

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***CAMBIO DE ESPECIFICIDAD POR DINUCLEÓTIDO DEL
SENSOR FLUORESCENTE PEREDOX MEDIANTE DISEÑO
RACIONAL***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Proteínas Recombinantes y Biotecnología y Memoria para
optar al Título de Bioquímico por:**

DIXON ANDRÉS CID HIDALGO

Director de Tesis: Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Santiago-CHILE

Mayo 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

Dixon Andrés Cid Hidalgo

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de especialización Bioquímica de Proteínas Recombinantes y Biotecnología y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Cabrera Paucar _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mauricio Báez Larach _____

Dr. Nelson Barrera Rojas _____

MSc. Davor Cotoras Tadic _____

“Deberías disfrutar de los desvíos. Disfrútalos mucho, porque de ese modo
encontrarás aquello que es más importante que lo que buscabas”

Ging Freecss

*A mis padres,
que, con cariño y paciencia, han apoyado mis aventuras y desafíos.*

AGRADECIMIENTOS

Siempre hay que dar las gracias a las personas que te ayudan. Una de las primeras enseñanzas que recibí de mi mamá, a quien debo la vida entera por su crianza cariñosa y valórica, el apoyo en los momentos difíciles y la rica comida caliente en los días que ya no quería más guerra. A mi papá por enseñarme lo importante que es aprender de todo lo que sea posible. A Sebastián, por inculcarme la pasión por la lectura. A Ivancito, por ser siempre tan Ivancito. A mi familia y mis amigxs de toda la vida, por darme ánimos para terminar la tesis cada vez que me preguntaban cuánto me faltaba.

A mis amigxs de la carrera, por hacer emocionante este largo trayecto. Jamás olvidaré el éxtasis de nuestras victorias en la semana BQ. A los longis chupaperros, el mejor equipo para quejarnos de los males del mundo.

A Ricardo, por enseñarme lo que realmente significa hacer ciencia y sus retos-consejos en momentos de flaqueza. A Feñita, por ser una gran compañera de batallas y postres. A Felipe, por su serenidad y consejos. A todas las personas del Laboratorio de Bioquímica, con quienes compartí grandes momentos de (des)ilusión científica, conversaciones de café y sesiones post-almuerzo viendo videos en Youtube. Muchas gracias por mostrarme como sobrevivir a las inclemencias de hacer ciencia en este país.

Y gracias a ti, Catalina, por ser la mejor compañera que pude haber deseado.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1121170.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	ii
FINANCIAMIENTO	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1. Dinucleótidos de adenina nicotinamida y su rol en el metabolismo celular.	1
2. Metodologías convencionales para la cuantificación de dinucleótidos	4
3. Sensores Fluorescentes Codificados Genéticamente	6
6. GEFS diseñados para la determinación <i>in vivo</i> de dinucleótidos	8
7. Análisis estructural de la interacción T-Rex/NAD(H)	14
8. Cambio de especificidad de Peredox mediante ingeniería de proteínas	16
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
MATERIALES	20
1. Reactivos.....	20
2. Cepas bacterianas.....	21
3. Vectores	22
4. Partidores	22
MÉTODOS.....	23
1. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS.....	23
1.1. Superposición y árbol estructural	23
1.2. Obtención de modelos <i>in silico</i> de mutantes de T-Rex y análisis de Potenciales Estadísticos.....	24

1.3. Simulación de Dinámica Molecular y cálculo de energía libre mediante método de MM-PBSA.....	27
2. MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	28
2.1. Medios de cultivo.....	28
2.2. Preparación de ADN plasmidial.....	28
2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	29
2.4. Digestión con enzimas de restricción	29
2.5 Ligación vector-inserto	29
2.6. Electrotransformación de células	30
3. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	31
3.1 Purificación de Peredox silvestre y mutante.....	31
3.2. Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)	33
3.3. Ensayos de fluorescencia.....	34
3.4. Determinación de parámetros de unión a ligando	34
RESULTADOS.....	37
Capítulo 1: Determinantes estructurales de la especificidad por dinucleótido en proteína Rex de <i>Thermus aquaticus</i>	37
1.1. Análisis preliminar de la estructura tridimensional de T-Rex.....	37
1.2. Análisis de Potenciales Estadísticos del <i>loop</i> β 4- β 5.....	39
1.3. Análisis estructural-evolutivo de la familia Rex.....	43
1.4. Dinámicas moleculares y análisis de energía libre por método MM-PBSA.....	48
Capítulo 2: Generación y purificación de Peredox silvestre y mutante NRS	53
2.1. Generación de la mutante Peredox NRS	54
2.2 Expresión y purificación de Peredox silvestre y mutante.....	55
Capítulo 3: Comportamiento fluorescente de Peredox silvestre y mutante ante la unión de dinucleótidos.	62
3.1. Caracterización de la respuesta fluorescente de Peredox silvestre y mutante frente a la unión de dinucleótidos	62
Capítulo 4: Comportamiento fluorescente de Peredox silvestre y mutante frente a cambios en la razón NAD(P)H/NAD(P) ⁺	66

4.1. Caracterización de la respuesta fluorescente de Peredox silvestre frente a la unión de NADH y NAD ⁺	69
4.2. Caracterización de la respuesta fluorescente de Peredox NRS frente a la unión de NADH y NAD ⁺	72
4.3. Caracterización de la respuesta fluorescente de Peredox NRS a la unión de NADPH y NADP ⁺	74
DISCUSIÓN	77
1. Análisis estructural-evolutivo de la especificidad por dinucleótido en T-Rex	77
2. Purificación de Peredox silvestre y mutante NRS	80
3. Efecto de mutaciones en el <i>loop</i> β4-β5 en la especificidad por dinucleótido en Peredox	81
4. Caracterización de Peredox silvestre y mutante NRS como sensor de la razón NAD(P)H/NAD(P) ⁺	82
CONCLUSIONES	87
REFERENCIAS	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura tridimensional de los cofactores NAD(P).....	2
Figura 2. Diseño de un Sensor Fluorescente Genéticamente Codificado.....	7
Figura 3. Representación esquemática del sensor Peredox.....	11
Figura 4. Comportamiento fluorescente de las proteínas T-Sapphire y mCherry del sensor Peredox.....	11
Figura 5. Comportamiento de la respuesta fluorescente de Peredox frente a la unión de NADH y NAD ⁺	12
Figura 6. Representación esquemática del monómero de T-Rex.....	15
Figura 7. Bolsillo de unión a NAD(H) en la estructura cristalográfica de proteína Rex de <i>Thermus aquaticus</i>	38
Figura 8. Escaneo por Alanina y evaluación de pseudo-energía.....	40
Figura 9. Escaneo por Arginina y evaluación de pseudo-energía.....	42
Figura 10. Superposición estructural de dominios Rossmann.	46
Figura 11. Árbol estructural de dominios Rossmann de miembros de la familia 6PGDH y de la familia Rex.....	47
Figura 12. Representación RMSD de la cadena principal de T-Rex en función del tiempo de simulación para los sistemas T-Rex silvestre y T-Rex NRS... ..	49
Figura 13. Descomposición de energía libre de unión por residuo en complejos de T-Rex silvestre con NADH y NADPH como ligando.....	51
Figura 14. Descomposición de energía libre de unión por residuo en complejos de T-Rex mutante NRS con NADH y NADPH como ligando.	52
Figura 15. Cromatograma de secuenciación de Peredox silvestre y mutante NRS.. ..	54
Figura 16. Test de expresión de Peredox silvestre visualizado en gel SDS-PAGE.....	56
Figura 17. Esquema preliminar de purificación de Peredox silvestre.....	57
Figura 18. Etapas de la purificación de Peredox silvestre mediante cromatografía por afinidad.....	58
Figura 19. Monitoreo de fluorescencia de Peredox silvestre en gel SDS-PAGE.	58
Figura 20. Cromatografía de exclusión molecular de Peredox silvestre.	59
Figura 21. Cromatografía de intercambio aniónico de Peredox silvestre.....	60
Figura 22. Purificación de Peredox silvestre y mutante NRS.....	61
Figura 23. Espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas fluorescentes T-Sapphire y mCherry presentes en Peredox silvestre.....	63
Figura 24. Curvas de saturación para la fluorescencia de Peredox silvestre y mutante NRS frente a la unión de NADH).	64
Figura 25. Curvas de saturación para la fluorescencia de Peredox silvestre y mutante NRS frente a la unión de NADPH.	64
Figura 26. Caracterización de la unión de NADH y NAD ⁺ a Peredox silvestre.	70

Figura 27. Comparación de respuesta fluorescente de Peredox silvestre a diferentes R'	71
Figura 28. Caracterización de la unión de NADH y NAD^+ a Peredox NRS... 73	
Figura 29. Comparación de respuesta fluorescente de Peredox NRS a diferentes R'	74
Figura 30. Caracterización de la unión de NADPH y NADP a Peredox NRS.	75
Figura 31. Comparación de respuesta fluorescente de Peredox NRS a diferentes R'	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los cambios de especificidad por NAD(P)(H).....	17
Tabla 2. Reactivos utilizados en este trabajo.....	20
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo	22
Tabla 4. Estructuras cristalinas utilizadas en la superposición estructural de dominios Rossmann.	45
Tabla 5. Energía libre de unión a ligando total y por posición en cada sistema de T-Rex.....	53
Tabla 6. Parámetros de unión a ligandos de Peredox silvestre y mutante NRS.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucléico
cpFP	Proteína Fluorescente permutada circularmente
cpYFP	Proteína Fluorescente Amarilla permutada circularmente
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
FP	Proteína Fluorescente
GEFS	Sensores Fluorescentes Genéticamente Codificados
GFP	Proteína Fluorescente Verde
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
K _d	Constante de disociación
K _d ^{app}	Constante de disociación aparente
NAD(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado y reducido
NAD(P)	NAD ⁺ y NADP ⁺
NAD(P)(H)	NAD ⁺ , NADH, NADP ⁺ y NADPH
NAD(P)H	NADH y NADPH
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado y reducido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de Datos de Proteínas
PDB ID	Identificador del Banco de Datos de Proteínas
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RMSD	Desviación de la media cuadrática
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
YFP	Proteína Fluorescente Amarilla

RESUMEN

Los dinucleótidos de adenina nicotinamida (NAD(P)(H)) cumplen un rol fundamental como cofactores enzimáticos, principalmente en reacciones de oxido-reducción. Sus concentraciones intracelulares determinan el estado fisiológico celular, en especial la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺, por lo que es necesario tener métodos que permitan una cuantificación confiable de estas moléculas. Los métodos *in vitro* e *in vivo* comúnmente utilizados no permiten determinar el estado redox intracelular con precisión dadas las dificultades analíticas que poseen. El diseño de Sensores Fluorescentes Codificados Genéticamente (GEFS, por su sigla en inglés) ayuda a superar esas dificultades, ya que, estos biosensores permiten la cuantificación *in vivo* y en tiempo real de moléculas específicas, sin dañar las células estudiadas. Estos sensores se diseñan a partir de la fusión de una proteína fluorescente permutada circularmente con un dominio sensor proteico capaz de generar un cambio conformacional en respuesta a la unión de un ligando específico.

Utilizando esta estrategia, muchos GEFS han sido diseñados para la cuantificación *in vivo* de dinucleótidos. Entre los sensores de dinucleótidos publicados a la fecha de inicio de esta tesis, el sensor Peredox era el único GEFS capaz de detectar la razón NADH/NAD⁺ intracelular. Peredox utiliza como dominio sensor al represor transcripcional sensible al estado redox T-Rex del organismo *Thermus aquaticus*. Aunque T-Rex es capaz de unir tanto

NADH como NAD⁺, sólo la unión del dinucleótido reducido induce un cambio conformacional de una forma abierta a una cerrada. Este fenómeno permite a Peredox detectar la razón NADH/NAD⁺.

Usando Peredox y la información estructural de T-Rex como punto de partida, el objetivo de esta tesis fue estudiar los determinantes estructurales de especificidad de dinucleótido con el fin de avanzar hacia la generación de un GEFS capaz de detectar la razón NADPH/NADP⁺, del cual no hay sensores diseñados a la fecha. Para esto se utilizaron estrategias de Diseño Racional mediante aproximaciones *in silico* e *in vitro*.

Se determinó experimentalmente que el *loop* β 4- β 5 de T-Rex contiene determinantes estructurales de la especificidad por dinucleótido. Mediante análisis de Potenciales Estadísticos, comparación de motivos de especificidad basados en homología y simulaciones de Dinámica Molecular, se determinó los residuos clave en la especificidad por NAD(H) y las mutaciones necesarias para obtener una variante NADPH preferente. Se evaluó el efecto de estas mutaciones en la especificidad por NAD(P)H a través de ensayos *in vitro* de fluorescencia, obteniéndose un sensor preferente por NADPH. Sin embargo, el sensor no presentó un mecanismo de unión mutuamente excluyente a NADPH y NADP⁺, condición *sine qua non* para que un sensor de cuenta de la razón NADPH/NADP⁺.

ABSTRACT

Nicotinamide adenine dinucleotides (NAD(P)(H)) play a fundamental role as enzymatic cofactors, mostly on oxidation-reduction reactions. The intracellular concentrations of these dinucleotides determine the cellular physiological state, especially the NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratio, so it is necessary to have methods that allow a reliable quantification of these molecules. The *in vitro* and *in vivo* methods commonly used do not allow to determine the intracellular redox state with accuracy, given the analytical difficulties they show. The design of Genetically Encoded Fluorescent Sensors (GEFS) aids to overcome these difficulties, since they can perform real-time *in vivo* detection of specific molecules, without damaging the cells studied. These sensors are designed from the fusion of a circularly permuted fluorescent protein with a protein sensor domain capable of generating a conformational change in response to the binding of a specific ligand.

Using this strategy, many GEFS have been designed for *in vivo* quantification of dinucleotides. Among the dinucleotide sensors published at the start date of this thesis, the sensor Peredox was the only GEFS capable of detecting intracellular NADH/NAD⁺ ratio. Peredox uses the redox-sensing transcriptional repressor T-Rex, from *Thermus aquaticus*, as a sensor domain. Although T-Rex is capable of binding both NADH and NAD⁺, only the binding of the

reduced dinucleotide induces a conformational change from an open to a closed form. This phenomenon allows Peredox to detect the NADH/NAD⁺ ratio.

Using Peredox and the structural information of T-Rex as a starting point, the goal of this thesis was the study of the structural determinants of dinucleotide specificity, with aim to achieve to a GEFS capable of detecting the NADPH/NADP⁺ ratio. There is no sensor designed for this parameter to date. To achieve this goal, we used Rational Design strategies, through *in silico* and *in vivo* approximations.

We determined experimentally that β 4- β 5 *loop* of T-Rex contains structural determinants of dinucleotide specificity. Through statistical potential analysis, homology-guided comparison of specificity motifs and Molecular Dynamics simulations, a triple mutant of T-Rex was proposed. The effect of these mutations on the specificity for NAD(P)H was evaluated through *in vitro* fluorescence assays, obtaining a Peredox variant with NADPH preference. However, the sensor did not show a mutually-exclusive binding fashion of NADPH and NADP⁺, a *sine qua non* condition for a sensor of the NADPH/NADP⁺ ratio.

INTRODUCCIÓN

La vida en sí misma, desde el punto de vista bioquímico, corresponde a una compleja red de reacciones químicas interrelacionadas dentro de un sistema de auto-reproducción (Meurant, 2012). Este conjunto de reacciones químicas es conocido como *metabolismo* y permite a todo organismo vivo responder a las exigencias de energía y materia prima para suministrar los procesos que lo mantienen y desarrollan.

1. Dinucleótidos de adenina nicotinamida y su rol en el metabolismo celular.

Dentro del metabolismo celular, los dinucleótidos de adenina nicotinamida, NAD(H) y su forma fosforilada, NADP(H), son moléculas que participan en múltiples reacciones de oxido-reducción enzimática (Ouzounis & Karp, 2000). En estas reacciones, actúan como sustrato obligado o *cofactor* de las enzimas involucrada (Stryer, 1995). Estas moléculas poseen potenciales redox estándar equivalentes ($E^{\circ} = -0,32 \text{ V}$), siendo la presencia del grupo 2'-fosfato en la ribosa adyacente a la adenina en NADP(H) la única diferencia estructural entre ellas (Figura 1). Sin embargo, esta diferencia determina la especificidad de las proteínas que utilizan estos cofactores y el rol fisiológico que poseen (Nelson & Cox, 2006).

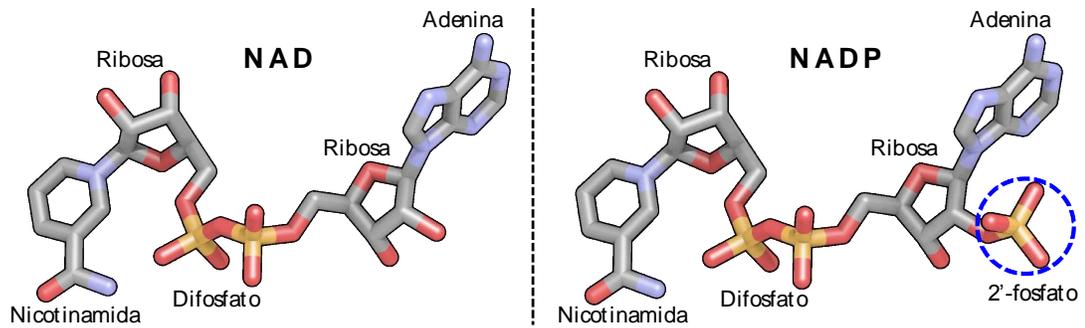


Figura 1. Estructura tridimensional de los cofactores NAD(P). Se nombran los grupos químicos que componen su estructura.

En las reacciones catabólicas, la degradación de moléculas orgánicas se produce a través de reacciones de oxidación, en las cuales estos dinucleótidos como aceptores de electrones, produciéndose equivalentes reducidos de NAD(P)H (Olavarria et al., 2014). El poder reductor de NADH es transferido principalmente a oxígeno a través de la cadena transportadora de electrones, con el fin de impulsar la generación de ATP mediante fosforilación oxidativa (Ying, 2008). Por otro lado, la forma fosforilada, NADPH, participa principalmente en las vías anabólicas de biosíntesis, transfiriendo sus electrones a moléculas que permanecen dentro de la célula en forma de biomasa (Sauer et al., 2004).

Interesantemente, los dinucleótidos de adenina ribosa participan no sólo de reacciones del metabolismo central, sino que también, en el caso de NAD(H), en la regulación de la homeostasis del calcio (Berger y cols., 2004), procesos de envejecimiento (Blander & Guarente, 2004), respuesta inmunológica (Ying y cols., 2003) y expresión génica (Zhang, Piston, & Goodman, 2002). Por otro lado,

NADP(H) posee un rol importante en los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo (Jiang, Zhang, & Dusting, 2011).

La reoxidación de los equivalentes reducidos de NAD(P)H permiten su reutilización en las vías catabólicas, por lo que existe una relación entre las concentraciones molares de cofactor reducido y oxidado que mantiene sus flujos de producción y consumo dentro de los parámetros que la homeostasis metabólica requiera (Henry, Broadbelt, & Hatzimanikatis, 2007). Esta relación – o razón aritmética– recibe el nombre de *razón NAD(P)H/NAD(P)⁺*.

Dada la participación de estos dinucleótidos en múltiples procesos fisiológicos, es que la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺ se considera un indicador del estado metabólico celular (Ying, 2008). En este sentido, se ha descrito cómo distintas perturbaciones fisiológicas reflejan cambios en la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺ (Auriol et al., 2011; Bennett, Kimball, & Gao, 2009; McCloskey et al., 2014).

Dada la relevancia de estos dinucleótidos en la homeostasis celular, resulta necesario contar con métodos que permitan cuantificarlos de manera lo más cercana posible al estado intracelular *in vivo* posible.

2. Metodologías convencionales para la cuantificación de dinucleótidos

Para determinar el rol crítico del NAD(P)(H) dentro de la célula, es necesario tener en cuenta su dinámica celular, vale decir, parámetros como su concentración total, su estado libre y unido a proteínas, su localización subcelular y estado redox (Pollak, Dölle, & Ziegler, 2007).

i) Métodos *in vitro*: Dentro de los métodos de cuantificación *in vitro* comúnmente utilizados se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución (Yang et al., 2007) y ensayos enzimáticos cíclicos (Zhang et al., 2002). Se plantea que estos métodos tienen como ventaja una alta sensibilidad y reproducibilidad, además de ser capaces de distinguir entre NAD⁺, NADH, NADP⁺ y NADPH. Sin embargo, se requiere un paso de lisado celular y extracción ácido/base previo a la cuantificación, lo que produce una destrucción parcial de los dinucleótidos, además de producirse un rápido cambio en su estado redox (Chenault, 1987). Además, mediante estos métodos sólo se logra determinar la concentración total de los cofactores sin distinguir la forma libre de la forma unida a proteínas, por lo que estas lecturas virtualmente no dan cuenta del estado redox *in vivo* (Sun et al., 2012). Para sortear este problema, Williamson y cols. desarrollaron un método para estimar indirectamente la razón NADH/NAD⁺ basado en el principio del equilibrio químico de la reacción catalizada por la enzima Lactato Deshidrogenasa (Williamson, Lund, & Krebs, 1967), cuantificando el lactato y piruvato presente en el extracto celular. A pesar de ser un método comúnmente

aceptado y ampliamente utilizado (Schwartz et al., 1974), esta técnica asume que la reacción entre lactato y piruvato se encuentra siempre cercana al equilibrio y que la razón NADH/NAD^+ sólo será fuertemente influenciada por esta reacción, obviando el hecho que estos cofactores participan en más de 700 reacciones redox (Sun et al., 2012).

Finalmente, debido a la ruptura celular, mediante estos métodos no es posible realizar análisis en tiempo real que permitan describir la dinámica intracelular de estos dinucleótidos en determinadas condiciones.

ii) Métodos *in vivo*: La determinación *in vivo* de NAD(P)(H) se realiza mediante mediciones de fluorescencia, debido a que tanto NADH como NADPH presentan un pico de excitación a 340 nm y un pico de emisión a 450 nm debido a la región nicotinamida que, en su forma reducida, presenta aromaticidad y le permite absorber la luz UV, mientras que la forma oxidada de estos cofactores no (Avi-Dor et al., 1962). De esta forma, es posible monitorear las fluctuaciones de la fracción reducida *in vivo*. Sin embargo, no es posible distinguir la fluorescencia proveniente de NADH de la emitida por NADPH , ya que, la presencia del fosfato diferenciador en NADPH no genera cambios en sus propiedades espectrales respecto a las de NADH (Wakita, Nishimura, & Tamura, 1995). Sumado a esto, la fracción de NAD(P)H libre está menos representada en la señal de fluorescencia obtenida respecto a la fracción unida a proteínas, debido a que en esta última se produce un aumento en la fluorescencia debido a cambios en el

microambiente circundante a la fracción nicotinamida (Lakowicz et al., 1992). Finalmente, estos métodos presentan problemas de sensibilidad a causa de la autofluorescencia celular, originada por flavinas, colágeno y piridoxina principalmente, que puede interferir la medición de fluorescencia de NAD(P)H (Patterson et al., 2000).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta evidente la necesidad de un método que permita cuantificar estos cofactores *in vivo*, en especial la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺.

3. Sensores Fluorescentes Codificados Genéticamente

La Proteína Fluorescente Verde (GFP, por su sigla en inglés) de la medusa *Aequorea victoria* y proteínas fluorescentes (FPs, por su sigla en inglés) homólogas de diversas especies marinas emiten fluorescencia de diferentes colores debido a grupos cromóforos únicos (Ghukasyan & Heikal, 2014). Estos cromóforos resultan de la ciclación y oxidación de residuos específicos dentro de la cadena polipeptídica en un proceso post-traducciona, sin necesidad de cofactores externos ni catálisis enzimática (Pakhomov & Martynov, 2008). Dada esta característica autocatalítica y por estar codificadas en un solo gen es que las FPs son ampliamente utilizadas como sondas fluorescentes (Chudakov et al., 2010).

El método más sofisticado de aplicación de las FPs consiste en la construcción de Sensores Fluorescentes Codificados Genéticamente (GEFS, por su sigla en

inglés) para iones, moléculas pequeñas y actividades enzimáticas (VanEngelenburg & Palmer, 2008). Estos sensores permiten el monitoreo en tiempo real de eventos intracelulares mediante la fusión de un dominio proteico sensor con una FP circularmente permutada (cpFP, por su sigla en inglés) (Nagai et al., 2004).

El diseño de una cpFP consiste en la fusión de sus extremos amino y carboxilo terminal mediante un *linker* polipeptídico y subsecuente generación de nuevos términos cerca del cromóforo, haciendo su fluorescencia mucho más sensible a cambios en el microambiente intramolecular (Baird, Zacharias, & Tsien, 1999) (Figura 2A). Para la construcción de un GEFS, una cpFP se debe fusionar un dominio sensor capaz de experimentar un cambio conformacional por unión de un ligando específico. Este cambio conformacional se transmite a la cpFP, produciéndose un cambio medible en sus propiedades espectrales (Figura 2B).

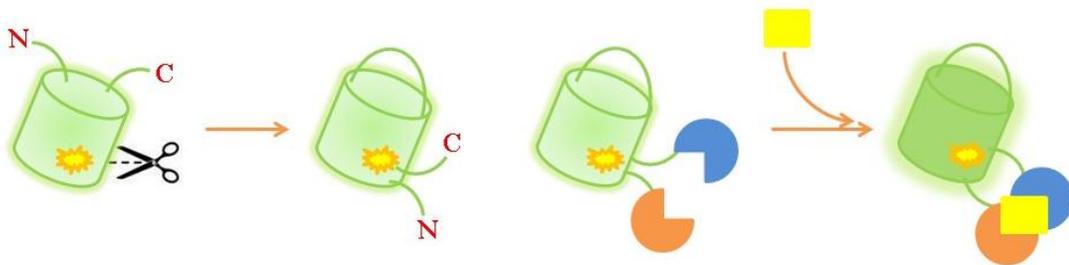


Figura 2. Diseño de un Sensor Fluorescente Genéticamente Codificado. (A) Se representa la generación de nuevos extremos amino y carboxilo terminales mediante el corte de una región del barril cercano al cromóforo (estrella amarilla). **(B)** Se representa la cpFP de sección (A) unida por sus extremos N- y C-terminal a dominios sensores (sección de círculo azul y naranja). La unión de un ligando específico (rectángulo amarillo) induce un cambio conformacional en el dominio sensor que se transmite a la cpFP, cambiando su actividad fluorescente.

El mecanismo de funcionamiento de los GEFS ha sido dilucidado a través de estudios cristalográficos (Akerboom et al., 2009), observándose que la permutante circular utilizada en el sensor de Ca^{2+} GCAMP2 tiene una pequeña abertura en su sitio de permutación. Esta abertura tiene 2 efectos principales: (1) el cromóforo está más expuesto al solvente, promoviendo la protonación del fenolato del cromóforo y (2) se disgrega la red de puentes de hidrógeno que normalmente estabiliza al fenolato fluorescente. En conjunto, estos efectos contribuyen a la baja fluorescencia del sensor en su estado apo-proteína. Sin embargo, la unión del ion calcio induce un cambio conformacional en el dominio sensor que sella la abertura en la permutante circular, bloquea la entrada de solvente y estabiliza su fluorescencia.

En base a esta estrategia se han diseñado GEFS para la cuantificación *in vivo* de distintas moléculas, siendo de interés para esta tesis aquellos destinados a la cuantificación de dinucleótidos.

6. GEFS diseñados para la determinación *in vivo* de dinucleótidos

A la fecha de inicio de este trabajo, varios sensores fluorescentes fueron diseñados para la determinación *in vivo* de dinucleótidos, los cuales se describirán a continuación. Es importante mencionar que todos estos sensores usan como dominio sensor a la proteína Rex, la cual es capaz de detectar cambios en la razón NADH/NAD^+ intracelular (McLaughlin et al., 2010).

Rex (por **Redox**-sensing transcriptional repressor) es un represor transcripcional sensible al estado redox intracelular que reprime la expresión de componentes de la cadena respiratoria en respuesta a cambios en la razón NADH/NAD⁺ intracelular (Brekasis & Paget, 2003). Aunque tanto NAD⁺ como NADH pueden unirse a Rex, sólo la unión de NADH induce un cambio conformacional desde una forma abierta a una forma cerrada que impide su unión al sitio de DNA blanco y ejercer su acción como represor transcripcional (McLaughlin et al., 2010). Es este cambio estructural el que permite su uso como dominio sensor en el diseño de GEFS para la cuantificación de dinucleótidos.

Frex es un sensor fluorescente de la concentración intracelular de NADH (Zhao et al., 2011). Su construcción consiste en una permutante circular de YFP (cpYFP) integrada entre las dos subunidades del dímero Rex de *Bacillus subtilis*, una de las cuales posee sólo su dominio de unión a dinucleótido. Las variantes de este sensor cubren un rango de afinidad por NADH de 40 nM a 50 µM, lo que permite utilizarlas en distintos compartimentos subcelulares, dado que poseen diferentes niveles de NADH entre ellos. Sin embargo, la señal obtenida por esta familia de sensores es sensible al pH en condiciones fisiológicas.

El sensor RexYFP (Bilan et al., 2014) fue construido insertando una cpYFP entre los dominios de una sola subunidad de la proteína Rex de *Thermus aquaticus* (T-Rex) (Sickmier et al., 2005). La unión de NADH produce un cambio en la señal

fluorescente obtenida por este sensor debido al cambio conformacional que produce en T-Rex. La forma oxidada puede unirse a T-Rex, pero no es capaz de inducir el mismo cambio conformacional que NADH, por lo que tanto NAD como NADH compiten por el sitio de unión a dinucleótido del sensor. En este escenario, la señal fluorescente de RexYFP depende de la concentración de ambos cofactores, NAD y NADH, por lo que el sensor responde a cambios en la razón NAD/NADH (Berg, Hung, & Yellen, 2009). Su afinidad por NADH es de 180 nM, describiéndose como un sensor capaz de obtener señales comparables desde distintos compartimentos subcelulares. Sin embargo, al igual que Frex, RexYFP es sensible a las variaciones de pH en condiciones fisiológicas, lo que dificulta su uso *in vivo*. Además, la unión de NADPH ($K_d \text{ NADPH} = 6,2 \mu\text{M}$) contribuye, aunque en menor medida, a la señal obtenida y no puede despreciarse bajo condiciones fisiológicas de mayor producción de NADPH.

De particular interés para este trabajo es el biosensor Peredox (Hung et al., 2011), el cual fue generado mediante inserción de una cpFP derivada de T-Sapphire (Zapata-Hommer & Griesbeck, 2003) entre las dos subunidades del dímero de T-Rex (Figura 3). Además, sobre esta construcción se unió en *tándem* mCherry (Shaner et al., 2004); proteína fluorescente roja incluida como normalizador de la señal (Figura 3), ya que, la adición de NADH no produce cambios en la fluorescencia roja de mCherry (Figura 4). La construcción produce una respuesta fluorescente verde exclusivamente por incubación con NADH, con

un pico de excitación alrededor de 400 nm y un pico de emisión alrededor de 510 nm (Figura 5).

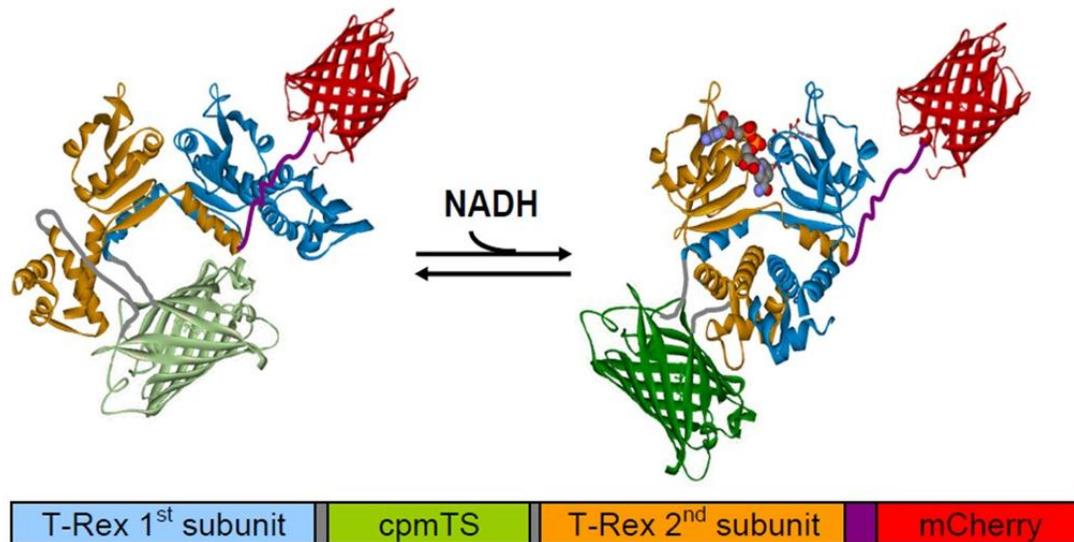


Figura 3. Representación esquemática del sensor Peredox. En este modelo, la cpFP verde (PDB ID: 3EVP) interpuesta entre 2 subunidades de Rex (azul y naranja) cambia su fluorescencia por unión de NADH (esferas y varas). La señal verde obtenida es normalizada por la fluorescencia roja de mCherry (PDB ID: 2H5Q).

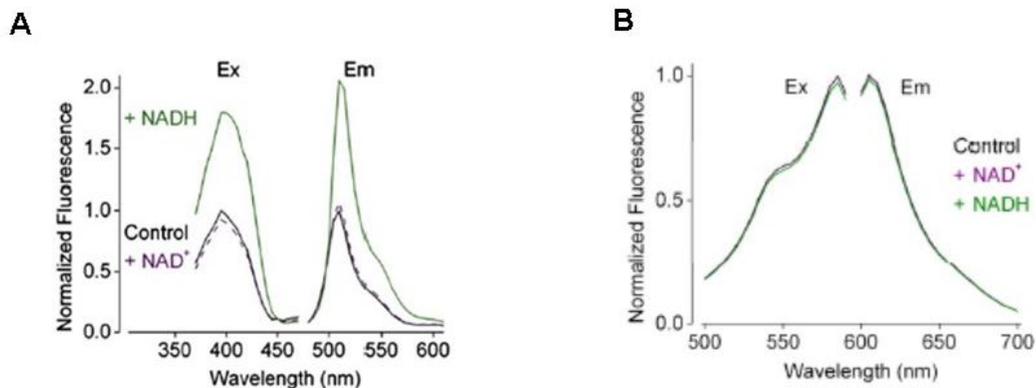


Figura 4. Comportamiento fluorescente de las proteínas T-Sapphire (A) y mCherry (B) del sensor Peredox. En ambos casos, se muestran los espectros de emisión y excitación en condición control (negro sólido), tras la adición de 100 mM de NAD⁺ (morado discontinuo) o 100 mM de NADH (verde sólido). Los valores de emisión fueron normalizadas respecto a la condición control. Modificado de Hung et al., 2011.

La unión de NAD^+ , si bien no produce cambios en la fluorescencia del sensor, compete por el sitio de unión con NADH, disminuyendo su afinidad de unión aparente (Figura 5A). Acorde a este modelo competitivo, cuando las concentraciones, tanto de NADH de NAD^+ , superan sus respectivas constantes de afinidad, entonces la respuesta de fluorescencia en estado estacionario del sensor indica la razón NADH/NAD^+ (Berg et al., 2009) (Figura 5B). Es importante destacar la dependencia con la concentración absoluta de NAD^+ de la respuesta fluorescente frente a R' (Figura 5B), cuya variación el autor considera que es aceptable si las fluctuaciones de $[\text{NAD}^+]$ no varían mucho en la condición *in vivo* (Hung et al., 2011).

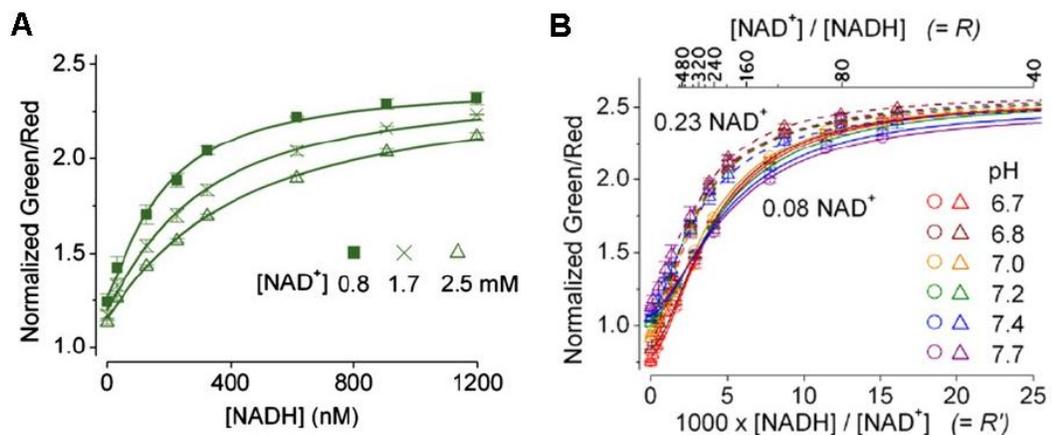


Figura 5. Comportamiento de la respuesta fluorescente de Peredox frente a la unión de NADH y NAD^+ . (A) Cambios en la razón de fluorescencia verde/roja de Peredox frente a cambios en la $[\text{NADH}]$, a distintas concentraciones fijas de $[\text{NAD}^+]$. (B) Comportamiento de la razón de fluorescencia verde/roja a diferentes razones NADH/NAD^+ a distintas concentraciones fijas de NAD^+ (línea continua: 0,23 mM, línea discontinua: 0,08 mM) y distintas condiciones de pH.

Peredox es capaz de dar cuenta de la razón NADH/NAD^+ en células de mamífero, tales como células epiteliales, gliales y neuronales, además de poder ser dirigido mediante péptidos señal a diversos compartimentos subcelulares. Sin embargo,

debido a la alta afinidad por NADH (5 nM), el sensor no es adecuado para medir la razón NADH/NAD⁺ mitocondrial por ser ésta entre 100 y 1000 veces mayor que la razón NADH/NAD⁺ citosólica (Williamson et al., 1967).

Peredox constituye un método confiable para detectar y cuantificar la razón NAD/NADH intracelular *in vivo* en células intactas en tiempo real. En un trabajo publicado posteriormente al inicio de esta tesis, se describió el diseño de un sensor de la razón NADH/NAD⁺ con mejores características de detección y emisión de fluorescencia (Zhao et al., 2016). Sin embargo, a la fecha, no existen sensores descritos para la razón NADPH/NADP⁺. Sólo existen sensores para la cuantificación por separado de NADPH (Tao et al., 2017) y de NADP⁺ (Cameron et al., 2016).

Por lo tanto, en este trabajo proponemos que es posible usar a Peredox como punto de partida para el diseño de un sensor de la razón NADPH/NADP⁺, para la cual no existen GEFS descritos. Para lograr este objetivo, es necesario comprender los aspectos estructurales que determinan su especificidad por dinucleótido.

7. Análisis estructural de la interacción T-Rex/NAD(H)

Dado que Peredox fue diseñado con T-Rex como dominio sensor, es pertinente realizar un análisis de su estructura para determinar el camino a seguir en la generación de un sensor fluorescente de la razón NADPH/NADP⁺.

Basado en la estructura cristalina de T-Rex (PDB ID:1XCB) (Sickmier et al., 2005), se observa que el monómero es bilobal, consistiendo en un dominio N-terminal α/β (residuos 2-76; $\alpha 1-\beta 1-\alpha 2-\alpha 3-\beta 2-\alpha 4$), con similitud con la familia de factores de transcripción Winged-Helix (Gajiwala & Burley, 2000), conectado por un *linker* al dominio C-terminal α/β (residuos 81-187; $\beta 3-\alpha 5-\beta 4-\beta 5-\beta 6-\alpha 6-\beta 7-\alpha 7-\beta 8-\beta 9-\alpha 8$) que posee un plegamiento tipo Rossmann, característico de las proteínas que unen dinucleótidos (Rossmann, Moras, & Olsen, 1974). Las subunidades se asocian resultando en un dímero de 60 kDa con forma de mariposa. Las moléculas de NADH se unen en la interfase monómero-monómero con una estequiometría de un NADH por dominio C-terminal (Figura 6). Un estudio cristalográfico de la unión de NADH y NAD⁺ a T-Rex evidencia que en el bolsillo de unión a dinucleótido de T-Rex pueden unirse 2 moléculas de NADH o una de NAD⁺. La unión de NADH a T-Rex induce un cambio en la disposición espacial de los residuos que interactúan con el anillo nicotinamida del dinucleótido que impide estéricamente la unión de NAD⁺, y viceversa (McLaughlin et al., 2010b).

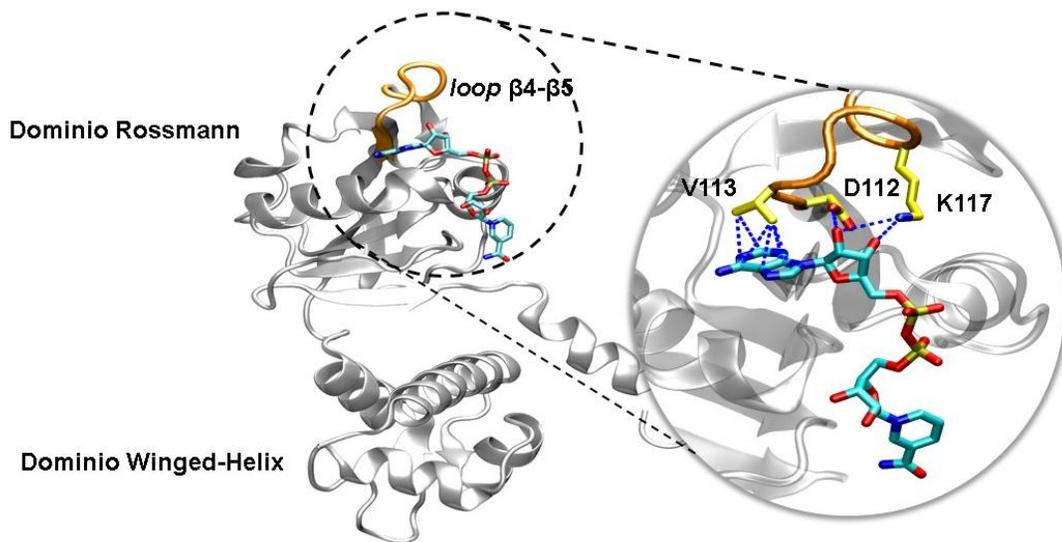


Figura 6. Representación esquemática del monómero de T-Rex. Se destacan los dominios que componen al monómero y al *loop* β4-β5, cuyo acercamiento muestra las interacciones que establece con NADH.

El *loop* β4-β5 resulta relevante puesto que interactúa directamente con la región adenina ribosa del NADH, lo cual podría dar luces de interacciones que determinan la selectividad entre NAD(H) y NADP(H) (Figura 6). Se observa la interacción entre D112 y la región 2'-OH de la ribosa adyacente a la adenina, la cual se relaciona con la especificidad por NAD(H) en otras proteínas de unión a dinucleótidos (Lesk, 1995). El residuo V113 interactúa con el anillo de adenina y el residuo K117 con el 3'-OH de la ribosa. El residuo D114, al poseer una carga negativa, podría estar actuando como impedimento electrostático de la unión de NADPH. Sin embargo, ninguna de estas interacciones ha sido evaluada experimentalmente, por lo que todos estos planteamientos son meramente especulativos.

Por lo tanto, el *loop* β 4- β 5 muestra características que podrían estar relacionándolo con la especificidad por dinucleótido. Sin embargo, aún no existe evidencia empírica que confirme esta hipótesis. Esta información tiene gran valor a la hora de evaluar un cambio en la especificidad de esta proteína hacia la unión de NADP(H).

8. Cambio de especificidad de Peredox mediante ingeniería de proteínas

La ingeniería de proteínas, como campo de investigación bioquímica, consiste en modificar una proteína de interés, mediante mutagénesis sitio-dirigida, para conseguir cambios funcionales como mejorar la sensibilidad a sustrato, aumento en constantes catalíticas, uso de cofactores a elección y cambio de especificidad de sustrato (Pleiss, 2011). Una de las estrategias utilizadas en ingeniería de proteínas es el Diseño Racional, el cual consiste en el uso de información *a priori* de la proteína de interés, como estructura o secuencia aminoacídica, para determinar residuos clave y la relevancia de cada uno de ellos en la función original y la deseada a diseñar (Z. Chen & Zeng, 2013).

El cambio de especificidad de NAD(H) a NADP(H), y viceversa, de diferentes enzimas ha sido conseguido por diversos grupos de investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los cambios de especificidad por NAD(P)(H).

Especie	Enzima	Cambio de especificidad	Referencia
<i>Candida tenuis</i>	Xilosa reductasa	NADPH → NADH	(Petschacher et al., 2005)
<i>Escherichia coli</i>	Glutación reductasa	NADPH → NADH	(Scrutton et al., 1990)
<i>Escherichia coli</i>	Ceto-ácido reductoisomerasa	NADPH → NADH	(Rane & Calvo, 1997)
<i>Escherichia coli</i>	Isocitrato deshidrogenasa	NADP → NAD	(Chen et al., 1995)
<i>Thermus thermophilus</i>	Isocitrato deshidrogenasa	NADP → NAD	(Yaoi et al., 1996)
<i>Vibrio harveyi</i>	Aldehído deshidrogenasa	NADP → NAD	(Zhang et al., 1999)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	L-lactato deshidrogenasa	NADH → NADPH	(Holmberg et al., 1999)
<i>Rattus norvegicus</i>	Citocromo b5 reductasa	NADH → NADPH	(Marohnic et al., 2003)
<i>Thermus thermophilus</i>	β-isopropilalato deshidrogenasa	NADH → NADPH	(Miller et al., 2006)
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Xilitol deshidrogenasa	NAD → NADP	(Ehrensberger et al., 2006)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Formato deshidrogenasa	NAD → NADP	(Serov et al., 2002)
<i>Thermus thermophilus</i>	Isopropilalato deshidrogenasa	NAD → NADP	(Chen et al., 1996)

(Modificado de Fuentealba, 2015)

A pesar de los casos exitosos de cambio de especificidad documentados, este desafío no está exento de dificultades. Las mutaciones propuestas pueden alterar la estructura proteica de tal manera, que es posible que se alteren drásticamente parámetros como la actividad enzimática, afinidad y especificidad de sustrato (Cahn et al., 2016).

Una herramienta que facilita el proceso de búsqueda de posiciones a mutar en la proteína de interés es el análisis de Potenciales Estadísticos. Esta herramienta recurre a aproximaciones estadísticas que evalúan la frecuencia de una interacción en particular dentro de un gran número de estructuras de proteínas. De esta forma, es posible extraer características estructurales comunes de acuerdo a las diferencias en las frecuencias de interacciones observadas en la muestra de estructuras (Thomas & Dill, 1996). En nuestro laboratorio se desarrolló una herramienta de Potenciales Estadísticos basado en el análisis de los sitios de unión a NAD(H) y NADP(H), la cual posee un carácter predictivo respecto al efecto de una mutación sobre la especificidad por dinucleótido (Fuentealba, 2015).

Por lo tanto, con la información estructural y herramientas predictivas disponibles, en esta tesis se plantea la búsqueda de una variante de T-Rex capaz de unir tanto NADPH como NADP⁺ mediante Diseño Racional. En base a los antecedentes mencionados anteriormente, se espera que la mutación de residuos en el *loop* β 4- β 5 afecte la especificidad de unión a dinucleótidos de adenina nicotinamida en el sensor fluorescente Peredox.

HIPÓTESIS

El *loop* β 4- β 5 de T-Rex contiene determinantes estructurales de la especificidad por dinucleótido, cuya mutación racional en el sensor fluorescente Peredox conducirá un cambio de especificidad de dinucleótido, orientado a la obtención de un sensor de la razón NADPH/NADP⁺.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto sobre la especificidad por dinucleótidos en Peredox de mutaciones propuestas mediante análisis bioinformático

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar residuos a mutar en T-Rex para obtener una variante NADPH preferente.
2. Generar y purificar Peredox silvestre y mutante candidata.
3. Determinar el efecto de las mutaciones propuestas en el objetivo específico 1 en la especificidad por dinucleótido en Peredox.
4. Determinar el efecto de las mutaciones propuestas en el objetivo específico 1 en la respuesta fluorescente de Peredox a distintas razones NAD(P)H/NAD(P)⁺.

MATERIALES

1. Reactivos

Tabla 2. Reactivos utilizados en este trabajo.

Becton Dickinson (NJ-EEUU)	Peptona
Biorad (CA-EEUU)	Bradford
Biotium (CA-EEUU)	Gel Red
Calbiochem (NJ-EEUU)	PMSF, Glicina, SDS
GE Healthcare (Sweden)	HisTrap™ HP
Invitrogen (CA-EEUU)	Genetailor, Acrilamida
IDT (IO-EEUU)	Partidores
Lonza (Basel-Switzerland)	LE Agarosa SeaKem®
Merck (NJ-EEUU)	Azul de Coomssie R-250, APS, Agar, Tris, NaCl, Imidazol, Etanol
New England Biolabs® Inc (MA-EEUU)	1Kb ADN Ladder, T4 ADN Ligasa
OMEGA Bio-tek (GA-EEUU)	E.Z.N.A (miniprep kit)

Biotium	GelRed™
Stratagene	PfuUltraII Fusion Polymerase
Fermentas	<i>XhoI, NdeI, BamHI, HindIII, EcoRI</i>
Sigma Aldrich	β -mercaptoetanol, BSA, NAD(P)(H), standard M.W.
TCL (STGO-CHILE)	TEMED
US Biological (MA-EEUU)	IPTG, Tetraciclina, Ampicilina
Winkler (STGO-CHILE)	Glicerol

2. Cepas bacterianas

Para la sobreexpresión de las proteínas estudiadas en este trabajo de tesis se usó la cepa *E. coli* BL21(DE3) (F- *ompT hsdSB* (rb- rb+) *gal dcm* (DE3)), PLysS, Ampr, que posee una copia del gen de la ARN polimerasa T7 inducible por IPTG.

Para la transformación y extracción de plasmidios se usó la cepa de *E. coli* DH5 α (F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1endA1 hsdR17* (rk- rk+) *poa supE44* λ - *thi- 1 gyrA96 relA1 tonA*).

3. Vectores

El plásmido pRsetB con el ORF completo de Peredox fue adquirido en Addgene (Plásmido #32382).

Los fragmentos de Peredox con las mutaciones propuestas contenidas en el vector pUC57 fueron sintetizadas por encargo a la empresa Genscript y gentilmente donadas por el Dr. Sebastián Brauchi, académico de la Universidad Austral.

4. Partidores

Los partidores para secuenciación utilizados en esta tesis se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5'-3'
sec1 fw	CCTGAACTTCGCTCCAGTTG
sec2 fw	GCAGCACGACTTCTTCAAGAG
sec3 fw	GGAGTTCATGCGCTTCAAG
sec nadsite1 rev	CAACCAGGATAGGAACAACACC
sec nadsite2 rev	CTGGGTCACGGTCACCAC

MÉTODOS

1. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

1.1. Superposición y árbol estructural

Se realizó una búsqueda en la base de datos Protein Data Bank de las estructuras clasificadas según SCOP (Hubbard, Ailey, Brenner, Murzin, & Chothia, 1999) como la familia de dominio N-terminal tipo 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la familia Rex. Los dominios Rossmann de las estructuras seleccionadas fueron superpuestas usando el programa STAMP 1.2 de multiseq 2.1 integrado en el programa VMD 1.9.1 (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996). El algoritmo de STAMP 1.2 procede mediante un ajuste de mínimos cuadrados, en el cual para dos estructuras A y B se toman un conjunto de n átomos provenientes de los carbonos α de la molécula A y B, se calculan las traslaciones y rotaciones que minimizan el RMSD para cada átomo de A con respecto a B en sus coordenadas cartesianas.

$$RMSD = \sqrt{\sum_i^n \frac{(X_{Ai} - X_{Bi})^2}{n} + \frac{(Y_{Ai} - Y_{Bi})^2}{n} + \frac{(Z_{Ai} - Z_{Bi})^2}{n}}$$

1.2. Obtención de modelos *in silico* de mutantes de T-Rex y análisis de Potenciales Estadísticos

Las coordenadas del complejo T-Rex/NADH (PDB ID: 1XCB, resolución 2,90 Å) fueron obtenidas del Protein Data Bank. Todas las herramientas utilizadas en la generación de los modelos *in silico* de T-Rex están incluidas en la interfaz Maestro (Versión 10.1, (Schrödinger Release, 2015)). La estructura cristalina fue refinada utilizando la herramienta Protein Preparation Wizard y las cadenas laterales faltantes fueron incorporadas utilizando Prime (Versión 3.0). El ligando NADPH y los residuos mutantes fueron construidos usando la herramienta Fragment Builder. La selección de los rotámeros apropiados fue realizada con la herramienta Rapid Torsion Scan Tool y la minimización energética del sistema utilizando el campo de fuerza de mecánica molecular OPLS_2005 (Banks et al., 2005).

La asignación de pseudo-energías de unión a ligando de los modelos *in silico* se realizaron siguiendo el modelo matemático propuesto en la Tesis de Matías Fuentealba (Fuentealba, 2015): Lo primero a considerar es que la frecuencia relativa (f) de una observación es equivalente a su probabilidad (P) cuando el número de observaciones tiende al infinito.

$$\lim_{n \rightarrow \infty} f = P$$

Por lo tanto, la probabilidad con la que dos átomos estén interactuando a una cierta distancia (r) es posible calcularla a partir de la frecuencia relativa de

observaciones entre estos pares de átomos a esa distancia en una base de datos de estructuras presentes en la base de datos PDB.

La distribución de Boltzmann (Boltzmann, 1896) indica que la energía de un estado ($E(r)$), como puede ser la interacción de dos átomos a una cierta distancia, está relacionada con la probabilidad de ese estado de estar ocupado ($P(r)$), vale decir, con la frecuencia relativa de esa interacción a esa distancia dentro de la base de datos ($f(r)$).

$$P(r) = \frac{1}{Z} \exp\left(\frac{-E(r)}{kT}\right) = f(r)$$

Donde Z es la función de partición del sistema, k es la constante de Boltzmann (0,001987 kcal/(mol*K)) y T es la temperatura (K). Integrando los componentes fisicoquímicos de los distintos tipos de átomos en interacción proteína-ligando, sus distancias y el peso estadístico de cada observación es posible determinar un valor de pseudo-energía (“pseudo” porque corresponde a una aproximación de naturaleza estadística y la coherencia con interacciones físicas reales no es aún clara) que aportará a la unión del cofactor. La sumatoria de la pseudo-energía de todos los átomos del sitio de unión al cofactor a un radio determinado es lo que llamamos la pseudo-energía del sitio de unión.

$$Pseudo - energía = \sum_a^{\text{radio de corte}} \sum_i^n \sum_j^n \Delta E^{ij}(r)$$

El parámetro experimental con que se compara esta pseudo-energía del sitio de unión será la energía libre calculada a partir de la constante de disociación.

$$\Delta G = -RT \ln K_D$$

Los Potenciales Estadísticos provienen de una base de entrenamiento que contiene 359 estructuras con NAD(H) y 330 con NADP(H). Para los sitios de NAD se utilizará una distancia de corte de 15 Å, usando un tamaño de ventana de 0,5 Å, mientras que para los sitios de NADP se utilizará una distancia de corte de 4 Å con un tamaño de ventana de 0,5 Å, siendo estos parámetros los que presentan una mejor correlación entre el cálculo de pseudo-energías y parámetros de unión determinados experimentalmente. El procedimiento de análisis con Potenciales Estadísticos consiste en: a) son generados modelos *in silico* de T-Rex silvestre, con NADH o NADPH como ligando, y mutantes puntuales de una región de interés, b) la pseudo-energía de cada sistema es calculada utilizando los parámetros de radio de corte y tamaño de ventana previamente definidos, c) los valores de pseudo-energía de cada sistema proteína mutante/ligando son comparados con su equivalente sistema proteína silvestre/ligando, calculando la diferencia aritmética entre ellos (ΔPe), d) la interpretación de las diferencias de pseudo-energía es similar al ΔG de unión; un $\Delta Pe > 0$ indica que la mutación desfavorece la unión del ligando, mientras que un $\Delta Pe < 0$ indica que la mutación favorece la unión del ligando.

1.3. Simulación de Dinámica Molecular y cálculo de energía libre mediante método de MM-PBSA

Los complejos de T-Rex silvestre y mutante NRS con NADH o NADPH fueron simulados durante 20 ns utilizando NAMD (NANoscale Molecular Dynamics) 2.8 con el campo de fuerza Amber99SB-ILDN (Phillips et al., 2005; Salomon-ferrer, Case, & Walker, 2012). Se utilizó un modelo de solvente explícito TIP3P neutralizado con iones Na^+ o Cl^- , según corresponda, en una caja de 15 Å en todas direcciones.

En la etapa de análisis, la energía libre de unión total y por residuo fue cuantificada utilizando el método MM/PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area) (Hayes & Archontis, 2011) incorporado en AMBER 11. Se seleccionaron instantáneas cada 30 ps a lo largo de la simulación, con un total de 500 instantáneas por trayectoria. La fuerza iónica se fijó en 0,1 M. La visualización de energía libre fue obtenida mediante comandos Tci/Tk ejecutados en VMD 1.9, reemplazando el factor beta en el archivo PDB por la energía libre de cada residuo.

2. MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Medios de cultivo

Medio Líquido

El medio Luria Bertani (LB) se usó para el crecimiento de las cepas bacterianas DH5 α y BL21 de *E. coli*. Se preparó adicionando 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura sobre 900 ml de agua desionizada. El pH fue ajustado a 7,0 previo a aforar a 1 L final. Se esterilizó en autoclave.

Medio sólido Agar LB

A un medio LB se le agregó agar hasta una concentración final de 1,7% p/v y se esterilizó en autoclave. Para la suplementación de antibióticos, el medio sólido fue calentado hasta lograr su fusión, para luego agregar los antibióticos hasta una concentración final de 100 ng/ μ l a 55°C.

2.2. Preparación de ADN plasmidial

El ADN plasmidial de los clones recombinantes se purificaron mediante el uso del kit E.Z.N.A® Plasmid Miniprep Kit I de Omega Bio-Tek (CA-EEUU). Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm, de una dilución 1:10 de la muestra purificada, en cubeta de cuarzo. Las concentraciones de las muestras se calcularon mediante la ecuación:

$$[\text{ADN plasmidial}] = \text{Abs } 260\text{nm} \cdot \text{FD} \cdot 50 \text{ (ng}/\mu\text{l)}$$

El grado de pureza de las muestras se estimó usando la relación Abs260/Abs280, la cual resultó superior a 1,8, indicando un grado de pureza superior al 95% de ADN.

2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

1 µl de muestra de ADN plasmidial se mezclaron con solución amortiguadora de carga 6X loading dye de Fermentas (Tris-HCl 10 mM pH 7,6 EDTA 10 mM, Azul de bromofenol 0,005 % y glicerol 10%) que fueron cargados en geles de agarosa 0.8%. La agarosa fue preparada en solución TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, acetato de 20 mM y EDTA 1 mM) y Gel Red 1X (Biotium, CA-EEUU). Se incluyó un carril con el estándar de peso molecular MassRuler™ ADN Ladder Mix (Thermo Scientific, CA-EEUU) de 10 kb. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 90 V (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad, CA-EEUU).

2.4. Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión se realizaron utilizando las indicaciones del proveedor (Thermo Scientific, CA-EEUU). Las mezclas de reacción se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y se detuvo la reacción incubando durante 5 minutos a 80 °C.

2.5 Ligación vector-inserto

Las ligaciones de los productos de digestión se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor (New England Biolabs, England). El vector y el inserto

se mezclaron en una razón 1:3 en masa. La reacción de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 16 horas y se detuvo la reacción incubando durante 5 minutos a 80 °C.

2.6. Electrotransformación de células

Se mezcló 50 µl de células DH5α o BL21(DE3) electrocompetentes con 1 µl de ADN plasmidial, en cubetas de electroporación de 2 mm. Se utilizó un electroporador GenePulser Xcell (Biorad) en condiciones de voltaje 2,4 KV, capacitancia 25 µF y resistencia de 200 Ohm. Se colocaron las cubetas en la cámara de electroporación y se generó el pulso. Las células electroporadas fueron suplementadas con 0,9 ml de medio LB incubándose en tubos de microcentrífuga durante 1 hora a 37°C con agitación moderada. Luego de la incubación se centrifugó a 850 x g por 10 minutos, se removió el sobrenadante y el pellet fue sembrado en medio sólido agar-LB con los antibióticos correspondientes. Las placas fueron incubadas por 16 horas o hasta obtener crecimiento de colonias. Tres colonias resultantes de cada transformación fueron sometidas a extracción de ADN plasmidial mediante kit de miniprep (Omega). Muestras de 50 ng/µl en 15 µL fueron enviadas a secuenciar por MacroGen Inc. (Maryland, EEUU). En la secuenciación se usaron los partidores universales del promotor y terminador del fago T7, ubicados río arriba y río abajo respectivamente del gen de Peredox en el vector de expresión, además de los partidores que cubren el marco de lectura completo. Los cromatogramas de

secuenciación fueron analizados con el programa Geneious v4.8 y las secuencias finales fueron contrastadas con la secuencia silvestre de Peredox para corroborar la adquisición de la mutación y descartar la presencia de mutaciones no deseadas.

3. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

3.1 Purificación de Peredox silvestre y mutante

Se inoculó 1 L de LB suplementado con ampicilina con la cepa *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pRsetB-Peredox silvestre y mutante, según sea el caso. Se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Luego, fue inducido con IPTG 1 mM y se mantuvo la incubación por 16 horas más. Pasado este tiempo, las células fueron colectadas por centrifugación a 5.000xg por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron suspendidas en 50 mL de solución A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, glicerol 10% v/v y 20 mM de imidazol), el cual se suplementó con el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM y el cóctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA cOplete (Roche). Para lisar las células y liberar el contenido intracelular, se utilizó un sonicador Branson Digital Sonifier® (CA-EEUU), con una sonda de 3,2 mm. Se realizaron 12 pulsos de 30 segundos con una amplitud de 30 %, con 1 minuto de pausa entre cada pulso en hielo. Luego, el extracto obtenido se centrifugó a 15.000xg, a 4°C por 30 minutos.

Los extractos celulares con las proteínas de interés se sometieron a una cromatografía en serie, teniendo como primer paso una cromatografía de intercambio iónico en columna HiTrap Q™ HP de 5 mL (GE Healthcare), la cual tiene conectada en su salida una columna HisTrap™ HP de 5 ml (GE Healthcare), para realizar una cromatografía de afinidad de ion inmovilizado (IMAC) con resina Ni²⁺-NTA. Como paso previo a cargar el extracto crudo en el sistema, cada columna fue equilibrada por separado, siendo la columna HiTrap Q equilibrada con solución A y la columna HisTrap con solución B (Tri-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerol 10% v/v, imidazol 20 mM). Cargado el extracto, la columna fue lavada con 10 volúmenes de solución A y eluída en un gradiente de 40 a 500 mM de NaCl. Luego, la columna de intercambio iónico fue desmontada y la columna HisTrap fue lavada con 10 volúmenes de solución B y eluída en un gradiente de 20 a 500 mM de imidazol. Las fracciones con mayor absorbancia a 280 nm se colectaron y se realizó un cambio a solución tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM y glicerol 8% mediante filtración en gel en columna Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare). La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford. Para confirmar la homogeneidad de la preparación de la enzima, se realizó un análisis de SDS-PAGE, comprobando la pureza de cada una de las fracciones.

3.2. Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)

El análisis de las masas moleculares de las muestras de proteína de cada etapa de la purificación se realizó mediante electroforesis en condiciones denaturantes en una cámara vertical Mini PROTEAN® 3 cell (BioRad). Las muestras se mezclaron con un amortiguador de carga 4 X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 4 % v/v, SDS 8 % p/v, β -mercaptoetanol 2,8 mM y azul de bromofenol 4 %) y diluyendo con agua, para posteriormente incubarlas a 100°C por 5 minutos.

Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 12 %. Las electroforesis se realizaron a corriente constante de 30 mA por 1 hora aproximadamente, hasta el momento antes de la caída del frente de migración (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad, CA-EEUU). Como amortiguador de electroforesis se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v).

Realizada la electroforesis, se tiñó el gel con azul brillante de Comassie R-250 0,3 % p/v disuelto en una mezcla de metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v, durante dos horas con agitación constante. El gel se destiñó con la misma mezcla sin Comassie, hasta obtener un contraste claro de las bandas. La masa molecular relativa de las proteínas se determinó a partir de su migración electroforética. Se utilizó el estándar de masa molecular AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder (Maestrogen) que contiene 10 proteínas patrón de masa molecular conocida.

3.3. Ensayos de fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en espectrofluorímetro (FP-8300, JASCO Corporation) utilizando cubeta de vidrio de 1 mL a una temperatura de 25 °C con una concentración de proteína de 0,01 µg/µL en solución tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM y glicerol 8%. La proteína fluorescente permutada circularmente verde T-Sapphire fue excitada a una longitud de onda de 400 nm y su emisión de fluorescencia recogida entre los 500 y 530 nm mientras que la proteína fluorescente roja mCherry fue excitada a una longitud de onda de 580 nm y su emisión de fluorescencia recogida entre los 600 y 630 nm (Se utilizaron los siguientes parámetros de medición: ancho de banda: 5 nm; tiempo de respuesta: medio; velocidad de barrido: 2000 nm/min; ganancia: media).

3.4. Determinación de parámetros de unión a ligando

Se realizaron curvas de saturación de Peredox silvestre y mutante, según sea el caso, utilizando NAD(P)(H) titulado enzimáticamente, añadiendo 1 µL de solución madre a la cubeta por medición. Para cada punto analizado, se registra el área bajo la curva de emisión de fluorescencia verde (T-Sapphire) y roja (mCherry) como se describe en el apartado 3.3 y se sustrajo la contribución de la solución amortiguadora. Posteriormente, se eliminó la contribución de la fluorescencia intrínseca del cofactor reducido a la emisión de fluorescencia verde por encontrarse en el mismo rango de longitudes de onda. Para conseguir esto, se

realizó una medición control registrando la fluorescencia para cada punto de la curva de titulación en ausencia de proteína y restando punto a punto esta contribución a lo obtenido en la condición experimental.

Adicionalmente, a concentración micromolar de ligando, las mediciones de fluorescencia se ven distorsionadas a causa del efecto de filtro interno (Kubista et al., 1994). Este efecto se debe a la absorción de fotones por el ligando en el rango de longitud de onda en que se está excitando la muestra, por lo que la intensidad del haz de luz incidente que efectivamente excita la muestra es menor, obteniéndose una menor emisión de fluorescencia. Del mismo modo, si el ligando absorbe luz en el rango de emisión de fluorescencia, la fluorescencia observada será menor a la fluorescencia emitida efectiva. Para corregir este efecto, se registra la densidad óptica de la muestra a las longitudes de onda de excitación y emisión, DO_{ex} y DO_{em} , respectivamente, utilizadas para cada punto de la curva de titulación, y se corrige la fluorescencia observada, F_{obs} , mediante la siguiente fórmula (Joseph R. Lakowicz, 2006):

$$F_{corr} = F_{obs} \times \text{antilog}\left(\frac{DO_{ex} + DO_{em}}{2}\right)$$

Una vez corregida la emisión de fluorescencia, se obtiene la razón de fluorescencia verde/roja y se normaliza respecto a la condición en ausencia de ligando. Estos datos fueron ajustado a un comportamiento sigmoide para obtener la constante de disociación (K_d), utilizando la siguiente fórmula:

$$y = \frac{Y_{max} * [\text{ligando}]^h}{K_d^h + [\text{ligando}]^h}$$

Donde **Y** corresponde a la señal de fluorescencia normalizada en función de la concentración de ligando, **Y_{max}** corresponde a la máxima señal a concentraciones saturantes de ligando, **h** es el coeficiente de Hill, el cual indica el grado de cooperatividad de la unión del ligando y **K_d** es la constante de disociación, cuya interpretación es la concentración de ligando a la cual se obtiene el 50% de la respuesta de unión. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

Capítulo 1: Determinantes estructurales de la especificidad por dinucleótido en proteína Rex de *Thermus aquaticus*

1.1. Análisis preliminar de la estructura tridimensional de T-Rex

En el proceso de ingeniería de proteínas se requiere información estructural que permita dirigir la mutagénesis a regiones de particular interés respecto a la función que se planea obtener. En el caso de este trabajo de tesis, el foco de exploración estructural es encontrar regiones de la proteína T-Rex que tengan un rol como determinantes estructurales de la discriminación entre NAD(H) y NADP(H).

Al realizar una inspección visual del bolsillo de unión a NADH en la estructura cristalina de T-Rex (PDB ID:1XCB), se observan 4 *loops* que interactúan con distintas regiones del dinucleótido (Figura 7). Los *loops* $\alpha 5\text{-}\beta 4$ y $\beta 9\text{-}\alpha 8$ contienen residuos que interactúan con la región nicotinamida-ribosa del dinucleótido, siendo los residuos Y98 y F189 elementos clave en el mecanismo de detección del estado redox intracelular (McLaughlin et al., 2010a). Por su parte, el *P-loop* interactúa con la región pirofosfato del dinucleótido y se ha descrito que mutaciones en esta región abolen totalmente la unión de NADH (McLaughlin et al., 2010a), indicando un rol en la unión del ligando y no su especificidad.

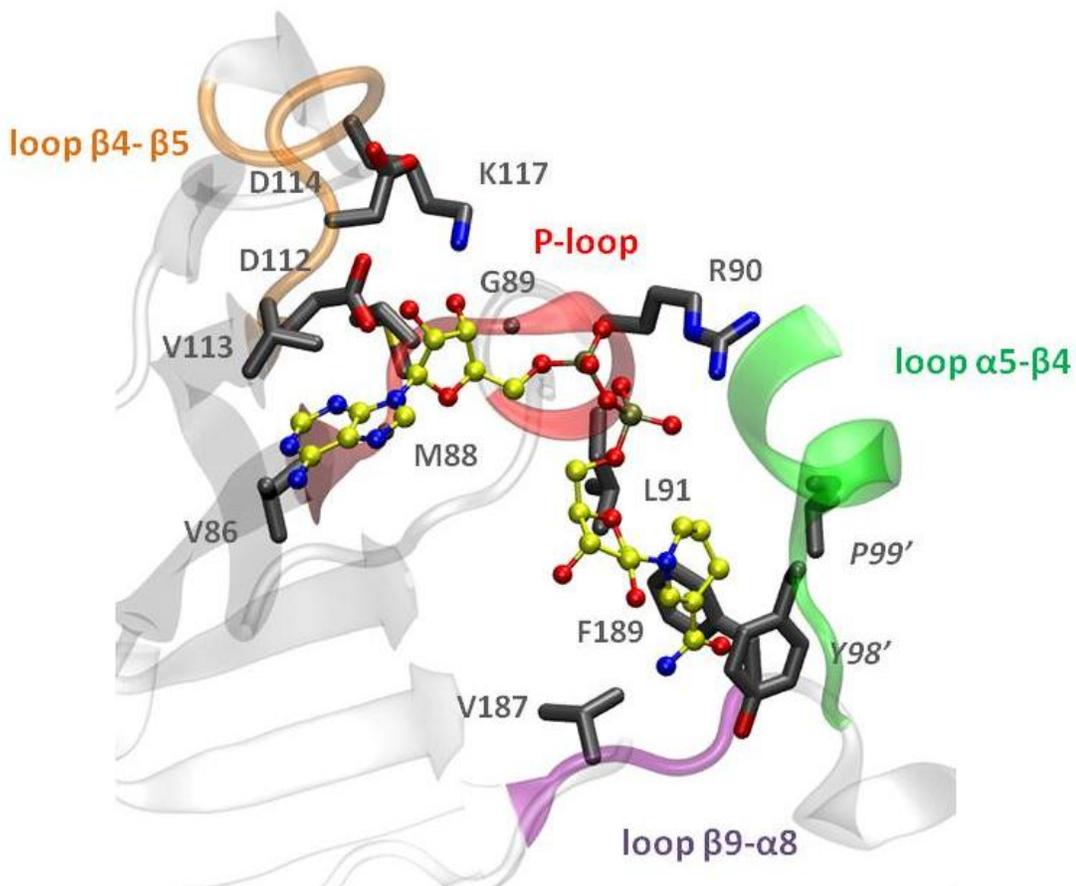


Figura 7. Bolsillo de unión a NAD(H) en la estructura cristalográfica de proteína Rex de *Thermus aquaticus*. Se destacan las regiones de contacto de la proteína con el dinucleótido; *loop* α 5- β 4 (verde), *loop* β 9- α 8 (morado), *P-loop* (rojo) y *loop* β 4- β 5 (naranja).

Interesantemente, el *loop* β 4- β 5 está en contacto directo con la región adenina-ribosa del dinucleótido, en especial con el grupo 2'-OH de la ribosa, el cual es la única diferencia estructural entre NAD(H) y NADP(H). El residuo D112 interactúa con el grupo 2'-OH de la ribosa, siendo esta interacción característica de proteínas que unen NAD(H). La presencia de este residuo ácido permite la discriminación entre NAD(H) y NADP(H) debido a la repulsión electrostática con el grupo fosfato cargado negativamente (Lesk, 1995). V113 mantiene

interacciones de tipo apolar con el anillo adenina y K117 interactúa mediante puente de hidrógeno con el hidroxilo 3'-OH de la ribosa.

Estas características sugieren que el *loop* β 4- β 5 contiene determinantes estructurales de especificidad por dinucleótido en T-Rex.

1.2. Análisis de Potenciales Estadísticos del *loop* β 4- β 5

Para evaluar la contribución de cada residuo en el *loop* β 4- β 5 en la selectividad entre NAD(H) y NADP(H) y proponer potenciales sitios a mutar, se realizó un análisis de Potenciales Estadísticos, herramienta bioinformática desarrollada en nuestro laboratorio (Fuentealba, 2015). Esta metodología corresponde al análisis de los residuos del bolsillo de unión a dinucleótido que contribuyen a la interacción de la proteína tanto con NAD(H) como NADP(H). Estas interacciones son comparadas con una base de datos de estructuras con NAD(P)(H) como ligando, extraídas desde el Protein Data Bank (ver sección Métodos 1.2).

En el caso de T-Rex, la búsqueda de residuos de interés se realizó mediante dos estrategias:

i) Escaneo por Alanina: Consiste en generar modelos *in silico* de mutantes puntuales por Ala para cada posición dentro de la región de interés de la proteína. Se evalúa la pseudo-energía de interacción proteína-ligando de cada modelo y se compara con el valor obtenido para la proteína silvestre. Los reemplazos por Ala dan cuenta de la contribución de la cadena lateral del residuo mutado a la unión del ligando, debido a que Ala posee un grupo metilo como cadena lateral y

dicho reemplazo equivale a truncar un residuo desde su carbono beta sin alterar la cadena principal (como sí lo harían Gly o Pro). Además, al ser poco voluminoso y químicamente inerte se minimiza el efecto de posibles cambios estructurales, permitiendo atribuir el fenómeno experimental observado a la eliminación de la cadena principal del residuo mutado (Cunningham & Wells, 1989).

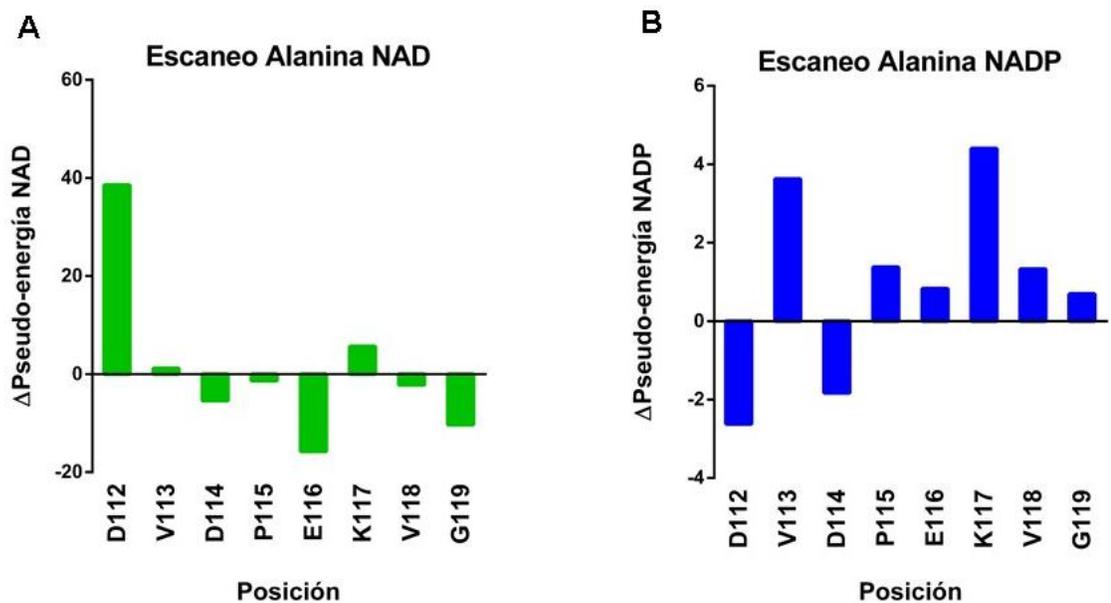


Figura 8. Escaneo por Alanina y evaluación de pseudo-energía. Las mutantes *in silico* por Ala del *loop* β 4- β 5 de T-Rex fueron evaluadas utilizando los potenciales estadísticos para (A) NAD y (B) NADP como ligando. Se expresa la diferencia de los valores de pseudo-energía de cada mutante respecto a la pseudo-energía de la proteína silvestre.

Se generaron mutantes puntuales de T-Rex para cada posición del *loop* β 4- β 5, tanto con NAD como NADP y se evaluaron las diferencias de pseudo-energía de cada sistema, los cuales se resumen en la Figura 8. Respecto a la interacción con NAD, se observa que el residuo D112 es el principal contribuyente Figura 8A. Esta observación corrobora la importancia de la interacción entre el grupo ácido

del aspartato y el 2'-OH de la ribosa en las proteínas que unen NAD (Lesk, 1995); criterio que sería aplicable a T-Rex. El residuo K117 también muestra una contribución positiva a la unión de NAD, aunque en menor magnitud, a través de la interacción con el 3'-OH de la ribosa.

En cuanto a la interacción con NADP, las cadenas laterales de los residuos D112 y D114 desfavorecen la unión del ligando (Figura 8B), en virtud de la baja probabilidad de encontrar residuos ácidos en bolsillos de unión de ribosa-adenina en proteínas de unión a NADP, debido a la repulsión electrostática con el grupo 2'-fosfato (Fuentealba, 2015). El residuo K117 muestra una contribución positiva a la unión de NADP, al igual que con NAD, lo que se explica por su interacción con el 3'-OH de la ribosa, región común entre ambos dinucleótidos.

ii) Escaneo por Arginina: Consiste en generar modelos *in silico* de mutantes puntuales por Arginina para cada posición dentro de la región de interés de la proteína. La racional de esta estrategia es encontrar la posición a mutar que favorezca en mayor medida la unión de NADP, puesto que Arginina, por su carga eléctrica positiva, interactúa favorablemente con el 2'-fosfato de la ribosa, además de ser el residuo más común estableciendo este tipo de interacción en las proteínas que unen NADP (Fuentealba, 2015).

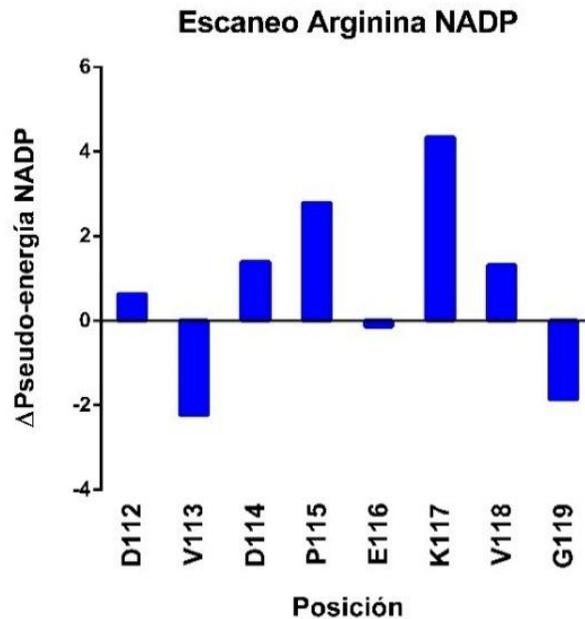


Figura 9. Escaneo por Arginina y evaluación de pseudo-energía. Las mutantes *in silico* por Arginina del *loop* β 4- β 5 de T-Rex fueron evaluadas utilizando los potenciales estadísticos para NADP como ligando. Se expresa la diferencia de los valores de pseudo-energía de cada mutante respecto a la pseudo-energía de la proteína silvestre.

Se generaron *in silico* mutantes puntuales de T-Rex para cada posición del *loop* β 4- β 5, con NADP como ligando, y se evaluaron los valores de pseudo-energía de cada sistema, observándose que las mutaciones en V113 y G119 favorecen en mayor medida la pseudo-energía de unión a NADP (Figura 9).

A modo de resumen, el análisis de Potenciales Estadísticos para T-Rex indica que:

- El residuo D112 es fundamental para la unión de NAD. La pérdida de su cadena lateral ácida provocaría una disminución considerable en su afinidad por dicho dinucleótido.
- El residuo D114, si bien no juega un rol fundamental en la unión de NAD, participa en la exclusión de la unión de NADP.
- El residuo K117 no exhibe un rol en la discriminación entre NAD y NADP. Esto debido a su interacción con el 3'-OH de la ribosa, región común entre ambos dinucleótidos.
- Las mutaciones V113R y G119R podrían tener un efecto positivo en la afinidad por NADP

Por lo tanto, las posiciones del *loop* β 4- β 5 de T-Rex candidatas a mutagénesis son D112, V113, D114 y G119.

1.3. Análisis estructural-evolutivo de la familia Rex

El análisis de Potenciales Estadísticos corresponde a una fase exploratoria que propone posiciones candidatas a mutagénesis a partir de información estadística de una multitud de complejos conocidos, homólogos y no-homólogos. Sin embargo, para determinar por cuál de los otros 19 aminoácidos mutar, también es posible acotar el rango de búsqueda al entorno evolutivo de la proteína de

interés con el fin de encontrar motivos de secuencia asociados a la función buscada.

Una revisión de homólogos de T-Rex, a lo largo de los diferentes *phyla* de bacteria, muestra características conservadas a nivel de secuencia en la región homóloga al *loop* β 4- β 5. La conservación del residuo Asp en la posición equivalente a D112 en T-Rex (Ravcheev et al., 2012) y una estricta especificidad por NAD(H) en los homólogos caracterizados (McLaughlin et al., 2010a) dificulta la exploración de motivos de secuencia relacionados con la especificidad por NADP(H) en la familia Rex. Con el fin de obtener evidencia relacionada con la especificidad por dinucleótido extrapolable a la familia Rex, se realizó una búsqueda de proteínas estructuralmente relacionadas con T-Rex. Según la Clasificación Estructural de Proteínas SCOP (Hubbard et al., 1999), la superfamilia c.2.1 “dominios de plegamiento tipo Rossmann de unión a NAD(P)” incluye tanto a la familia c.2.1.12 “dominio C-terminal, represor transcripcional Rex”, dentro de la cual se clasifica el dominio Rossmann de T-Rex, como a la familia c.2.1.6 “dominio N-terminal tipo 6-fosfogluconato deshidrogenasa” (en adelante, “familia 6PGDH”). Esta última posee miembros con especificidad por cofactor por NAD(H) y NADP(H), y presenta motivos de especificidad por dinucleótidos caracterizados (Maturana, 2014). Para evaluar la similitud estructural entre ambas familias de proteínas, fue realizada una superposición de los dominios Rossmann de 9 miembros de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa y 2 de la familia Rex (Tabla 4; resolución promedio: 2,38 Å),

obteniéndose un RMSD promedio de 2,49 Å, lo que indica que las diferencias estructurales son apenas distinguibles respecto a la resolución de éstas y, por ende, son comparables entre sí.

Tabla 4. Estructuras cristalinas utilizadas en la superposición estructural de dominios Rossmann.

PDB ID	Organismo	Especificidad	Resolución (Å)
1XCB	<i>Thermus aquaticus</i>	NAD	2,90
2VT2	<i>Bacillus subtilis</i>	NAD	2,30
1PGJ	<i>Trypanosoma brucei</i>	NADP	2,82
3FWN	<i>Escherichia coli</i>	NADP	1,50
2W90	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NADP	2,20
2P4Q	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NADP	2,37
2JKV	<i>Homo sapiens</i>	NADP	2,53
2ZYG	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NADP	2,10
2IYO	<i>Lactococcus lactis</i>	NADP	2,40
4E21	<i>Geobacter metallireducens</i>	NAD	2,30
2I9P	<i>Homo sapiens</i>	NAD	2,55
1P1J*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NAD	1,70

*Estructura clasificada dentro de la misma superfamilia, por lo que fue utilizada como grupo externo.

En la Figura 10 se observa la superposición de los dominios Rossmann de T-Rex (gris), 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *E. coli* (verde) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *G. metallireducens* (naranja), donde se puede apreciar que los residuos que interactúan con la región 2'-OH del dinucleótido adoptan la misma disposición espacial tanto en el *loop* β 4- β 5 de T-Rex como en el *loop* β 2- α 2 de las 6PGDH. Este *loop* contiene motivos de secuencia implicados en la especificidad por dinucleótido a lo largo de la familia 6PGDH (Maturana, 2014).

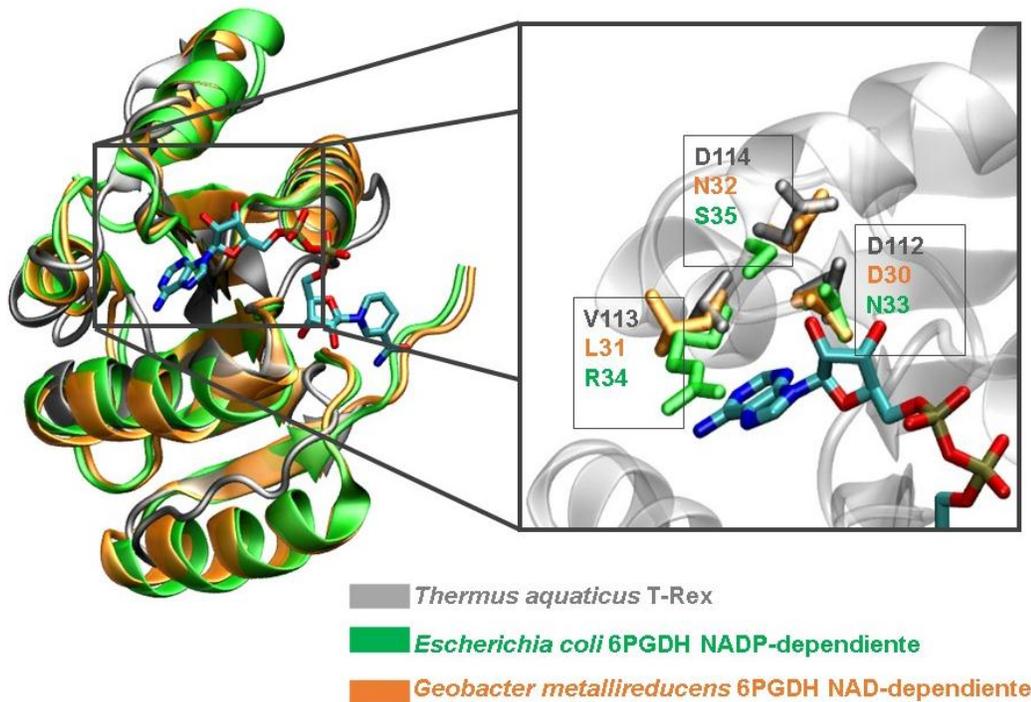


Figura 10. Superposición estructural de dominios Rossmann. Los dominios Rossmann de T-Rex (gris), 6PGDH NADP-dependiente de *E. coli* (verde) y 6PGDH NAD-dependiente de *Geobacter metallireducens* (naranja). Un acercamiento hacia los residuos de cada proteína que interactúan con la región adenina-ribosa del dinucleótido muestra una disposición espacial común entre ellos.

El resultado anterior se refuerza al analizar el árbol estructural generado a partir de la superposición de dominios Rossmann (Figura 11), el cual muestra que, en las estructuras de la familia 6PGDH, existe una segregación de los grupos basados en su especificidad por dinucleótido. Además, se observan los residuos conservados en las secuencias de residuos del *loop* β 4- β 5 de T-Rex, y sus equivalentes en el *loop* β 2- α 2 de las 6PGDH, que podrían ser esenciales para la discriminación entre uno u otro cofactor.

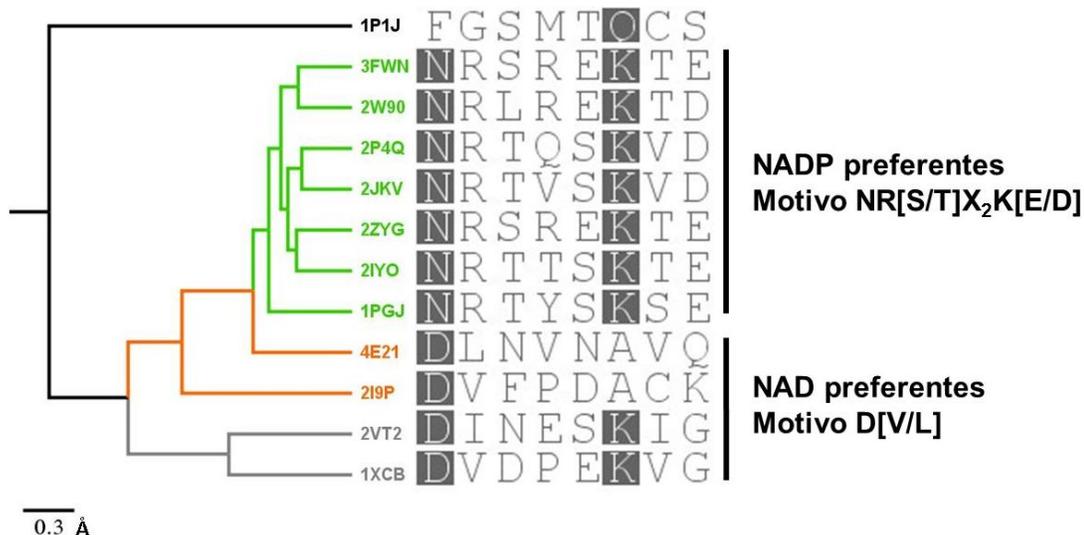


Figura 11. Árbol estructural de dominios Rossmann de miembros de la familia 6PGDH (rama verde y naranja) y de la familia Rex (rama gris). El alineamiento de secuencias homólogas el *loop* β 4- β 5 de T-Rex muestra motivos de secuencia conservados asociados a la preferencia por NAD y NADP. La escala representa RMSD en Å. El árbol fue enraizado con el grupo externo mencionado en la Tabla 4.

En los miembros NADP preferentes, existe la presencia estricta de los residuos N y R, seguidos por S/T en la mayoría de los casos. Además, tres posiciones a partir del residuo R, se observa la presencia estricta de un residuo K. El último residuo del *loop* presenta una cadena lateral ácida, ya sea E o D. Este motivo, NR[S/T]X₂KX[E/D], estaría dando cuenta de una especificidad por NADP en la familia 6PGDH.

Respecto a la especificidad por NAD, se observa la presencia de un residuo D estrictamente conservado en la posición inicial del *loop*, en concordancia con lo observado en deshidrogenasas que unen NAD(H), seguido de un aminoácido alifático de tamaño variable. Este motivo, D[V/L], estaría asociado a la especificidad por NAD en la familia 6PGDH.

Como T-Rex comparte tanto la similitud estructural como el motivo de especificidad por NAD con miembros de la familia 6PGDH, se espera que la mutación de los residuos del *loop* β 4- β 5 equivalentes al motivo NR[S/T]X₂KX[E/D] le confieran a T-Rex una especificidad por NADP(H).

Complementando esta observación con los resultados obtenidos del análisis de Potenciales Estadísticos, se concluye lo siguiente:

- Se corroboran las posiciones candidatas D112, V113 y D114 a ser mutadas por sus equivalentes al motivo de especificidad por NADP, N, R y S, respectivamente.
- La mutación G119R no coincide con el residuo ácido evidenciado por el análisis evolutivo, por ende, se descarta.

Por lo tanto, se propone la mutante triple de T-Rex D112N/V113R/D114S como candidata para ser evaluada respecto a su especificidad por NADP.

1.4. Dinámicas moleculares y análisis de energía libre por método MM-PBSA

La mutante triple fue analizada *in silico* mediante Dinámica Molecular para determinar la energía libre de las interacciones del complejo proteína-ligando y evaluar el efecto de las mutaciones en la especificidad por dinucleótido.

Se generaron modelos *in silico* de T-Rex silvestre (T-Rex^{WT}) y la mutante triple D112N-V113R-D114S (T-Rex^{NRS}), cada uno en complejo con NADH y NADPH,

usando la suite Maestro 10 de Schödringer (Maestro, Schrödinger, 2017). Dichos modelos fueron sometidos a simulaciones de Dinámica Molecular usando el programa NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics) 2.8 (Phillips et al., 2005). Cada sistema se simuló, en triplicado, durante 20 ns después de una minimización de energía.

El análisis de RMSD de la proteína a lo largo de cada simulación (Figura 12) indica que ambos sistemas son estables, con RMSD promedios en torno a los 2 Å. No obstante, los complejos con la proteína mutante tardan ~3 nanosegundos más en llegar a un estado estable.

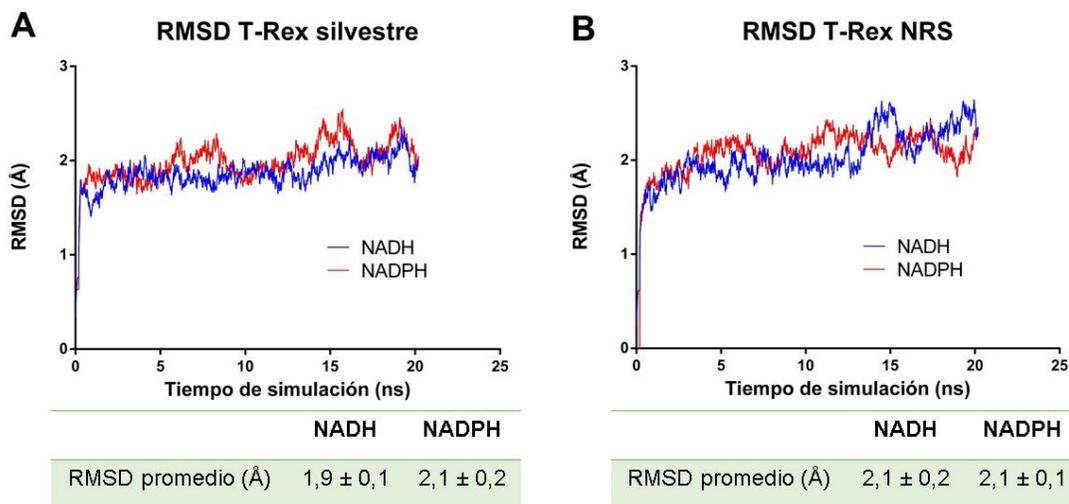


Figura 12. Representación RMSD de la cadena principal de T-Rex en función del tiempo de simulación para los sistemas T-Rex silvestre (A) y T-Rex NRS (B). En líneas coloreadas se representan los complejos con NADH (azul) y NADPH (rojo) como ligando. La fase de producción comienza en a los 5 ns de simulación para todos los sistemas. Se muestran los valores de RMSD promedio y la desviación estándar de éstos, obtenidos en la fase de producción.

Posteriormente, las trayectorias fueron analizadas mediante el método MM-PBSA, el cual permite calcular la energía libre de unión a ligando total y su descomposición por residuo (Hayes & Archontis, 2011).

El cálculo de energía libre de unión a ligando y su descomposición por residuo en la superficie de T-Rex silvestre (Figura 13) muestra la contribución positiva de los residuos D112 y V113 a la unión de NADH, representando el ~10% de la energía libre de unión total (Tabla 5). El residuo D114 no contribuye directamente a la unión de NADH, sin embargo, desfavorece la unión de NADPH, al igual que D112, debido a repulsión electrostática. Sumado a esto, el residuo D112 presenta un valor más positivo de energía libre de unión para NADPH (Tabla 5), lo que confirma su rol clave en la especificidad de T-Rex por NADH.

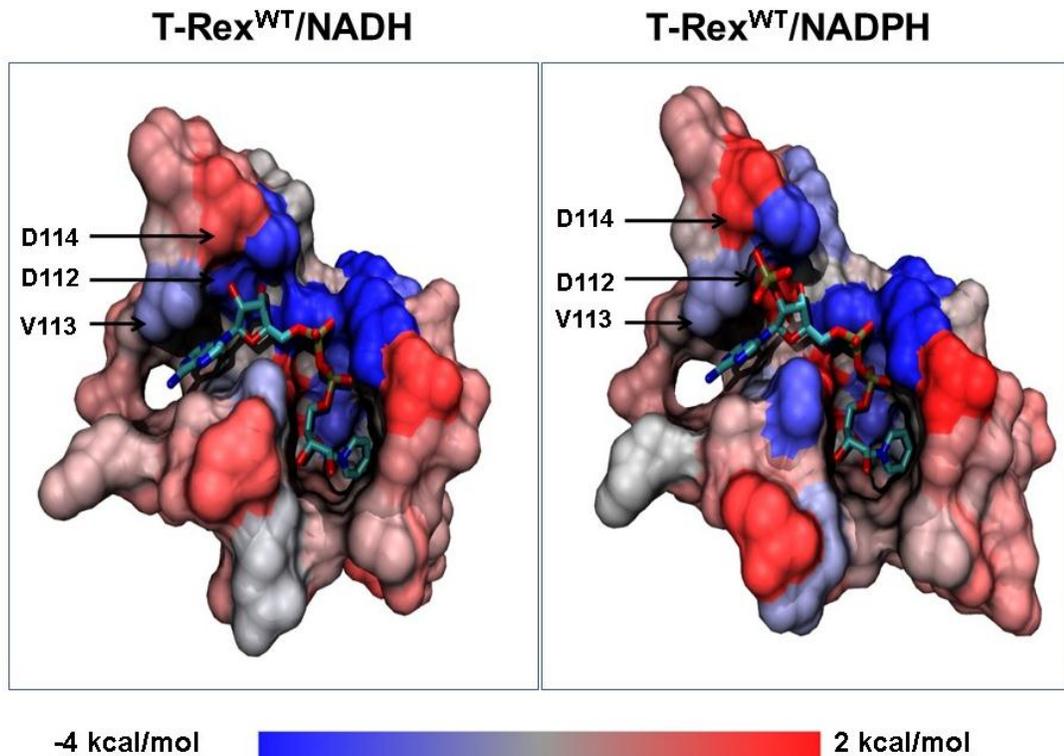


Figura 13. Descomposición de energía libre de unión por residuo en complejos de T-Rex silvestre con NADH (izquierda) y NADPH (derecha) como ligando. La representación de superficie muestra la contribución de cada residuo a la energía de unión a ligando en cada sistema.

En la mutante NRS (Figura 14), se observa que las interacciones de NADPH con N112, R113 y S114 son favorables y contribuyen con un ~22% de la energía libre de unión del ligando (Tabla 5). El residuo R113 es uno de los mayores contribuyentes a la unión de NADPH, al establecer un puente salino con el 2'-fosfato. Esto confirma la importancia que tiene la presencia de un residuo de Arginina en las proteínas que unen NADP(H). Las mutaciones D112N y D114S remueven la repulsión electrostática que ejercen las cadenas laterales ácidas de ambos aspartatos sobre el 2'-fosfato del NADPH, favoreciendo su unión mediante interacciones electrostáticas.

En términos globales de energía libre de unión, la mutación NRS conlleva una disminución del 94% para la unión de NADPH, mientras que para la unión de NADH aumentó en sólo 7% (Tabla 5). Es importante destacar que los valores de ΔG obtenidos no consideran el componente entrópico de la unión del ligando, sin embargo, las diferencias sí son informativas respecto a cambios de afinidad (Genheden & Ryde, 2016).

Por lo tanto, la mutante T-Rex^{NRS} es una candidata plausible para la obtención de una variante de Peredox NADP-preferente.

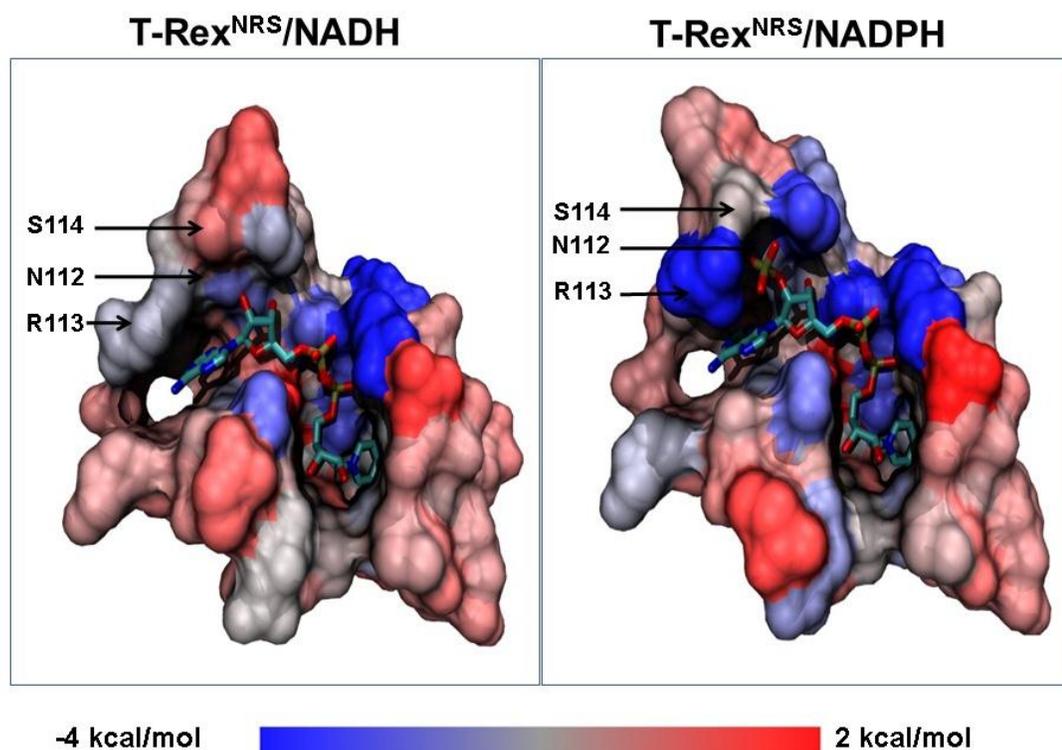


Figura 14. Descomposición de energía libre de unión por residuo en complejos de T-Rex mutante NRS con NADH (izquierda) y NADPH (derecha) como ligando. La representación de superficie muestra la contribución de cada residuo a la energía de unión a ligando en cada sistema.

Tabla 5. Energía libre de unión a ligando total y por posición en cada sistema de T-Rex

Posición	T-Rex ^{WT} /NADH	T-Rex ^{WT} /NADPH	T-Rex ^{NRS} /NADH	T-Rex ^{NRS} /NADPH
112	-7 ± 1	18 ± 2	-4,8 ± 0,5	-6 ± 2
113	-4,4 ± 0,6	-5,2 ± 0,6	-5,6 ± 0,5	-28 ± 3
114	1,1 ± 0,2	3,5 ± 0,1	-3 ± 1	-7,4 ± 1,0
ΔG total	-137 ± 1	-95 ± 8	-131 ± 3	-190 ± 7

Los valores de energía libre están expresados en unidades de kcal/mol.

Capítulo 2: Generación y purificación de Peredox silvestre y mutante NRS

Una vez propuestas las mutaciones necesarias para la obtención de una variante NADP-preferente de Peredox, se procedió a la obtención *in vitro* de la mutante Peredox NRS para su posterior expresión y purificación y así evaluar experimentalmente el efecto de dichas mutaciones respecto a la proteína silvestre.

Es preciso mencionar que, en el trabajo donde se reporta el proceso de optimización realizado en la generación del sensor Peredox (Hung et al., 2012), fueron realizadas 2 mutaciones puntuales en del *loop* β4-β5 de T-Rex, E116G y K117M, cuyo objetivo es minimizar posibles interacciones del sensor con NADPH. Por lo tanto, además de las mutaciones D112N-V113R-D114S, en esta tesis fue necesario realizar 2 mutaciones puntuales extras, G116E-M117K, para revertir el efecto de la optimización de Peredox y favorecer la unión de NADPH.

2.1. Generación de la mutante Peredox NRS

Los fragmentos de ADN, con las mutaciones deseadas para cada subunidad de T-Rex en Peredox, fueron sintetizados encargo a la empresa GenScript™, los cuales fueron generosamente donados por el Dr. Sebastián Brauchi, académico de la Universidad Austral de Chile.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN, se procedió a subclonarlos en el vector original utilizando los sitios de restricción *Bam*HI, *Hind*III y *Eco*RI. Los productos de ligación fueron enviados a secuenciación de ADN y se corroboró la correcta inserción de las mutaciones deseadas (Figura 15). Por lo tanto, fue generada con éxito la mutante de Peredox D112N-V113R-D114S en el vector de expresión pRsetB.

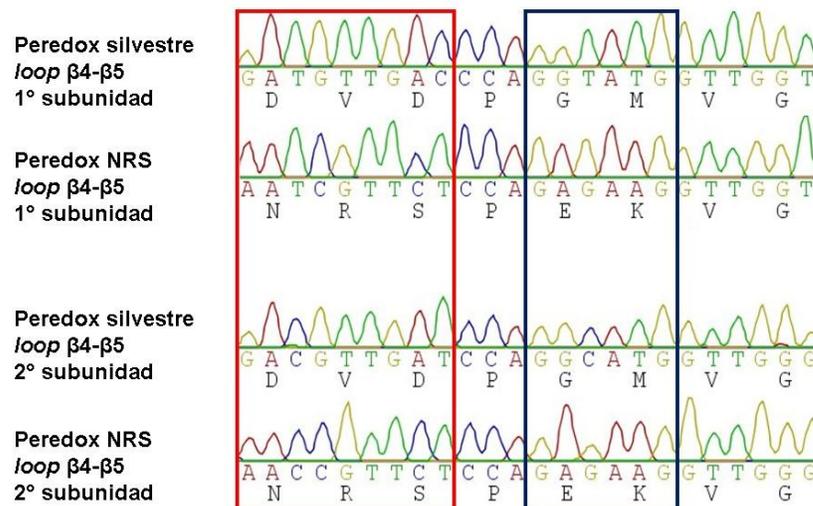


Figura 15. Cromatograma de secuenciación de Peredox silvestre y mutante NRS. Se muestran los resultados de secuenciación de ADN para cada subunidad de T-Rex en las variantes de Peredox. El cuadro rojo muestra las mutaciones de cambio de especificidad y el cuadro azul muestra las mutaciones de reversión de la optimización realizada sobre Peredox silvestre.

2.2 Expresión y purificación de Peredox silvestre y mutante

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) fue transformada con el sensor Peredox silvestre y mutante, por separado, con cola de histidina N-terminal contenido en el vector de expresión pRsetB (Addgene #32382), cuya expresión está bajo el control del promotor T7 inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Las condiciones de inducción de proteína fueron determinadas mediante un test de inducción a diferentes temperaturas y concentraciones de inductor, mediante análisis de expresión de proteína en extracto celular a través de SDS-PAGE. En la Figura 16 se observa que la proteína tiende a la agregación, ya que aparece mayormente en la fracción insoluble del extracto celular. Sin embargo, se obtuvo proteína soluble, presentando una mayor expresión en la condición de temperatura de 25°C, densidad óptica de inducción de 0,5 y 1 mM IPTG. Bajo estas condiciones fue sobreexpresado Peredox silvestre y Peredox NRS para su posterior purificación.

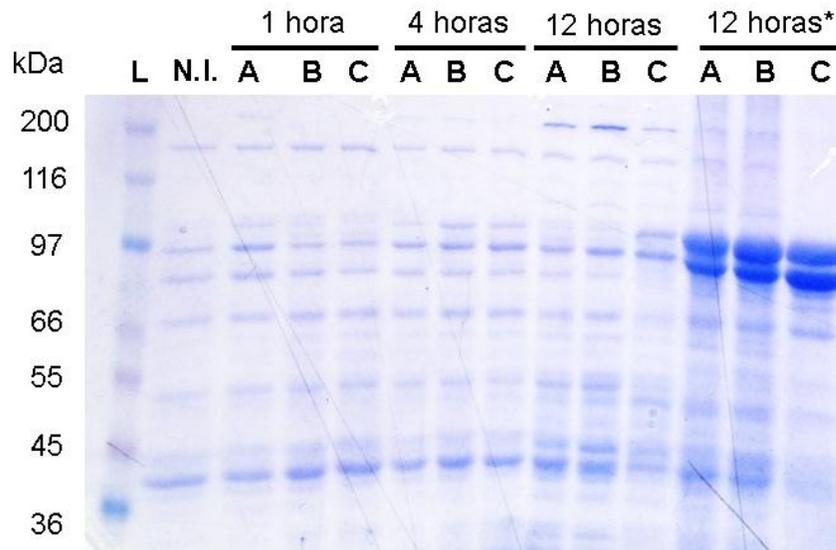


Figura 16. Test de expresión de Peredox silvestre visualizado en gel SDS-PAGE. Se testaron las condiciones **A**: 0,5 mM IPTG, 37°C, OD~0,5; **B**: 1 mM IPTG, 37°C, OD~0,5; **C**: 1 mM IPTG, 25°C, OD~0,5, a los tiempos de inducción señalados. **L**: Estándar de Peso Molecular, **N.I.**: No inducido. * Fracción insoluble tras 12 horas de inducción

El proceso de purificación exploratorio de Peredox (Figura 17) se realizó siguiendo una etapa inicial de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC) con resina Ni²⁺-NTA por medio de una columna HisTrap™ HP de 5 mL. El *pool* obtenido de las fracciones que contienen el pico de absorción mayoritario fue sometido alternativamente a: i) cromatografía de exclusión molecular por filtración en gel en columna Sephacryl S-500 HR o ii) cromatografía de intercambio aniónico en columna HiTrap Q HP de 5mL. La pureza de la muestra tras cada paso de purificación fue determinada mediante análisis visual en gel de SDS-PAGE.

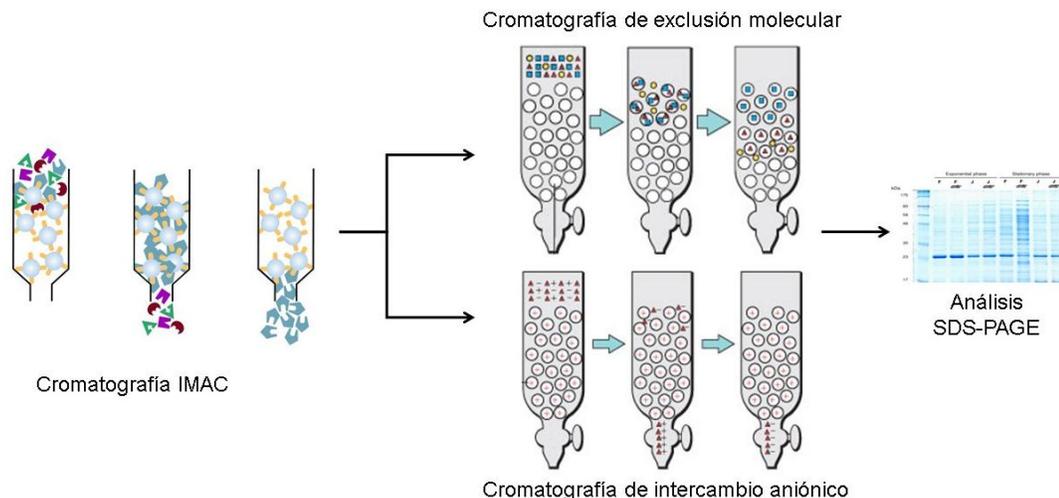


Figura 17. Esquema preliminar de purificación de Peredox silvestre.

En la Figura 18, se muestra que al realizar la elución en la cromatografía IMAC se obtiene un único pico de absorbancia, correlacionado con el intenso color rosa de la solución obtenida debido a la fluorescencia de mCherry.

Tras la electroforesis del *pool* de fracciones obtenido en este paso de purificación (Figura 18B), se observó que no es homogéneo en composición proteica, dada la presencia de bandas de menor peso molecular respecto a la banda mayoritaria en el peso molecular de Peredox (103 kDa).

Se ha descrito que un análisis de SDS-PAGE sin tratamiento de calor previo a la carga en el gel mantiene la fluorescencia roja de mCherry (Wu et al., 2008), lo que permite monitorear la presencia de Peredox visualmente. Siguiendo este tratamiento, el análisis de una muestra del *pool* obtenido muestra que las bandas de menor peso molecular exhiben fluorescencia de diversos colores, lo cual podría explicarse por una posible degradación del sensor (Figura 19).

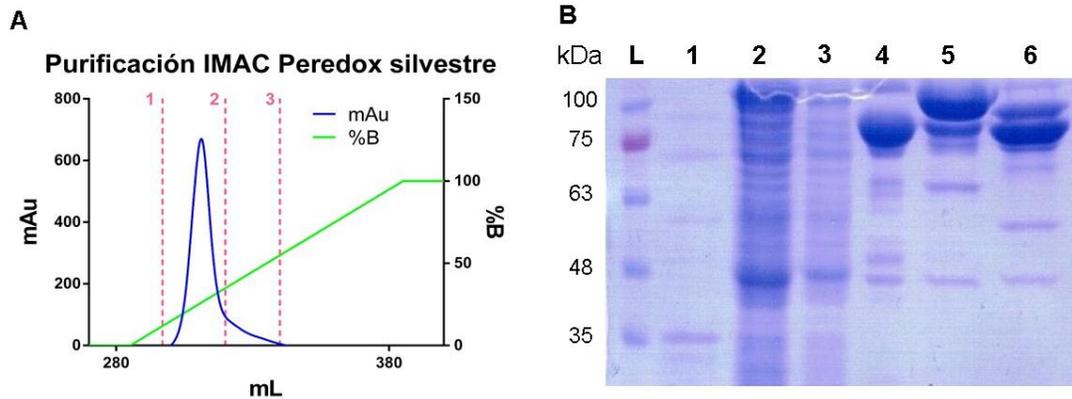


Figura 18. Etapas de la purificación de Peredox silvestre mediante cromatografía por afinidad. (A) Cromatograma de purificación IMAC en columna HisTrap con gradiente de imidazol. **(B)** Análisis de pureza en gel SDS-PAGE: L: Estándar de Peso Molecular; 1: No inducido; 2: Extracto crudo, 3: Frente de corrida; 4: Elución Fracción 1; 5: Elución Fracción 2; 6: Elución Fracción 3.

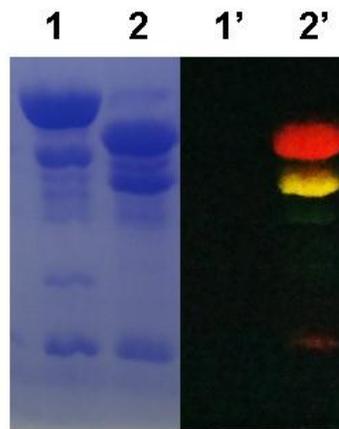


Figura 19. Monitoreo de fluorescencia de Peredox silvestre en gel SDS-PAGE. Se analizó una muestra del *pool* de Peredox silvestre obtenido en la cromatografía por afinidad con tratamiento de calor denaturante (1) y sin tratamiento de calor previo (2), para posteriormente visualizar la fluorescencia de la proteína en un transiluminador UV (números con apóstrofes).

Una subsecuente cromatografía de exclusión molecular (Figura 20) es capaz de remover gran parte de las bandas de bajo peso molecular, no así la banda de ~90 kDa. La intensidad de esta banda se incrementa al mantener una alícuota a temperatura ambiente durante 3 días en comparación a alícuotas almacenadas a 4 y -20°C.

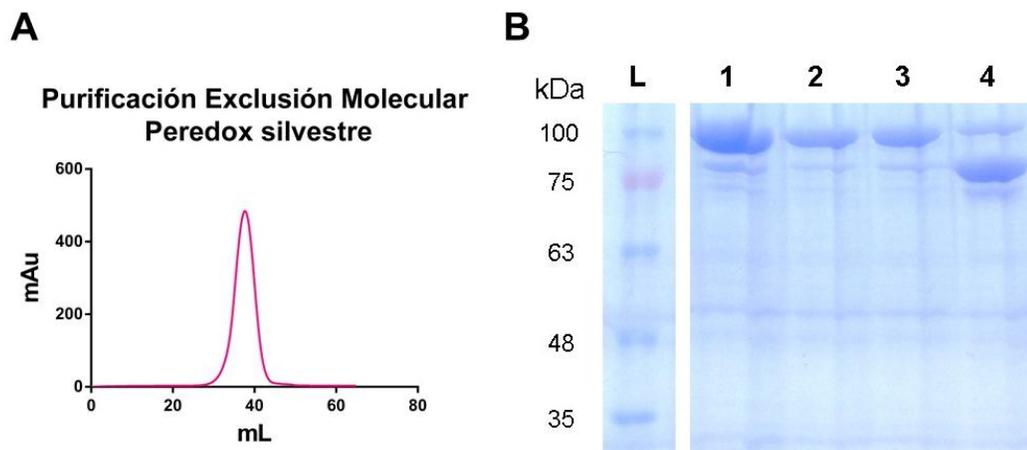


Figura 20. Cromatografía de exclusión molecular de Peredox silvestre. (A) Cromatograma de elución de muestra a través de columna de filtración en gel S500 de muestras obtenidas tras cromatografía IMAC. (B) Análisis de pureza en gel SDS-PAGE de muestras de Peredox tras este paso de purificación, almacenadas a -20°C (2), 4°C (3) y temperatura ambiente (4). L: Estándar de Peso Molecular, 1: Muestra obtenida de cromatografía por afinidad.

Alternativamente, se sometió una muestra del *pool* obtenido tras la cromatografía IMAC a una cromatografía de intercambio aniónico (Figura 21A). El análisis de SDS-PAGE del *pool* obtenido tras este paso de purificación muestra que no es posible eliminar por completo la presencia de la banda de ~90 kDa. Sin embargo, se logró enriquecer la presencia de Peredox de un 60 a un 70% de pureza (determinado por densitometría de las bandas en el gel).

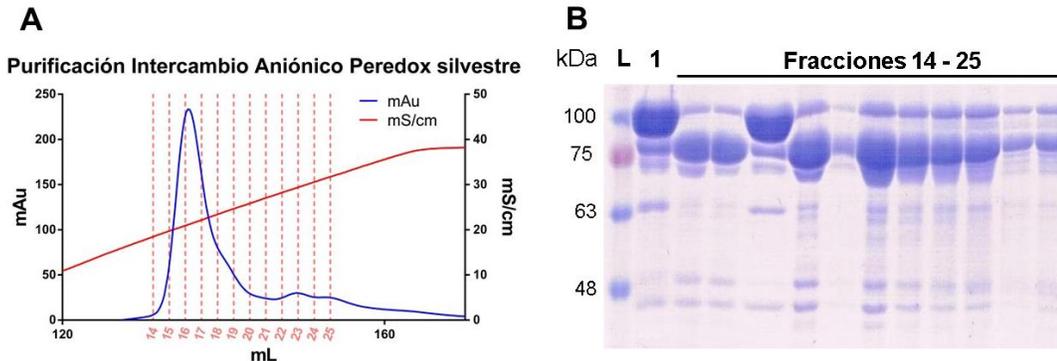


Figura 21. Cromatografía de intercambio aniónico de Peredox silvestre. (A) Cromatograma de purificación por intercambio aniónico en columna HiQ con gradiente de NaCl de muestra obtenida tras cromatografía IMAC. Se muestran las fracciones colectadas a lo largo del gradiente (líneas rosadas verticales). (B) Análisis de pureza en gel SDS-PAGE de muestras obtenidas con este paso de purificación. L: Estándar de Peso Molecular, 1: Muestra obtenida tras cromatografía por afinidad.

Estos resultados sugieren una posible degradación de Peredox favorecida por la temperatura, la cual explicaría la presencia de bandas de bajo peso molecular en el pico único obtenido de cromatografía IMAC. Este fenómeno podría deberse, principalmente, a la manipulación de la muestra a temperatura ambiente (aunque la cromatografía IMAC a 4°C no presenta mejoras; datos no mostrados). Se probó la estrategia de purificación IMAC, seguida de intercambio aniónico y seguida, a su vez, de filtración en gel a temperatura ambiente. En ésta última se colectó el pico de absorbancia único en un solo *pool* el cual, mediante análisis en SDS-PAGE, muestra degradación prácticamente total de Peredox debido al largo tiempo de manejo de la muestra a temperatura ambiente (datos no mostrados).

La estrategia final de purificación de Peredox silvestre y mutante consistió en un primer paso de purificación a través de una columna IMAC conectada en tándem a una columna de intercambio aniónico, seguido de un segundo paso de

purificación utilizando una columna de filtración en gel (para mayor detalle, referirse a la sección Métodos 3.1). Todo este sistema se ejecutó a 4°C para minimizar la degradación de Peredox. En la Figura 22 muestran los geles con cada paso de purificación de Peredox silvestre y mutante. Mediante densitometría se determinó la obtención de una pureza de ~70% para Peredox silvestre y ~65% para Peredox NRS.

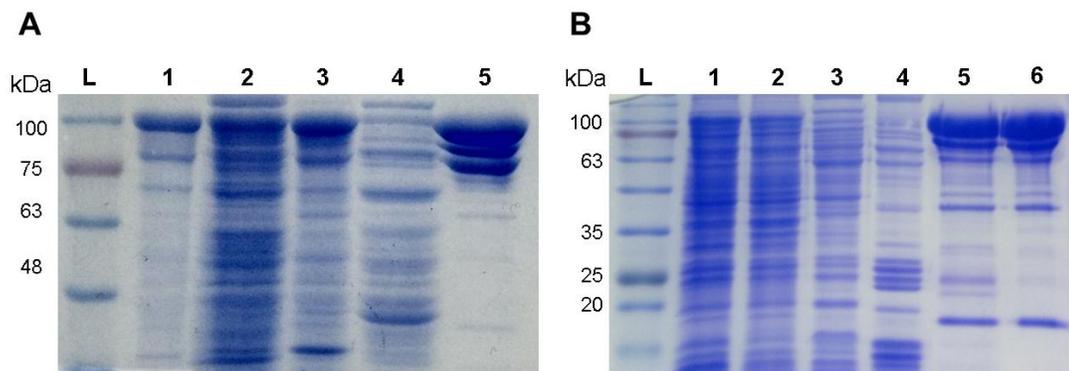


Figura 22. Purificación de Peredox silvestre y mutante NRS. (A) Análisis de pureza de Peredox silvestre en gel SDS-PAGE: L: Estándar de Peso Molecular; 1: Extracto crudo; 2: Frente de corrida sistema *tándem*, 3: Elución columna HisTrap sistema *tándem*; 4: Elución columna HiQ sistema *tándem*; 5: Elución columna de filtración en gel. (B) Análisis de pureza de Peredox NRS en gel SDS-PAGE: L: Estándar de Peso Molecular; 1: Extracto crudo; 2: Frente de corrida sistema *tándem*, 3: Elución columna HiQ sistema *tándem*; 4: Lavado columna HiQ sistema *tándem*; 5: Elución columna HisTrap sistema *tándem*; 6: Elución columna de filtración en gel.

Con estos resultados, se concluye que las distintas estrategias de purificación ensayadas no fueron suficientes para obtener una muestra homogénea en composición proteica tanto de Peredox silvestre como de Peredox NRS.

No obstante, obteniéndose una purificación parcial de Peredox silvestre y mutante NRS, se procedió a la realización de ensayos de fluorescencia y obtención de parámetros de unión a ligando.

Capítulo 3: Comportamiento fluorescente de Peredox silvestre y mutante ante la unión de dinucleótidos.

Una vez obtenidas las muestras enriquecidas en Peredox silvestre y mutante, se procedió a caracterizar la respuesta fluorescente de ambas proteínas respecto a la unión de los dinucleótidos NAD(H) y NADP(H) y evaluar el efecto de la mutación NRS en la especificidad por dinucleótido.

3.1. Caracterización de la respuesta fluorescente de Peredox silvestre y mutante frente a la unión de dinucleótidos

El sensor Peredox consta de dos proteínas fluorescentes: T-Sapphire y mCherry, cuyos picos de fluorescencia se encuentran a 513 nm y 610 nm, respectivamente. La fluorescencia verde de T-Sapphire aumenta con la unión de NADH (Figura 23A). Por su parte, la unión de dinucleótido oxidado no genera un aumento en la fluorescencia verde, sin embargo, compite con la forma reducida por el sitio de unión, disminuyendo la fluorescencia observada.

La fluorescencia roja de mCherry es prácticamente insensible a la unión de ambos dinucleótidos (Figura 23B), observándose sólo pequeñas variaciones en su emisión en las distintas condiciones (~3% de coeficiente de variación en un

conjunto de datos). Esto confirma su uso como normalizador de la señal fluorescente en función de la concentración del sensor (Hung et al., 2012).

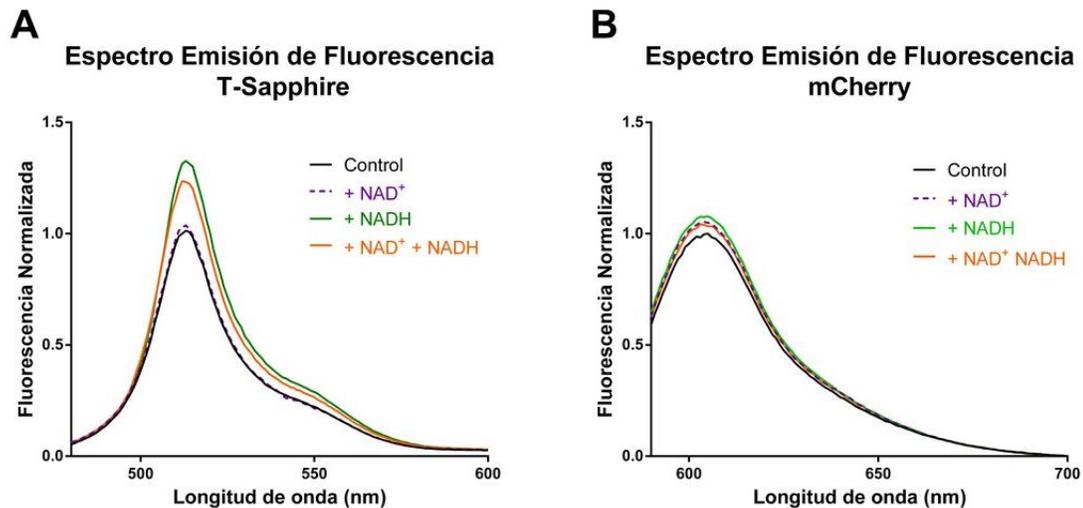


Figura 23. Espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas fluorescentes T-Sapphire y mCherry presentes en Peredox silvestre. Las mediciones de fluorescencia de T-Sapphire (A) y mCherry (B) fueron realizadas en ausencia de ligandos (línea negra), con 100 μM de NAD^+ (línea discontinua morada), 1,5 μM de NADH (línea verde) y con ambos ligandos a dichas concentraciones (línea naranja).

Para evaluar el efecto de la mutación NRS en la especificidad por dinucleótido en Peredox, se determinaron los parámetros de unión a NADH y NADPH para la proteína silvestre y mutante. Las curvas de saturación sigmoideas obtenidas para cada condición (Figura 24, Figura 25) fueron ajustadas a la ecuación de Hill (ver sección Métodos 3.3 y 3.4) obteniéndose las constantes de disociación (K_d) para cada dinucleótido, las cuales se resumen en la Tabla 6. Con 2 sitios de unión al dinucleótido reducido, de acuerdo a la estructura cristalográfica de T-Rex (McLaughlin et al., 2010b), los valores de coeficiente de Hill para todas las condiciones sugieren cooperatividad positiva entre los sitios de unión.

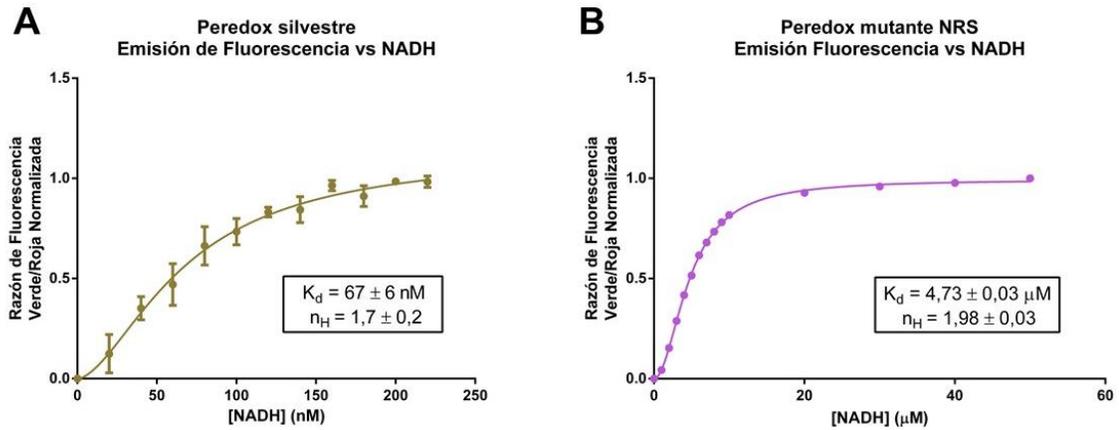


Figura 24. Curvas de saturación para la fluorescencia de Perodox silvestre y mutante NRS frente a la unión de NADH. Se aprecia que el comportamiento fluorescente se ajusta a un modelo sigmoide siguiendo la ecuación de Hill. Los valores de fluorescencia verde/roja fueron normalizados respecto a la condición sin dinucleótido. Los valores de K_d y n_H corresponden al promedio de 3 mediciones independientes (media \pm SD, $n=3$).

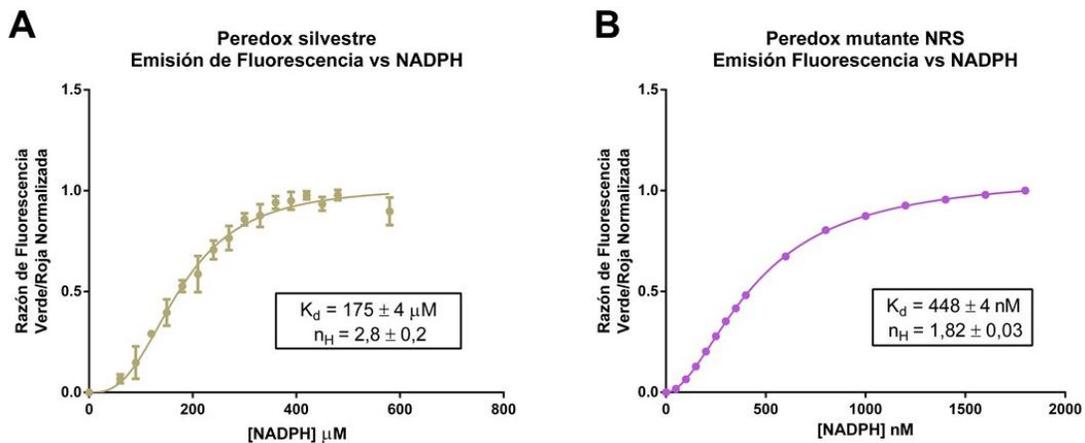


Figura 25. Curvas de saturación para la fluorescencia de Perodox silvestre y mutante NRS frente a la unión de NADPH. Se aprecia que el comportamiento fluorescente se ajusta a un modelo sigmoide siguiendo la ecuación de Hill. Los valores de fluorescencia verde/roja fueron normalizados respecto a la condición sin dinucleótido. Los valores de K_d y n_H corresponden al promedio de 3 mediciones independientes (media \pm SD, $n=3$).

Tabla 6. Parámetros de unión a ligandos de Peredox silvestre y mutante NRS.

	K_d NADH (μ M)	K_d NADPH (μ M)	Preferencia NADH/NADPH*	Preferencia NADPH/NADH*
Peredox silvestre	$6,7 \times 10^{-2} \pm 0,6$	175 ± 4	2612	$3,8 \times 10^{-4}$
Peredox NRS	$4,73 \pm 0,03$	$4,48 \times 10^{-1} \pm 0,04$	0,09	10,55

* La preferencia por un dinucleótido sobre otro se determinó a través del cociente entre las constantes de afinidad ($K_a = 1/K_d$) respectivas.

Respecto a la unión de NADH, se observa que Peredox silvestre muestra una alta afinidad de unión, en el orden nanomolar del dinucleótido. La mutación NRS logra una disminución de 70 veces la afinidad por NADH. En cuanto a la unión de NADPH, Peredox silvestre muestra una baja afinidad de unión, en el orden micromolar del dinucleótido. La mutación NRS consigue aumentar la afinidad por NADPH 390 veces.

En términos globales, la proteína silvestre prefiere ~2600 veces la unión de NADH por sobre NADPH, considerándose un sensor específico por NADH. La mutante NRS, prefiere 11 veces la unión de NADPH por sobre NADH, obteniéndose un sensor preferente por NADPH.

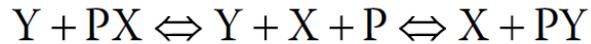
Capítulo 4: Comportamiento fluorescente de Peredox silvestre y mutante frente a cambios en la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺

El objetivo de este trabajo de tesis es evaluar el efecto de mutaciones en Peredox que permitan avanzar hacia la generación de un sensor fluorescente de la razón NADPH/NADP⁺. Por lo que se evaluó el comportamiento fluorescente de las variantes de Peredox en función de la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺ para determinar si son sensores idóneos para dicho propósito.

Para que un sensor sea capaz de responder a la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺ deben cumplirse ciertas condiciones : 1) Unir tanto la forma oxidada como la reducida, siguiendo un modelo competitivo por el sitio de unión; 2) Sólo la unión del dinucleótido reducido, y no del oxidado, genera respuesta fluorescente; 3) La concentración de cada dinucleótido debe ser superior a su respectiva constante de disociación (Berg, Hung, & Yellen, 2009; Hung et al., 2012). De esta forma, las curvas de saturación obtenidas se superponen al graficarlas en función de la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺.

De acuerdo a estudios cristalográficos, la unión de NADH a cualquiera de los 2 sitios de unión de T-Rex excluye la unión de NAD⁺ a uno de los sitios y viceversa (McLaughlin et al., 2010b), por lo que se procedió a evaluar el ajuste de la respuesta fluorescente de Peredox, frente a la unión de NAD(P)H y NAD(P)⁺, a un modelo competitivo, el cual se describe mediante la siguiente aproximación (Bellelli & Carey, 2017):

Considerando el siguiente sistema, que describe la unión de un ligando X que compite por la unión de la proteína P con el ligando Y:



Definiéndose las constantes de disociación para los ligandos X e Y:

$$K_{d,X} = [P][X] / [PX] \quad K_{d,Y} = [P][Y] / [PY]$$

La concentración de proteína total en función de P estará dada por:

$$[P]_{\text{tot}} = [P] + [PX] + [PY] = [P] \left(1 + [X] / K_{d,X} + [Y] / K_{d,Y} \right)$$

La fracción de saturación de X (\bar{X}), vale decir, la proporción de la especie PX respecto a la concentración de proteína total viene dada por la siguiente ecuación:

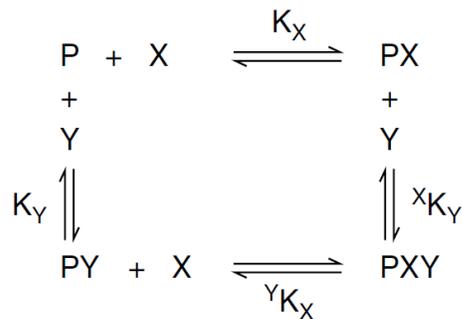
$$\bar{X} = [X] / K_{d,X} / \left(1 + [X] / K_{d,X} + [Y] / K_{d,Y} \right)$$

Bajo este modelo, la constante de disociación aparente del ligando X ($X_{1/2}$ o K_d^{app}) varía linealmente con la concentración del competidor Y siguiendo la siguiente ecuación:

$$X_{1/2} = K_{d,X} \left(1 + [Y] / K_{d,Y} \right)$$

Otro caso posible es que la unión de NAD(P)H y NAD(P)⁺ a Peredox no sea mutuamente excluyente y puedan coexistir ambas formas ocupando un sitio de unión cada una. Este modelo de unión no competitiva de ligandos se puede describir mediante la siguiente aproximación (Bellelli & Carey, 2017):

Considerando el siguiente sistema que describe una proteína que une dos ligandos diferentes, X e Y, en distintos sitios de unión:



Si el experimento es llevado a cabo a concentración fija de uno de los ligandos, por ejemplo, Y, la saturación fraccional del ligando X resulta:

$$\begin{aligned}
 \bar{X} &= ([PX] + [PXY]) / ([P] + [PX] + [PY] + [PXY]) \\
 &= [X] (K_Y + [Y] K_X / {}^Y K_X) / \{ K_X (K_Y + [Y]) + [X] (K_Y + [Y] K_X / {}^Y K_X) \}
 \end{aligned}$$

En este caso, la dependencia de la constante de disociación aparente del ligando X con la concentración del competidor Y es de tipo hiperbólica y está descrita por la siguiente expresión:

$$X_{1/2} = K_X (K_Y + [Y]) / (K_Y + [Y] K_X / {}^Y K_X)$$

Dado que la K_d del dinucleótido reducido fue determinada experimentalmente (Tabla 6), es posible determinar de forma aproximada la constante de disociación del dinucleótido oxidado para cada caso y, de este modo, saber si se cumple la condición (3) para evaluar la capacidad del sensor de responder a la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺.

Por otra parte, se evaluó la dependencia de la respuesta fluorescente de Peredox silvestre o mutante con la razón oxidado/reducido (R) de dinucleótidos a distintas concentraciones fijas de NAD(P)⁺. Se espera que la señal de fluorescencia de Peredox *versus* R sea independiente de las distintas combinaciones de concentraciones del par oxidado y reducido de dinucleótido que forman R .

Entonces, desviaciones de este comportamiento indican condiciones donde el sensor ya no estaría respondiendo exclusivamente a la razón oxidado/reducido de dinucleótidos.

4.1. Caracterización de la respuesta fluorescente de Peredox silvestre frente a la unión de NADH y NAD⁺

Se determinó si existe un comportamiento competitivo entre NADH y NAD⁺ por la unión a Peredox silvestre a través de ensayos de fluorescencia a lo largo de rangos de concentración de NADH a distintas concentraciones fijas de NAD⁺. La Figura 26A muestra que, efectivamente, el incremento en la concentración de NAD⁺ disminuye la afinidad aparente por NADH. Al graficar K_d^{app} en función de [NAD⁺] se observa una dependencia lineal (Figura 26B), lo que implica que la

unión de NADH y NAD⁺ a Peredox sigue un modelo competitivo. Se determinó una K_d NAD⁺ de ~14 μ M, menor a las concentraciones de NAD⁺ utilizadas, por lo que todas las mediciones fueron realizadas en condiciones de medición efectiva de razón NADH/NAD⁺.

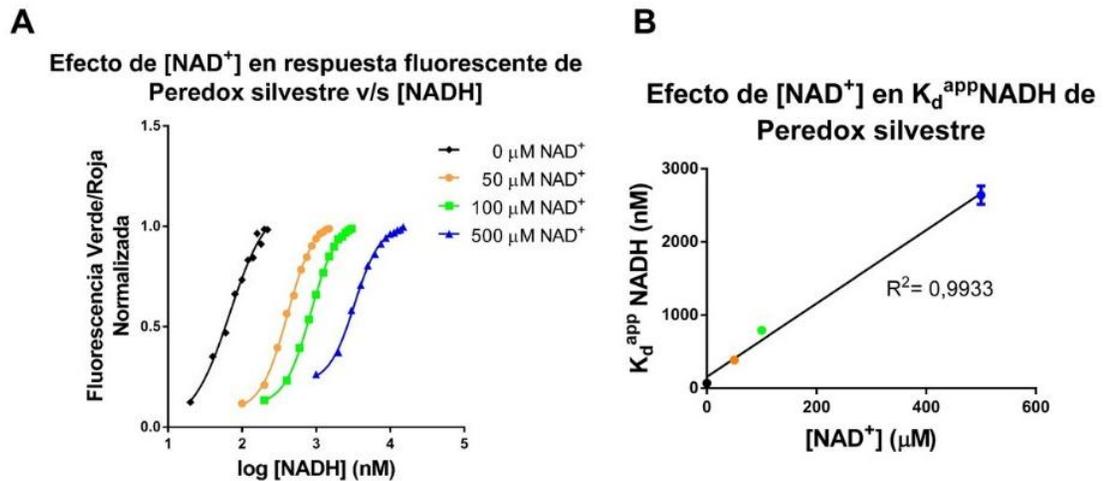


Figura 26. Caracterización de la unión de NADH y NAD⁺ a Peredox silvestre. (A) Respuesta fluorescente de Peredox silvestre *versus* [NADH] a distintas concentraciones fijas de NAD⁺. (B) Variación de la constante de disociación aparente de NADH de Peredox silvestre con la concentración de NAD⁺ se ajusta a un modelo lineal.

El rango de concentración de NADH utilizado para cada concentración de NAD⁺ es tal que, al operar la división, se obtienen los mismos valores de R por condición. Por lo tanto, del resultado anterior es posible extraer el comportamiento fluorescente de Peredox silvestre frente a la variación en R (para efectos de comprensión, los datos son expresados en función de $R' = 1000 \cdot [NADH]/[NAD^+]$). Esto aplica para todos los análisis posteriores.

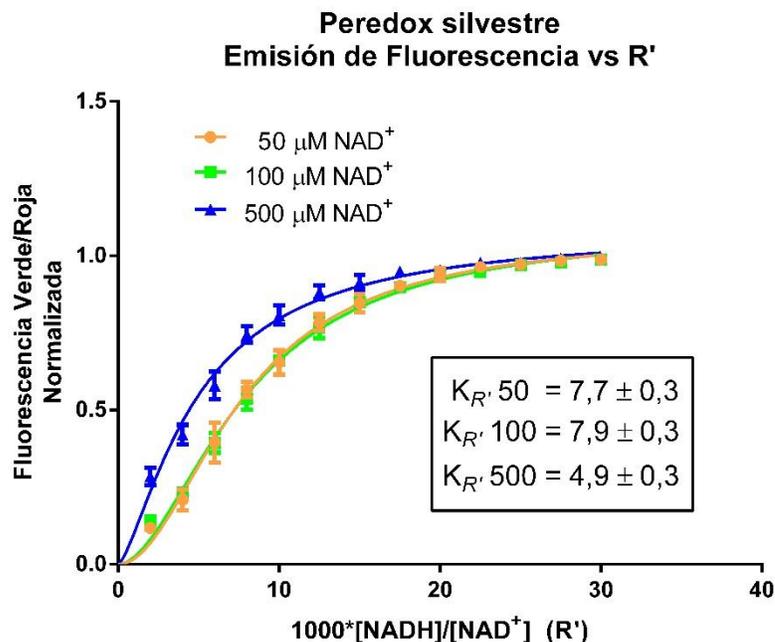


Figura 27. Comparación de respuesta fluorescente de Peredox silvestre a diferentes R' . Los ensayos fueron realizados a concentraciones fijas de 50 (línea naranja), 100 (línea verde) y 500 μM (línea azul) de NAD^+ . Se muestran los valores de $K_{R'}$ obtenidos para cada condición (media \pm SD, $n=3$). Las razones de fluorescencia obtenidas (media \pm SEM, $n=3$) fueron normalizadas respecto a la condición control sin dinucleótidos.

En la Figura 27 se muestran las curvas de fluorescencia verde/roja en el rango de R' de 2 a 30, a concentraciones fijas de 50, 100 y 500 μM de NAD^+ . En cada condición los datos se ajustan a una sigmoide, obteniéndose los valores de R' al cual el sensor exhibe la mitad de su respuesta máxima ($K_{R'}$ del sensor, análogo a la constante de disociación (K_d) de un receptor).

Los valores de $K_{R'}$ obtenidos muestran que entre 50 y 100 μM de NAD^+ no hay variación en la respuesta fluorescente frente a los mismos valores de R' , superponiéndose ambas curvas. Un incremento de 100 a 500 μM de NAD^+ produce un desplazamiento de la curva de respuesta a R' , por una disminución

en K_R . Esto representa una disminución de K_R en 1,5 veces dado un aumento de 10 veces la concentración de NAD^+ .

Por lo tanto, Peredox silvestre es un sensor de la razón NADH/NAD^+ en el rango de bajas concentraciones de NAD^+ (50-100 μM de NAD^+), pero exhibe una leve variación de respuesta frente a mayores concentraciones (500 μM de NAD^+).

4.2. Caracterización de la respuesta fluorescente de Peredox NRS frente a la unión de NADH y NAD^+

En primer lugar, se evaluó si la mutación NRS modifica el tipo de unión del par NADH/NAD^+ respecto a Peredox silvestre.

La Figura 28A muestra el comportamiento de la respuesta fluorescente de Peredox NRS a lo largo de distintos rangos de concentración de NADH a distintas concentraciones fijas de NAD^+ . Considerando sólo las condiciones en presencia de NAD^+ , dado el comportamiento errático de la condición sin NAD^+ , se observa una leve disminución de la afinidad aparente por NADH , la cual depende linealmente con la concentración de NAD^+ , presentando este último una $K_d \sim 525 \mu\text{M}$ (Figura 28B). Por lo tanto, la unión de NADH y NAD^+ a Peredox NRS seguiría un modelo competitivo.

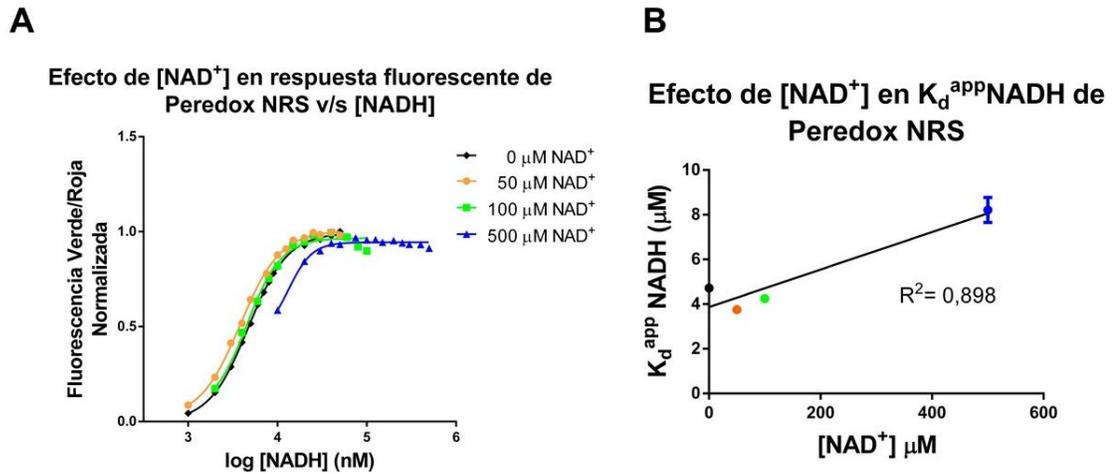


Figura 28. Caracterización de la unión de NADH y NAD^+ a Peredox NRS. (A) Respuesta fluorescente de Peredox NRS *versus* $[NADH]$ a distintas concentraciones fijas de NAD^+ . (B) Variación de la constante de disociación aparente de NADH de Peredox NRS con la concentración de NAD^+ se ajusta a un modelo lineal.

En la Figura 29 se muestran las curvas de fluorescencia verde/roja en el rango de R' de 20 a 300 a concentraciones fijas de 50, 100 y 500 μM de NAD^+ . Sin embargo, las concentraciones de NAD^+ utilizadas fueron menores que la K_d determinada, por lo que se espera que la respuesta fluorescente frente a distintos R' sí dependa de la concentración de NAD^+ . En acuerdo a este punto, se observa una disminución en $K_{R'}$ de 1,8 veces para el incremento de 50 a 100 μM de NAD^+ y de 4,7 veces para el incremento de 50 a 500 μM .

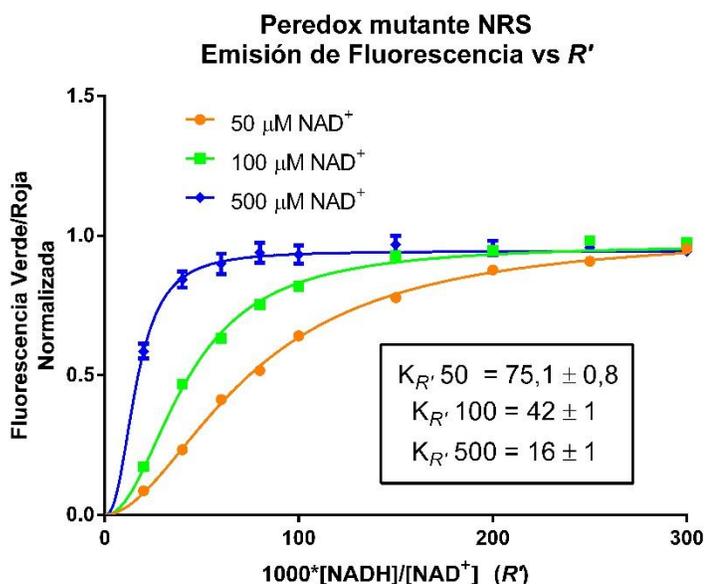


Figura 29. Comparación de respuesta fluorescente de Peredox NRS a diferentes R' . Los ensayos fueron realizados a concentraciones fijas de 50 (línea naranja), 100 (línea verde) y 500 μM (línea azul) de NAD^+ . Se muestran los valores de $K_{R'}$ obtenidos para cada condición (media \pm SD, $n=3$). Las razones de fluorescencia obtenidas (media \pm SEM, $n=3$) fueron normalizadas respecto a la condición control sin dinucleótidos.

Por lo tanto, se sugiere que la mutación NRS no estaría modificando el mecanismo de unión mutuamente excluyente de NADH y NAD^+ a Peredox NRS.

4.3. Caracterización de la respuesta fluorescente de Peredox NRS a la unión de NADPH y NADP^+

Siguiendo el esquema de trabajo anterior, se evaluó si Peredox NRS exhibe el comportamiento esperado para un sensor $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Se determinó si existe un comportamiento competitivo entre NADPH y NADP^+ por la unión a Peredox NRS a través de ensayos de fluorescencia a lo largo de rangos de concentración de NADPH a distintas concentraciones fijas de NADP^+ . La Figura 30A muestra que, efectivamente, el incremento en la concentración de NADP^+ disminuye la

afinidad aparente por NADPH. Sin embargo, al graficar las K_d^{app} de NADPH en función de $[NADP^+]$ se observa una dependencia hiperbólica (Figura 30B); comportamiento descrito para una unión de tipo no-competitiva (Bellelli & Carey, 2017). A partir de este ajuste se determinó una K_d para $NADP^+$ de $\sim 11 \mu M$.

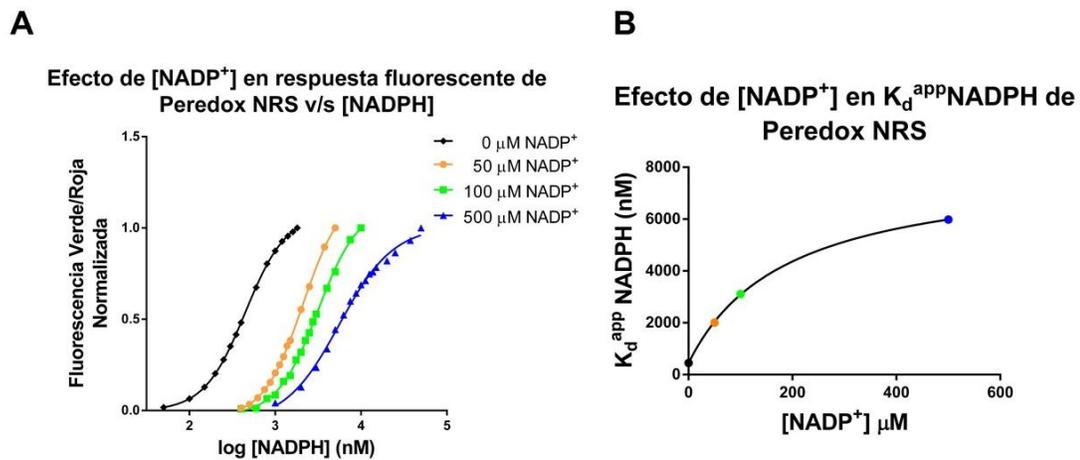


Figura 30. Caracterización de la unión de NADPH y $NADP^+$ a Perox NRS. (A) Respuesta fluorescente de Perox NRS *versus* $[NADPH]$ a distintas concentraciones fijas de $NADP^+$. (B) Variación de la constante de disociación aparente de NADPH de Perox NRS con la concentración de $NADP^+$ se ajusta a un modelo hiperbólico.

En la Figura 31 se muestran las curvas de fluorescencia verde/roja en el rango de R' de 2 a 100 a concentraciones fijas de 50, 100 y 500 μM de $NADP^+$. Estas concentraciones de $NADP^+$ están por sobre la K_d determinada para $NADP^+$ de $\sim 11 \mu M$. Reforzando el resultado anterior, la respuesta fluorescente de Perox NRS en función de R' no muestra superposición de las curvas para ninguna condición.

Los valores de $K_{R'}$ obtenidos muestran una disminución gradual respecto al aumento en la concentración de NADP^+ , con una disminución en $K_{R'}$ de 1,3 veces para el incremento de 50 a 100 μM de NADP^+ y de 3,3 veces para el incremento de 50 a 500 μM .

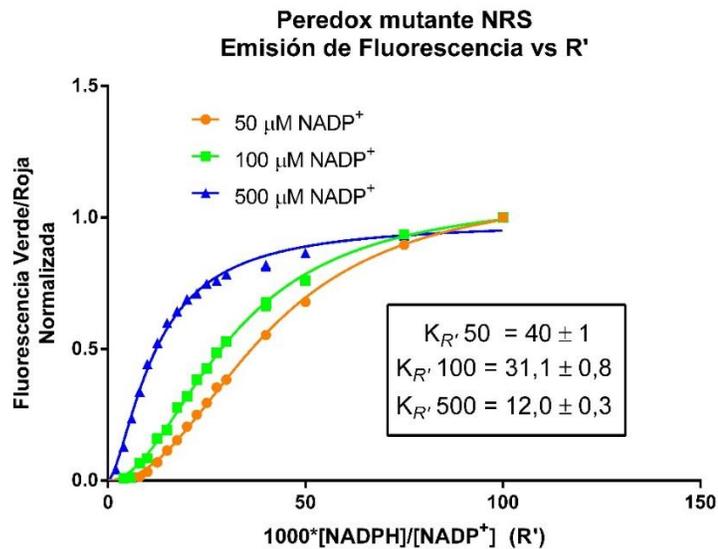


Figura 31. Comparación de respuesta fluorescente de Peredox NRS a diferentes R' . Los ensayos fueron realizados a concentraciones fijas de 50 (línea naranja), 100 (línea verde) y 500 μM (línea azul) de NADP^+ . Se muestran los valores de $K_{R'}$ obtenidos para cada condición (media \pm SD, $n=3$). Las razones de fluorescencia obtenidas (media \pm SEM, $n=3$) fueron normalizadas respecto a la condición control sin dinucleótidos.

Estos resultados sugieren que la unión de NADPH y NADP^+ a Peredox NRS sigue un modelo no competitivo. Como consecuencia, Peredox NRS no sería adecuado para la medición de la razón $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se estudiaron los determinantes estructurales de la especificidad por dinucleótido en la proteína Rex de *Thermus aquaticus* en el contexto de la construcción Peredox, sensor de la razón NADH/NAD⁺. Este análisis tuvo como objetivo proponer mutaciones que permitieran avanzar hacia el cambio de especificidad de NAD(H) a NADP(H) en el sensor fluorescente Peredox y así obtener un sensor de la razón NADPH/NADP⁺. Nuestros resultados apuntan a que el *loop* β 4- β 5 es una región de la proteína que contiene determinantes estructurales de la especificidad por NAD(H), en especial los residuos D112, V113 y D114. La mutación de estos residuos en el sensor Peredox, nos permitió obtener una variante preferente por NADP(H). Sin embargo, por mecanismos aún por dilucidar, la mutante caracterizada no es capaz de dar cuenta de la razón NADPH/NADP⁺.

1. Análisis estructural-evolutivo de la especificidad por dinucleótido en T-Rex

A través del enfoque del Diseño Racional, el desafío del cambio de especificidad se abordó desde el aspecto estructural de T-Rex. La información estructural y de secuencias disponible a la fecha sólo da cuenta de la conservación estricta del residuo Asp (D112 en T-Rex) en la familia Rex (Ravcheev et al., 2012). En la descripción de la estructura cristalográfica de T-Rex, la presencia de D112 se relaciona con la especificidad por NAD(H) sólo a través de evidencia en literatura

con proteínas relacionadas (Sickmier et al., 2005). Sin embargo, dicha relación no ha sido determinada experimentalmente.

La primera indagación experimental realizada en esta tesis revela que la presencia del residuo D112 en el *loop* β 4- β 5, comparada con otras proteínas de unión a NAD(H) mediante Potenciales Estadísticos, efectivamente posee un rol en la discriminación entre NAD(H) y NADP(H) (Figura 8). Esto se demostró mediante cálculos de energía libre, los cuales muestran que D112 establece una interacción favorable con la porción 2'-OH de la ribosa adyacente a la adenina de NADH y, además, genera repulsión electrostática con el 2'-fosfato de NADPH (Figura 13). Del mismo modo, se determinó que D114 también posee un rol en la especificidad por dinucleótido, desfavoreciendo tanto la unión de NADPH como la de NADH (Figura 8). Sin embargo, esta repulsión es de mayor magnitud respecto a la unión de NADPH (Figura 13). Esta observación permite plantear que D112 es responsable de la selectividad por NADH, dado que su presencia asegura la unión de NADH por sobre NADPH, mientras que D114 permite regular el nivel de afinidad por NADH.

Desde un punto de vista evolutivo, este planteamiento resulta interesante si se considera el análisis filogenético de la familia Rex publicado por Ravcheev y cols en el 2012, en el cual se puede observar que la identidad del residuo en la posición equivalente a D114 es conservado dentro de cada *phyla* de bacteria, no así entre ellas (Ravcheev et al., 2012). Esta divergencia podría estar relacionada

con la aparición de distintas variantes de Rex con diferentes grados de afinidad por NADH. Este planteamiento tiene sentido si es que las concentraciones intracelulares de NADH y NAD⁺ fuesen diferentes entre los distintos *phyla*, a los cuales Rex tendría que ajustarse para poder cumplir su función como represor transcripcional sensible al estado redox.

El residuo V113, por su parte, exhibe una energía libre de unión favorable, y en similar medida, tanto para la unión de NADH como NADPH (Tabla 5). Sin embargo, en este trabajo se evidenció que esta posición tuvo un rol clave en la obtención de la especificidad por NADPH. Se determinó que en esta posición es factible mutar por un residuo de Arg (Figura 9), produciendo un aumento en la afinidad por NADPH (Tabla 5).

Paralelamente, al realizar una búsqueda de secuencias homólogas utilizando la herramienta PSI-BLAST, la cual permite encontrar homólogos lejanos de una secuencia (Altschul et al., 1997), se encontró 2 secuencias de proteínas Rex, del *phylum* Chloroflexi, con un motivo ARN equivalente a DVD del *loop* β 4- β 5 en T-Rex. Estas evidencias sugieren la posibilidad de aparición de una nueva rama evolutiva con especificidad por NADPH en la familia Rex.

Este conjunto de evidencias e inferencias permiten aseverar que el *loop* β 4- β 5 en T-Rex contiene determinantes estructurales de la especificidad por dinucleótido. Dicha aseveración está en concordancia con lo observado por Tao y cols. en 2017, quienes diseñaron un sensor fluorescente, también con T-Rex

como dominio sensor, para la detección *in vivo* de NADPH mediante mutantes del *loop* β 4- β 5 (Tao et al., 2017). Las semejanzas entre este trabajo de tesis y lo obtenido por Tao y cols. serán discutidas en la sección 3 de la presente Discusión.

2. Purificación de Peredox silvestre y mutante NRS

El proceso de purificación de Peredox silvestre y mutante NRS no estuvo exento de dificultades. Siguiendo el protocolo descrito en el diseño de Peredox, cromatografía IMAC con resina de Ni^{2+} (Hung et al., 2012), no se obtuvo proteína pura como era de esperarse. La misma dificultad fue observada por Vijay Tejwani en su tesis doctoral (Tejwani, 2016), en la cual se utilizó Peredox para monitorear las fluctuaciones en la razón NADH/NAD^+ en *Ralstonia eutropha*. Sin embargo, Tejwani expresó, además, una variante de Peredox sin mCherry en su extremo carboxilo terminal, la cual sí pudo obtener totalmente pura siguiendo el mismo protocolo. Si a esto sumamos la emisión de fluorescencia de diversos colores en las bandas de menor peso molecular respecto a Peredox (Figura 19), se puede plantear la posibilidad de que mCherry sufre una degradación parcial durante el proceso de expresión y purificación. En tal caso, los fragmentos mayores, producto de esta degradación, serían los responsables de la emisión de fluorescencia de colores diferentes al rojo.

3. Efecto de mutaciones en el *loop* β 4- β 5 en la especificidad por dinucleótido en Peredox

Las mutaciones propuestas para el cambio de especificidad de Peredox de NADH a NADPH se basaron, principalmente, en la similitud estructural entre los dominios Rossmann de T-Rex y miembros de la familia 6PGDH. Como proyección a futuro, podría evaluarse el cambio completo del *loop* β 4- β 5 de T-Rex con la secuencia del *loop* β 2- α 2 de *Ec*6PGDH y su efecto en la especificidad por NAD(P)H.

La racional de las mutantes propuestas es similar a la abordada por Tao y cols. en 2017 para la generación de un sensor *in vivo* de NADPH basado en T-Rex (Tao et al., 2017). La estrategia de propuesta de mutantes se basó en la similitud estructural de T-Rex con proteínas de unión a NAD(H) y NADP(H), a diferencia de esta tesis que se basó en la búsqueda de homólogos. Tao y cols. caracterizaron 40 mutantes, las cuales comparten características con la mutante NRS propuesta en este trabajo. Destaca la presencia del residuo Arg en la posición 113 en todas las mutantes caracterizadas, corroborando su rol clave en la especificidad por NADPH. En la posición 114 se observa que la presencia del residuo Ser/Thr conlleva una mayor afinidad por NADPH respecto a mutantes por Lys en dicha posición. Por otro lado, todas las mutantes poseen el residuo Ser en la posición 112, en vez de Asn como se propuso en este trabajo de tesis. Sin

embargo, esto de igual manera apoya la idea de remover la carga negativa del residuo Asp para favorecer la unión del 2'-fosfato de NADPH.

Como descripción general del efecto de la mutación NRS propuesta en esta tesis, el reemplazo D112N remueve la carga negativa y su repulsión electrostática con el grupo 2'-fosfato de NADP(H), además de establecer interacciones polares con dicho grupo. El reemplazo V113R incorpora una carga positiva y una cadena lateral más larga. El primer factor estabiliza el grupo 2'-fosfato, mientras que el segundo podría suponer un impedimento estérico para dicha interacción. Sin embargo, los resultados de Dinámica Molecular sugieren que esta cadena lateral se posiciona sobre el anillo adenina y orientada hacia el 2'-fosfato, estableciendo interacciones favorables con ambas regiones del dinucleótido (Figura 14). El reemplazo D114S actúa de una forma similar al reemplazo en la posición 112, eliminando la repulsión electrostática y estableciendo interacciones polares con el grupo 2'-fosfato.

4. Caracterización de Peredox silvestre y mutante NRS como sensor de la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺

En este trabajo de tesis se evidenció la dependencia con la concentración absoluta de NAD⁺ de la respuesta fluorescente de Peredox silvestre frente a cambios en la razón NADH/NAD⁺. Este fenómeno también ha sido descrito por Hung y cols. en el año 2012 y en la tesis doctoral de Vijay Tejwani en 2016. Hung y cols. establecieron que Peredox “da cuenta de la concentración de NADH,

parcialmente compensada por la concentración de NAD, en vez de estrictamente la razón NADH/NAD⁺ (Hung et al., 2012, Tejwani, 2016). Sin embargo, ambos autores consideraron que el sensor aún mantenía un rango de trabajo aceptable si las fluctuaciones de [NAD⁺] no varían mucho en la condición *in vivo*.

Es importante recalcar que el diseño de sensores de la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺ se basa en la premisa de la unión competitiva de sus ligandos (Berg et al., 2009). En este punto, resulta pertinente remarcar la necesidad de abordar la caracterización de este tipo de sensores considerando la determinación experimental del tipo de competencia entre sus ligandos.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la unión de NADH y NAD⁺ a Peredox silvestre es de tipo competitiva (Figura 26). Sin embargo, la cantidad de observaciones no permite establecer con claridad el rango de concentraciones de NAD⁺ en que se pierde este comportamiento. En el caso de Peredox NRS, la unión de NADH y NAD⁺ mantiene el carácter competitivo (Figura 28). Dado que las concentraciones de NAD⁺ utilizadas estaban bajo la K_d determinada, no se pudo evaluar canónicamente el comportamiento fluorescente de Peredox NRS frente a la razón NADH/NAD⁺. Dicha evaluación queda como proyección, a futuro, de esta tesis.

Contrario a lo esperado, los resultados de esta tesis sugieren que la unión de NADPH y NADP⁺ a Peredox NRS es de tipo no-competitiva (Figura 30). Esto implica que la unión de NADPH y NADP⁺ no es mutuamente excluyente, lo cual

difiere del mecanismo de detección del estado redox reportado por McLaughlin y cols. en 2010 (McLaughlin et al., 2010a). En dicho estudio se evidencia que en el bolsillo de unión a dinucleótido de T-Rex pueden unirse 2 moléculas de NADH o una de NAD⁺. La unión de NADH a T-Rex induce un cambio en la disposición espacial de los residuos que interactúan con el anillo nicotinamida del dinucleótido que impide estéricamente la unión de NAD⁺, y viceversa.

Por lo tanto, si existe una unión no competitiva a Peredox NRS entre NADPH y NADP⁺, ambos ligandos están unidos en simultáneo, cada molécula ocupando uno de los sitios de unión, a pesar del impedimento estérico descrito por McLaughlin y cols. (McLaughlin et al., 2010). Este fenómeno podría deberse a que la mutación NRS genera interacciones favorables con el 2'-fosfato de una magnitud superior a las interacciones desfavorables con el anillo nicotinamida de NADPH o NADP⁺, permitiendo que ambos dinucleótidos coexistan en los sitios de unión. Una aproximación bioinformática, a través de simulaciones de Dinámica Molecular de los complejos de T-Rex silvestre y mutante con NAD(P)H y NAD(P)⁺, podría entregar evidencia que permita esclarecer si una unión no excluyente es posible. Se sugiere que el diseño de un GEFS para la detección de la razón NADPH/NADP⁺ con un dominio sensor con sólo un sitio de unión a dinucleótido podría evitar este fenómeno, siempre y cuando exista un cambio conformacional de por medio.

Un punto importante que destacar es el rango de detección de la razón NAD(P)H/NAD(P)^+ *in vivo* de las variantes de Peredox. Los valores de la razón NAD^+/NADH determinados en diferentes tipos celulares dan cuenta de un rango de 1-700 en células eucariontes (Ying, 2008) y de 0,4-10 (Kabir & Shimizu, 2004, Zhou et al., 2011) en células procariontes.

En términos de R' , los valores serían de 1,4-1000 en eucariontes y de 100-2500 en procariontes. En el caso de células eucariontes, si consideramos que la saturación de la señal fluorescente de Peredox silvestre se determinó a un valor de R' de 30, entonces el sensor tiene una aplicabilidad parcial. Esto fue evidenciado y discutido por Hung y cols., quienes validaron el uso de Peredox en astrocitos y neuronas de ratón, pero observaron su saturación al dirigirlo hacia las mitocondrias (Hung et al., 2012).

Por otro lado, en el caso de células procariontes, la señal de Peredox estaría siempre saturada en el rango de razón NADH/NAD^+ determinado para este tipo celular. Este fenómeno fue evidenciado y discutido por Tejwani en su tesis doctoral, al no poder observar diferencias claras en la caracterización *in vivo* de Peredox en *R. eutropha* (Tejwani, 2016).

La saturación de la señal fluorescente de Peredox en procariontes podría deberse, principalmente, a la alta afinidad del sensor por NADH (rango nanomolar), mientras que las concentraciones *in vivo* son del orden milimolar (Zhou et al., 2011). Además, la diferencia de afinidad entre NADH y NAD^+

favorece que el rango de detección de la razón entre ambos dinucleótidos sea a valores bajos de R' .

En síntesis, abordando estos dos últimos aspectos discutidos, se plantea como proyección de este trabajo de tesis el análisis de los determinantes estructurales especificidad entre dinucleótido oxidado y reducido en T-Rex. De esta forma, se podría dar respuesta clara al problema de la unión no excluyente entre NADPH y NADP⁺ en Peredox NRS. Además, este análisis permitiría determinar residuos clave en la discriminación entre dinucleótido oxidado/reducido y así proponer mutantes que consigan ajustar el rango de detección de la razón NAD(P)H/NAD(P)⁺ en variantes de Peredox dependiendo del tipo celular en el cual se desee utilizar.

CONCLUSIONES

- 1) El *loop* β 4- β 5 de T-Rex posee determinantes estructurales de la especificidad por dinucleótido. El análisis de Potenciales Estadísticos y las simulaciones de Dinámica Molecular indican que los residuos D112 y D114 son fundamentales en la selectividad por NAD(H). D112 actúa favoreciendo la unión NAD(H) y desfavoreciendo la unión de NADP(H), mientras que D114, a pesar de tener un rol negativo con ambos dinucleótidos, desfavorece en mayor medida a NADP(H).
- 2) El dominio Rossmann de T-Rex comparte similitud estructural y motivos de especificidad con miembros de la familia N-terminal tipo 6-fosfogluconato deshidrogenasa. A partir de este análisis se propuso la mutante NRS del motivo DVD presente en el *loop* β 4- β 5 como candidata para la obtención de una variante de Peredox con afinidad por NADP(H).
- 3) Se logró obtener muestras enriquecidas en Peredox silvestre y mutante. Sin embargo, no fue posible conseguir una purificación total ni se pudo determinar porqué aparecen bandas de menor peso molecular a lo esperado en los análisis de SDS-PAGE. Se sugiere que mCherry estaría sufriendo una degradación por exposición a temperatura ambiente.
- 4) La mutación NRS de T-Rex en Peredox consigue aumentar la afinidad por NADPH en 390 veces. Sin embargo, la variante Peredox NRS prefiere 11 veces la unión de NADPH por sobre NADH, obteniéndose un sensor preferente por NADPH.

5) Peredox silvestre se comporta como un sensor de la razón NADH/NAD^+ a concentraciones bajas de NAD^+ . Si bien el mecanismo de unión a ambos dinucleótidos es de tipo competitivo, no se pudo determinar porqué a altas concentraciones de NAD^+ la respuesta de Peredox se desvía del comportamiento esperado para un sensor de la razón NADH/NAD^+

6) La mutación NRS en Peredox disminuyó su afinidad por NAD(H) . Aunque no se pudo evaluar su comportamiento frente a la razón NADH/NAD^+ , se determinó que la mutación no afectó el comportamiento de unión competitiva de NAD^+ y NADH . En el caso de NADPH y NADP^+ , se evidenció que su unión sigue un modelo no competitivo, lo que implica que no se estaría cumpliendo la condición de unión mutuamente excluyente necesaria para que el sensor responda, efectivamente, a la razón $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Se plantea que la mutación NRS genera interacciones favorables con el grupo 2'-fosfato de NADP(H) que permite la coexistencia de ambas formas del dinucleótido en el sitio de unión, a pesar del impedimento estérico con la región nicotinamida que la unión de una forma genera con la otra.

REFERENCIAS

- Akerboom, J., Rivera, J. D. V., Rodríguez Guilbe, M. M., Malavé, E. C. A., Hernandez, H. H., Tian, L., ... Schreiter, E. R. (2009). Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6455–6464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807657200>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694>
- Auriol, C., Bestel-Corre, G., Claude, J.-B., Soucaille, P., & Meynial-Salles, I. (2011). Stress-induced evolution of *Escherichia coli* points to original concepts in respiratory cofactor selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1278–1283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010431108>
- Avi-Dor, Y., Olson, J. M., Doherty, M. D., & Kaplan, N. O. (1962). Fluorescence of pyridine nucleotides in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 237(7), 2377–2383.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11241–11246. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11241>
- Banks, J. L., Beard, H. S., Cao, Y., Cho, A. E., Damm, W., Farid, R., ... others. (2005). Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1752–1780.
- Bellelli, A., & Carey, J. (2017). *Reversible Ligand Binding: Theory and Experiment*. John Wiley & Sons.
- Bennett, B., Kimball, E., & Gao, M. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 5(8), 593–599. <https://doi.org/10.1038/nchembio.186.Absolute>
- Berg, J., Hung, Y. P., & Yellen, G. (2009). A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nature Methods*, 6(2), 161–166. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1288>
- Berger, F., Ramírez-Hernández, M. H., & Ziegler, M. (2004). The new life of a centenarian: signalling functions of NAD (P). *Trends in Biochemical Sciences*, 29(3), 111–118.
- Bilan, D. S., Matlashov, M. E., Gorokhovatsky, A. Y., Schultz, C., Enikolopov, G., & Belousov, V. V. (2014). Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD⁺/NADH ratio changes in different cellular compartments. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(3), 951–957. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.018>
- Blander, G., & Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 417–435.
- Boltzmann, L. (1896). Entgegnung auf die wärmetheoretischen Betrachtungen des Hrn. E. Zermelo. *Annalen Der Physik*, 293(4), 773–784.
- Brekasis, D., & Paget, M. S. B. (2003). A novel sensor of NADH / NAD + redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO Journal*, 22(18).

- Cahn, J. K. B., Werlang, C. A., Baumschlager, A., Brinkmann-Chen, S., Mayo, S. L., & Arnold, F. H. (2016). A general tool for engineering the NAD/NADP cofactor preference of oxidoreductases. *ACS Synthetic Biology*, *6*(2), 326–333.
- Cameron, W. D., Bui, C. V., Hutchinson, A., Loppnau, P., Gräslund, S., & Rocheleau, J. V. (2016). Apollo-NADP+: a spectrally tunable family of genetically encoded sensors for NADP+. *Nature Methods*, *13*(4), 352–358. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3764>
- Chen, R., Greer, A. F., Dean, A. M., & Hurley, J. H. (1996). Redesigning secondary structure to invert coenzyme specificity in isopropylmalate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(22), 12171–12176. [https://doi.org/10.1016/S1080-8914\(97\)80078-6](https://doi.org/10.1016/S1080-8914(97)80078-6)
- Chen, R., Greer, a, & Dean, a M. (1995). A highly active decarboxylating dehydrogenase with rationally inverted coenzyme specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(25), 11666–11670. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11666>
- Chen, Z., & Zeng, A.-P. (2013). Protein design in systems metabolic engineering for industrial strain development. *Biotechnology Journal*, *8*(5), 523–533.
- Chenault, H. K. (1987). of Nicotinamide Cofactors Regeneration for use in Organic Synthesis, *14*(11).
- Chudakov, D., Matz, M., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. (2010). Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews*, *90*(3), 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>.
- Cunningham, B. C., & Wells, J. a. (1989). High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science (New York, N. Y.)*, *244*(4908), 1081–1085. <https://doi.org/10.1126/science.2471267>
- Ehrensberger, A. H., Elling, R. A., & Wilson, D. K. (2006). Structure-Guided Engineering of Xylitol Dehydrogenase Cosubstrate Specificity. *Structure*, *14*(3), 567–575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.str.2005.11.016>
- Fuentealba, M. (2015). *Estudio de las características estructurales y energéticas de los sitios de unión a NAD y NADP mediante Potenciales Estadísticos*. Universidad de Chile.
- Gajiwala, K. S., & Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *10*(1), 110–116.
- Genheden, S., & Ryde, U. (2016). Expert Opinion on Drug Discovery The MM / PBSA and MM / GBSA methods to estimate ligand-binding affinities The MM / PBSA and MM / GBSA methods to estimate ligand-binding affinities, *441*(February). <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Ghukasyan, V. V., & Heikal, A. A. (2014). *Natural Biomarkers for Cellular Metabolism: Biology, Techniques, and Applications*.
- Hayes, J. M., & Archontis, G. (2011). MM-GB (PB) SA Calculations of Protein-Ligand Binding Free Energies.
- Henry, C. S., Broadbelt, L. J., & Hatzimanikatis, V. (2007). Thermodynamics-Based Metabolic Flux Analysis. *Biophysical Journal*, *92*(5), 1792–1805. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.093138>
- Holmberg, N., Ryde, U., & Bülow, L. (1999). Redesign of the coenzyme specificity in L-lactate dehydrogenase from bacillus stearothermophilus using site-directed mutagenesis and media engineering. *Protein Engineering*, *12*(10), 851–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556245>
- Hubbard, T. J. P., Ailey, B., Brenner, S. E., Murzin, A. G., & Chothia, C. (1999). SCOP:

- A structural classification of proteins database. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 254–256. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.254>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38.
- Hung, Y. P., Albeck, J. G., Tantama, M., & Yellen, G. (2011). Imaging Cytosolic NAD-NAD⁺ Redox State with a Genetically Encoded Fluorescent Biosensor. *Cell Metabolism*, 1071(14), 545–554. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-622-1-7>
- Jiang, F., Zhang, Y., & Dusting, G. J. (2011). NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 218–242.
- Kabir, M. M., & Shimizu, K. (2004). Metabolic regulation analysis of icd-gene knockout Escherichia coli based on 2D electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry and enzyme activity measurements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), 84–96. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1627-1>
- Kubista, M., Sjoback, R., Eriksson, S., & Albinsson, B. (1994). Experimental Correction for the Inner-filter Effect in Fluorescence Spectra, 119(March), 417–419.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy. Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, USA, 3rd edn, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Lakowicz, J. R., Szmajdzinski, H., Nowaczyk, K., & Johnson, M. L. (1992). Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1271–1275.
- Lesk, A. M. (1995). NAD-binding domains of dehydrogenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 5, 775–783.
- Marohnic, C. C., Bewley, M. C., & Barber, M. J. (2003). Engineering and Characterization of a NADPH-Utilizing Cytochrome *b₅* Reductase †. *Biochemistry*, 42(38), 11170–11182. <https://doi.org/10.1021/bi034819b>
- Maturana, P. (2014). *Evolución de los Determinantes de la Especificidad de Sustratos en la Familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa*. Universidad de Chile.
- Mccloskey, D., Gangoiti, J. A., King, Z. A., Naviaux, R. K., Barshop, B. A., Palsson, B. O., & Feist, A. M. (2014). A model-driven quantitative metabolomics analysis of aerobic and anaerobic metabolism in E. coli K-12 MG1655 that is biochemically and thermodynamically consistent. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(4), 803–815. <https://doi.org/10.1002/bit.25133>
- McLaughlin, K. J., Strain-Damerell, C. M., Xie, K., Brekasis, D., Soares, A. S., Paget, M. S. B., & Kielkopf, C. L. (2010a). Structural Basis for NADH/NAD⁺ Redox Sensing by a Rex Family Repressor. *Molecular Cell*, 38(4), 563–575. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.006>
- McLaughlin, K. J., Strain-Damerell, C. M., Xie, K., Brekasis, D., Soares, A. S., Paget, M. S. B., & Kielkopf, C. L. (2010b). Structural Basis for NADH/NAD⁺ Redox Sensing by a Rex Family Repressor. *Molecular Cell*, 38(4), 563–575. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.006>
- Meurant, G. (2012). *Cellular energy metabolism and its regulation*. Elsevier.
- Miller, S., Lunzer M., D. A. (2006). Direct Demonstration of an Adaptive Constraint. *Science*, 6(October), 458–462.
- Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., & Miyawaki, A. (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29),

- 10554–10559. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400417101>
- Nelson, D. L. (2006). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Olavarria, K., De Ingeniis, J., Zielinski, D. C., Fuentealba, M., Muñoz, R., McCloskey, D., ... Cabrera, R. (2014). Metabolic impact of an NADH-producing glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)*, *160*(2014), 2780–2793. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082180-0>
- Ouzounis, C. A., & Karp, P. D. (2000). Global Properties of the Metabolic Map of *Escherichia coli*. *Genome Research*, *10*, 568–576.
- Pakhomov, A. A., & Martynov, V. I. (2008). GFP family: structural insights into spectral tuning. *Chemistry & Biology*, *15*(8), 755–764.
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Arkhammar, P., Thastrup, O., & Piston, D. W. (2000). Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(10), 5203–5207. <https://doi.org/10.1073/pnas.090098797>
- PETSCHACHER, B., LEITGEB, S., KAVANAGH, K. L., WILSON, D. K., & NIDETZKY, B. (2005). The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochemical Journal*, *385*(1), 75–83. <https://doi.org/10.1042/BJ20040363>
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W. E. I., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., ... Poincare, H. (2005). Scalable Molecular Dynamics with NAMD. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Pleiss, J. (2011). Protein design in metabolic engineering and synthetic biology. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(5), 611–617.
- Pollak, N., Dölle, C., & Ziegler, M. (2007). The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal*, *402*(2), 205–218. <https://doi.org/10.1042/BJ20061638>
- Rane, M. J., & Calvo, K. C. (1997). Reversal of the Nucleotide Specificity of Ketol Acid Reductoisomerase by Site-Directed Mutagenesis Identifies the NADPH Binding Site1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *338*(1), 83–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9802>
- Ravcheev, D. A., Li, X., Latif, H., Zengler, K., Leyn, S. A., Korostelev, Y. D., ... Rodionov, D. A. (2012). Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor rex. *Journal of Bacteriology*, *194*(5), 1145–1157. <https://doi.org/10.1128/JB.06412-11>
- Release, S. (2015). 1: Maestro, version 10.1. *Schrödinger, LLC, New York, NY*.
- Rossmann, M. G., Moras, D., & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, *250*(463), 194–199. <https://doi.org/10.1038/250194a0>
- Salomon-ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C. (2012). An overview of the Amber biomolecular simulation package, *0*(February), 1–13. <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>
- Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A., & Fischer, E. (2004). The Soluble and Membrane-bound Transhydrogenases UdhA and PntAB Have Divergent Functions in NADPH Metabolism of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(8), 6613–6619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311657200>
- Schwartz, J. P., Passonneau, J. V., Johnson, G. S., & Pastan, I. (1974). The effect of

- growth conditions on NAD⁺ and NADH concentrations and the NAD⁺: NADH ratio in normal and transformed fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 249(13), 4138–4143.
- Scrutton, N. S., Berry, A., & Perham, R. N. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature*, 343, 38. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/343038a0>
- SEROV, A. E., POPOVA, A. S., FEDORCHUK, V. V., & TISHKOV, V. I. (2002). Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 367(3), 841 LP-847. Retrieved from <http://www.biochemj.org/content/367/3/841.abstract>
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1567.
- Sickmier, E. A., Brekasis, D., Parawithana, S., Bonanno, J. B., Paget, M. S. B., Burley, S. K., & Kielkopf, C. L. (2005). X-ray structure of a Rex-family repressor/NADH complex insights into the mechanism of redox sensing. *Structure*, 13(1), 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.10.012>
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry*, 1995. *H Freeman & Co., New York*.
- Sun, F., Dai, C., Xie, J., & Hu, X. (2012). Biochemical issues in estimation of cytosolic free NAD/NADH ratio. *PLoS ONE*, 7(5), 31–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034525>
- Tao, R., Zhao, Y., Chu, H., Wang, A., Zhu, J., Chen, X., ... Yang, Y. (2017). Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism. *Nature Methods*, 14(7), 720–728. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4306>
- Tejwani, V. (2016). Investigation of the NADH / NAD + state in *Ralstonia eutropha* H16 using the fluorescence reporter protein Peredox and Synthesis strategies of RNase A by splicing chemistry of DnaE Inteins.
- Thomas, P. D., & Dill, K. A. (1996). Statistical potentials extracted from protein structures: how accurate are they? *Journal of Molecular Biology*, 257(2), 457–469.
- VanEngelenburg, S. B., & Palmer, A. E. (2008). Fluorescent biosensors of protein function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.020>
- Wakita, M., Nishimura, G., & Tamura, M. (1995). Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridine nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes, and perfused rat liver in situ. *Journal of Biochemistry*, 118(6), 1151–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720129>
- Williamson, D. H., Lund, P., & Krebs, H. A. (1967). The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochemical Journal*, 103(2), 514.
- Wu, Y., Zhou, Y., Song, J., Hu, X., Ding, Y., & Zhang, Z. (2008). Using green and red fluorescent proteins to teach protein expression, purification, and crystallization. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 36(1), 43–54. <https://doi.org/10.1002/bmb.117>
- Yang, H., Yang, T., Baur, J. A., Perez, E., Matsui, T., Carmona, J. J., ... others. (2007). Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell*, 130(6), 1095–1107.
- Yaoi, T., Miyazaki, K., Oshima, T., Komukai, Y., & Go, M. (1996). Conversion of the

- Coenzyme Specificity of Isocitrate Dehydrogenase by Module Replacement. *The Journal of Biochemistry*, 119(5), 1014–1018.
- Yin Pun Hung, John G. Albeck, Mathew Tantama, G. Y. (2012). Imaging cytosolic NADH-NAD⁺ redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor Yin. *Cell Metab.*, 14(4), 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.012>. Imaging
- Ying, W. (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2), 179–206. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1672>
- Ying, W., Garnier, P., & Swanson, R. A. (2003). NAD⁺ repletion prevents PARP-1-induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(4), 809–813.
- Zapata-Hommer, O., & Griesbeck, O. (2003). Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP. *BMC Biotechnology*, 3, 5. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-5>
- Zhang, L., Ahvazi, B., Szittner, R., Vrieling, A., & Meighen, E. (1999). Change of Nucleotide Specificity and Enhancement of Catalytic Efficiency in Single Point Mutants of *Vibrio harveyi* Aldehyde Dehydrogenase[†]. *Biochemistry*, 38(35), 11440–11447. <https://doi.org/10.1021/bi991101g>
- Zhang, Q., Piston, D. W., & Goodman, R. H. (2002). Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science*, 295(5561), 1895–1897.
- Zhao, Y., Jin, J., Hu, Q., Zhou, H.-M., Yi, J., Yu, Z., ... Loscalzo, J. (2011). Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection. *Cell Metabolism*, 14(4), 555–566.
- Zhao, Y., Wang, A., Zou, Y., Su, N., Loscalzo, J., & Yang, Y. (2016). In vivo monitoring of cellular energy metabolism using SoNar, a highly responsive sensor for NAD⁺/NADH redox state. *Nature Protocols*, 11(8), 1345–1359. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.074>
- Zhou, Y., Wang, L., Yang, F., Lin, X., Zhang, S., & Zhao, Z. K. (2011). Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD⁺-auxotrophic mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6133–6140. <https://doi.org/10.1128/AEM.00630-11>

