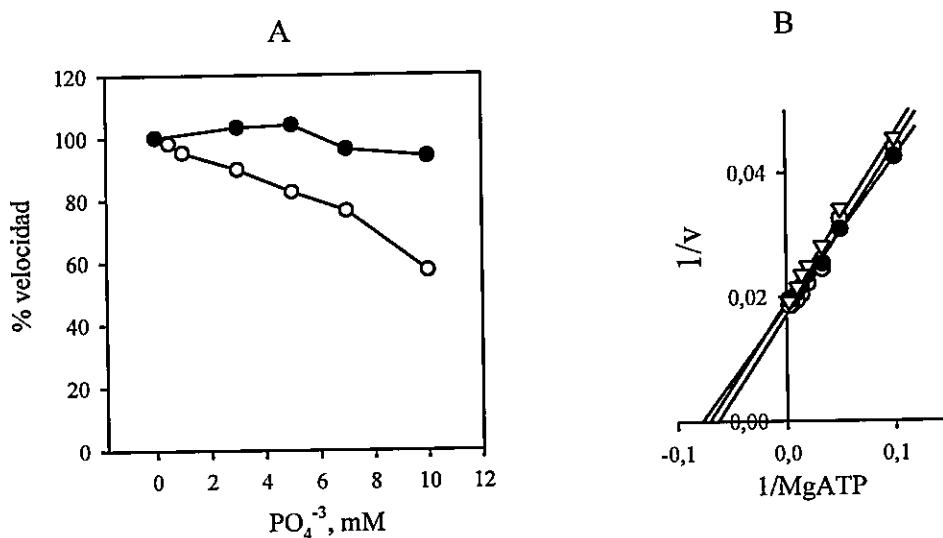


Figura 20. Efecto del PO_4^{3-} sobre la velocidad inicial de Pfk-2 silvestre. (A) Porcentaje de velocidad en función de la concentración de PO_4^{3-} , en condiciones saturantes de ambos sustratos, fructosa-6-P 1 mM y MgATP 1 mM (●) y en condiciones subsaturantes, fructosa-6-P 0,2 mM y MgATP 0,1 mM (○). (B) Dobles recíprocos de la velocidad inicial en función de la concentración de MgATP. La actividad enzimática fue medida en ausencia de PO_4^{3-} (●), PO_4^{3-} 5 mM (○) y PO_4^{3-} 10 mM (△). Los valores de K_M fueron: 16 μM en ausencia de fosfato, 12 μM en fosfato 5 mM y 15 μM en fosfato 10 mM.

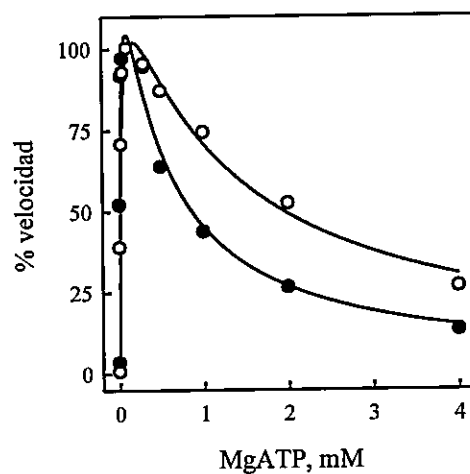


Figura 21. Efecto del PO_4^{3-} sobre la inhibición inducida por MgATP en Pfk-2. La actividad fue medida en ausencia (○) y en presencia (●) de PO_4^{3-} 10 mM.

En Pfk-2 silvestre, la inhibición de la actividad enzimática por PO_4^{-3} se incrementa a concentraciones subsaturantes de sustratos (fructosa-6-P 0,2 mM y MgATP 0,1 mM). Como se muestra en la figura 20A, la actividad disminuye hasta un 40% al incrementar la concentración de PO_4^{-3} a 10 mM. Estudios de velocidad inicial en función de la concentración de MgATP a diferentes concentraciones de PO_4^{-3} , nos permiten descartar a este ion como un inhibidor que compita con el MgATP que se une al sitio activo (figura 20B). Por lo tanto la otra posibilidad que permite explicar este efecto inhibitorio, es que PO_4^{-3} actúe como un inhibidor a bajas concentraciones de ambos sustratos, uniéndose al sitio alostérico para MgATP. Para probar esta hipótesis, observamos la inhibición inducida por MgATP en la Pfk-2 silvestre en presencia de PO_4^{-3} 10 mM y fructosa-6-P 0,1 mM. La figura 21 muestra que este ion produce un efecto inhibitorio adicional a todas las concentraciones del nucleótido ensayadas, lo que apoya la idea de que PO_4^{-3} actúa como un inhibidor alostérico, posiblemente uniéndose al mismo sitio alostérico que MgATP. Estos resultados sugieren que el residuo E190 de Pfk-2 de *E. coli* posiblemente media la interacción entre el sitio activo y el sitio alostérico.

DISCUSIÓN

Los miembros de la familia riboquinasa catalizan la fosforilación de sustratos que contienen un hidroxilo secundario y entre éstos se encuentran adenosina quinasas, fructoquinasas, tagatosa-6-P quinasas, fructosa-1-P quinasas, Pfk-2 de *E. coli* y la enzima canónica, riboquinasa (Bork y col, 1993; Wu y col, 1991). Se ha descrito la estructura de varios miembros de esta familia, lo que permite tener una visión bastante amplia sobre la función de residuos conservados en la catálisis y los cambios conformacionales inducidos por sustrato (Mathews y col, 1998; Schumacher y col, 2000; Sigrell y col, 1998; Campobasso y col, 2000; Zhang y col, 2002). La evolución a partir de un ancestro común (homología evolutiva), predice que ciertos rasgos estructurales pueden ser generalizados para todos los miembros relacionados con una familia de enzimas. Por otro lado, una misma función enzimática que carece de un ancestro común (convergencia), se explica por la importancia que tienen ciertos residuos análogos en los sitios activos. Pfk-2 es un caso interesante dentro de la familia riboquinasa, ya que permite un análisis sobre la base de predicciones por homología, obteniendo información de los miembros caracterizados de la familia y permite estudios de comparación por analogía con la enzima no homóloga Pfk-1, debido a que ambas catalizan la misma reacción en la cepa silvestre de *E. coli*.

Por el análisis de alineaciones múltiples de estructuras primarias de miembros de la familia riboquinasa (figuras 1 y 2), se identificó dos motivos de secuencia altamente conservados: GAGD y NXXE. Estas regiones conservadas se encuentran localizadas en el sitio activo de las estructuras de miembros de la familia, lo cual sugiere que estos

rasgos estructurales corresponden a determinantes de la función catalítica en la familia riboquinasa. Se ha propuesto que el residuo ácido aspártico del motivo GAGD actúa como la base catalítica general, desprotonando el hidroxilo del sustrato a ser fosforilado (Maj y col, 2000). Por otra parte, los residuos N y E del motivo NXXE han sido implicados en la catálisis y regulación de la actividad enzimática como determinantes de unión de PO_4^{-3} y Mg^{+2} al sitio activo en miembros de la familia riboquinasa (Maj y col, 2001). En la Pfk-2 de *E.coli*, estos residuos corresponden a D256 y E190, por lo que nos propusimos evaluar el efecto que tiene la carga de estos residuos en la catálisis y unión de ligandos, para lo cual se efectuaron los reemplazos de D256N y E190Q. El espectro de dicroísmo circular (figura 9) de las enzimas mutantes Pfk-2 D256N y Pfk-2 E190Q, es prácticamente indistinguible del de la enzima silvestre, lo cual nos indica que el impacto de las mutaciones es poco significativo a nivel del contenido de estructura secundaria en la enzima.

Con respecto al motivo GAGD, estudios de mutagénesis sitio dirigida en la adenosina quinasa de hámster chino (Maj y col., 2000), mostraron que la sustitución del ácido aspártico 316 por asparragina o glutamina provocan una drástica disminución en la actividad específica. Como se observa en la tabla 4, en Pfk-2 el reemplazo de D256N provoca que la k_{cat} de la enzima silvestre sea 15.000 veces mayor que la de la enzima mutante. Por otra parte, la K_M aparente para MgATP no se ve afectada por la mutación, mientras que la K_M aparente para fructosa-6-P aumenta al triple en la enzima mutante. Con respecto a las consecuencias de la mutación sobre la unión alostérica de MgATP (inhibición de la actividad enzimática y tetramerización), éstas no se ven afectadas en la mutante Pfk-2 D256N, ya que podemos observar un comportamiento similar al de la enzima

silvestre (figuras 10 y 11). Estos resultados indican que el efecto del reemplazo del residuo ácido aspártico ocurre más bien sobre la constante catalítica y no así sobre la regulación alostérica por MgATP. De manera que es posible proponer que el residuo ácido aspártico 256, conservado en Pfk-2, funciona como la base catalítica en la reacción de fosforilación. En los miembros de la familia riboquinasa, la transferencia del grupo PO_4^{-3} desde el ATP al sustrato, procede como un proceso ordenado sin involucrar un intermediario covalente unido a la enzima. El grupo hidroxilo del sustrato a ser fosforilado es activado por el carboxilato del residuo ácido aspártico conservado y lleva a cabo un ataque nucleofílico directo sobre el fosfato γ del ATP (Dyguda y cols, 2004). El hidroxilo que se fosforila en el sustrato azúcar se encuentra formando un puente de hidrógeno con el residuo D del motivo GAGD en las estructuras tridimensionales de RK de *E. coli* (D255), AK de humano (D300) y AK de *Toxoplasma gondii* (D318) cristalizadas en presencia del sustrato y por ende, es probable que el incremento en la K_M aparente para fructosa-6-P de la Pfk-2 (tabla 4) se deba a la pérdida de esta interacción (Sigrell y col, 1998; Mathews y col, 1998; Schumacher y col, 2000).

Con el propósito de evaluar la importancia del residuo E190 sobre la unión de Mg^{+2} y PO_4^{-3} en Pfk-2, lo reemplazamos por Q ya que es de tamaño y polaridad similar, pero carece de la carga negativa. Bajo condiciones estándar (sustratos saturantes y Mg^{+2} libre 1 mM) la k_{cat} de la Pfk-2 silvestre es 400 veces mayor que la de la enzima Pfk-2 E190Q y muestra un incremento de 10 veces al aumentar la concentración de Mg^{+2} libre a 30 mM (tabla 5). Esta dependencia de la k_{cat} de la enzima mutante por iones Mg^{+2} tiene una tendencia de saturación hiperbólica, con una constante de activación de 10 mM, como se puede ver en la figura 12. La mutación disminuye la afinidad por

MgATP, como se sugiere por el incremento de 15 veces en la K_M aparente para este sustrato a concentraciones saturantes del catión divalente (tabla 7, figura 14). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el residuo E190 del motivo NXXE de Pfk-2 está involucrado en la unión de Mg^{+2} al sitio activo. De acuerdo con el mecanismo asociativo de la transferencia de fosfato (tipo SN_2), el catión divalente aumentaría la electrofilicidad del fosfato y del nucleótido, neutralizando las cargas de los átomos de oxígeno en el fosfato, estabilizando el estado de transición de la reacción (Matte y col, 1998). Lo más probable es que esta dependencia por Mg^{+2} libre que muestra la enzima mutante (figura 12), no se observe en la enzima silvestre dada la alta afinidad relativa por Mg^{+2} y la mínima concentración de Mg^{+2} libre (0,4 mM), a la cual se realiza el ensayo para minimizar el efecto inhibitorio de ATP^{4-} (tabla 6). Experimentos de fluorescencia intrínseca (figura 13) indican que el 50% de saturación se observa a una concentración de 41 μM de Mg^{+2} , por lo que a 0,4 mM de Mg^{+2} libre el sitio de unión para Mg^{+2} se encuentra saturado en un 90% y por lo tanto, no se observa la activación por Mg^{+2} libre. Tomando en cuenta que los experimentos cinéticos de la figura 12 fueron realizados a concentraciones fijas y saturantes de MgATP y que, la actividad de la enzima mutante disminuye con la concentración de Mg^{+2} libre, aproximándose a un valor menor al 6% de la velocidad máxima, se puede proponer que el requerimiento de Mg^{+2} libre en Pfk-2 E190Q involucra un sitio adicional para este catión divalente, distinto del que une MgATP al sitio activo. Esta es la primera evidencia que se reporta para un segundo sitio de Mg^{+2} en Pfk-2 u otra fosfofructoquinasa.

Basados en comparaciones por homología de las estructuras del sitio activo de RK de *E. coli* y AK de distintas fuentes, Maj y col. (2002) propusieron un modelo para

las interacciones que se dan entre ligandos y residuos del sitio activo de estas enzimas. En este modelo general del sitio activo de la familia riboquinasa ellos incluyen dos iones Mg^{+2} , uno que corresponde al que se encuentra coordinado con AMP-PCP (análogo no hidrolizable de ATP) y el otro que se localiza entre el fosfato γ y el hidroxilo 5' de adenosina. Esto sugiere que la presencia de dos iones Mg^{+2} en el sitio activo, es un rasgo conservado del mecanismo catalítico entre los miembros de la familia riboquinasa. Este punto de vista es apoyado también por cálculos *in silico* de la reacción de transferencia de fosfato en 4-metil-5- β -hidroxy-etiltiazol quinasa (THz quinasa), otro miembro de la familia riboquinasa; en este estudio dos iones Mg^{+2} parecen ser importantes para la estabilización preferencial del estado de transición, bajando la barrera de activación (Dyguda y col, 2004). El requerimiento de un segundo ion metálico para la actividad enzimática, ha sido reportado para fosfotransferasas no relacionadas con la familia riboquinasa, como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, piruvato quinasa y tirosina quinasa (Colombo y col, 1981; Sun y Budde, 1997; Boehr y col, 2001). Aunque el mecanismo con el que utilizan el segundo Mg^{+2} varía en cada caso, éste es siempre un elemento intrínseco de la reacción y forma parte del estado de transición.

Por otro lado, Pfk-2 muestra una reversión de la inhibición alostérica inducida por MgATP cuando se incrementa la concentración de iones Mg^{+2} libre (figura 15A). Altas concentraciones de Mg^{+2} libre incrementan aproximadamente un 40% la actividad enzimática desde condiciones inhibitorias (figura 15B), a diferencia de lo que se observa en otros miembros de la familia riboquinasa, donde a altas concentraciones del catión divalente ocurre inhibición de la actividad enzimática. Experimentos de filtración

molecular de la enzima silvestre muestran un cambio en las propiedades hidrodinámicas del tetrámero en la presencia de Mg^{+2} 30 mM. La reducción del radio hidrodinámico de la especie de mayor peso molecular, que se puede observar en la figura 16, puede ser el resultado de un equilibrio rápido en la disociación del tetrámero o de una compactación del mismo, en la presencia de altas concentraciones del catión divalente. Este efecto de baja afinidad relativa que causa el Mg^{+2} libre sobre la regulación alostérica por MgATP, puede ser debido a una competencia por el sitio alostérico entre Mg^{+2} libre y MgATP. El comportamiento alostérico de la mutante Pfk-2 E190Q (figura 17) es cuantitativamente similar al de la enzima silvestre, ya que la inhibición puede ser revertida por altas concentraciones de iones Mg^{+2} libre. Sin embargo, se requieren de concentraciones mayores de MgATP para alcanzar la inhibición y ésta no es revertida por fructosa-6-P en la misma magnitud que ocurre en la enzima silvestre.

Por otra parte, el PO_4^{-3} afecta la actividad de varias fosfofructoquinasas y la actividad de los miembros de la familia riboquinasa, siendo un activador en ambos casos. Para AK de mamíferos, como también para RK de *E. coli*, PO_4^{-3} incrementa la velocidad máxima y disminuye la K_M para el sustrato aceptor de fosfato. En oposición con los efectos observados para fosfato en los miembros de la familia riboquinasa, en la Pfk-2 este ion incrementa 3 veces la K_M aparente para fructosa-6-P (tabla 8) y a concentraciones altas del mismo se puede observar una leve inhibición, la actividad específica en la enzima silvestre disminuye en un 25%. La inhibición de la actividad enzimática por PO_4^{-3} resulta ser muy marcada en la mutante Pfk-2 E190Q; a concentraciones altas del ion (~ 30 mM) hay un 60% de inhibición (figura 19). A concentraciones subsaturantes de sustratos (fructosa-6-P 0,2 mM y MgATP 0,1 mM), la

inhibición por PO_4^{-3} en la enzima silvestre es mayor que a concentraciones saturantes (figura 20A), efecto que se asemeja a la inhibición alostérica causada por MgATP. Ya que estudios de velocidad inicial nos permiten descartar el efecto de PO_4^{-3} como un inhibidor competitivo con respecto al MgATP del sitio activo (figura 20B), exploramos la posibilidad de que PO_4^{-3} estuviera actuando a nivel del sitio alostérico. De acuerdo con esta hipótesis, PO_4^{-3} produce un efecto inhibitorio adicional sobre la inhibición inducida por MgATP (figura 21). Si el PO_4^{-3} y MgATP se unen al mismo sitio, es tentador sugerir que el origen evolutivo del sitio alostérico de la Pfk-2 pueda estar relacionado con el sitio de unión a PO_4^{-3} caracterizado en otros miembros de la familia riboquinasa.

En este trabajo se evaluó la participación de residuos aminoacídicos pertenecientes a motivos estructurales conservados en la familia riboquinasa, sobre la catálisis y regulación alostérica de Pfk-2 de *E. coli*. Los resultados presentados en esta tesis indican que el residuo ácido aspártico 256 del motivo GAGD se conserva como base catalítica en la reacción de fosforilación en la Pfk-2. Por otro lado, los resultados de este trabajo señalan que el residuo ácido glutámico 190 del motivo NXXE en la Pfk-2 de *E. coli*, es necesario para la unión apropiada de un Mg^{+2} catalítico, el que constituye un segundo ion Mg^{+2} en el sitio activo, distinto del Mg^{+2} que forma complejo con el ATP. Los datos cinéticos de la mutante Pfk-2 E190Q indican que la unión de Mg^{+2} al sitio activo es requerida para estabilizar el estado de transición de la reacción. El efecto de baja afinidad que tiene Mg^{+2} libre sobre la inhibición alostérica y las propiedades hidrodinámicas del tetrámero, sugieren una competencia del catión divalente con el MgATP a nivel del sitio alostérico. Considerado típicamente como un activador de la

actividad de fosfofructoquinasas y de los miembros de la familia riboquinasa, el fosfato inorgánico actúa como un inhibidor en la Pfk-2, asemejándose a la inhibición alostérica inducida por MgATP en la enzima silvestre, probablemente por unión al sitio alostérico. Los resultados obtenidos y la línea argumental seguida en esta discusión nos permiten resumir el trabajo de tesis en dos propuestas generales:

1) Los residuos cargados presentes en los motivos NXXE y GAGD participan en interacciones fundamentales para la catálisis, de acuerdo con las etapas propuestas en el mecanismo general de fosforilación: la desprotonación del hidroxilo, lo cual inicia la reacción, y la estabilización del estado de transición mediante la unión de un catión divalente al sitio activo. 2) La posibilidad de que el sitio alostérico en la Pfk-2 haya derivado del sitio de fosfato presente en otras enzimas de la familia, permite contextualizar la regulación de la actividad de las enzimas de la familia en términos de la unión de los efectores a un único sitio. La observación de que la mutación de E190 por Q afecta las propiedades del sitio alostérico sugiere interacción entre éste y el sitio activo. Desde este punto de vista, las proyecciones de esta tesis deberían orientarse hacia la caracterización, en otras enzimas de la familia riboquinasa, del mecanismo de reacción mediante mutagénesis dirigida de residuos conservados en el sitio activo. Por otra parte, es necesario el estudio de las propiedades de mutantes de N187 del motivo NXXE respecto del uso de Mg^{+2} y PO_4^{-3} , con el propósito de disectar las interacciones que median los efectos de estos iones en la Pfk-2.

CONCLUSIONES

- El residuo ácido aspártico 256 de Pfk-2 actúa como una base general en el mecanismo catalítico de esta enzima, al igual que en otros miembros de la familia riboquinasa.
- Los datos sugieren la existencia de un segundo Mg^{+2} en el sitio activo de Pfk-2 diferente del Mg^{+2} en el complejo MgATP, necesario para la actividad enzimática.
- El residuo ácido glutámico 190 de Pfk-2, presente en el motivo NXXE, participa en la unión de este Mg^{+2} , probablemente estabilizando el estado de transición de la reacción.
- La mutación E190Q en el sitio activo de Pfk-2 afecta las propiedades del sitio alostérico, por lo que se sugiere que el motivo NXXE media la interacción entre ambos sitios.

REFERENCIAS

- Babul, J. (1978) Phosphofructokinases from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 253, 4350-4355.
- Bañuelos, M., Gancedo, C. y Gancedo, J. (1977) Activation by phosphate of yeast phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 252, 6394-6398.
- Berger, S.A. y Evans, P.R. (1992) Site directed mutagenesis identifies catalytic residues in the active site of *Escherichia coli* phosphofructokinase. Biochemistry 31, 9237-9242.
- Blangy, D., Buc, H. y Monod, J. (1968) Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 31, 13-35.
- Boehr, D.D., Thompson, P.R. y Wright, G.D. (2001) Molecular mechanism of aminoglycoside antibiotic kinase APH(3')-IIIa. Roles of conserved active site residues. J. Biol. Chem. 276, 23929-23936.
- Bork, P., Sander, C. y Valencia, A. (1993) Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase familias of sugar kinases. Protein Science 2, 31-40.
- Cabrera, R., Guixé, V., Alfaro, J., Rodríguez, H. y Babul, J. (2002) Ligand-dependent structural changes and limited proteolysis of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2. Arch. Biochem. Biophys. 406, 289-295.
- Cabrera, R., Fischer, H., Trapani, S., Craievich, A.F., Garrat, R.C., Guixé, V. y Babul, J. (2003) Domain motions and quaternary packing of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli* studied by small angle X-ray scattering and homology modelling. J. Biol. Chem. 278, 12913-12919.
- Cabrera, R. (2004) Control alostérico de la oligomerización y la inhibición de la actividad catalítica en la fosfofructoquinasa-2 de *Escherichia coli* consecuencias estructurales de la unión de ligandos. Tesis Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Campobasso, N., Mathews, I.I., Begley, T.P. y Ealick, S.E. (2000) Crystal structure of 4-methyl-5- β -hydroxyethylthiazole kinase from *Bacillus subtilis* at 1.5 Å resolution. Biochemistry 39, 7868-7877.

- Colombo, G., Carlson, G. M. y Lardy, H. A. (1981) Phosphoenolpiruvate carboxykinase (guanosine 5'-triphosphate) from rat liver cytosol. Dual-cation requirement for the carboxylation reaction. *Biochemistry* 20, 2749-2757.
- Cook, W.J., Pelucas, L.J. y Chattopadhyay, D. (2000) Cristal structure of adenosine kinase from *Toxoplasma gondii* at 1.8 Å resolution. *Protein Science* 9, 704-712.
- Daldal, F. (1984) Nucleotide sequence of gene *pfkB* encoding the minor phosphofruktokinase of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 28, 337-342.
- Dyguda, E., Szefczyk, W. y Sokalski, W.A. (2004) The mechanism of phosphoryl transfer reaction and the role of active site residues on the basis of ribokinase-like kinases. *Int. J. Mol. Sci.* 5, 141-153.
- Fisher, M. N. y Newsholme, E. A. (1984) Properties of rat heart adenosine kinase. *Biochem. J.* 221, 521-528.
- Guixé, V. y Babul, J. (1985) Effect of ATP on Phosphofruktokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for MgATP. *J. Biol. Chem.* 260, 11001-11005.
- Guixé, V. y Babul, J. (1988) Influence of ligands on the aggregation of the normal and mutant forms of Phosphofruktokinase-2 from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 313-319.
- Guixé, V., Rodriguez P.H. y Babul J. (1998) Ligand-induced conformational transitions in *Escherichia coli* phosphofruktokinase-2: evidence for an allosteric site for MgATP². *Biochemistry* 37, 13269-13275.
- Hao, W. y Gupta, R.S. (1996) Pentavalent ions dependency of mammalian adenosine kinase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38, 889-899.
- Hofer, H.W., Allen, B.L., Kaeini, M.R., Pette, D.P. y Harris, B.G. (1982) Phosphofruktokinase from *Ascaris suum*. Regulatory kinetic studies and activity near physiological conditions. *J. Biol. Chem.* 257, 3801-3806.
- Ito, S., Fushinobu, S. Yoshioka, I., Koga, S., Matsuzawa, H. y Wakagi, T. (2001) Structural basis for the ADP-Specificity of a novel glukokinase from a hyperthermophilic archaeon. *Structure* 9, 205-214.
- Kotlarz, D. y Buc, H. (1981) Regulatory properties of phosphofruktokinase 2 from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 117, 569-574.
- Kornberg, A. y Pricer, W. E. Jr. (1953). Enzymatic esterification of alpha-glycerolphosphate by long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 204, 345-357.

- Kuhn, B., Jacobash, G. y Rapoport, S.M. (1974) Identity of sulphate and phosphate activation of the phosphofructokinase from erythrocytes. *FEBS Lett.* *38*, 354-356.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Laloux, M., Van Schaftingen, E., Francois, J. y Hers, H.G. (1985) Phosphate dependency of phosphofructokinase 2. *Eur. J. Biochem.* *148*, 155-159.
- Li, M. H., Kwok F., Chang, W. R., Lau, C. K., Zhang, J.P., Lo, S. C. L., Jiang, T. y Liang, D. C. (2002) Crystal structure of brain pyridoxal kinase, a novel member of the ribokinase superfamily. *J. Biol. Chem.* *277*, 46385-46390.
- Maj, M.C., Singh, B. y Gupta, R.S. (2000) Structure-activity studies on mammalian adenosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *275*, 386-393.
- Maj, M.C. y Gupta, R.S. (2001) The effect of inorganic phosphate on the activity of bacterial ribokinase. *J. Protein Chem.* *20*, 139-144.
- Maj, M.C., Singh, B. y Gupta, R.S. (2002) Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: Identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry* *41*, 4059-4069.
- Mathews, I.I., Erion, M.D. y Ealick, S.E. (1998) Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution. *Biochemistry* *37*, 15607-15620.
- Matte, A., Tari, L. W. y Delbaere, L. (1998) How do kinases transfer phosphoryl groups?. *Structure* *6*, 413-419.
- Morrison, J. F. (1979) Approaches to kinetic studies on metal-activated enzymes. *Methods Enzymol.* *63*, 257-294.
- Ohshima, N., Inagaki, E., Yasuike, K., Takio, K. y Tahirov, T.H. (2004) Structure of *Thermus thermophilus* 2-Keto-3-deoxygluconate Kinase: Evidence for recognition of and Open Chain Substrate. *J. Mol. Biol.* *340*, 477-489.
- Ronimus, R.S. y Morgan, H. W. (2001) The Biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinases from extremophiles. *Extremophiles* *5*, 357-373.
- Shirakihara, Y. y Evans, P.R. (1988) Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* *204*, 973-994.

- Schumacher, M.A., Scott, M.D., Mathews, I.I., Ealick, S.E., Roos, D.S., Ullman, B. y Brennan, R.G. (2000) Crystal Structures of *Toxoplasma gondii* Adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. *J. Mol. Biol.* 296, 549-567.
- Sigrell, J.A., Cameron, A., Jones, A. y Mowbray, S. (1998) Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure* 6, 183-193.
- Sugden, P.H. y Newsholme, E.A. (1975) The effects of ammonium, inorganic phosphate and potassium ions on the activity of phosphofructokinase from muscle and nervous tissues of vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 150, 113-122.
- Sun, G. y Budde, R.J.A. (1997) Requirement for an additional divalent metal cation to activate protein tyrosine kinases. *Biochemistry* 36, 2139-2146.
- Tabor, S. y Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 82, 1074-1078.
- Wu, L.F., Reizer, A., Reizer, J., Cai, B., Tomich, J.M. y Saier, M.H. (1991) Nucleotide sequence of the *Rhodobacter capsulatus* fruK gene, which encodes fructose-1-phosphate kinase: evidence for a kinase superfamily including both phosphofructokinases of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 3117-3127.
- Zhang, R. G., Grembecka, J., Vinokour, E., Collart, F., Dementieva, I., Minor, W. y Joachimiak, A. (2002) Structure of *Bacillus Subtilis* YXKO – A member of the UPF0031 family and a putative kinase. *J. Struct. Biol.* 139, 161-170.