

VCH-FC  
Biotecnología  
K 396  
C.1



Escuela de Pregrado  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

Estudio de la flexibilidad de la ADP-PFK/GK de  
*Methanococcoides burtonii* como mecanismo de  
adaptación al frío en la superfamilia de las riboquinasas

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de  
Ingeniera en Biotecnología Molecular

**Macarena Andrea Kern Mikkelsen**

Directora del Seminario de Título: Dra. Victoria Guixé Leguía

Co-director del Seminario de Título: Dr. Víctor Hugo Castro Fernandez

Julio 2016  
Santiago-Chile



ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Macarena Andrea Kern Mikkelsen**, “Estudio de la flexibilidad de la ADP-PFK/GK de *Methanococcoides burtonii* como mecanismo de adaptación al frío en la superfamilia de las riboquinasas”, ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular



Director Seminario de Título: \_\_\_\_\_

*V. Guzmán J. Víctor Guixé*

Codirector Seminario de Título: \_\_\_\_\_

*Victor Castro*  
Victor CASTRO

#### Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: \_\_\_\_\_

*M. Cecilia Rojas*  
M. CECILIA ROJAS

Evaluador: \_\_\_\_\_

*Ana Priller*  
Ana Priller

Santiago de Chile, Julio 2016

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco cordialmente al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile donde realicé este Seminario de Título como parte del proyecto Fondecyt 1150460, a la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile por otorgarme la beca que me permitió presentar parte de este trabajo en la XXXVIII Reunión de la SBBMCh y al laboratorio de Biología Estructural y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que me facilitó su fluorímetro.

Agradezco sinceramente a la profesora Guixé y a Víctor Castro Fernández, quienes me orientaron y corrigieron durante toda la realización de este Seminario de Título.

También agradezco sinceramente a todos los demás miembros del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. El tiempo pasado en el laboratorio no me alcanzó para compartir con todos y conocerlos como se debe, pero aun así le agradezco a cada uno de ustedes por su amabilidad y buena disposición. Quiero agradecer especialmente a Mora, por haberme dejado participar en su trabajo, a Ale, quien me introdujo en el ritmo y trabajo del laboratorio, a Coté, por la paciencia y disposición, a Felipe, por su gran apoyo como compañero y por haberme ayudado con el plan alternativo de este trabajo, y a Danae y Nieves, quienes con su trabajo aliviaron el mío todos los días.

Finalmente, agradezco profundamente a todos mis cercanos que estuvieron apoyándome y alentándome durante toda mi vida universitaria y en la realización de este trabajo: a Seba, a mis amigas y amigos, y a mi familia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Hipótesis</i> .....	13
<i>Objetivo general</i> .....	13
<i>Objetivos específicos</i> .....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Materiales. ....	15
Determinación de la concentración de los sustratos.....	15
Diseño de las mutantes.....	16
Mutaciones puntuales. ....	17
Mutante sin triptófano de <i>MbPFKJGK</i> .....	19
Obtención de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> . ....	19
Purificación de proteínas recombinantes mediante columna de afinidad de níquel. .	20

Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de intercambio aniónico.....	21
Análisis de la pureza de las proteínas. ....	21
Almacenamiento de las proteínas. ....	22
Precipitación por sulfato de amonio.....	22
Purificación de proteínas recombinantes mediante columna de intercambio aniónico conectada en tándem a columna de afinidad de níquel.....	23
Medición de la actividad enzimática. ....	24
Dependencia de la actividad de la ADP-PFK/GK silvestre de <i>M. burtonii</i> con el pH. ....	25
Determinación de los parámetros cinéticos.....	25
Eliminación del hexapéptido de histidina de las ADP-PFK/GK silvestres de <i>M. burtonii</i> y <i>M. mazei</i> .....	26
Apagamiento de fluorescencia por acrilamida de las ADP-PFK/GK silvestre de <i>M. burtonii</i> y <i>M. mazei</i> . ....	27
Estudios de unión de ligando de la mutante <i>MmN203W</i> por fluorescencia intrínseca. ....	28
RESULTADOS .....	29
Purificación de las proteínas recombinantes de ADP-PFK/GK de <i>M. maripaludis</i> y <i>M. burtonii</i> . ....	29
Dependencia de la actividad de <i>MbPFK/GK</i> en función del pH. ....	37
Determinación de parámetros cinéticos.....	38

Búsqueda de un modelo alternativo para experimentos de fluorescencia. ....	44
Eliminación del hexapéptido de histidina de las ADP-PFK/GK silvestres de <i>M. mazei</i> y <i>M. burtonii</i> . ....	47
Apagamientos de fluorescencia por acrilamida de <i>MbPFK/GK</i> y <i>MmzPFK/GK</i> . ....	47
Estudios de unión de ligando por fluorescencia intrínseca de la mutante <i>MmN203W</i> . .....	53
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Residuo de aminoácido original y reemplazante para la ADP-PFK/GK sin triptófanos de <i>M. burtonii</i> . .....	17
Tabla 2. Secuencias de los partidores para los PCR mutagénicos. ....	17
Tabla 3. Especificaciones para la inducción de cada proteína recombinante.....	20
Tabla 4. Pesos moleculares teóricos de las proteínas. ....	21
Tabla 5. Parámetros cinéticos de la actividad fosfofructoquinasa de las ADP-PFK/GK silvestre y mutantes de <i>M. maripaludis</i> con 1 mM de Mg <sup>2+</sup> libre a 25°C .....	40
Tabla 6. Parámetros cinéticos de la actividad glucoquinasa de <i>Mm</i> PFK/GK y <i>Mm</i> N203W con 1 mM de Mg <sup>2+</sup> libre a 25°C .....	41
Tabla 7. Parámetros cinéticos de la actividad fosfofructoquinasa de las ADP-PFK/GK silvestre y mutantes de <i>M. burtonii</i> con 1 mM de Mg <sup>2+</sup> libre a 25°C.. .....	44
Tabla 8. K <sub>SV</sub> para <i>Mbwt</i> y <i>Mmzwt</i> a 10°C y 25°C. ....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la ADP-GK de <i>Thermococcus litoralis</i> .....	2
Figura 2. Alineamiento estructural de los modelos por homología de las quinasas dependientes de ADP de <i>M. maripaludis</i> y <i>M. burtonii</i> .....	8
Figura 3. Comportamiento cinético de <i>Mb</i> PFK/GK y <i>Mm</i> PFK/GK.....	9
Figura 4. Residuos escogidos para ser mutados por triptófanos en las enzimas <i>Mb</i> PFK/GK y <i>Mm</i> PFK/GK, para realizar experimentos de apagamiento de fluorescencia intrínseca.....	11
Figura 5. Estructura de las <i>Mb</i> PFK/GK y <i>Mm</i> PFK/GK que muestra las relaciones entre los residuos escogidos para mutar y los residuos implicados en la catálisis.....	12
Figura 6. Purificación de <i>Mm</i> PFK/GK.....	30
Figura 7. Purificación de las mutantes <i>Mm</i> N203W y <i>Mm</i> V231W.....	31
Figura 8. Purificación de <i>Mb</i> PFK/GK.....	32
Figura 9. Purificación de las mutantes <i>Mb</i> 214W y <i>Mb</i> Y242W siguiendo el protocolo de la enzima silvestre.....	33
Figura 10. Purificación de las mutantes de <i>Mb</i> PFK/GK por una columna de afinidad de níquel, haciendo un gradiente lineal de imidazol.....	34
Figura 11. Precipitación con sulfato de amonio de <i>Mb</i> 214W.....	35



Figura 12. Purificación de <i>MbsW</i> y <i>Mb214W</i> por una columna de intercambio aniónico conectada en tándem con una columna de afinidad de níquel.....	36
Figura 13. Dependencia del pH de <i>MbPFK/GK</i> .....	37
Figura 14. Curvas de saturación para MgADP y fructosa-6-P de las ADP-PFK/GK silvestre y mutantes de <i>M. maripaludis</i> .....	39
Figura 15. Curvas de saturación para MgADP y glucosa de <i>MmPFK/GK</i> y <i>MmN203W</i> .....	41
Figura 16. Curvas de saturación para MgADP y fructosa-6-P de las ADP-PFK/GK silvestre y mutantes de <i>M. burtonii</i> .....	43
Figura 17. Alineamiento estructural de los modelos por homología de las ADP-PFK/GK de <i>M. mazei</i> y de <i>M. burtonii</i> .....	46
Figura 18. Purificación de <i>MmzPFK/GK</i> .....	46
Figura 19. Corte del hexapéptido de histidina de <i>MbPFK/GK</i> y <i>MmzPFK/GK</i> .....	47
Figura 20. Control de estabilidad de la fluorescencia intrínseca de las enzimas. ....	48
Figura 21. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca con acrilamida a baja temperatura. ....	49
Figura 22. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca con acrilamida a temperatura ambiente.....	50

Figura 23. Gráficos de Stern-Volmer del apagamiento de fluorescencia intrínseca por acrilamida para <i>Mb</i> PFK/GK y <i>Mmz</i> PFK/GK a 10°C y 25°C.....	52
Figura 24. Gráficos de la variación del apagamiento de acrilamida a 10°C y 25°C para <i>Mb</i> PFK/GK y <i>Mmz</i> PFK/GK.....	52
Figura 25. Espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de <i>MmN203W</i> en ausencia y en presencia de ligandos. ....	54
Figura 26. Posición del W181 con respecto al cambio estructural de <i>Mb</i> PFK/GK al unir ligando.....	56
Figura 27. Vista superior de <i>Mm</i> PFK/GK, mostrando la posición de V231.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADP-PFK/GK:** fosfofructoquinasa/glucoquinasa dependiente de ADP

**MbY242W:** mutante de la ADP-PFK/GK de *M. burtonii*, donde la tirosina 242 es reemplazada por un triptófano.

**MmV231V:** mutante de la ADP-PFK/GK de *M. maripaludis*, donde la valina 231 es reemplazada por un triptófano.

**Mb214W:** mutante de la ADP-PFK/GK de *M. burtonii*, en que se reinseta el triptófano 214.

**MmN203W:** mutante de la ADP-PFK/GK de *M. maripaludis*, donde la asparagina 203 es reemplazada por triptófano.

**fructosa-6-P:** fructosa-6-fosfato

**MgADP:** complejo metálico del ADP con Mg<sup>2+</sup>

**actividad PFK:** actividad fosfofructoquinasa

**actividad GK:** actividad glucoquinasa

**K<sub>M</sub>:** constante de Michaelis-Menten

**k<sub>cat</sub>:** constante catalítica

**k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>:** eficiencia catalítica

**MmzPFK/GK:** ADP-PFK/GK de *M. mazei*

**U:** Unidades enzimáticas, definidas como los  $\mu\text{mol}$  de producto generados por minuto ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )

**U/mg:** Unidades enzimáticas por mg de proteína

**K<sub>SV</sub>:** constante de Stern-Volmer

**F6P:** fructosa-6-P

## RESUMEN

Algunos miembros del reino Euryarchaeota presentan una modificación de la vía canónica de la glicólisis donde utilizan quinasas dependientes de ADP, en lugar de las convencionales quinasas dependientes de ATP. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia riboquinasa y se caracterizan estructuralmente por presentar un dominio mayor y un dominio menor, conectado mediante una bisagra. Los miembros de esta superfamilia se encuentran en organismos que habitan diversos ambientes en extremos de temperatura, constituyendo un modelo apropiado para estudiar la evolución de la psicofilicidad.

Este trabajo se centró en estudiar la flexibilidad conformacional de la enzima fosfofructoquinasa/glucoquinasa dependiente de ADP (ADP-PFK/GK) de *Methanococoides burtonii* como mecanismo de la adaptación al frío. Para ello, se propuso comparar la flexibilidad conformacional de un modelo psicrófilo y un modelo mesófilo, en condiciones de baja temperatura y de temperatura ambiente, utilizando como metodología el apagamiento de la fluorescencia intrínseca. Inicialmente se planteó como modelo mesófilo la ADP-PFK/GK de *Methanococcus maripaludis*, dado que este había sido utilizado en otros estudios de evolución a la psicofilicidad del laboratorio donde se realizó este trabajo. Sin embargo, las enzimas ADP-PFK/GK de los organismos *M. burtonii* y *M. maripaludis* no se pueden comparar directamente mediante fluorescencia intrínseca, puesto que la primera proteína contiene cinco triptófanos mientras que la segunda no posee ninguno. Por ello se generaron mediante PCR mutagénico, mutantes de cada enzima, colocando residuos de triptófano en la misma posición y en sitios estratégicos de la estructura proteica, los cuales

correspondieron al dominio mayor (mutantes *MbY242W* y *MmV231W*) y a la bisagra (mutantes *Mb214W* y *MmN203W*).

Posteriormente, se determinaron los parámetros cinéticos de las mutantes mediante espectrofotometría, observándose que se habían producido cambios significativos en ellos. Por otra parte, todas las mutantes de *M. burtonii* presentaron grandes dificultades en su purificación y resultaron ser más inestables que la enzima silvestre. No obstante, la mutante N203W de *M. maripaludis* (*MmN203W*) presentó cambios cinéticos interesantes con respecto a la enzima silvestre, habiendo una disminución en la  $K_M$  para fructosa-6-P y para MgADP en la actividad PFK, y una disminución en la  $K_M$  para glucosa en la actividad GK.

La búsqueda de un modelo mesófilo alternativo llevó a utilizar la ADP-PFK/GK del organismo mesófilo *Methanosarcina mazei*, la que también presenta cinco triptófanos en la misma posición que la enzima de *M. burtonii*. Experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca a 10°C y 25°C con las enzimas silvestres de *M. burtonii* y *M. mazei*, mostraron que al aumentar la temperatura, el modelo psicrófilo presenta un incremento en la flexibilidad, mientras que en el modelo mesófilo la flexibilidad se mantiene constante.

Por otra parte, *MmN203W* mostró ser capaz de sensar los tres ligandos que une esta enzima, presentando un aumento de la fluorescencia intrínseca al unir ADP y glucosa, y una disminución al unir fructosa-6-P. Esto, en conjunto con los cambios en las  $K_M$  de *MmN203W*, hace que esta mutante resulte un modelo útil para estudios posteriores que permitan analizar el mecanismo catalítico y la unión de sustratos en esta enzima.

## ABSTRACT

Some members of Euryarchaeota kingdom present a modified version of the canonical glycolytic pathway with the use of ADP-dependent kinases instead of the conventional ATP-dependent kinases. These enzymes belong to ribokinase superfamily and are structurally characterized for having a large domain and a small domain, connected by a hinge. Members of this superfamily are found in organisms that habit diverse extreme temperature environments, constituting an appropriate model for studying evolution of cold-adaptation.

The aim of this work was to study the conformational flexibility of the ADP-dependent phosphofructokinase/glucokinase (ADP-PFK/GK) of *Merhanococcoides burtonii* as a mechanism of cold adaptation. To reach this objective, it was proposed to compare the conformational flexibility of a psychrophilic model with a mesophilic model at low and room temperature, using intrinsic fluorescence quenching. Initially ADP-PFK/GK of *Methanococcus maripaludis* was the mesophilic model proposed as, since this one had been used in another studies of evolution of cold adaptation by the laboratory were this work was done. However, ADP-PFK/GK of *M. burtonii* and *M. maripaludis* cannot be directly compared by their intrinsic fluorescence properties since the first one has five tryptophan and the other protein has none. Considering this fact, mutants of each enzyme were generated by mutagenic PCR, inserting a tryptophan residue in same position and in strategic sites of protein structure: the large domain (*MbY242W* and *MmV231W* mutants) and the hinge (*Mb214W* and *MmN203W* mutants).

Then, kinetic parameters of the mutant enzymes were determined using spectrophotometric assays, being observed that they presented significant changes

between. On the other hand, all the *M. burtonii* mutant enzymes exhibited huge difficulties in their purification and were more unstable than the wildtype enzyme. Nonetheless, the *M. maripaludis* N203W mutant (*MmN203W*) displayed interesting changes in its kinetic parameters, showing a decrease in  $K_M$  for fructose-6-P and MgADP in the PFK activity and a decrease in the  $K_M$  for glucose in the GK activity, comparing with the wild type.

Searching of an alternative mesophilic model led us to use the ADP-PFK/GK of the mesophilic organism *Merhanosarcina mazei*, which also presents five tryptophan residues in the same position as in the *M. burtonii* enzyme. Intrinsic fluorescence quenching assays at 10°C and 25°C with wild type enzymes from *M. burtonii* and *M. mazei*, showed that an increase in temperature provokes an increase in the flexibility of the psychrophilic model, while the flexibility in the mesophilic model remains constant.

Otherwise, the *MmN203W* mutant was able to sense binding of their three ligands, showing an increment in the intrinsic fluorescence upon ADP and glucose binding, and a decrease upon fructose-6-P binding. These results, along with changes in the  $K_M$  values make this mutant very useful for future studies regarding the catalytic mechanism and substrate binding of this enzyme.

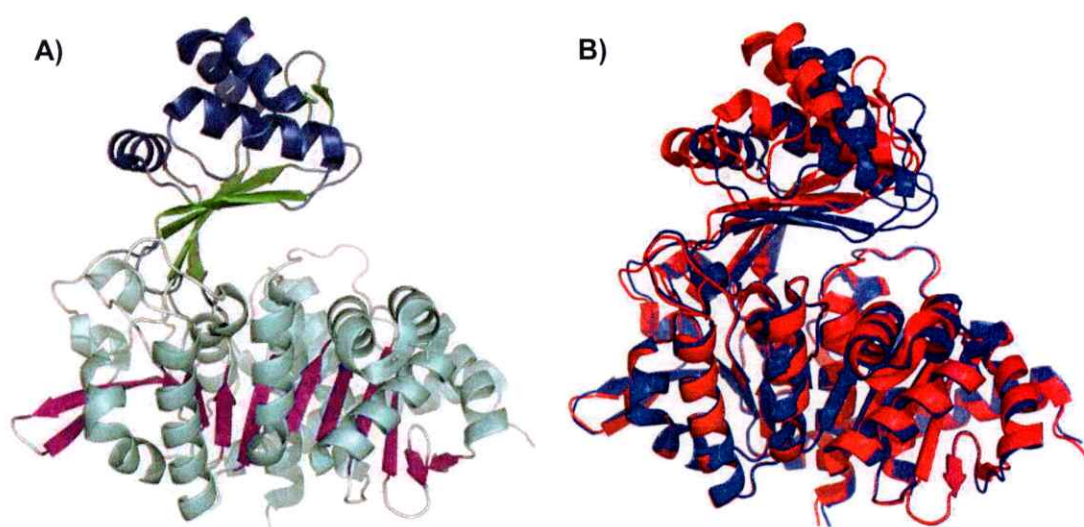
## INTRODUCCIÓN

Una de las vías más relevantes del metabolismo central es la glicólisis, cuya vía canónica es la de Embden-Meyerhof. Como en toda vía del metabolismo central, las enzimas implicadas en esta ruta se encuentran altamente conservadas entre distintos organismos. Sin embargo, algunos miembros del reino Euryarchaeota presentan una versión modificada de esta vía, conservando solo cuatro de las enzimas clásicas presentes en la vía canónica. Entre las modificaciones de esta vía destaca la presencia de quinasas dependientes de ADP en lugar de las convencionales quinasas dependientes de ATP, particularmente glucoquinasas dependientes de ADP (ADP-GKs) y fosfofructoquinasas dependientes de ADP (ADP-PFKs) (Rivas-Pardo y cols., 2013).

Dichas enzimas pertenecen a la superfamilia riboquinasa, en la cual todos los miembros de la superfamilia comparten un plegamiento tipo Rossmann, compuesto por ocho hebras  $\beta$  rodeadas por tres  $\alpha$ -hélices por un lado y cinco por el otro, lo cual conforma el denominado dominio mayor (Figura 1A). Además de esto, algunos miembros de esta superfamilia cuentan con un dominio extra, denominado dominio menor, el cual permite diferenciar a las tres clases de enzimas que componen la superfamilia. Por una parte, se tiene que las quinasas de vitaminas dependientes de ATP no presentan dominio menor, y por otra parte, en las quinasas de azúcares dependientes de ATP el dominio menor está constituido por hebras  $\beta$ , mientras que en las quinasas de azúcares dependientes de ADP dicho dominio está formado por cinco sábanas  $\beta$  con inserciones de  $\alpha$ -hélices, lo que deja al sitio activo entre los dos dominios (Figura 1A). De esta forma, el dominio menor puede actuar como una tapa



sobre el sitio activo, protegiendo a los sustratos de la hidrólisis por el solvente. Estudios detallados del mecanismo catalítico y de los cambios conformacionales asociados a la unión de ligandos de la glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis*, han establecido que en su forma apo la enzima se encuentra en una conformación abierta, mientras que al unir sus dos sustratos, ADP y glucosa, el dominio menor y el dominio mayor se mueven de modo tal que generan una conformación cerrada (Figura 1B). Al analizar la unión de cada ligando por separado, se tiene que la unión de ADP genera una conformación semi-cerrada, mientras que glucosa no se une a la enzima libre (Rivas-Pardo y cols., 2013).



**Figura 1. Estructura de la ADP-GK de *Thermococcus litoralis* (PDBID:4BR8)** **A)** Se observa en la región inferior el dominio mayor con plegamiento tipo Rossmann, formado por hebras  $\beta$  (morado) rodeadas por  $\alpha$ -hélices (celeste), y en la región superior el dominio menor, formado por cinco hebras  $\beta$  (verde) con inserciones de  $\alpha$ -hélices (azul). **B)** Superposición de las estructuras en la conformación abierta (sin ligando), en rojo (PDBID:4BR8) y cerrada (en presencia de ADP y glucosa), en azul (PDBID:4BS8).

Los distintos niveles de complejidad estructural que encontramos en las enzimas de la superfamilia, en conjunto con las diferentes especificidades de sustratos, llevan a que el estudio de la evolución de estas enzimas sea de alto interés. Asimismo, los miembros de esta superfamilia se encuentran en organismos que habitan diversos ambientes en extremos de temperatura, con lo que constituyen un modelo apropiado para estudiar la evolución de la psicofilicidad.

Las proteínas adaptadas al frío, denominadas *psicrófilas*, son sintetizadas por organismos que viven a bajas temperaturas desde un punto de vista antropocéntrico, colonizando ambientes que bordean los 0°C. Dichas condiciones de temperatura suelen disminuir la velocidad de las reacciones químicas, debido a que generan cambios en las propiedades fisicoquímicas de las soluciones, como el aumento de la viscosidad y el descenso de la velocidad de difusión de las moléculas. Por ello, la adaptación de las enzimas al frío resulta uno de los mecanismos adaptativos más esenciales de los organismos psicrófilos, permitiéndoles sustentar su metabolismo y ciclo celular al catalizar las reacciones biológicas a una velocidad apropiada para la vida (Feller, 2013).

La catálisis enzimática se caracteriza por ser un proceso altamente eficiente, aumentando significativamente la velocidad de las reacciones químicas. Esto se debe a la capacidad que tienen estas proteínas de unir una gran cantidad de moléculas de una manera altamente específica. Los sustratos se unen en el sitio activo de las enzimas, donde la disposición de aminoácidos en dicho sitio permite que los sustratos se orienten de una manera óptima para que se forme el estado de transición, el cual consiste en una molécula altamente inestable y con alta energía, que rápidamente colapsa y se transforma en producto. Mediante la estabilización del estado de

transición, las enzimas disminuyen la energía de activación requerida para alcanzar dicho estado, con el consecuente aumento en la velocidad de reacción (Berg y cols., 2008).

El modelo propuesto por Leonor Michaelis y Maud Menten, permite explicar de manera sencilla las propiedades cinéticas de las enzimas. En una solución con enzima (E) y sustrato (S) libres, se tiene que el o los sustratos se unen a la enzima, formando un complejo enzima-sustrato (ES) (Ecuación 1). Este complejo puede disociarse para volver a formar enzima y sustrato libres, o puede reaccionar para formar el o los productos (P), los cuales pueden volver a asociarse con la enzima y realizar la reacción reversa, formando el complejo enzima-sustrato. Cada uno de estos procesos está limitado por la constante de velocidad de cada reacción ( $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  y  $k_{-2}$ ) (Berg y cols., 2008).



Al caracterizar una enzima y la cinética que esta presenta, se utilizan distintos parámetros cinéticos que derivan del modelo mencionado, entre los que se encuentra la constante de Michaelis ( $K_M$ ), la cual se expresa como:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde  $k_1$  y  $k_{-1}$  representan las constantes de velocidad de la reacción directa y reversa de la formación de complejo enzima-sustrato a partir de enzima libre y sustrato, mientras que  $k_2$  representa la constante de velocidad de la formación de producto y enzima libre a partir del complejo enzima-sustrato. Los ensayos de cinética enzimática

miden las velocidades iniciales de la reacción, con lo cual la cantidad de producto es pequeña y el equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación de producto, razón por la cual la velocidad de la reacción inversa es despreciable, y  $k_2$  no es considerada.

Desde la Ecuación 2, se puede observar que en el caso de que  $k_2 \ll k_{-1}$ ,  $K_M$  se aproxima al valor de la constante de disociación del complejo enzima-sustrato. De esta manera, mientras mayor sea el valor de  $K_M$ , menor será la afinidad de la enzima por el sustrato.

Otros parámetros relevantes a evaluar, son la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y la constante catalítica ( $k_{cat}$ ). La velocidad máxima, es la que se obtiene cuando todos los sitios activos de las enzimas están ocupados por el sustrato, y por lo tanto, la cantidad de enzima total ( $E_T$ ) es igual a la cantidad de enzima asociada a sustrato, lo que matemáticamente se expresa como:

$$V_{max} = k_2 [E_T] \quad (\text{Ecuación 3})$$

Reordenando la Ecuación 3, se obtiene la expresión que define la  $k_{cat}$ :

$$k_{cat} = k_2 = \frac{V_{max}}{[E_T]} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Conceptualmente se puede definir a  $V_{max}$  como la cantidad de sustrato convertida en producto por unidad de tiempo, en condiciones saturantes de sustrato, mientras que la  $k_{cat}$  corresponde a la cantidad de sustrato convertida en producto por unidad de tiempo por molécula de enzima.

Con lo anterior se puede comprender que la razón  $k_{cat}/K_M$ , denominada eficiencia catalítica o constante de especificidad, permite comparar la eficiencia del proceso

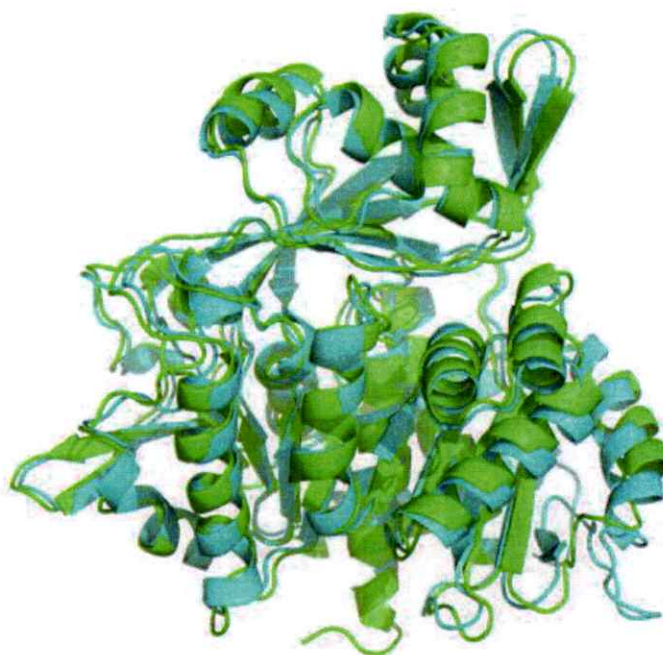
catalítico de distintas enzimas, o el recambio de una misma enzima frente a diferentes sustratos.

En el contexto de la adaptación de las enzimas al frío, los parámetros cinéticos mencionados permiten contrastar las características propias de las enzimas psicrófilas y mesófilas bajo distintas condiciones experimentales. A pesar de que los múltiples estudios realizados acerca de la evolución hacia la psicrofilicidad no han convergido en una estrategia común, una gran cantidad de estos da cuenta de que las enzimas adaptadas al frío tienen mayores  $K_M$  y  $k_{cat}$  (Siddiqui y Cavicchioli, 2006) y menores valores de  $k_{cat}/K_M$  (Feller, 2013) que sus contrapartes termoestables. Las teorías que argumentan este comportamiento atribuyen el aumento en la  $K_M$  a una estrategia de las enzimas psicrófilas por evolucionar a sitios activos más grandes y accesibles, que facilitarían el ingreso y acomodo del sustrato, y que en consecuencia, disminuirían su especificidad y afinidad por este. Otras evidencias experimentales indican que en las enzimas psicrófilas hay una disminución en la energía de activación de la reacción y una menor termoestabilidad de la proteína, muchas veces aumentada en el sitio activo (Siddiqui y Cavicchioli, 2006; Struvay y Feller, 2012; Feller, 2013; D'Amico y cols., 2003).

La menor termoestabilidad y especificidad de las enzimas adaptadas al frío implicaría la evolución de estas hacia una estructura más flexible. De esta manera, el aumento en la flexibilidad constituye un mecanismo común de adaptación al frío en las proteínas, donde el aumento de la flexibilidad puede corresponder a una característica de la estructura completa (flexibilidad global), o puede estar restringida a regiones específicas (flexibilidad local) (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Diversas enzimas psicrófilas como la fosfoglicerato quinasa de *Pseudomonas* sp. TACII18 (Bentahir y

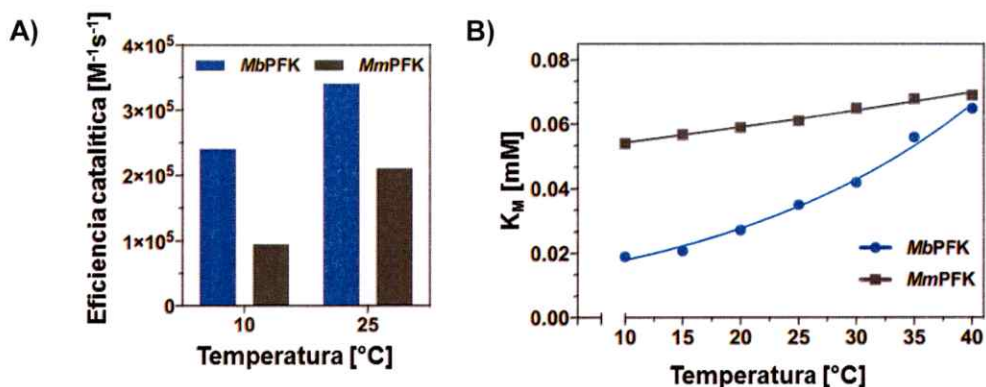
cols., 2000), la chitobiasa de *Arthrobacter* sp. TAD20 (Lonhienne y cols., 2001), la alcohol deshidrogenasa de *Moraxella* sp. TAE123 (Liang y cols., 2004), la tirosina fosfatasa de proteínas de una especie psicrófila de *Shewanella* sp. (Tsuruta y cols., 2005) y la uracil-DNA glicosilasa de bacalao del Atlántico (Olufsen y cols., 2005) poseen una mayor flexibilidad en la región del sitio activo.

No obstante lo anterior, como antecedente de este trabajo se había visto que en la familia de las quinasas ADP-dependientes la estrategia evolutiva para la adaptación al frío sería diferente. En el laboratorio donde se realizó este Seminario de Título se han realizado diversos estudios utilizando como modelo las quinasas dependientes de ADP de los microorganismos *Methanococcus maripaludis* y *Methanococcoides burtonii*, los cuales corresponden a arqueas metanogénicas mesófilas y psicrófilas, respectivamente. Estos microorganismos presentan una quinasa dependiente de ADP bifuncional (ADP-PFK/GK), capaz de fosforilar tanto fructosa-6-P como glucosa, siendo predominante la actividad PFK en ambas enzimas (Castro-Fernandez y cols., 2014; Zamora y cols., datos no publicados). Estas enzimas presentan un porcentaje de identidad del 36% entre sí y catalizan la misma reacción, además de presentar una gran similitud estructural de acuerdo a los modelos por homología (Figura 2). Por ello, resultaron candidatos apropiados para la realización de estudios comparativos entre homólogos mesófilos y psicrófilos que permitieran señalar aspectos claves en la adaptación de las enzimas al frío.



**Figura 2.** Alineamiento estructural de los modelos por homología de las quinasas dependientes de ADP de *M. maripaludis* (verde) (PMDDB ID: PM0079107) y *M. burtonii* (cian) (elaborado por Zamora, datos no publicados).

Los estudios cinéticos de las ADP-PFK/GK de *M. maripaludis* (*Mm*PFK/GK) y *M. burtonii* (*Mb*PFK/GK) dieron cuenta de que en la actividad PFK, la  $K_M$  y  $k_{cat}$  para fructosa-6-P son menores para *Mb*PFK/GK, tanto a 10°C como a 25°C, teniéndose una eficiencia catalítica mayor para la enzima psicrófila a ambas temperaturas (Figura 3A). A su vez, al estudiar el comportamiento de la  $K_M$  en un amplio rango de temperaturas, se observó que dicho parámetro tendía a disminuir con la temperatura en el caso de *Mb*PFK/GK, mientras que para *Mm*PFK/GK se mantenía más o menos constante (Figura 3B), lo que contrasta con el comportamiento observado para otras enzimas psicrófilas que presentan un aumento en la  $K_M$  con respecto a sus homólogos mesófilos.



**Figura 3. Comportamiento cinético de *MbPFK/GK* y *MmPFK/GK*.** A) Eficiencia catalítica de la enzima psicrófila *MbPFK/GK* (barras azules) y de la enzima mesófila *MmPFK/GK* (barras negras), a  $10^{\circ}C$  y  $25^{\circ}C$ . B)  $K_M$  de la enzima psicrófila *MbPFK/GK* (círculos azules) y la enzima mesófila *MmPFK/GK* (cuadrados negros) en función de la temperatura. Datos no publicados de Zamora y cols.

Los estudios de otros aspectos de estas enzimas, como la estabilidad estructural y los parámetros termodinámicos de transición, también arrojaron resultados atípicos, dando cuenta de que la psicrófila *MbPFK/GK* no presenta un sitio activo con menor termoestabilidad en contraste con el resto de la estructura proteica, así como tampoco presenta diferencias significativas en los parámetros termodinámicos de transición si se le compara con la mesófila *MmPFK/GK* (Zamora y cols., datos no publicados).

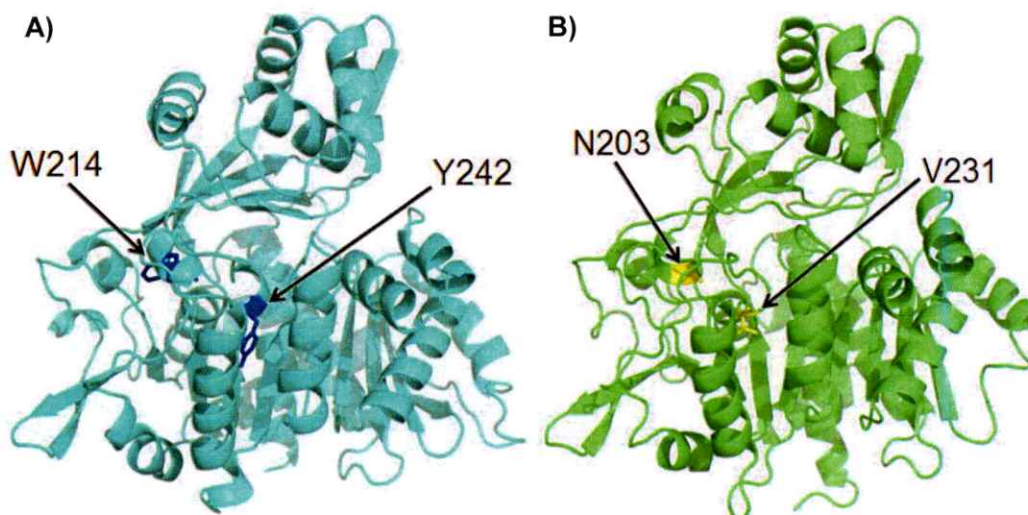
Dentro de este escenario, resultaba de gran valor realizar estudios de la flexibilidad de estas proteínas, puesto que como se mencionó previamente, el aumento en la flexibilidad es una característica que presentan la mayoría de las enzimas psicrófilas, y cabía preguntarse si este mecanismo también era utilizado por *MbPFK/GK* en la adaptación al frío. La flexibilidad puede ser estudiada mediante experimentos de intercambio hidrógeno/deuterio y mediante apagamientos de fluorescencia intrínseca. Esta última técnica consiste básicamente en ir agregando distintas concentraciones de un apagador, como acrilamida, mientras se miden los cambios de fluorescencia



intrínseca de la proteína, proveniente de residuos de aminoácidos que presentan fluorescencia, como triptófano. El apagador colisiona con estos residuos de la proteína produciendo la disminución progresiva de su fluorescencia intrínseca, dando cuenta de la capacidad que tiene el apagador de penetrar la estructura proteica. De este modo, se puede considerar al apagamiento de la fluorescencia como una medición de la permeabilidad de la proteína, la cual estaría directamente relacionada con la flexibilidad de esta (Eftink y Ghiron, 1976; Lakovicz, 2006).

Sin embargo, las *MbPFK/GK* y *MmPFK/GK* no podían ser estudiadas mediante la mencionada técnica, ya que mientras la enzima de *M. burtonii* posee cinco triptófanos en su estructura, la enzima de *M. maripaludis* no presenta ninguno. Esto llevó a que el objetivo de este Seminario de Título consistiera en el estudio de la adaptación al frío en las ADP-PFK/GK, mediante la generación de mutantes de *MbPFK/GK* y *MmPFK/GK* que permitieran realizar estudios de apagamiento de la fluorescencia intrínseca, para contrastar la flexibilidad proteica de un modelo mesófilo y un modelo psicrófilo.

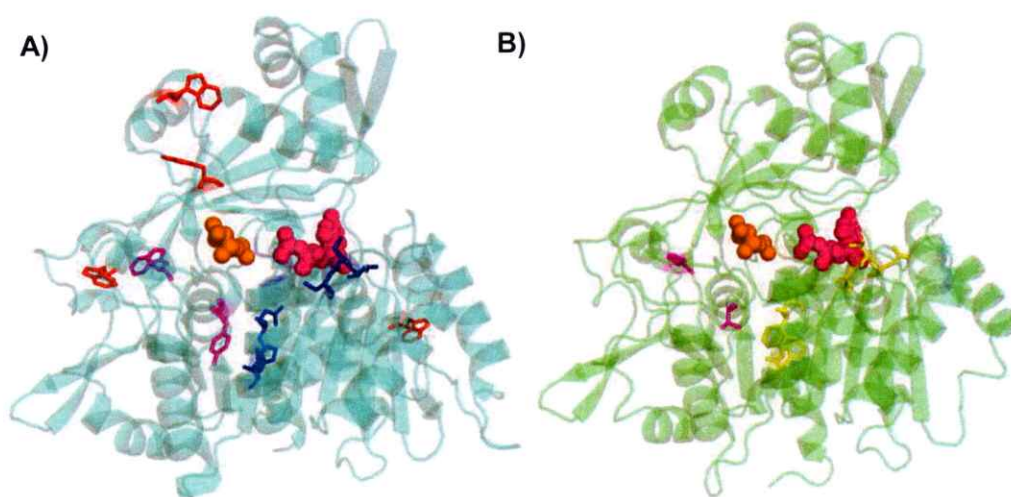
De esta manera, se diseñó un par de mutantes para cada enzima, a fin de obtener mutantes con un triptófano en la bisagra que conecta los dos dominios proteicos (residuos W214 y N203 en *MbPFK/GK* y *MmPFK/GK*) y otras mutantes con un triptófano en el interior del dominio mayor (residuos Y242 y V231 en *MbPFK/GK* y *MmPFK/GK*), como se muestra en la Figura 4. Para esto, además, fue preciso diseñar una mutante basal de *MbPFK/GK* que no tuviese triptófanos, a fin de que estos no interfirieran en la señal de fluorescencia, y a partir de esta enzima generar las inserciones de triptófano en los sitios escogidos.



**Figura 4. Residuos escogidos para ser mutados por triptófanos en las enzimas *MbPFK/GK* (A) y *MmPFK/GK* (B), para realizar experimentos de apagamiento de fluorescencia intrínseca. Los residuos se indican en color azul para *MbPFK/GK* y amarillo para *MmPFK/GK*, y se muestran en forma de varillas. Para simplificar, se muestran las dos posiciones escogidas en la misma estructura, a pesar de haber sido escogidas para generar mutantes independientes. Cabe destacar que en la posición 214 de *MbPFK/GK* hay un triptófano, sin embargo, este triptófano tuvo que ser reinsertado en una mutante basal que no tenía triptófanos.**

Los triptófanos en la posición 242/231 de *MbPFK/GK* y *MmPFK/GK*, respectivamente, permitirían analizar la flexibilidad del dominio mayor, puesto que los triptófanos se encontrarían insertos en el interior de dicho dominio, y el efecto de apagamiento habría sentido la permeabilidad que presentaba la proteína en dicha región. En cambio, los triptófanos en la posición 214 de *MbPFK/GK* y 203 de *MmPFK/GK* permitirían analizar la flexibilidad de movimiento entre el dominio menor y mayor, la cual se vería influenciada por la unión de ligando, que hace cambiar a la estructura proteica desde una conformación abierta a una conformación cerrada, pasando por una conformación semi-cerrada, como se mencionó anteriormente.

Cabe destacar que los residuos que se postuló mutar, no forman parte de los motivos NXXE, HXE y GXGD que se encuentran altamente conservados en la familia de las ADP-quinazas y que han sido asociados con la catálisis por diversos estudios (Abarca-Lagunas y cols., 2015; Castro-Fernández y cols., 2014; Guixé y Merino, 2009). Tampoco parecieran interactuar directamente con los residuos de dichos motivos, ni con los sustratos, como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5. Estructura de las *MbPFK/GK* (A) y *MmPFK/GK* (B) que muestra las relaciones entre los residuos escogidos para mutar y los residuos implicados en la catálisis.** En ambos se muestra como referencia el ADP (fucsia) y glucosa (naranja) de la glucoquinasa ADP-dependiente de *Thermococcus litoralis* en modelo de esferas (PDB ID 1GC5 y 4B8S). En azul (*MbPFK/GK*) y amarillo (*MmPFK/GK*) se muestran los residuos pertenecientes a los motivos altamente conservados en la familia de las quinazas ADP-dependientes y asociados con la catálisis. En *MbPFK/GK* se muestran en rojo los triptófanos eliminados y en magenta el triptófano que sería reinsertado y la tirosina que sería mutada por triptófano. En *MmPFK/GK* se muestra en magenta la asparagina y valina que serían mutadas por triptófanos.

No obstante lo anterior, ensayos de docking realizados con el modelo de homología de *Mm*PFK/GK en el trabajo de Castro-Fernández y cols. (2014) habían dado cuenta de que el residuo N203 se encontraba en la región de 5Å de distancia con el sustrato fructosa-6-P, mientras que no se presentaba en dicha región con el sustrato glucosa, lo que sugería que dicho residuo podría tener alguna relación con la especificidad por sustrato. Sin embargo, en ese mismo trabajo, al analizar la presencia de este residuo en distintos miembros de la familia de las quinasas ADP-dependientes, se observó que dicho residuo estaba ausente en todas las PFKs de los órdenes Methanosarcinales y Thermococcales, lo que sugería que este residuo no tenía un rol clave en la especificidad por sustrato, ni presentaba indicios claros de interactuar con fructosa-6-P.

Ante lo expuesto previamente, en este Seminario de Título se realizó la generación de mutantes puntuales de *Mb*PFK/GK y *Mm*PFK/GK con residuos de triptófano en la bisagra o en el dominio mayor, para poder contrastar la flexibilidad de una enzima mesófila y psicrófila bajo distintas temperaturas.

### **Hipótesis**

La enzima ADP-PFK/GK del psicrófilo *M. burtonii* presenta una mayor flexibilidad que la enzima homóloga del mesófilo *M. maripaludis*, tanto en condiciones de baja temperatura como en condiciones de temperatura ambiente.

### **Objetivo general**

Analizar la flexibilidad de las ADP-PFK/GK de los organismos *M. burtonii* y *M. maripaludis* en relación con la adaptación al frío, mediante la permeabilidad que presentan a un apagador de fluorescencia intrínseca.



**Objetivos específicos**

- ❖ Generar y purificar mutantes de las ADP-PFK/GK de *M. maripaludis* y *M. burtonii* con triptófanos en posiciones específicas que permitan realizar experimentos de apagamiento de fluorescencia.
- ❖ Determinar los parámetros cinéticos de las enzimas mutantes de *M. maripaludis* y *M. burtonii*, y contrastar estos con los de la enzima silvestre de cada organismo, a fin de corroborar que las mutaciones generadas no presenten alteraciones significativas en estos parámetros.
- ❖ Analizar la flexibilidad de las mutantes generadas mediante ensayos de apagamiento de fluorescencia intrínseca por acrilamida realizados en condiciones de baja temperatura (10°C) y a temperatura ambiente (25°C).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Materiales.** Los reactivos utilizados fueron obtenidos de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich, Merck, Bio-Rad, USBiological, Promega, New England BioLabs) y fueron utilizados con el grado de pureza (técnico o analítico) pertinente a cada experimento. Para los experimentos de fluorescencia, todas las soluciones fueron preparadas con reactivos de la mayor pureza disponible y agua nanopura, y filtradas con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Para las mediciones espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett Packard/Aligent modelo 8453, mientras que para las mediciones de fluorescencia se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-50.

**Determinación de la concentración de los sustratos.** Los reactivos glucosa y ADP fueron titulados con ensayos espectrofotométricos estandarizados utilizando la enzima ADP-GK de *T. litoralis*, mientras que la fructosa-6-P con la enzima ADP-PFK/GK de *M. maripaludis*, utilizando los co-sustratos en concentraciones saturantes. La concentración de proteínas fue determinada mediante el Método de Bradford, utilizando el ensayo Bio-Rad protein assay de Bio-Rad (Hercules, California, Estados Unidos) y un estándar de BSA de Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

**Diseño de las mutantes.** Puesto que las enzimas *Mb*PFK/GK y *Mm*PFK/GK presentan una alta similitud estructural y catalizan la misma reacción, se podía pensar que la inserción de un triptófano en *Mm*PFK/GK en la misma posición en la que *Mb*PFK/GK posee un triptófano, no generaría cambios significativos en la estructura y proceso catalítico de *Mm*PFK/GK. Por otra parte, es práctica frecuente reemplazar un residuo aminoacídico por otro que posea propiedades químicas y volúmenes equivalentes, pretendiendo de esta manera realizar mutaciones que produzcan una mínima alteración en la proteína. Bajo estos criterios es que se analizaron los residuos de aminoácidos aromáticos presentes en la estructura de *Mb*PFK/GK, y se seleccionaron dos de estos que estuviesen en regiones de interés para estudiar la accesibilidad de apagadores a dichos sitios. Así, se escogieron para ser preservados o mutados por triptófano, de manera independiente, los residuos W214 y Y242 de *Mb*PFK/GK, que se ubican respectivamente en la bisagra que conecta los dominios proteicos y en el dominio mayor, y corresponden a los residuos N203 y V231 en *Mm*PFK/GK (Figura 4). De esta manera, se generó un par de mutantes que tenía un triptófano en la posición 203/214, y otro que tenía un triptófano en la posición 231/242, las cuales de aquí en adelante serán referidas como *Mm*N203W, *Mb*214W, *Mm*V231W y *Mb*Y242W.

Además de lo anterior, era preciso eliminar los demás triptófanos de la enzima *Mb*PFK/GK, a fin de que estos no interfirieran con la señal de fluorescencia de los residuos escogidos. Por ello, se diseñó una mutante basal de *Mb*PFK/GK a la cual se le eliminaron todos los triptófanos (de aquí en adelante *Mbs*W, por "*M. burtonii* sin triptófanos").

Para elegir el residuo de aminoácido que reemplazaría a cada triptófano, se analizaron las secuencias de múltiples quinasas dependientes de ADP de otras arqueas, entre

ellas *M. maripaludis*, y se determinó cuál era el aminoácido más conservado en la posición de cada triptófano en la enzima de *M. burtonii*, Estos aminoácidos fueron los escogidos para realizar el reemplazo y se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Residuo de aminoácido original y reemplazante para la ADP-PFK/GK sin triptófanos de *M. burtonii*.

Aminoácido original y su posición	Aminoácido reemplazante y su posición
W5	F5
W101	F101
W137	F137
W181	F181
W214	N214

**Mutaciones puntuales.** Para la generación de las mutantes puntuales, se diseñaron los partidores que se muestran en la Tabla 2, de acuerdo al protocolo de mutagénesis sitio dirigida de GeneTailor™.

Tabla 2. Secuencias de los partidores para los PCR mutagénicos. Secuencias de los partidores sentido o "forward" (F) y antisentido o "reverse" (R) para generar las mutantes *MmN203W*, *MmV231W*, *Mb214W* y *MbY242W*. Las mutantes de la *MbPFK/GK* fueron generadas a partir de la mutante *MbsW*.

Partidor	Secuencia
<i>MmN203W_F</i>	5'-GCG TCG CGT CCG GAA TGG CTG CGC ATT G-3'
<i>MmN203W_R</i>	5'-TTC CGG ACG CGA CGC AAC AAT GAA GCG ATT TG -3'
<i>MmV231W_F</i>	5'-GCA ATT ATC TCC GGT TGG CAA GCT ATC A -3'
<i>MmV231W_R</i>	5'-ACC GGA GAT AAT TGC GCA ATC AAC CAG -3'
<i>MbF214W_F</i>	5'-CAG CTC TCG TCC GAA ATG GAT TCG CAT CG -3'
<i>MbF214W_R</i>	5'-TTT CGG ACG AGA GCT GAT AAT CAG GCG GTT ATC A -3'
<i>MbY242W_F</i>	5'- GCG CTG CTG GCC GGT TGG CAA ATG ATC A-3'
<i>MbY242W_R</i>	5'- ACC GGC CAG CAG CGC GCC ATC AAT GTT-3'



Posteriormente, se realizó el PCR mutagénico utilizando el kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis de Stratagene (La Jolla, California, Estados Unidos), siguiendo el protocolo del fabricante. El kit mencionado utiliza la ADN polimerasa de alta fidelidad *Pfu* ultra II y la endonucleasa *DpnI*, lo que disminuye la posibilidad de generar mutaciones indeseadas, y permite digerir el ADN metilado o hemimetilado, pudiendo de este modo digerir selectivamente las hebras del ADN templado del PCR. De acuerdo al caso, se utilizó como ADN templado el gen codificante para la ADP-PFK/GK de *M. maripaludis* inserto en el plásmido pET-TEV, o el gen codificante para la ADP-PFK/GK sin triptófanos de *M. burtonii* inserto en el plásmido pET-15b. El plásmido pET-TEV consiste en una versión modificada del plásmido pET-28a, que permite la inserción de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína con un sitio de corte para la proteasa TEV y otorga resistencia al antibiótico kanamicina. Por su parte, el plásmido pET-15b permite la inserción de seis histidinas en el extremo N-terminal, con un sitio de corte para trombina, y otorga resistencia a ampicilina. Ambos plásmidos poseen sitios de clonamiento múltiple para *NdeI* y *BamHI*. En todos los PCR se realizaron controles negativos, los cuales recibieron el mismo tratamiento, con la excepción de que no se les agregaron los partidores (control negativo de partidores) o el plásmido templado (control negativo de templado). Los productos de PCR tratados con *DpnI* fueron transformados en la cepa DH5 $\alpha$  de *E.coli*, con la consecuente extracción de DNA plasmidial utilizando el kit E.Z.N.A. plasmid DNA Mini Kit II de Omega Bio-tek (Norcross, Georgia, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. La generación exitosa de las mutaciones y la ausencia de mutaciones no deseadas se corroboró por secuenciación automática de los respectivos genes, realizada por MacroGen Inc. (Séul, Corea del Sur).

**Mutante sin triptófano de MbPFK/GK.** El gen codificante para la mutante *MbsW*, optimizado para su expresión en *E. coli*, fue sintetizado y subclonado por la empresa GenScript (Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos) en el plásmido pET-15b.

**Obtención de proteínas recombinantes en *E. coli*.** Para la obtención de las proteínas recombinantes de las ADP-PFK/GK silvestres y mutantes de *M. maripaludis*, *M. burtonii* y *M. mazei*, se transformó la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* con los plásmidos pertinentes y se creció en medio LB suplementado con kanamicina a 35 µg/mL o ampicilina 100 µg/mL a 37°C hasta alcanzar el OD<sub>600</sub> pertinente (véase la Tabla 3). Luego se indujo la expresión de la proteína a la temperatura correspondiente (Tabla 3) por toda la noche, suplementando el medio de crecimiento con el análogo de lactosa IPTG (isopropil β-D-galactopiranosido) a 1 mM. Las células fueron separadas del medio de crecimiento mediante centrifugación (4.260 g por 10 minutos), y resuspendidas en amortiguador de carga Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. A la solución con células resuspendidas se le agregó PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM para inhibir la acción de proteasas, y en el caso de las enzimas silvestre y mutantes de *M. burtonii* se agregó además β-mercaptoetanol 1 mM, agente reductor que previene la formación de puentes disulfuro. Finalmente, las células fueron lisadas por sonicación, utilizando una sonda de sonicación de 0,5 cm de diámetro, efectuando 30 ciclos de 20 segundos de pulso, seguido de 50 segundos de descanso, con una amplitud del 30% y manteniendo la muestra en hielo para evitar que se sobrecalentara.

Tabla 3. Especificaciones para la inducción de cada proteína recombinante. Para las mutantes de *Mb*PFK/GK se probaron dos OD<sub>600</sub> de inducción. En negrita se indica la que fue utilizada.

Proteínas	Vector de expresión	Antibiótico	OD <sub>600</sub>	T° inducción [°C]
<i>Mm</i> PFK/GK, <i>Mm</i> N203W, <i>Mm</i> V231W	pET-TEV	Kanamicina	0,4	37
<i>Mb</i> PFK/GK	pET-TEV	Kanamicina	1	14
<i>Mbs</i> W, <i>Mb</i> 214W, <i>Mb</i> Y242W	pET-15b	Ampicilina	1/ 1,8	14
<i>Mmz</i> PFK/GK	pET-TEV	Kanamicina	0,6	30

**Purificación de proteínas recombinantes mediante columna de afinidad de níquel.** El lisado celular obtenido en el procedimiento anterior fue sometido a una centrifugación de 47.360 g por 15 minutos para separar los componentes celulares solubles de los insolubles, y la fracción soluble fue cargada en una columna de afinidad de níquel (HisTrap HP, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). La columna fue lavada con 100 mL de amortiguador de carga Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM y posteriormente la proteína fue eluida con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM, colectando fracciones de 1,5-2 mL, y seleccionando aquellas que presentaban actividad enzimática. En las purificaciones de las enzimas de *M. burtonii* y *M. mazei* se agregó β-mercaptoetanol 1 mM a los amortiguadores de carga y elución, y en el caso de *M. burtonii*, además, se mantuvieron las muestras en hielo.

**Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de intercambio aniónico.** La muestra de proteína purificada mediante columna de afinidad de níquel fue dializada contra amortiguador de carga Tris-HCl 25 mM pH 7,8 y MgCl<sub>2</sub> 5 mM por toda la noche, para luego ser cargada a una columna de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Luego de lavar la columna con 100 mL de amortiguador de carga, la proteína fue eluida con amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 7,8, NaCl 1M y MgCl<sub>2</sub> 5 mM, colectando fracciones de 1,5-2 mL y seleccionando aquellas que presentaban actividad enzimática. En los procesos llevados a cabo con las enzimas de *M. burtonii* se agregó β-mercaptoetanol 1 mM a todos los amortiguadores utilizados, y se mantuvo la muestra en hielo o a 4°C.

**Análisis de la pureza de las proteínas.** La pureza de las muestras obtenidas luego de cada paso de purificación fue analizada por SDS/PAGE teñido con Azul de Coomassie, donde la banda correspondiente a las enzimas se observaba entre los 51-62 kD, con respecto al estándar de peso molecular, lo que se correspondía con los pesos teóricos de las proteínas (Tabla 4).

**Tabla 4. Pesos moleculares teóricos de las proteínas.** Los pesos moleculares teóricos fueron calculados con la herramienta ProtParam del servidor ExpASy (<http://www.expasy.org>).

Proteína	Peso molecular teórico [kDa]
<i>Mm</i> PFK/GK	52,7
<i>Mm</i> N203W	52,7
<i>Mm</i> V231W	52,8
<i>Mb</i> PFK/GK	54,1
<i>Mbs</i> W	53,9
<i>Mb</i> 214W	54,0
<i>Mb</i> Y242W	54,0
<i>Mmz</i> PFK/GK	55,3

**Almacenamiento de las proteínas.** Las muestras de proteína pura fueron dializadas contra amortiguador Pipes 25 mM pH 6,5 y  $MgCl_2$  5 mM, y almacenadas con glicerol al 50% a  $-20^\circ C$  en el caso de las enzimas *Mm*PFK/GK, *Mm*N203W y *Mm*V231W, mientras que en el caso de las enzimas *Mb*PFK/GK, *Mbs*W, *Mb*214W, *Mb*Y242W y *Mmz*PFK/GK, las muestras fueron dializadas contra amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 500 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM y  $MgCl_2$  5 mM, y almacenadas con glicerol al 50% y DTT (ditiotreitól) 1 mM a  $4^\circ C$  o  $-20^\circ C$ . El DTT es un agente reductor que previene la formación de puentes disulfuro, pero al ser menos volátil que  $\beta$ -mercaptoetanol, resulta más apropiado para el almacenamiento de proteínas.

**Precipitación por sulfato de amonio.** Los ensayos se llevaron a cabo a  $4^\circ C$  en una solución con amortiguador TrisHCl 50 mM pH 7,8, NaCl 500 mM y  $MgCl_2$  5 mM y enzima previamente purificada por una columna de afinidad de níquel. A dicha solución se le fue agregando gradualmente cierta cantidad de sulfato de amonio de modo tal que la solución quedase con un determinado porcentaje de saturación de dicha sal, y una vez que esta quedaba totalmente disuelta, se dejaba incubar por 10-15 minutos, para posteriormente centrifugar por 15 minutos a 18.620 g a  $4^\circ C$  en microcentrífuga. Luego, el pellet se resuspendía con el amortiguador mencionado previamente y se medía la actividad enzimática que identificaba en qué fracción había quedado la enzima. Si esta aún no precipitaba, se procedía a repetir el proceso agregando más sulfato de amonio, de modo tal que quedase una solución con un porcentaje de saturación mayor, y se repetía el procedimiento de precipitación, hasta que finalmente se identificase la presencia de la enzima en la fracción insoluble o pellet. La cantidad de sulfato de amonio a agregar para obtener determinado porcentaje, se calculó

utilizando la herramienta online Ammonium Sulfate Calculator de EnCor Biotechnology Inc. ([www.encorbio.com](http://www.encorbio.com)).

**Purificación de proteínas recombinantes mediante columna de intercambio aniónico conectada en tándem a columna de afinidad de níquel.** Se crecieron células transformadas de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* del mismo modo en que se especificó previamente. Las células colectadas por centrifugación se resuspendieron en amortiguador de carga Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 20 mM, imidazol 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM y  $MgCl_2$  5 mM, y fueron lisadas por sonicación, seguido de una centrifugación para separar las fracciones celulares, realizando los procesos de centrifugación y sonicación de la misma manera en que se había realizado anteriormente. La fracción soluble fue cargada en una columna de intercambio aniónico, la cual fue lavada con 100 mL de amortiguador de carga, y posteriormente la proteína fue eluida con un gradiente lineal de 20 mM a 500 mM de NaCl. Dicho eluido fue directamente cargado a una columna de afinidad de níquel conectada en tándem a la columna de intercambio iónico. La segunda columna fue lavada con 100 mL de su respectivo amortiguador de carga Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1mM y  $MgCl_2$  5 mM, y la proteína fue eluida con un gradiente lineal de 20 mM a 500 mM de imidazol, colectando fraccionés de 1,5-2mL, y seleccionando las que presentaban actividad enzimática. Dado que este protocolo se utilizó para las enzimas de *M. burtonii*, se mantuvieron las muestras en hielo.



**Medición de la actividad enzimática.** La actividad fosfofructoquinasa se midió espectrofotométricamente de acuerdo al método descrito por Kengen y cols. (1994), el cual permite medir la oxidación de NADH a 340 nm, utilizando un ensayo acoplado con las enzimas auxiliares  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa y fructosa-1,6-bisfosfato aldosa de músculo de conejo de Sigma-Aldrich Co. (San Luis, Misuri, Estados Unidos), las cuales fueron agregadas en cantidades de 1,96 U, 19,6 U y 0,52 U, respectivamente, donde U corresponde a Unidades enzimáticas. Para el ensayo se utilizó amortiguador Pipes 25 mM pH 6,5, NADH 0,2 mM y los sustratos MgADP y fructosa-6-P en concentraciones saturantes, o en el caso de que la enzima presentase inhibición por sustrato, una concentración de estos donde la enzima presentaba un alto porcentaje de actividad enzimática ( $\geq 80\%$  con respecto a la velocidad máxima) y no presentaba inhibición. Dado que el  $Mg^{2+}$  forma complejos con el ADP, en todos los ensayos se utilizó una concentración constante de 1 mM de  $Mg^{2+}$  libre ( $MgCl_2$ ), considerando una  $K_D$  de 676  $\mu M$  para la formación del complejo Mg-ADP.

La actividad glucoquinasa se midió espectrofotométricamente siguiendo la reducción de  $NAD^+$  a 340 nm, utilizando un ensayo acoplado con la enzima auxiliar glucosa-6-P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, agregada en cantidades de 2-5U. Se utilizó amortiguador Pipes 25 mM pH 6,8,  $Mg^{2+}$  libre 1 mM ( $MgCl_2$ ), 0,5 mM de  $NAD^+$  y los sustratos MgADP y glucosa en concentraciones saturantes o de un alto porcentaje de actividad enzimática ( $\geq 80\%$  con respecto a la velocidad máxima) en aquellas situaciones en que había inhibición por sustrato.

Las reacciones fueron iniciadas agregando la enzima a las soluciones con todos los reactivos mencionados, previamente aclimatadas a 25°C (excepto en el caso de *MmzPFK/GK*, donde las reacciones se midieron a 40°C). Para el cálculo de las

velocidades iniciales se utilizó la pendiente de la curva de progreso, y el coeficiente de extinción a 340 nm de NADH de valor de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , para finalmente expresar la velocidad inicial en Unidades enzimáticas por mg de proteína (U/mg), donde las Unidades enzimáticas se definen como los  $\mu\text{mol}$  de producto generados por minuto ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ). Para los cálculos de las  $k_{\text{cat}}$  a partir de  $V_{\text{máx}}$ , se utilizaron los pesos moleculares teóricos, especificados en la Tabla 4.

#### **Dependencia de la actividad de la ADP-PFK/GK silvestre de *M. burtonii* con el pH.**

Se determinó la actividad de la enzima en función del pH midiendo la actividad fosfofructoquinasa espectrofotométricamente, reemplazando el amortiguador Pipes por los siguientes amortiguadores: amortiguador ácido acético 25 mM para el pH 5,5; amortiguador Pipes 25 mM para los pH 6,0; 6,5 y 7,0 y amortiguador Tris-HCl 25 mM para los pH 7,3 y 7,8.

**Determinación de los parámetros cinéticos.** Se realizaron estudios de velocidad inicial para determinar los parámetros cinéticos de la actividad fosfofructoquinasa de las enzimas silvestres y mutantes de *M. maripaludis* y *M. burtonii*, y de la actividad glucoquinasa de la mutante *MmN203W* y su respectiva enzima silvestre. Las concentraciones de cada sustrato se fueron variando mientras se mantenía una concentración saturante o cercana a la saturación ( $\geq 80\%$  con respecto a la velocidad máxima) del co-sustrato. Cada medición fue realizada en triplicado, o se realizó dos veces el ensayo completo, con excepción de los ensayos de actividad glucoquinasa y los de la mutante *MbsW*, los cuales fueron realizados una sola vez cubriendo un amplio



intervalo de mediciones. Los resultados fueron analizados mediante regresión no lineal con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos) y ajustados a los modelos Michaelis-Menten o de Inhibición por sustrato.

**Eliminación del hexapéptido de histidina de las ADP-PFK/GK silvestres de *M. burtonii* y *M. mazei*.** Se utilizó la proteasa TEV recombinante producida en el laboratorio, en una solución con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,8, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5 mM y DTT 1 mM, a la cual se agregó la enzima con el hexapéptido de histidina a una concentración final de 0,2 mg/mL. Para el caso de la ADP-PFK/GK de *M. burtonii* se agregó la proteasa TEV en una razón de 1:25 con respecto a *Mb*PFK/GK y se dejó la reacción durante toda la noche con agitación leve a 4°C. Para la ADP-PFK/GK de *M. mazei* se agregó la proteasa TEV en una razón de 1:3 con respecto a *Mmz*PFK/GK y se dejó la reacción por 2 horas a temperatura ambiente con agitación leve. Finalmente, las muestras con TEV y enzima fueron cargadas en una columna de afinidad por níquel, con lo que las enzimas cuyo hexapéptido de histidina no había sido eliminado y la misma TEV quedaban adsorbidas a la resina de la columna, mientras que las enzimas sin hexapéptido de histidina pasaban por la columna sin quedarse adsorbida a esta y eran colectadas. La presencia de las enzimas en dicho colectado y su grado de pureza, se evaluó midiendo la actividad enzimática y mediante SDS/PAGE teñido con Azul de Coomassie.

**Apagamiento de fluorescencia por acrilamida de las ADP-PFK/GK silvestre de *M. burtonii* y *M. mazei*.** Los ensayos se realizaron a 10°C y 25°C para ambas enzimas, utilizando una concentración entre 4-5 µM. Las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 295 nm, para limitar la excitación a los triptófanos, con un ancho de banda de excitación de 5 nm, y se registró el espectro de emisión entre 305 y 500 nm, con un ancho de banda de emisión de 5 nm. El espectro de emisión fue corregido restando el espectro de la solución amortiguadora libre de proteína. Dicha solución consistió en Pipes 25 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Para los apagamientos se fueron agregando a la muestra con amortiguador y proteína pequeñas alícuotas de una solución de acrilamida 5 M. En cada ensayo se realizó un control de la estabilidad de la fluorescencia intrínseca en el tiempo.

Los datos obtenidos fueron normalizados por la dilución de la proteína y por la cantidad de proteína agregada a fin de que fueran comparables, y graficados de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde  $F_0$  corresponde a la intensidad de fluorescencia en ausencia de apagador,  $F$  corresponde a la intensidad de fluorescencia a una determinada concentración de apagador  $Q$ ,  $K_{SV}$  corresponde a la denominada constante de Stern-Volmer, y  $[Q]$  es la concentración de apagador, en este caso, acrilamida.

Finalmente se determinaron las  $K_{SV}$ , correspondientes a la pendiente del gráfico de Stern-Volmer, mediante regresión lineal con el programa GraphPad Prism 5.0. Con el mismo programa se realizó un Análisis de Varianza de una vía seguido de una prueba

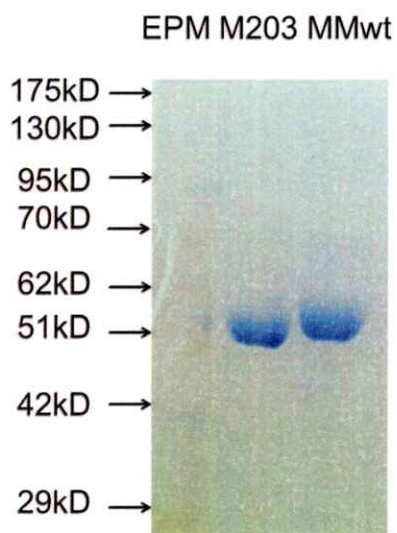
de Tukey para determinar si las  $K_{SV}$  presentaban diferencias estadísticamente significativas.

**Estudios de unión de ligando de la mutante *MmN203W* por fluorescencia intrínseca.** Los ensayos se realizaron a 25°C, añadiendo alícuotas de una solución concentrada de ligando de modo tal que este quedara en concentraciones saturantes. La concentración de proteína usada fue entre 16-17  $\mu\text{M}$ . Las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 295 nm, con un ancho de banda de excitación de 5 nm, y se registró el espectro de emisión entre 305 y 500 nm, con un ancho de banda de emisión de 10 nm. El espectro de emisión fue corregido y los datos fueron normalizados como los descritos anteriormente. Se realizó además un control de la estabilidad de la fluorescencia intrínseca a lo largo del tiempo.

## RESULTADOS

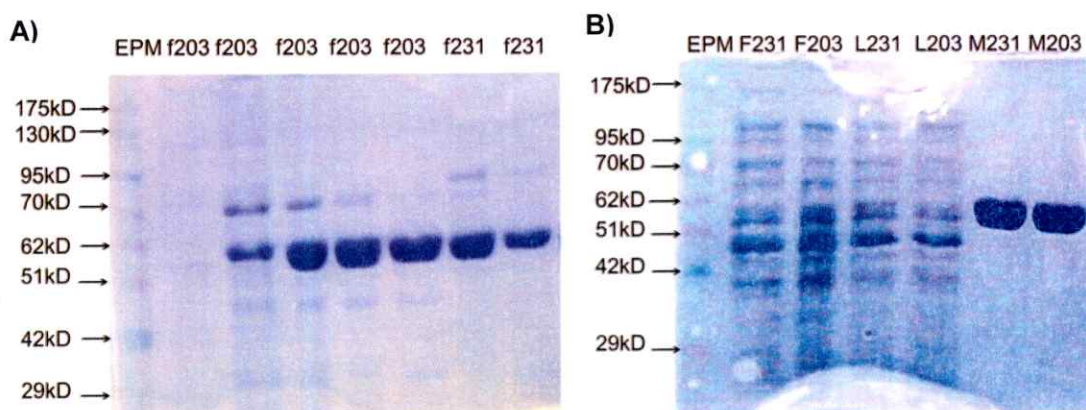
**Purificación de las proteínas recombinantes ADP-PFK/GK de *M. maripaludis* y *M. burtonii*.** Las ADP-PFK/GK de *M. maripaludis* y *M. burtonii* fueron purificadas como se describe en Materiales y Métodos. Las imágenes que exhiben los resultados, corresponden a una purificación estándar. Cabe destacar que en todos los pasos de purificación también se analizó por SDS/PAGE la presencia y grado de pureza de la enzima en las distintas fracciones del proceso: la fracción soluble (*sobrenadante*) y la fracción insoluble (*pellet*) que quedaban luego de centrifugar el lisado celular; el *frente*, fracción no retenida en la columna, que contiene las proteínas e impurezas que no quedan adsorbidas en la columna y el *lavado*, correspondiente al eluido de la columna al lavar esta con 100 mL de amortiguador de carga. Esto permitía analizar cuánto aumentaba la pureza en cada paso de la purificación, y revisar que la enzima a purificar no estuviese quedando en una fracción indeseada. La mayoría de estos datos no son mostrados debido a su irrelevancia en los resultados del experimento, y solo son exhibidos en aquellos casos en que el gel de electroforesis donde se cargaron las muestras puras era el mismo en el que se cargaron estas otras fracciones.

En la purificación de la *Mm*PFK/GK, luego del paso por la columna de afinidad de níquel se obtuvo enzima pura, como se observa en la Figura 6.



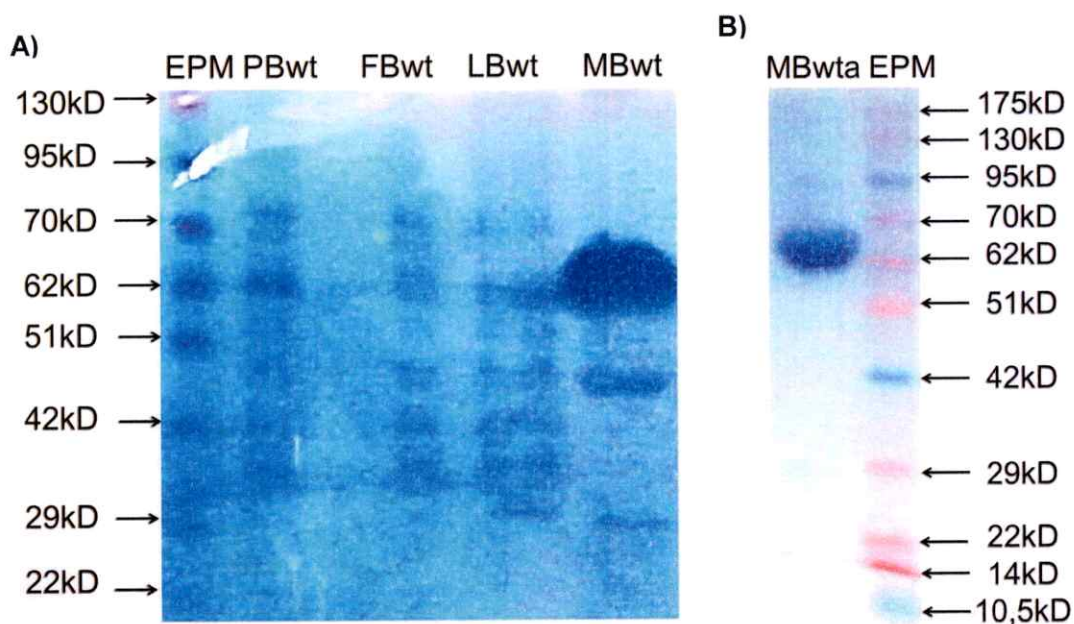
**Figura 6. Purificación de *Mm*PFK/GK.** EPM= estándar de peso molecular, **M203**= muestra de una purificación de *Mm*N203W (resultado mostrado por estar en el mismo gel), **MMwt**= muestra de *Mm*PFK/GK luego de ser purificada por una columna de afinidad de níquel. En ambos carriles se cargaron aproximadamente 20 $\mu$ g de proteína.

En cuanto a la purificación de las especies mutantes de ADP-PFK/GK de *M. maripaludis*, se utilizó una columna de afinidad de níquel y se analizó el grado de pureza de las fracciones que presentaban actividad enzimática. Como es posible observar en la Figura 7A, la mayoría de las fracciones presentaban proteína con un grado de pureza significativo, pero insuficiente, con lo que estas que se juntaron y sometieron a una cromatografía de intercambio aniónico. Posterior a este paso, se obtuvo la proteína pura, como se observa en la Figura 7B.



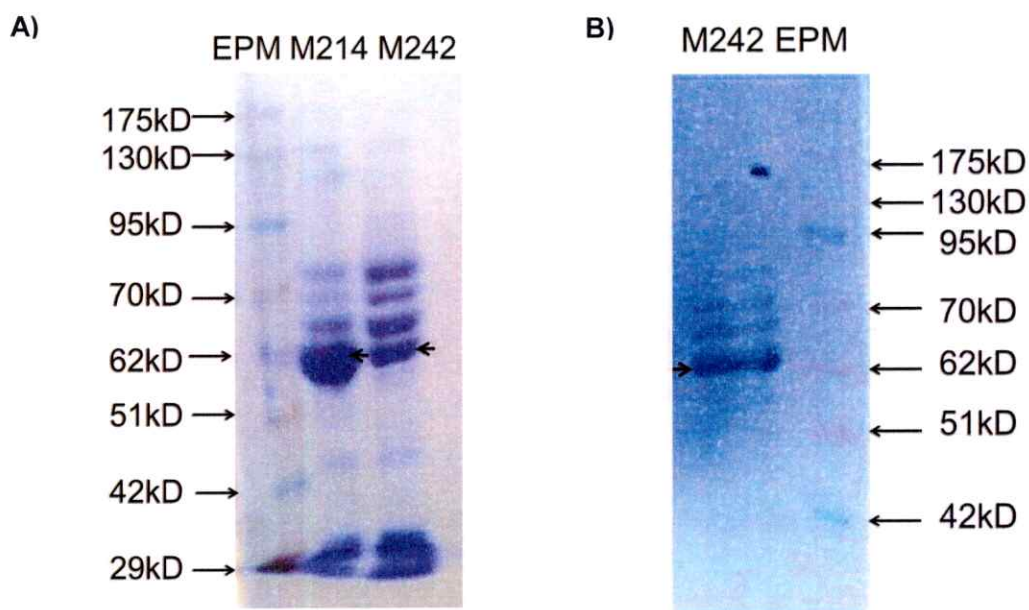
**Figura 7. Purificación de las mutantes *MmN203W* y *MmV231W*.** SDS/PAGE luego de la columna de afinidad de níquel (A) o de la columna de intercambio aniónico (B). EPM= estándar de peso molecular, f203 y f231= fracciones de 1,5-2 mL de *MmN203W* o *MmV231W* en la purificación por la columna de afinidad de níquel, F231, F203, L231 y L203= frente o lavado de la columna de intercambio aniónico en la purificación de *MmV231W* o *MmN203W*, M231 y M203= proteína *MmV231W* o *MmN203W* obtenida en la purificación por cromatografía de intercambio aniónico. En todos los carriles se cargaron aproximadamente 20  $\mu$ g de proteína, con excepción del segundo y tercer carril (de izquierda a derecha) del gel en (A), donde se cargaron aproximadamente 2,4  $\mu$ g y 16  $\mu$ g, respectivamente.

Por su parte, en la purificación de la especie silvestre *MbPFK/GK*, luego del paso por una columna de afinidad de níquel se obtuvo enzima con un grado de pureza apreciable, y luego de la cromatografía de intercambio aniónico, se obtuvo enzima purificada a homogeneidad, como se observa en la Figura 8A y B.



**Figura 8. Purificación de *MbPFK/GK*.** SDS/PAGE luego de la columna de afinidad de níquel (A) y luego de la columna de intercambio aniónico (B). EPM= estándar de peso molecular, PBwt, FBwt, LBwt,= pellet, frente y lavado de la columna de afinidad de níquel, MBwt= *MbPFK/GK* luego de la columna de afinidad de níquel, MBwta= *MbPFK/GK* luego de la cromatografía de intercambio aniónico. En todos los carriles se cargaron aproximadamente 20µg de proteína.

Al proceder a purificar a las mutantes *Mb214* y *Mb242* siguiendo el mismo protocolo utilizado para la enzima silvestre, no se obtuvo enzima pura luego del paso por la columna de afinidad de níquel, como se puede observar en la Figura 9. A su vez, al dejar las muestras de enzima dializando toda la noche contra el amortiguador de carga para el paso por una columna de intercambio aniónico, se observó al día siguiente que las soluciones con proteína estaban blancas, indicando que las enzimas habían agregado. Al controlar la actividad específica de las enzimas, se observó que esta había disminuido en más de un 50%.



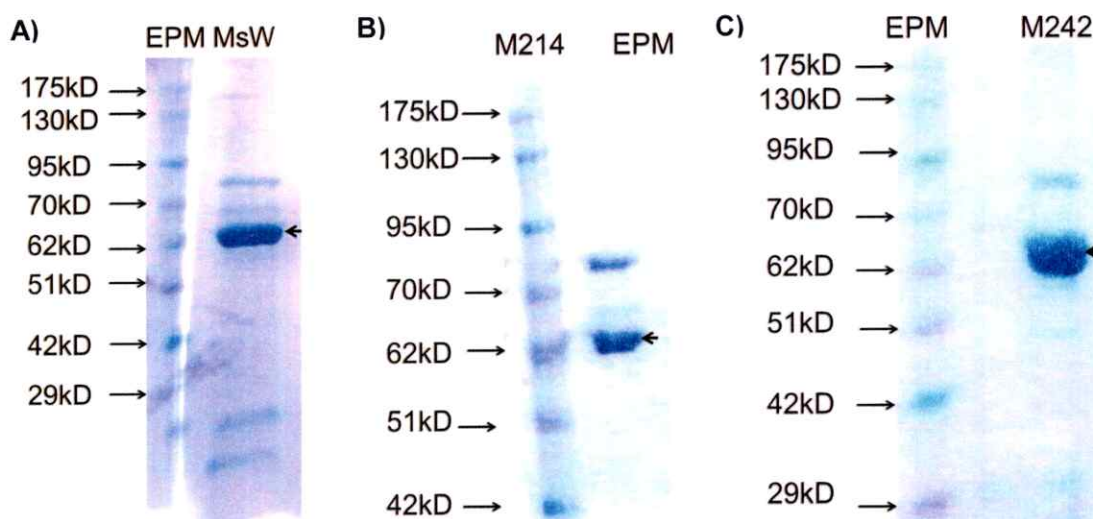
**Figura 9. Purificación de las mutantes *Mb214W* y *MbY242W* siguiendo el protocolo de la enzima silvestre.** SDS/PAGE luego de la columna de afinidad de níquel (A) y luego de la cromatografía de intercambio aniónico (B). EPM= estándar de peso molecular, M214 y M242= proteína *Mb214W* o *MbY242W* luego del paso de purificación por la columna de afinidad de níquel (A) o luego de la columna de intercambio aniónico (B). En todos los carriles se cargaron aproximadamente 20 $\mu$ g de proteína.

Esto llevó a la conclusión de que las mutantes *MbsW*, *Mb214W* y *MbY242W* eran menos estables que la enzima silvestre, y que tenían una menor resistencia a la deficiencia de NaCl. Por ello, se repitió el protocolo con la mutante *MbY242W* de manera similar al anterior, pero esta vez preparando un amortiguador de carga con 100 mM de NaCl (en lugar de 0 mM), y dializando la muestra por tan solo 2 horas (en vez de toda la noche), para luego pasarla rápidamente por una columna de intercambio aniónico. Luego de este paso, si bien se obtuvo muestra con un mayor grado de pureza, este seguía siendo insuficiente, como se exhibe en la Figura 9B. Por su parte, la actividad de la enzima nuevamente disminuyó en más de un 50%.



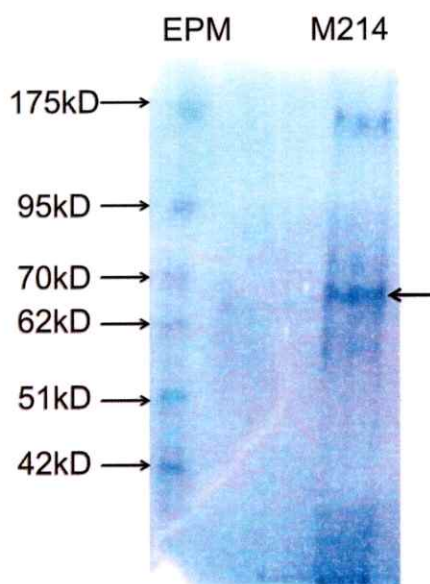
Posteriormente se procedió a purificar por columna de afinidad de níquel las tres mutantes de *M.burtonii* (*MbsW*, *Mb214* y *MbY242W*) induciendo a un  $OD_{600}=1,8$  en lugar de un  $OD_{600}=1$  y eluyéndolas esta vez mediante un gradiente lineal de 20 a 500 mM de imidazol.

El aumento en el OD de inducción generó una mayor expresión de proteína, obteniéndose una cantidad final de proteína de  $\approx 20$  mg, en contraste con los  $\approx 2$  mg que se obtenían al inducir con  $OD_{600}=1$ , con lo que en el resto de los protocolos llevados a cabo para purificar mutantes de *M. burtonii* se utilizó una  $OD_{600}=1,8$  para la inducción. Por su parte, el paso por la columna de afinidad de níquel con la posterior elución de la proteína mediante un gradiente lineal de imidazol permitió obtener muestras con un mayor grado de pureza, pero aun así no se logró purificar la enzima a homogeneidad tal como se muestra en la Figura 10A, B y C.



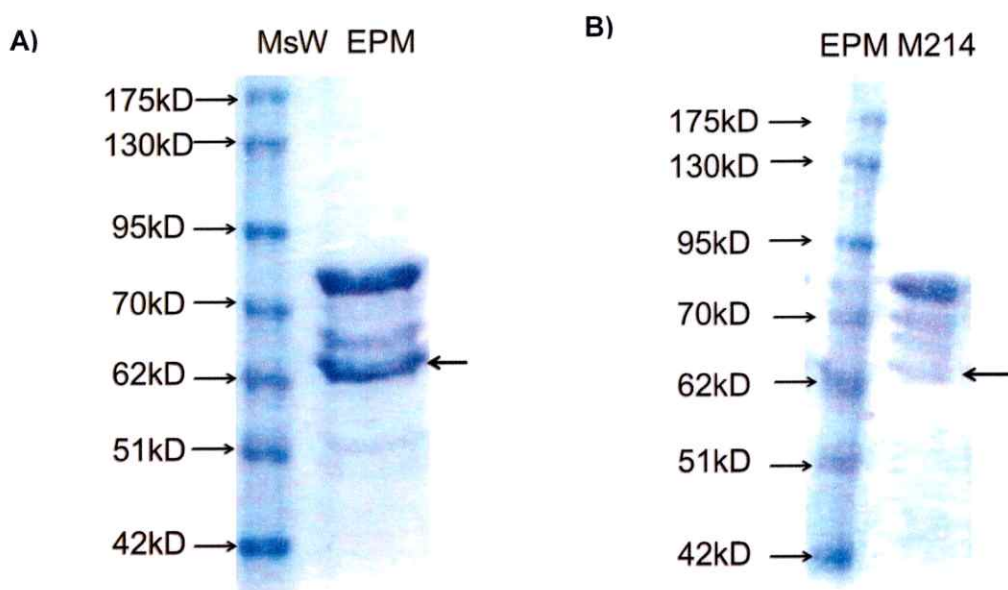
**Figura 10.** Purificación de las mutantes de *MbPFK/GK* por una columna de afinidad de níquel, haciendo un gradiente lineal de imidazol. EPM= estándar de peso molecular, MsW, M214 y M242= proteína *MbsW*, *Mb214W* o *MbY242W* luego de la columna de afinidad de níquel. En todos los carriles se cargaron aproximadamente 20 $\mu$ g de proteína.

Luego la mutante *Mb214W* se precipitó por sulfato de amonio, obteniéndose la enzima en el pellet de una solución con 40% de saturación. Sin embargo, con este procedimiento no se obtuvo la enzima pura (Figura 11). Por otra parte, la precipitación con sulfato de amonio se realizó con el objetivo de obtener la enzima pura, o en caso contrario, purificarla mediante cromatografía de interacción hidrofóbica. Esta cromatografía separa a las proteínas en base a la hidrofobicidad de su superficie, donde la fase estacionaria consiste en una resina de superficie hidrofóbica, y la fase móvil en una solución salina altamente concentrada. De esta manera, la proteína es eluida por un gradiente lineal desde altas concentraciones de sulfato de amonio a bajas concentraciones de este. Sin embargo, el hecho de que la proteína precipitara con bajas concentraciones de sulfato de amonio impidió que fuese factible realizar una purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.



**Figura 11. Precipitación con sulfato de amonio de *Mb214W*.** EPM= estándar de peso molecular, M214= proteína *Mb214W* obtenida en el pellet en la precipitación con sulfato de amonio al 40%. Se cargaron aproximadamente 20µg de proteína.

Finalmente, se realizó otra purificación de las mutantes *MbsW* y *Mb214W* mediante una columna de intercambio aniónico conectada en tándem con una columna de afinidad de níquel. Este protocolo generó una pérdida significativa en la actividad específica de la mutante *Mb214W*, no así en el caso de la mutante *MbsW*. Por otro lado, en ambos casos no se obtuvo enzima pura, especialmente en el caso de *Mb214W* (Figura 12).



**Figura 12.** Purificación de *MbsW* y *Mb214W* por una columna de intercambio aniónico conectada en tándem con una columna de afinidad de níquel. SDS/PAGE de las mutantes *MbsW* (A), y *Mb214W* (B). EPM= estándar de peso molecular, MsW y M214= proteína *MbsW* o *Mb214W* luego del protocolo de purificación mencionado. En ambos carriles se cargaron aproximadamente 20 $\mu$ g de proteína.



Dependencia de la actividad de *Mb*PFK/GK en función del pH. A fin de establecer las condiciones apropiadas para la determinación de la actividad enzimática, se determinó el pH óptimo de la enzima silvestre de *M.burtonii* midiendo la actividad fosfofructoquinasa. De esta manera, se obtuvo que el pH óptimo de la enzima corresponde a pH 7,0, mientras que a pH 6,5 la enzima presenta un 85% de actividad máxima (Figura 13). Trabajos anteriores habían determinado que el pH óptimo de la actividad fosfofructoquinasa de *Mm*PFK/GK era de 6,5 (Castro-Fernandez y cols., 2014). De esta manera se estableció que el amortiguador Pipes a pH 6,5 era apropiado para realizar los ensayos de cinética enzimática.

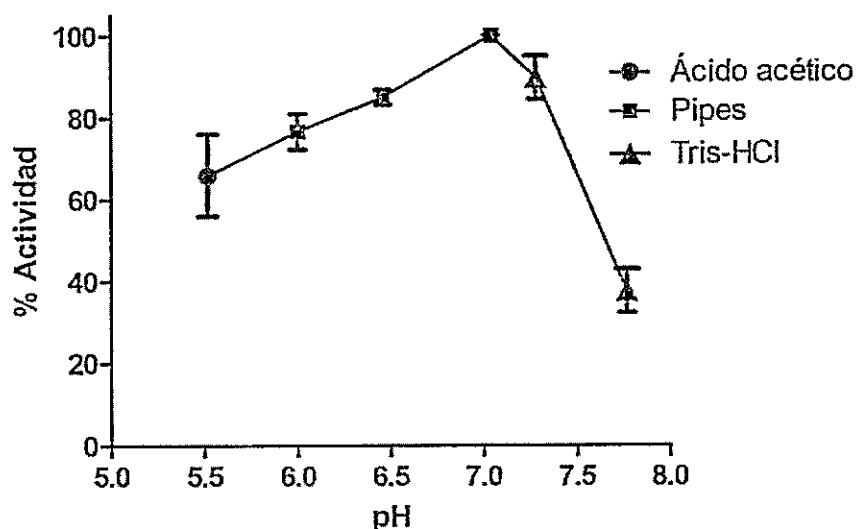


Figura 13. Dependencia del pH de *Mb*PFK/GK. Se midió la actividad fosfofructoquinasa. Cada medición se realizó en triplicado; la desviación estándar se señala como barras negras en el gráfico. La actividad enzimática fue normalizada de acuerdo al máximo de actividad (pH 7,0 considerado el 100%).

**Determinación de parámetros cinéticos.** La actividad fosfofructoquinasa de la enzima silvestre de *M. maripaludis* y la mutante *MmN203W*, presentaron un comportamiento hiperbólico para MgADP, mientras que la mutante *MmV231W* presentó inhibición por sustrato (Figura 14 A, C y E respectivamente). En cambio para fructosa-6-P, las tres enzimas presentaron inhibición por sustrato, siendo esta inhibición más leve para la enzima *MmV231W* (Figura 14 B, D y F).

Los parámetros cinéticos de las enzimas silvestre y mutantes de *M. maripaludis* se muestran en la Tabla 5, donde se observa que estos muestran diferencias entre sí. La mutante *MmN203W*, presenta una disminución significativa en la  $K_M$ , tanto para MgADP como para fructosa-6-P, pero dado que la  $k_{cat}$  también disminuye, no se generan cambios significativos en la eficiencia catalítica. Aun así, dado que la  $K_M$  está asociada con la afinidad que presenta la enzima por un sustrato en específico, esta disminución resultaba de gran interés, y cabía preguntarse qué ocurría en la cinética con glucosa para esta enzima.

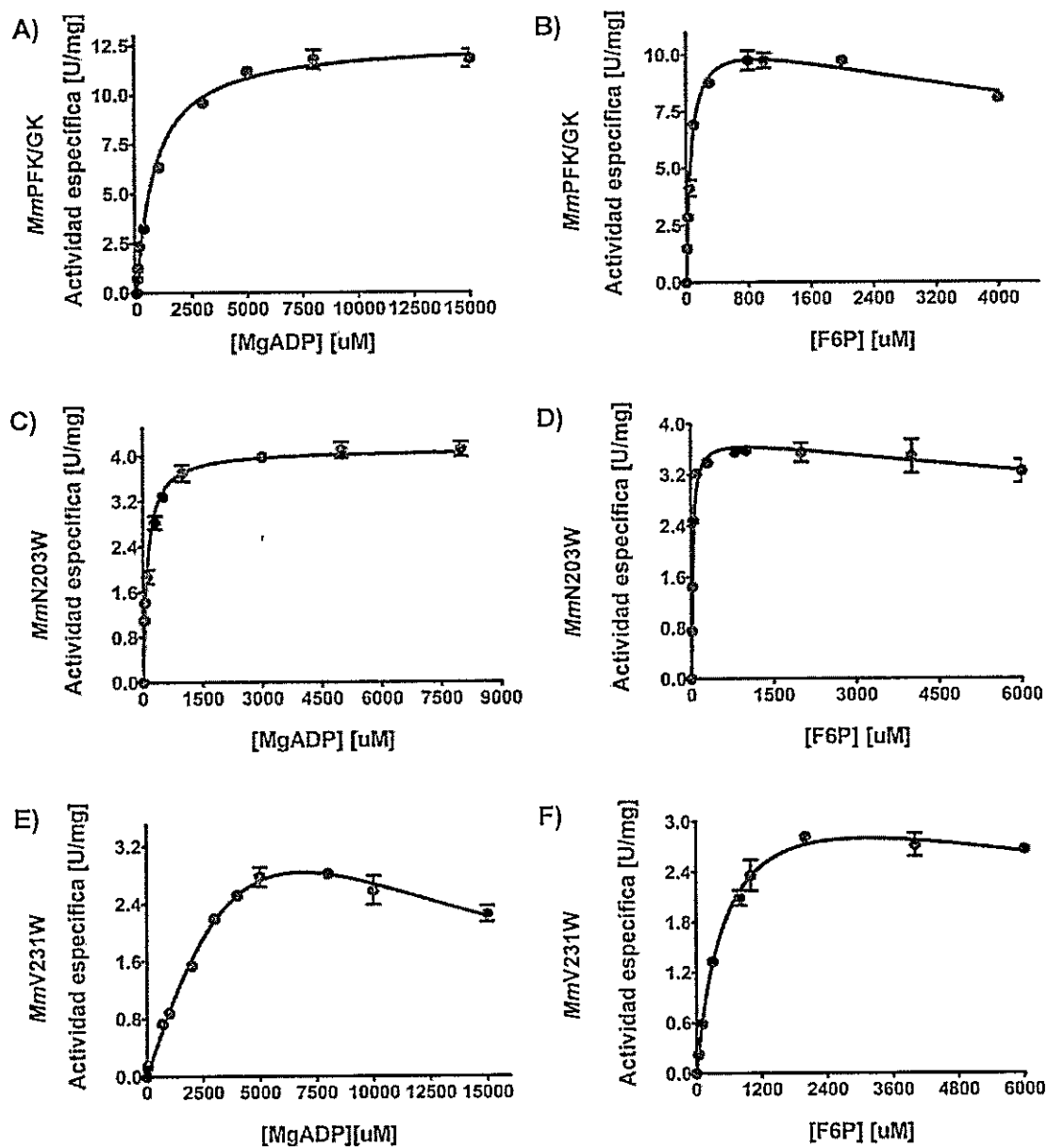


Figura 14. Curvas de saturación para MgADP y fructosa-6-P de las ADP-PFK/GK silvestre y mutantes de *M. maripaludis*. Curvas de saturación para MgADP de *Mm*PFK/GK (A), *Mm*N203V (C) y *Mm*V231W (E), y curvas de saturación para fructosa-6-P de *Mm*PFK/GK (B), *Mm*N203V (D) y *Mm*V231W (F). Se utilizó fructosa-6-P 1 mM en (A), (C) y (E), MgADP 6 mM en (B) y (F) y MgADP 4 mM en (D). En todas las ocasiones se utilizó  $Mg^{2+}$  libre 1 mM y los ensayos se realizaron a 25°C. Cada medición se realizó en triplicado; la desviación estándar se señala como barras negras en cada gráfico.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de la actividad fosfofructoquinasa de las ADP-PFK/GK silvestre y mutantes de *M. maripaludis* con 1 mM de  $Mg^{2+}$  libre a 25°C.

	MgADP			F6P		
	$K_M$ [ $\mu M$ ]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $s^{-1} \cdot M^{-1}$ ]	$K_M$ [ $\mu M$ ]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $s^{-1} \cdot M^{-1}$ ]
<i>Mm</i> PFK/GK	850±87	11±1	$1,34 \cdot 10^4 \pm 2,41 \cdot 10^3$	65±5	9,7±0,9	$1,49 \cdot 10^5 \pm 2,49 \cdot 10^4$
<i>Mm</i> N203W	110±8	3,6±0,1	$3,27 \cdot 10^4 \pm 3,18 \cdot 10^3$	29±3	3,3±0,1	$1,15 \cdot 10^5 \pm 1,49 \cdot 10^4$
<i>Mm</i> V231W	2.400±340	3,3±0,2	$1,36 \cdot 10^3 \pm 2,66 \cdot 10^2$	570±79	3,3±0,3	$5,87 \cdot 10^3 \pm 1,28 \cdot 10^3$

Por lo anterior, se procedió a determinar los parámetros cinéticos de esta mutante y de la enzima silvestre para la actividad glucoquinasa, los cuales se muestran en la Tabla 6. Las curvas de saturación para ambos sustratos (Figura 15), muestran en todos los casos un comportamiento de inhibición por sustrato, siendo la inhibición por glucosa menos marcada en la enzima *Mm*PFK/GK. Por su parte, al analizar los parámetros cinéticos en la Tabla 6, se observa que para MgADP no hay diferencias significativas entre la enzima silvestre y mutante, sin embargo sí se observan diferencias notables para glucosa, particularmente en la  $K_M$ , donde nuevamente se observa una disminución de esta en la enzima mutante, con el consecuente aumento de la eficiencia catalítica.

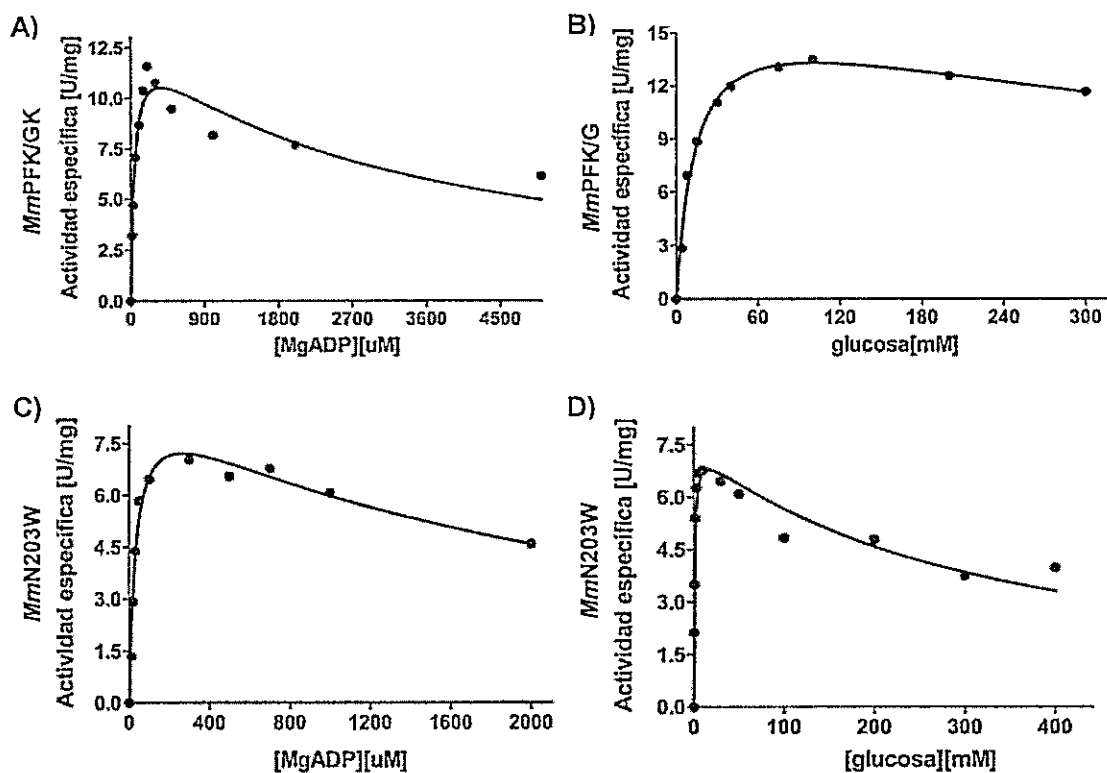


Figura 15. Curvas de saturación para MgADP y glucosa de *MmPFK/GK* y *MmN203W*. Curvas de saturación para MgADP de *MmPFK/GK* (A) y *MmN203W* (C), y curvas de saturación para glucosa de *MmPFK/GK* (B) y *MmN203W* (D). Se utilizó glucosa 150 mM en (A), glucosa 10 mM en (C) y MgADP 0,5 mM en (B) y (D). En todas las ocasiones se utilizó  $Mg^{2+}$  libre 1 mM y los ensayos se realizaron a 25°C.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la actividad glucoquinasa de *MmPFK/GK* y *MmN203W* con 1 mM de  $Mg^{2+}$  libre a 25°C.

	MgADP			Glucosa		
	$K_M$ [ $\mu M$ ]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $s^{-1} \cdot M^{-1}$ ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $s^{-1} \cdot M^{-1}$ ]
<i>MmPFK/GK</i>	$44 \pm 12$	$11 \pm 1$	$2,60 \cdot 10^5 \pm 9,07 \cdot 10^4$	$14 \pm 2$	$15 \pm 1$	$1,07 \cdot 10^3 \pm 2,15 \cdot 10^2$
<i>MmN203W</i>	$34 \pm 6$	$8,0 \pm 0,5$	$2,35 \cdot 10^5 \pm 5,70 \cdot 10^4$	$0,90 \pm 0,20$	$6,6 \pm 0,4$	$7,32 \cdot 10^3 \pm 2,02 \cdot 10^3$



Los parámetros cinéticos de las enzimas mutantes de *M. burtonii* se determinaron con una preparación semi-purificada. Para *Mb214W* y *MbY242W* se utilizaron las muestras purificadas por columna de afinidad níquel eluidas mediante gradiente lineal de imidazol. Para *MbsW* se utilizó la muestra purificada por una columna de intercambio aniónico conectada en tándem a una columna de afinidad de níquel. Esta mutante resultó ser altamente inestable, con lo que se procedió a caracterizarla cinéticamente el mismo día en que fue purificada. Dado que ninguna de las mutantes de *MbPFK/GK* se encontraban purificadas a homogeneidad, no fue posible calcular la  $k_{cat}$ .

Al analizar las curvas de saturación de las enzimas de *M. burtonii*, se observa que tanto la enzima silvestre como las mutantes *MbsW* y *Mb214W* presentan un comportamiento de inhibición por sustrato para MgADP, mientras que la mutante *MbY242W*, presenta un comportamiento hiperbólico. A su vez, para fructosa-6-P todas las enzimas presentan comportamiento hiperbólico (Figura 16).

Las enzimas mutantes de *M. burtonii* también exhibieron cambios significativos en los parámetros cinéticos con respecto a la enzima silvestre (Tabla 7). Las enzimas *MbsW* y *Mb214W* no presentan diferencias significativas entre sí en las  $K_M$  para MgADP y fructosa-6-P, pero sí hay un aumento en la  $V_{m\acute{a}x}$  de *Mb214W* con respecto a *MbsW*. Por otro lado, la  $K_M$  para fructosa-6-P de estas dos mutantes no presenta diferencias significativas con la  $K_M$  de *MbPFK/GK*, mas sí se observa una disminución en la  $K_M$  para MgADP de ambas mutantes con respecto a la enzima silvestre. La mutante *MbY242W* presenta un aumento en ambas  $K_M$  con respecto a *MbPFK/GK*, y esta diferencia es más significativa aún si se le compara con la mutante *MbsW*. Con respecto a la  $V_{m\acute{a}x}$ , nuevamente se observa un aumento de esta con respecto a la mutante basal sin triptófanos, y una disminución con respecto a la enzima silvestre.

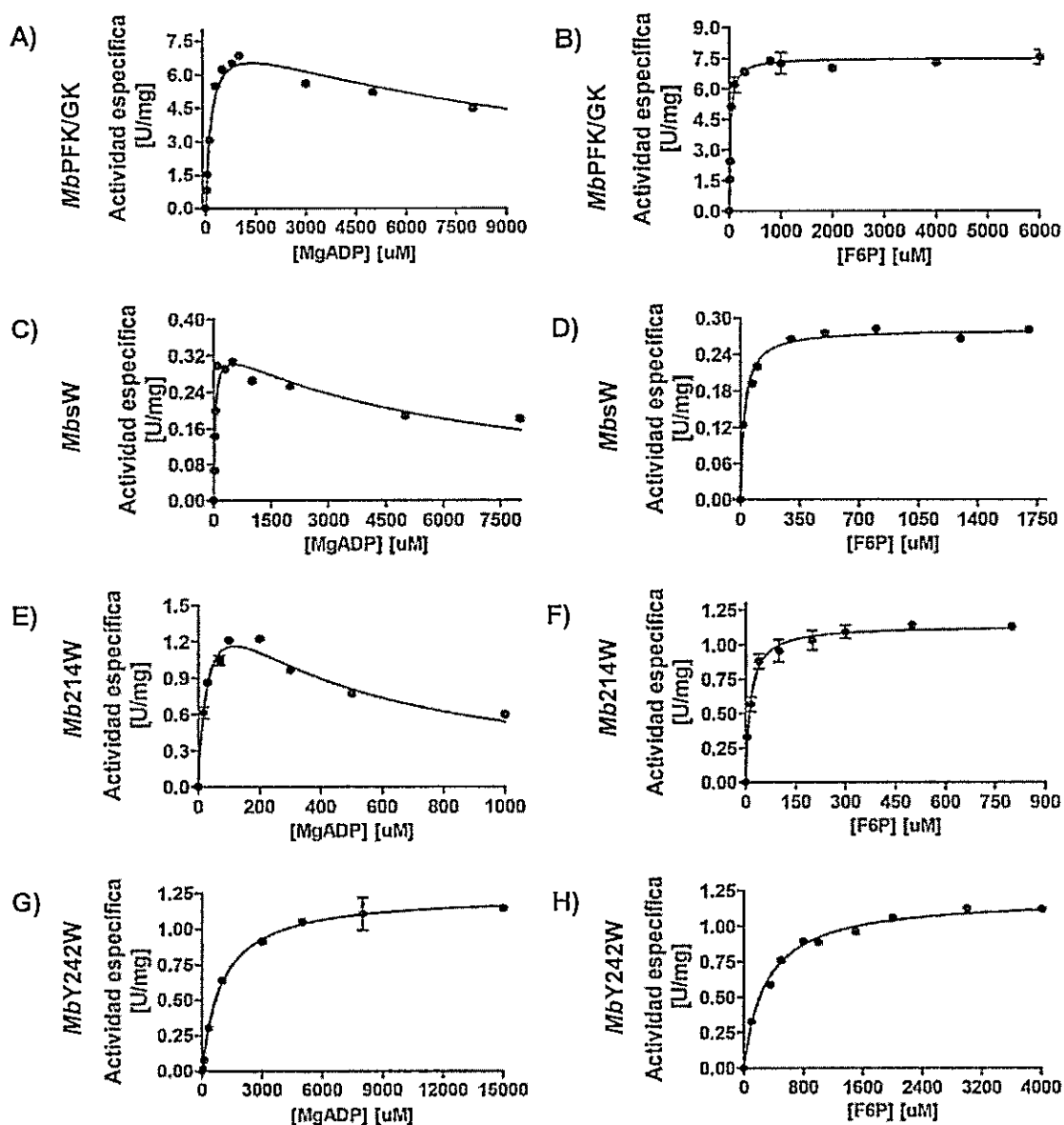


Figura 16. Curvas de saturación para MgADP y F6P de las ADP-PFK/GK silvestre y mutantes de *M. burtonii*. Curvas de saturación para MgADP de MbPFK/GK (A), MbsW (C), Mb214W (E) y MbY242W (G), y curvas de saturación para fructosa-6-P de MbPFK/GK (B), MbsW (D), Mb214W (F) y MbY242W (H). Se utilizó fructosa-6-P 1 mM en (A), fructosa-6-P 4 mM en (C) y (E), fructosa-6-P 5 mM en (G), MgADP 1 mM en (B), MgADP 0,3 mM en (D), MgADP 0,15 mM en (F) y MgADP 10 mM en (F). En todos los ensayos se utilizó  $Mg^{2+}$  libre 1 mM y una temperatura de 25°C. Cada medición se realizó en triplicado o se realizaron dos ensayos (excepto para MbsW); la desviación estándar se señala como barras negras en cada gráfico.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la actividad fosfofructoquinasa de las ADP-PFK/GK silvestre y mutantes de *M. burtonii* con 1 mM de  $Mg^{2+}$  libre a 25°C. El grado de pureza insuficiente de las enzimas *MbsW*, *Mb214W* y *MbY242W* no permitió determinar parámetros cinéticos específicos.

	MgADP		F6P	
	$K_M$ [ $\mu M$ ]	$V_{max}$ [U/mg]	$K_M$ [ $\mu M$ ]	$V_{max}$ [U/mg]
<i>MbPFK/GK</i>	170±21	8,2±0,4	28±3	7,5±0,2
<i>MbsW</i> *	39±10	0,35±0,03	24±3	0,28±0,01
<i>Mb214W</i> *	32±6	1,8±0,2	14±2	1,1±0,1
<i>MbY242W</i> *	980±120	1,2±0,1	300±23	1,2±0,1

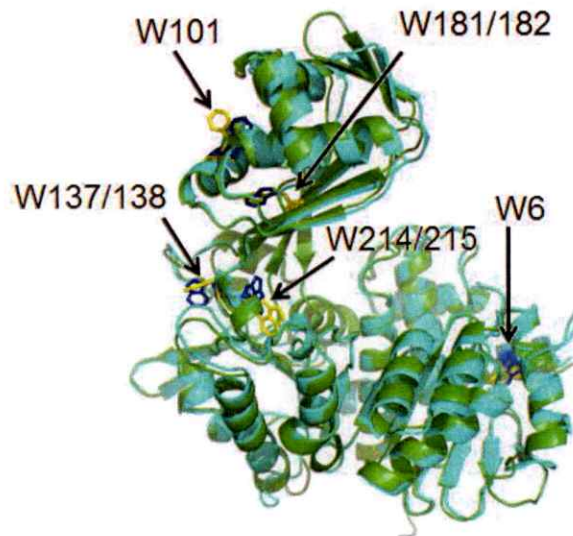
Las diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de las enzimas silvestres con sus respectivas mutantes, en conjunto con la incapacidad de obtener muestras puras de las especies mutantes de *M. burtonii*, llevaron a la búsqueda de un modelo alternativo de las ADP-PFK/GK para el estudio de la flexibilidad de estas enzimas como mecanismo de adaptación al frío. Por otra parte, la disminución de la  $K_M$  para todos los sustratos en la mutante *MmN203W*, tanto en la actividad fosfofructoquinasa como glucoquinasa, llevó a plantear a esta mutante como un modelo atractivo para estudiar la unión de ligando mediante fluorescencia intrínseca, experiencia que se detalla más adelante.

**Búsqueda de un modelo alternativo para experimentos de fluorescencia.** En la búsqueda de un modelo mesófilo con el cual comparar los datos de flexibilidad que se obtuvieran para la enzima psicrófila *MbPFK/GK*, se encontró que la enzima homóloga ADP-PFK/GK de *Methanosarcina mazei* (de aquí en adelante *MmzPFK/GK*) también

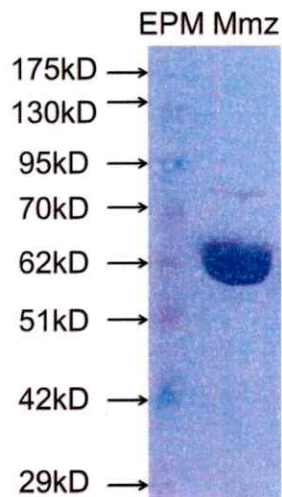
poseía cinco triptófanos en su secuencia. De esta manera, se determinó el porcentaje de identidad entre *Mb*PFK/GK y *Mmz*PFK/GK realizando un alineamiento local utilizando el programa pBLAST (protein Basic Local Alignment Search Tool) a través del servidor de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se realizó un alineamiento estructural con los modelos por homología de ambas especies, utilizando el programa PyMOL(TM) Molecular Graphics System, Version 1.7.6.0 (Schrödinger, LLC, ciudad de Nueva York, Nueva York, Estados Unidos).

Con lo anterior fue posible apreciar que *Mmz*PFK/GK comparte un 58% identidad con *Mb*PFK/GK, porcentaje aún mayor que el que comparte *Mm*PFK/GK con *Mb*PFK/GK (28% identidad). A su vez, el alineamiento estructural permitió esclarecer que *Mmz*PFK/GK y *Mb*PFK/GK presentan sus cinco triptófanos en posiciones equivalentes, como se observa en la Figura 17.

El alto porcentaje de identidad entre estas enzimas, el hecho de que ambas catalicen la misma reacción y la posición equivalente de sus triptófanos, permitieron plantear a *Mmz*PFK/GK y *Mb*PFK/GK como modelos apropiados para estudiar la adaptación al frío en las ADP-PFK/GK. Por consiguiente, se procedió a purificar la ADP-PFK/GK de *M. mazei* mediante una columna de afinidad de níquel, obteniéndose enzima purificada a homogeneidad, como se exhibe en la Figura 18.

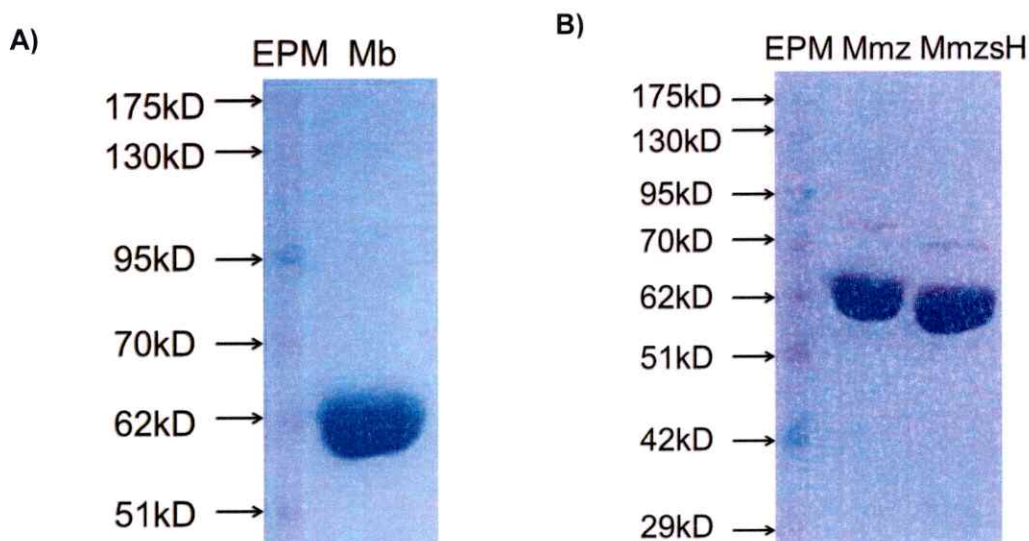


**Figura 17. Alineamiento estructural de los modelos por homología de las ADP-PFK/GK de *M. mazei* y de *M. burtonii*.** En verde, la estructura de *MmzPFK/GK* (modelo realizado por González, datos no publicados), en cian, la estructura de *MbPFK/GK* (modelo realizado por Zamora, datos no publicados). Los triptófanos se muestran en forma de varillas de color amarillo en *MmzPFK/GK* y de color azul en *MbPFK/GK*, y señalados con flechas. Primero se menciona la posición del triptófano en *MbPFK/GK* y luego la posición del triptófano en *MmzPFK/GK*



**Figura 18. Purificación de *MmzPFK/GK*.** SDS/PAGE luego de la columna de afinidad de níquel. **EPM**= estándar de peso molecular, **Mmz**= muestra de enzima de *MmzPFK/GK*. Se cargaron aproximadamente 20µg de proteína.

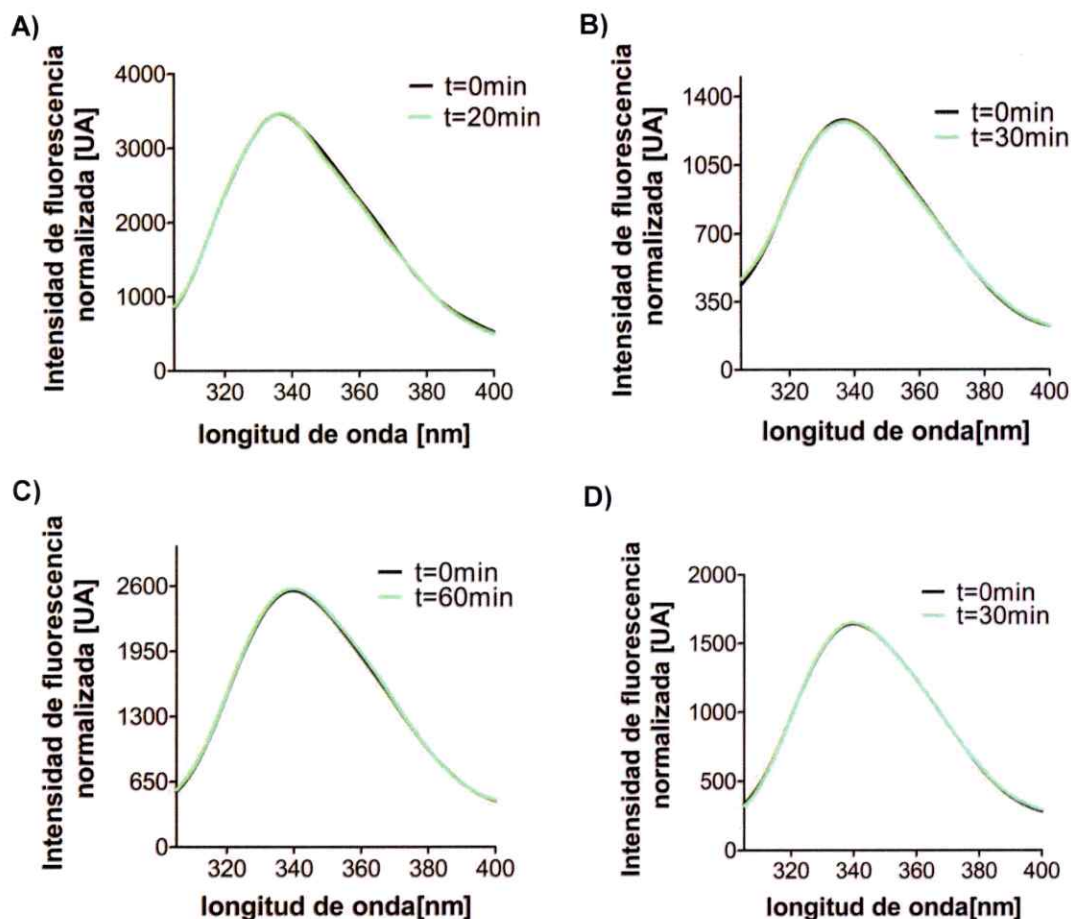
**Eliminación del hexapéptido de histidina de las ADP-PFK/GK silvestres de *M. mazei* y *M. burtonii*.** El corte exitoso del hexapéptido de histidina por la proteasa TEV fue corroborado mediante la presencia de las enzimas en el frente de la columna de afinidad de níquel. Posterior a dicho proceso las enzimas se encontraban purificadas a homogeneidad (Figura 19), con lo que se pudo prescindir de la cromatografía de intercambio aniónico en el caso de *Mb*PFK/GK.



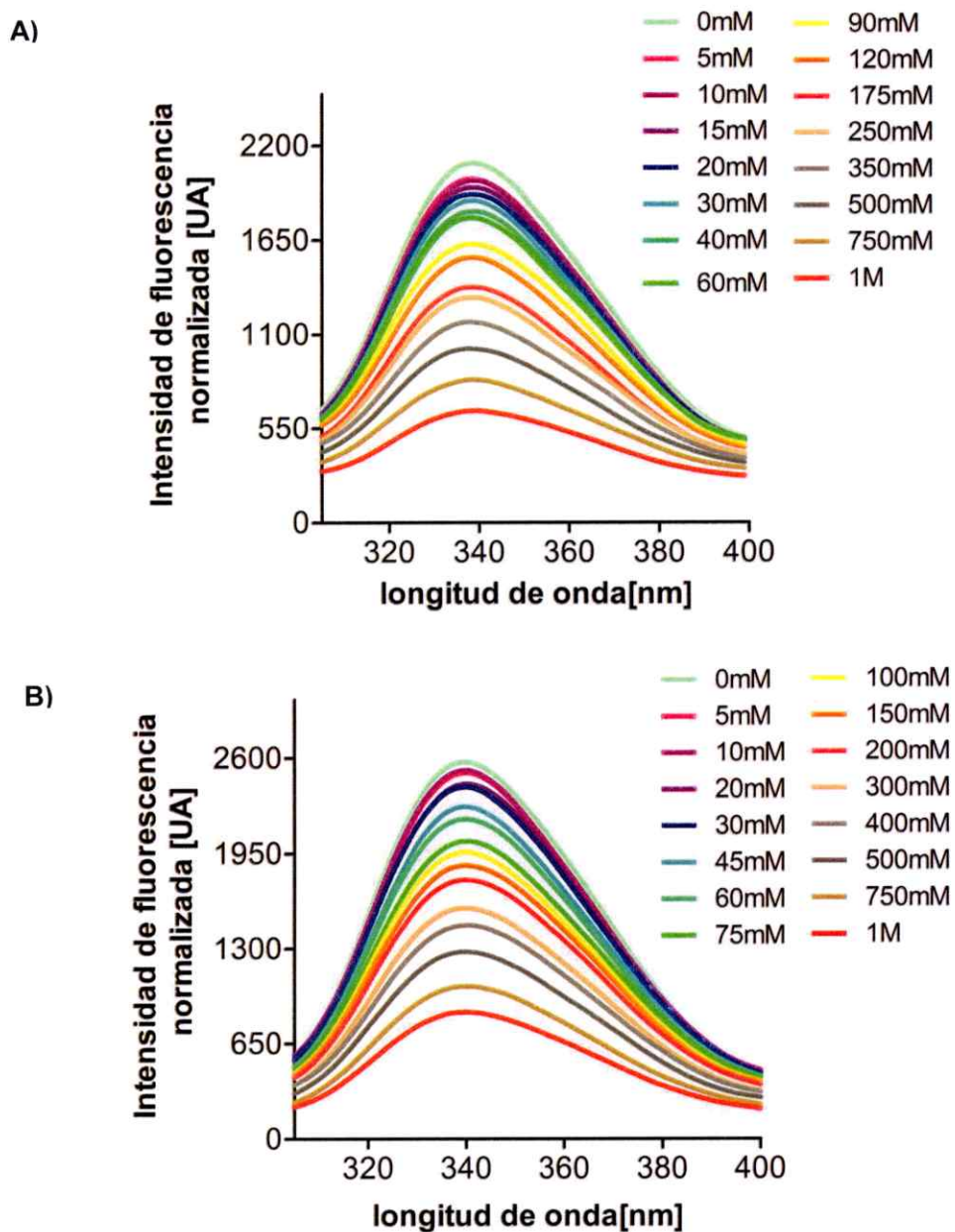
**Figura 19.** Corte del hexapéptido de histidina de *Mb*PFK/GK y *Mmz*PFK/GK. SDS/PAGE de las enzimas *Mb*PFK/GK (A) y *Mmz*PFK/GK (B) que caían en el frente de la columna de afinidad de níquel, luego de realizar el corte con la proteasa TEV. **EPM**=Estándar de peso molecular, **Mb**=muestra de *Mb*PFK/GK en el frente, **Mmz**=muestra *Mmz*PFK/GK previo al corte, **Mmzwtsh**= muestra de *Mmz*PFK/GK en el frente.

**Apagamientos de fluorescencia por acrilamida de *Mb*PFK/GK y *Mmz*PFK/GK.** Se obtuvieron los espectros de apagamiento de la fluorescencia intrínseca que se exhiben en las Figuras 20, 21 y 22, donde se observa en todos los casos que la fluorescencia intrínseca va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de acrilamida en la

solución. Los controles de fluorescencia intrínseca a lo largo del tiempo (Figura 20) dan cuenta de que la enzima se mantenía estable en aquellas condiciones, lo que permite atribuir al apagador los efectos de disminución de la fluorescencia.

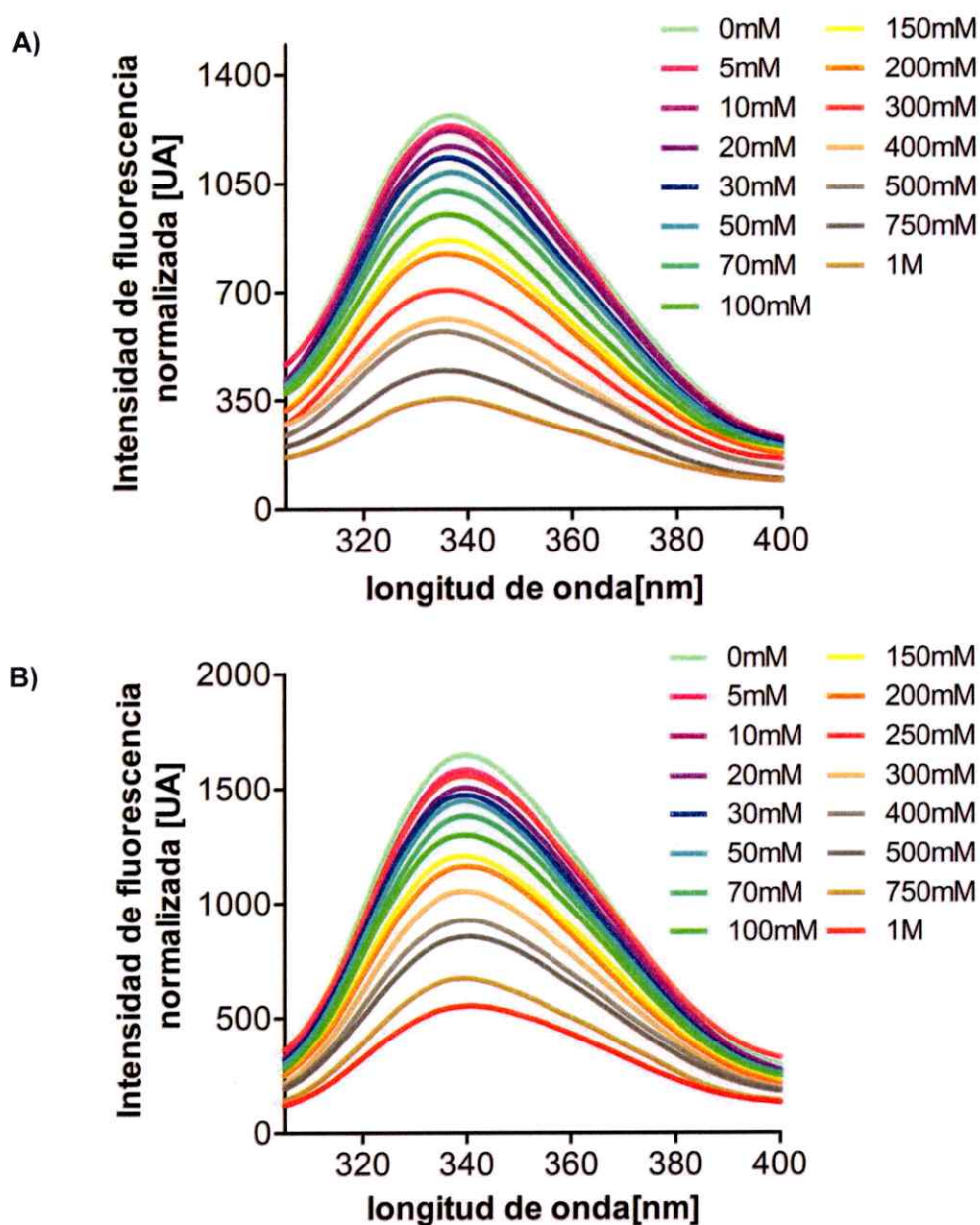


**Figura 20. Control de estabilidad de la fluorescencia intrínseca de las enzimas.** Espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de (A) *MbPFK/GK* a 10°C, (B) *MbPFK/GK* a 25°C, (C) *MmzPFK/GK* a 10°C y (D) *MmzPFK/GK* a 25°C, medidos a tiempo cero (línea negra) y luego de varios minutos (línea verde). Los tiempos de medición se indican en el extremo superior derecho de cada figura.



**Figura 21. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca con acrilamida a baja temperatura.** Apagamientos de *MbPFK/GK* (A) y *MmzPFK/GK* (B). Los espectros de emisión se midieron entre 300 y 400 nm a 10°C, usando una longitud de onda de excitación de 295 nm. Las concentraciones de acrilamida se indican en colores en el extremo superior derecho de cada figura.





**Figura 22. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca con acrilamida a temperatura ambiente.** Apagamientos de *MbPFK/GK* (A) y *MmzPFK/GK* (B). Los espectros de emisión se midieron entre 300 y 400 nm a 25°C, usando una longitud de onda de excitación de 295 nm. Las concentraciones de acrilamida se indican en colores en el extremo superior derecho de cada figura.

Los datos obtenidos se graficaron de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer (Figura 23) y a partir de la pendiente de dichos gráficos se determinaron las  $K_{SV}$  (Tabla 8). Al realizar el análisis estadístico especificado en Materiales y Métodos, resultó que las  $K_{SV}$  no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas, con excepción de la  $K_{SV}$  de *Mb*PFK/GK a 25°C, la cual presenta diferencias significativas con todas las demás, con un valor  $P < 0,001$ . Esto también se puede apreciar en la Figura 23, donde se observa que las rectas se superponen entre sí, con excepción de la que corresponde al apagamiento de *Mb*PFK/GK a 25°C. Por su parte, al graficar la diferencia de la recta a 25°C con la de 10°C para cada enzima (Figura 24), es fácil visualizar que *Mmz*PFK/GK prácticamente no presenta cambios en su permeabilidad al variar la temperatura, mientras que los cambios en *Mb*PFK/GK son evidentes.

**Tabla 8.**  $K_{SV}$  para *Mb*PFK/GK y *Mmz*PFK/GK a 10°C y 25°C. La  $K_{SV}$  de *Mb*PFK/GK a 25°C, señalada con un asterisco (\*), es la única que muestra diferencias estadísticas significativas al compararla con todas las demás  $K_{SV}$ , con un valor  $P < 0,001$ .

	$K_{SV} [M^{-1}]$	
	10°C	25°C
<i>Mb</i> PFK/GK	1,77 ± 0,04	2,31 ± 0,03*
<i>Mmz</i> PFK/GK	1,81 ± 0,03	1,78 ± 0,03

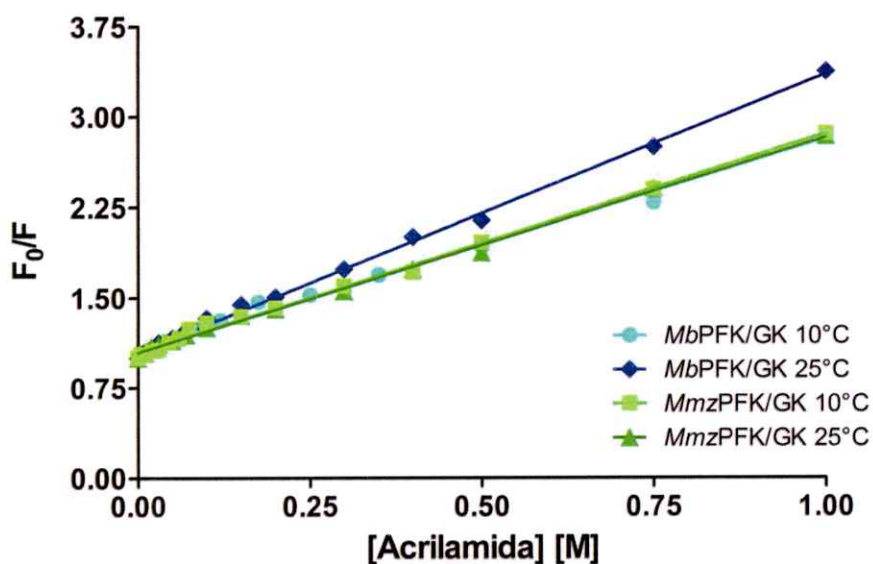


Figura 23. Gráficos de Stern-Volmer del apagamiento de fluorescencia intrínseca por acrilamida para *MbPFK/GK* y *MmzPFK/GK* a  $10^\circ C$  y  $25^\circ C$ .

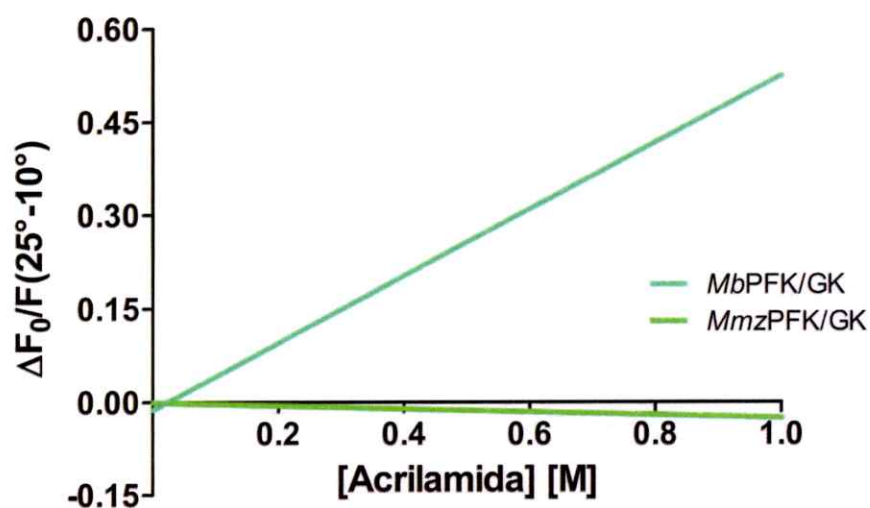


Figura 24. Gráficos de la variación del apagamiento de acrilamida a  $10^\circ C$  y  $25^\circ C$  para *MbPFK/GK* y *MmzPFK/GK*. Gráficos de  $F_0/F(25^\circ) - F_0/F(10^\circ)$  en función de la concentración de acrilamida obtenidos a partir de la resta de las ecuaciones de Stern-Volmer de cada experimento a  $25^\circ C$  con el de  $10^\circ C$ .

El comportamiento lineal de todos los gráficos de Stern-Volmer da cuenta de un comportamiento propio de apagamientos dinámicos de la fluorescencia intrínseca, en el cual todos los triptófanos de la proteína presentaron un grado de exposición similar.

**Estudios de unión de ligando por fluorescencia intrínseca de la mutante *MmN203W*.** Los resultados obtenidos permitieron determinar que la mutante *MmN203W* es capaz de sensar los tres ligandos: MgADP, fructosa-6-P y glucosa. En las Figura 25A y C, se puede observar que la fluorescencia aumenta significativamente al agregar concentraciones saturantes de MgADP o glucosa, y en contraste, en la Figura 25B se tiene que la fluorescencia disminuye al agregar concentraciones saturantes de fructosa-6-P. En ninguno los casos se observa un corrimiento en el máximo de emisión. El control de fluorescencia intrínseca de *MmN203W*, (Figura 25D) muestra que la fluorescencia se mantiene estable a lo largo del tiempo, con lo que los cambios observados son atribuibles a la unión de ligando.

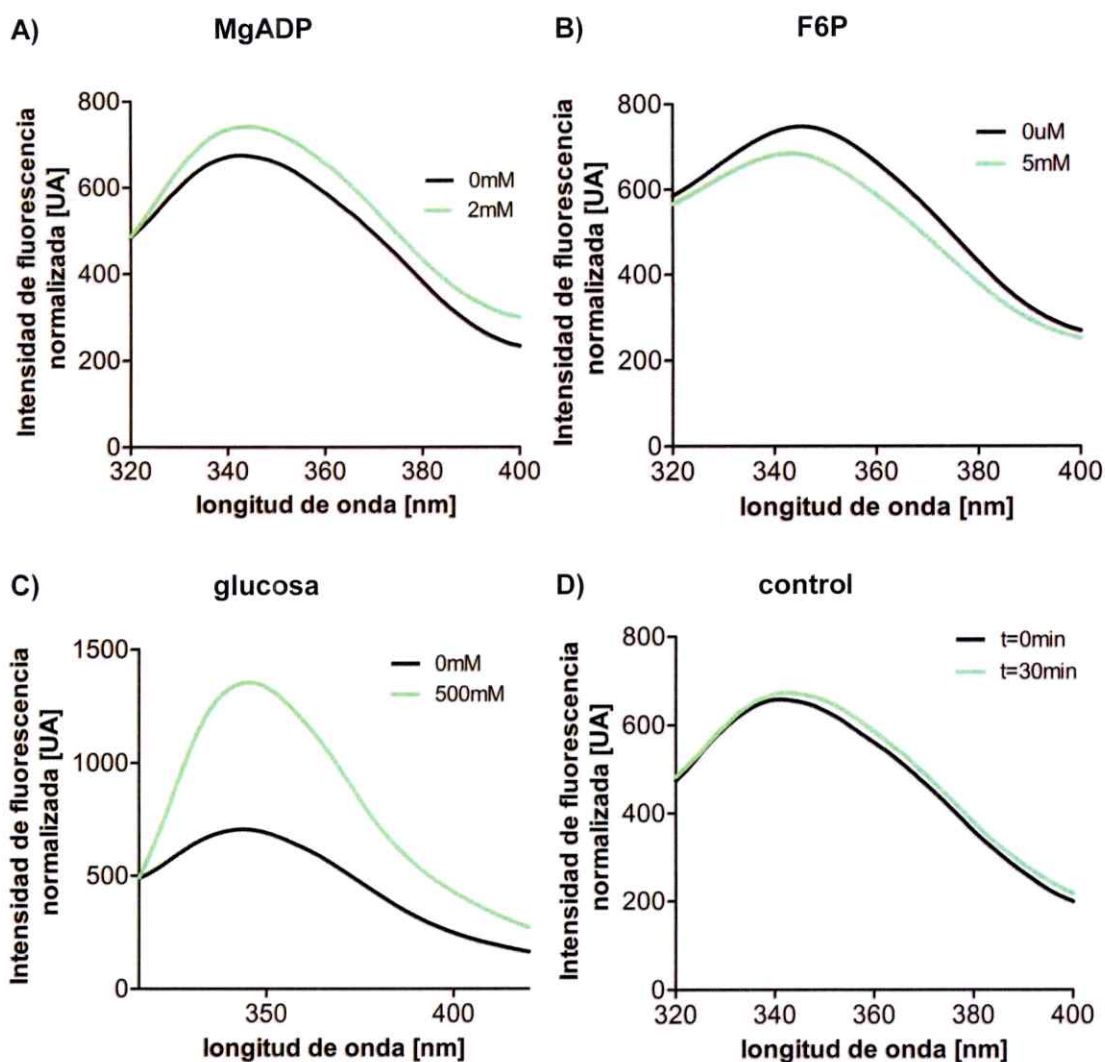


Figura 25. Espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de *MmN203W* en ausencia y en presencia de ligandos. Se analizaron los ligandos MgADP (A), fructosa-6-P (B) y glucosa (C), midiendo la fluorescencia a 0mM de ligando (línea negra) y concentraciones saturantes de ligando (línea verde). Las concentraciones de cada medición se indican en el extremo superior derecho de cada figura. Se realizó además un control de estabilidad (D), midiendo la fluorescencia a tiempo cero (línea verde) y a los 30 minutos (línea negra).

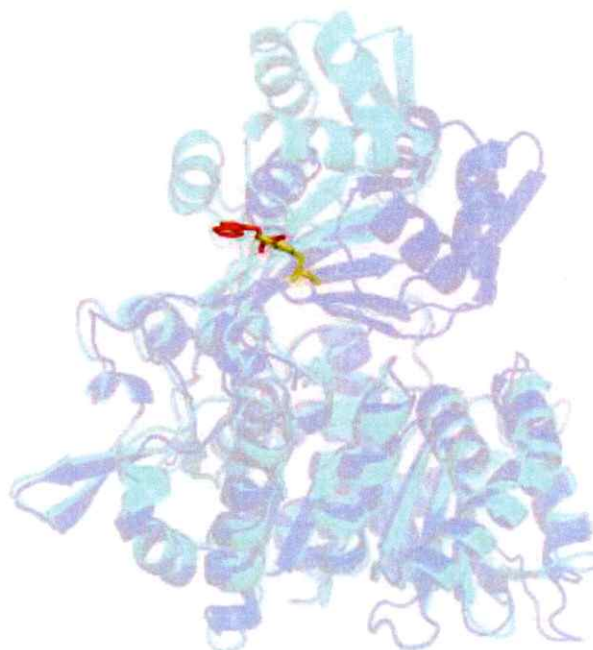
## DISCUSIÓN

Los resultados de este Seminario de Título pueden dividirse en la caracterización cinética de las mutantes generadas y en aquellos que corroboran parcialmente la hipótesis planteada.

Al analizar el efecto que tuvieron las distintas mutaciones realizadas, se puede concluir que la eliminación de los triptófanos en *MbPFK/GK* genera una alta inestabilidad en la proteína. Esto se manifestó en la alta sensibilidad que presentaron todas las mutantes de *MbPFK/GK* al déficit de NaCl. Betts y Russel (2003) sugieren que para el diseño apropiado de una mutagénesis que altere levemente la estructura y función de la proteína, los aminoácidos deben ser reemplazados por otros que tengan tamaño y propiedades fisicoquímicas similares, además de considerar factores como el grado de conservación que tiene la posición entre proteínas ortólogas y parálogas, y si es que está implicado en la catálisis, aspectos que fueron considerados en el diseño de estas mutantes. Sin embargo, los mismos autores advierten que los residuos de triptófanos son únicos en propiedades químicas y tamaño, con lo que su reemplazo por cualquier otro residuo de aminoácido puede resultar en cambios indeseados, tal como ocurrió en este trabajo.

Al analizar los parámetros cinéticos de la enzima *MbPFK/GK* y sus mutantes, se tiene que la eliminación de los triptófanos (mutante *MbsW*) genera una disminución en la  $K_M$  para MgADP, mientras que no presenta cambios significativos en la  $K_M$  para fructosa-6-P, comportamiento que se mantiene al reinsertar el W en la posición 214 en la mutante *Mb214W*. Aparentemente, alguno de los triptófanos de *MbPFK/GK* estaría interfiriendo en la unión de MgADP a la enzima, y dicho triptófano no correspondería al

214. Esto resulta llamativo, debido a que los otros cuatro triptófanos no parecieran estar interactuando con MgADP. Al contrastar los modelos por homología de las estructuras abierta y cerrada de *Mb*PFK/GK, se puede observar que el cierre se debe a una rotación que realizan los residuos que se encuentran en la región que conecta los dominios de la proteína. Dado que el triptófano es menos hidrofóbico y más reactivo que la fenilalanina al poseer un átomo de nitrógeno dentro de su sistema de anillos aromáticos (Betts y Russel, 2003), es posible que el cambio del triptófano 181 por una fenilalanina genere un cambio en dicha rotación que permite una unión más estrecha del MgADP a la enzima (Figura 26).



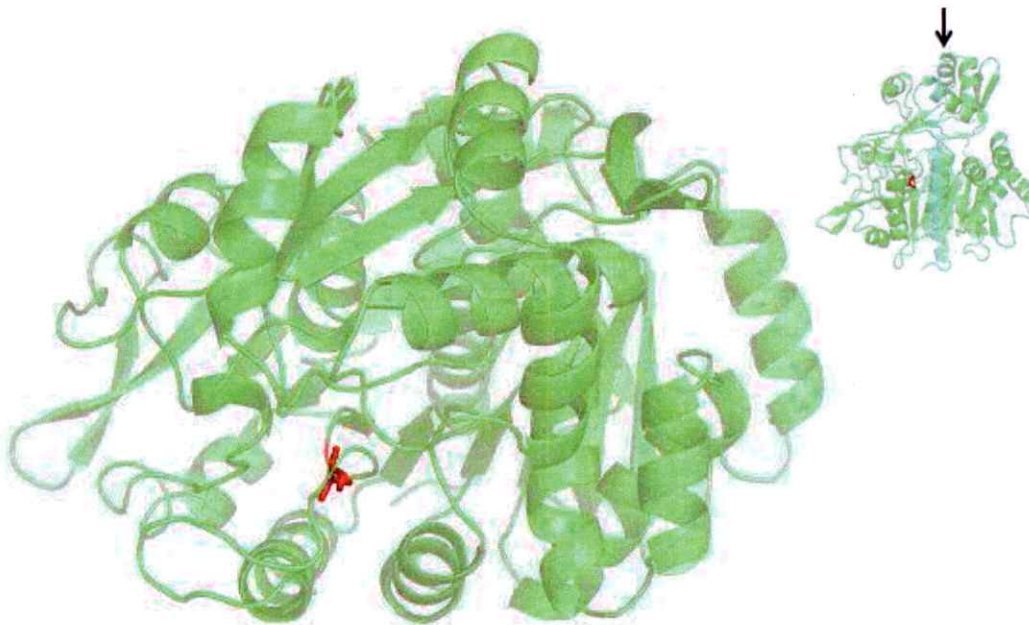
**Figura 26. Posición del W181 con respecto al cambio estructural de *Mb*PFK/GK al unir ligando.** Estructura de *Mb*PFK/GK abierta (cian) y cerrada (azul), donde se observa el W181 en modelo de varillas, y el movimiento que este realiza al cambiar la conformación de la enzima. En rojo se muestra el W181 cuando la estructura se encuentra abierta, mientras que en amarillo, cuando está cerrada.

En el trabajo de Knappskog y Haavik (1995) con la fenilalanina hidroxilasa humana y en el de Markovic-Housley y cols. (1999) con la subunidad hidrofílica del transportador de manosa de *E. coli*, se realizaron sustituciones individuales, dobles o triples de triptófano por fenilalanina y en ambos casos se observó que algunas de las sustituciones individuales generaban cambios en la cinética y estabilidad de la proteína. Sin embargo, al realizar mutantes dobles o triples, el comportamiento cinético y la estabilidad se recuperaban total o parcialmente, teniéndose para la cinética que las mutantes dobles de la subunidad hidrofílica del transportador de manosa de *E. coli* presentaban los mismos niveles de actividad que la enzima silvestre, mientras que la triple mutante de la fenilalanina hidroxilasa humana presentaba una variación (aumento o disminución) de no más de dos veces en cada uno de sus parámetros cinéticos ( $V_{m\acute{a}x}$ ,  $K_M$ ,  $S_{0.5}$  y  $n_h$ ) con respecto a la enzima silvestre, cambios menos abruptos que los observados en este Seminario de Título. En el trabajo de Knappskog y Haavik, también se da cuenta de que la sustitución de cierto triptófano, ya sea de manera individual o combinada, generaba la precipitación gradual de la proteína incluso al ser almacenada a 0-4°C, lo que resulta similar a la menor estabilidad observada en las mutantes de *MbPFK/GK*.

Al realizar el cambio de la tirosina 242 por un triptófano en la mutante *MbY242W*, se tiene un aumento en la  $K_M$  de ambos sustratos, tanto si se compara con la enzima silvestre como si se le compara con la mutante sin triptófano, *MbsW*. La misma situación se observa en el caso de la mutante *MmV231W* al contrastarla con *MmPFK/GK*. Estos residuos aminoacídicos se ubican en un lazo que se encuentra al interior del dominio mayor (Figura 27) y en ambos casos el residuo aminoacídico original posee un menor volumen e hidrofobicidad que el triptófano, con lo que se



puede especular que la mutación realizada tiene mayor capacidad de afectar al sitio activo, con la consecuente reducción en la capacidad de unir ambos sustratos.



**Figura 27. Vista superior de *MmPFK/GK*, mostrando la posición de V231.** V231 (de color rojo en modelo de varillas) se ubica en un lazo al interior del dominio mayor. En la esquina superior se indica con una flecha la cara superficial de la proteína.

El cambio de la asparagina 203 por un triptófano en *MmN203W* dio cuenta de los resultados más sorprendentes. En la actividad PFK, la  $K_M$  de fructosa-6-P disminuye dos veces y la  $K_M$  de MgADP disminuye ocho veces, con respecto a la enzima silvestre, mientras que en la actividad GK, la  $K_M$  de glucosa disminuye catorce veces y la  $K_M$  de MgADP se mantiene más o menos similar. Los ensayos de docking realizados por Castro-Fernandez y cols (2014) con el modelo por homología de la enzima *MmPFK/GK*, mostraron que el residuo N203 no presenta interacción con glucosa, mientras que las cadenas laterales de este residuo estarían formando puentes de hidrógeno con el fosfato de fructosa-6-P. Sin embargo, en ese mismo trabajo se

observó que dicha asparagina no se encontraba conservada en ninguna de las ADP-PFK de los Methanosarcinales y Thermococcales, lo que les llevó a cuestionar la relevancia de este residuo en la especificidad por sustrato y en el proceso catalítico. Sin embargo, el aumento de la eficiencia catalítica para glucosa en la enzima *MmN203* con respecto a su enzima silvestre vuelve a poner en relevancia la participación de este residuo en la catálisis. Los ensayos de unión de ligandos de *MmN203W* mediante fluorescencia intrínseca, sustentan la relevancia del cambio generado por la mutación puntual. Resulta curioso que mientras la fructosa-6-P genera un apagamiento de la fluorescencia, la glucosa genera un aumento de esta. Esto da cuenta de que la unión de estos azúcares a la enzima está generando distintos efectos en la estructura de la proteína, dado que mientras un aumento de la fluorescencia da cuenta de una menor exposición del triptófano al solvente, una disminución de la fluorescencia indica lo contrario (Jackman y cols., 1992).

Además de lo anterior, los cambios en la eficiencia catalítica de la mutante *MmN203W*, y la capacidad que presentó para sensar ligando, tienen una alta relevancia, dado que esta mutante resultará un modelo útil para estudios posteriores que permitan analizar el mecanismo catalítico y la unión de sustratos en esta enzima.

Finalmente, los experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca por acrilamida realizados con la *MbPFK/GK* y la *MmzPFK/GK*, permitieron corroborar parcialmente la hipótesis planteada, ya que si bien no se observó una mayor permeabilidad en la enzima psicrófila en condiciones de baja temperatura, sí se observó una mayor permeabilidad en condiciones de temperatura ambiente. Esto contrasta con los resultados obtenidos por D'Amico y cols. (2003) para los homólogos de  $\alpha$ -amilasa, donde el aumento de la temperatura genera un aumento de la

permeabilidad en ambos homólogos, con un aumento más marcado para la enzima psicrófila. Sin embargo, los resultados obtenidos se condicen con la teoría de los estados correspondientes, la cual a grandes rasgos expone que los homólogos de enzimas adaptadas a distintas temperaturas, presentan cantidades equivalentes de ensambles conformacionales bajo su respectiva temperatura fisiológica (Závodzky y cols., 1998). Las  $K_{SV}$  de *Mb*PFK/GK a 10°C y de *Mmz*PFK/GK a 25°C son similares, lo que indicaría que en condiciones cercanas a las fisiológicas, ambas enzimas presentan un grado de flexibilidad similar.

Estos resultados se pueden relacionar con lo obtenido por Zamora y cols. (datos no publicados) para la variación de las  $K_M$  de *Mb*PFK/GK y *Mm*PFK/GK en función de la temperatura (véase Introducción), que dan cuenta de que en el modelo mesófilo la  $K_M$  de fructosa-6-P se mantiene constante al aumentar la temperatura, mientras que en el modelo psicrófilo, la  $K_M$  va aumentando con el incremento de la temperatura. La flexibilidad puede ser vista como la capacidad de una enzima de visitar distintos ensambles conformacionales. De esta manera, mientras la ADP-PFK/GK mesófila mantiene el mismo número de ensambles conformacionales al variar la temperatura dentro de cierto rango, lo que se manifiesta en su flexibilidad invariable, su afinidad por el sustrato no varía significativamente, debido a que está visitando con la misma frecuencia aquellas conformaciones que favorecen la unión con el sustrato. A su vez, la ADP-PFK/GK psicrófila incrementa su flexibilidad al aumentar la temperatura, con lo que aumenta el número de ensambles conformacionales que adopta, lo que genera una disminución en la frecuencia con que visita las conformaciones favorables a la unión del sustrato.

No obstante lo anterior, hay que considerar que este cambio en la  $K_M$  por sí solo no puede considerarse como una estrategia de adaptación al frío, ya que la enzima evoluciona a lo largo del tiempo con una presión selectiva en la que no solamente actúan las bajas temperaturas, sino que también influyen otros factores, como la disponibilidad de sustrato, la relevancia que tiene la vía metabólica en que participa la enzima, y asimismo, la importancia de la enzima dentro de la ruta metabólica. En otras palabras, la disminución de la  $K_M$  podría deberse a otros aspectos evolutivos de la enzima y haber resultado favorable en la adaptación a la psicofilicidad. La corroboración de la relación entre la  $K_M$ , la permeabilidad de la proteína, y la adaptación al frío, podría ser estudiada con las mutantes *Mb214W* y *MbY242W* elaboradas en este trabajo, puesto que justamente estas dos mutantes presentaron respectivamente una disminución y un aumento en las  $K_M$  para MgADP y para fructosa-6-P.

Finalmente, es preciso destacar que los experimentos realizados en este Seminario de Título permitieron cumplir los objetivos propuestos, aunque de una manera diferente a la previamente establecida.

## CONCLUSIONES

- ❖ Las mutaciones realizadas en las posiciones 214/203 y 242/231 en *MbPFK/GK* y *MmPFK/GK*, generan cambios significativos en los parámetros cinéticos de las enzimas, lo que refleja que dichas mutaciones afectan la catálisis y unión de sustratos.
- ❖ La eliminación de los triptófanos en *MbPFK/GK* genera una pérdida significativa en la estabilidad de la proteína, haciéndola particularmente más sensible a la deficiencia de NaCl en el medio.
- ❖ La mutante *MmN203W* presenta un aumento en la eficiencia catalítica en las actividades PFK y GK, siendo este aumento más significativo en la actividad GK.
- ❖ Las diferencias en los cambios de fluorescencia intrínseca por unión de ligando en *MmN203W*, dan cuenta de que esta enzima es capaz de sensar los tres ligandos, y que la unión de fructosa-6-P genera cambios distintos en el ambiente del W203 que los generados por la unión de glucosa.
- ❖ Las  $K_{SV}$  obtenidas para el modelo mesófilo *MmzPFK/GK* y para el modelo psicrófilo *MbPFK/GK* dan cuenta de que mientras la enzima mesófila mantiene su flexibilidad constante, la enzima psicrófila presenta un incremento de esta al aumentar la temperatura.
- ❖ Los resultados obtenidos en este trabajo para las  $K_{SV}$  del modelo mesófilo *MmzPFK/GK* y modelo psicrófilo *MbPFK/GK*, relacionados con los obtenidos para las  $K_M$  del modelo mesófilo *MmPFK/GK* y el mismo modelo psicrófilo en trabajos anteriores, sugieren que en la familia de las quinasas dependientes de

ADP las enzimas psicrófilas han evolucionado para tener un mismo número de ensambles conformacionales a baja temperatura que los que tiene una enzima mesófila a temperatura ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abarca-Lagunas, M. J., Rivas-Pardo, J. A., Ramírez-Sarmiento, C. A., & Guixé, V. (2015). Dissecting the functional roles of the conserved NXXE and HXE motifs of the ADP-dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis*. *FEBS letters* 589: 3271-3276.
- Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J. P., & Gerday, C. (2000). Structural, Kinetic, and Calorimetric Characterization of the Cold-active Phosphoglycerate Kinase from the Antarctic *Pseudomonas sp.* TAC118. *Journal of Biological Chemistry* 275: 11147-11153.
- Berg, J.M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. 2008. Enzimas: conceptos básicos y cinética. En Berg, J.M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. (eds.), *Bioquímica* (pp. 205-240). Reverté, Barcelona.
- Betts, M. J., & Russell, R. B. (2003). Amino acid properties and consequences of substitutions. *Bioinformatics for geneticists* 317: 289.
- Castro-Fernandez, V., Bravo-Moraga, F., Herrera-Morandé, A. & Guixé, V. (2014). Bifunctional ADP-dependent phosphofructokinase/glucokinase activity in the order *Methanococcales*—biochemical characterization of the mesophilic enzyme from *Methanococcus maripaludis*. *FEBS Journal* 281: 2017-2029.
- D'Amico, S., Marx, J. C., Gerday, C. & Feller, G. (2003). Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 278: 7891-7896.
- Eftink, M. R. & Ghiron, C. A. (1976). Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* 15: 672-680.
- Feller, G. (2013). Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica*, vol. 2013.



Guixé, V., & Merino, F. (2009). The ADP-dependent sugar kinase family: Kinetic and evolutionary aspects. *IUBMB Life* 61: 753-761.

Jackman, M. P., Parry, M. A., Hofsteenge, J., & Stone, S. R. (1992). Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of the reaction of thrombin with hirudin. *Journal of Biological Chemistry* 267: 15375-15383.

Kengen, S. W., De Bok, F. A., Van Loo, N. D., Dijkema, C., Stams, A. J., & De Vos, W. M. (1994). Evidence for the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 17537-17541.

Knappskog, P. M., & Haavik, J. (1995). Tryptophan fluorescence of human phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34:11790-11799.

Lakowicz, J. R. 2006. Dynamics of Solvent and Environmental Effects. En Lakowicz, J. R.(ed.), *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp 237-276). Springer, Nueva York.

Liang, Z. X., Tsigos, I., Lee, T., Bouriotis, V., Resing, K. A., Ahn, N. G., & Klinman, J. P. (2004). Evidence for increased local flexibility in psychrophilic alcohol dehydrogenase relative to its thermophilic homologue. *Biochemistry* 43:14676-14683.

Lonhienne, T., Zoidakis, J., Vorgias, C. E., Feller, G., Gerday, C., & Bouriotis, V. (2001). Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *Journal of Molecular Biology* 310: 291-297.

Markovic-Housley, Z., Stolz, B., Lanz, R., & Erni, B. (1999). Effects of tryptophan to phenylalanine substitutions on the structure, stability, and enzyme activity of the IIBB Man subunit of the mannose transporter of *Escherichia coli*. *Protein science* 8: 1530-1535.

Olufsen, M., Smalås, A. O., Moe, E., & Brandsdal, B. O. (2005). Increased flexibility as a strategy for cold adaptation: a comparative molecular dynamics study of cold-and warm-active uracil DNA glycosylase. *Journal of Biological Chemistry* 280: 18042-18048.



Rivas-Pardo, J. A., Herrera-Morandé, A., Castro-Fernandez, V., Fernandez, F. J., Vega, M. C., & Guixé, V. (2013). Crystal structure, SAXS and kinetic mechanism of hyperthermophilic ADP-dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis* reveal a conserved mechanism for catalysis. *PLoS ONE* 8: e66687.

Siddiqui, K. S., & Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 75: 403-433.

Struvay, C. & Feller, G. (2012). Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 11643-11665.

Tsuruta, H., Mikami, B., & Aizono, Y. (2005). Crystal structure of cold-active protein-tyrosine phosphatase from a psychrophile, *Shewanella* sp. *Journal of Biochemistry* 137: 69-77.

Žavodszky, P., Kardos, J., Svingor, Á. & Petsko, G. A. (1998). Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 7406-7411.