

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



*EVOLUCIÓN DE LOS DETERMINANTES ESTRUCTURALES
DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS EN LA FAMILIA
6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA*

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

por:

Pablo Esteban Maturana Véliz

Director de Tesis: Dr. Ricardo Cabrera Paucar

**Santiago-Chile
Julio 2014**

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

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

Pablo Esteban Maturana Véliz

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 y Biotecnología y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día 7 de Julio del 2014

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mauricio Báez

Dra Lorena García

Dra. Ana Preller

A mis padres Patricia y Claudio
A mi tía Ruth

A Marcia Maturana con amor

AGRADECIMIENTOS

A Ricardo, por confiar en mí y darme la libertad de plantear un proyecto tan fascinante. Transmitirme su pasión por la evolución de proteínas, tan ajena a mi formación. Por soportarme, por su paciencia infinita y sus consejos para corregir mis indolencias. Pero por sobre todo, por fomentar día a día mi pasión de ser científico y por ser un gran mentor en dominios que van más allá del tubo de ensayo.

A Richard Garratt, por inculcar en mí el interés por la Biología Estructural un verano en Concepción. Por entregarme la oportunidad de desarrollar parte de este trabajo en su laboratorio. Pero por sobre todo por su sencillez y ejemplo de ser un gran científico y mejor persona.

A la comisión, primero por no truncar mi intención de desarrollar íntegramente cada objetivo en desmedro del tiempo que emplearía. Segundo, por sus sugerencias en la presentación y en el escrito.

A todos mis compañeros del laboratorio, por la alegría diaria y la enriquecedora rutina discutiendo desde deportes y política hasta el detalle de cada experimento. En particular a quienes contribuyeron directamente en este trabajo. A Daddy por haberme enseñado a trabajar con proteínas en el mesón. A Matías, por enseñarme a trabajar con ellas en el computador, por las discusiones enriquecedoras y fundamental aporte implícito en este trabajo.

A l@s cabr@s de la U, por esos 5 años de no estudio, de amistad y alegrías. Lo tomado y vivido no lo borrará nadie. A Nico, por su amistad, por hacer de nuestras noches de estudio las más llevaderas y felices sesiones de canto con Mike Patton.

A Javiera, la más linda de todas, a quién me alegra haber conocido en los comienzos de esta etapa, y que sufrió todas mis desazones y frustraciones. Fuiste en todo momento mi cable a tierra y más aún cuando la distancia nos separó. Gracias por tu cariño y amor. Me encantas!

Finalmente a mi familia, a quienes dedico este trabajo. Sin el apoyo fundamental de ustedes habría sido muy difícil todo. A mi tía Ruth, por tu cobijo siempre cálido y amor de madre. A mis hermanos Carolina, Fernanda, Claudio y Julio, por las alegrías juntos y por aguantar mis pesadeces de ser mayor. A mi vieja, por haber estado siempre, por educarnos prácticamente sola, por lo aguerrida que eres y lo mucho que te amo y admiro. A mi viejo, por haber fomentado en mí el espíritu científico y el espíritu humano, por tu sabiduría de padre, por ser el mentor de mi vida.

A ti Brujita, te extraño, por haberme acogido y amado en el peor momento de mi vida. Cuando las cosas se venían difíciles y los experimentos eran largos y agotadores, tú siempre me diste fuerza para acabar con todo esto.

Gracias a Dios.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada en el grupo de Bioenergética y Enzimología Molecular del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En el Laboratorio de Biología Estructural y Laboratorio de Biofísica Molecular, ambos del Instituto de Física de São Carlos, de la Universidad de São Paulo y en el Laboratorio Nacional de Biociencias del Centro Nacional de Investigación en Energía y Materiales de Brasil. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1121170 y por fondos del Instituto de Física de São Carlos. Además, para la realización del programa de estudios se contó con el financiamiento del PCHA/Beca Magister en Chile de CONICYT.

ÍNDICE

Tabla de contenido

DEDICATORIA.....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
1. SUPERFAMILIA DE ENZIMAS β -HIDROXIÁCIDO DESHIDROGENASAS	2
2. FAMILIA 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA	5
Estructura y función de la familia 6PGDH.....	8
6PGDHs con un sólo hemidominio C-terminal.....	11
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES.....	19
1. REACTIVOS.....	19
2. CEPAS BACTERIANAS	20
3. VECTORES	20
4. PARTIDORES MUTAGÉNICOS Y DE SUBCLONAMIENTO	21
MÉTODOS.....	22
1. MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.....	22
1.1. Medios de cultivo	22
1.2. Preparación de ADN plasmidial.....	22
1.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	22
1.4. Electrotransformación de células	23
1.5. Mutagénesis sitio dirigida	23

1.6. Subclonamiento de la 6 fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Gluconobacter suboxydans</i> y de <i>Escherichia coli</i>	25
1.7. Test de inducción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>G. suboxydans</i> y <i>E. coli</i>	26
2. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>Go6PGDH</i> y <i>Ec6PGDH</i> SILVESTRE Y MUTANTES	27
2.1. Purificación de proteasa TEV, <i>Gs6PGDH</i> y <i>Ec6PGDH</i> mutantes y silvestre	27
2.2. Determinación de la concentración de proteínas	28
2.3. Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).....	29
2.4. Proteólisis de cola de histidina	29
2.5 Síntesis de 3-hidroxisobutirato	30
2.6 Titulación de sustratos.....	32
2.7 Determinación de la actividad enzimática de <i>Go6PGDH</i> y <i>Ec6PGDH</i> silvestre y mutante	32
2.8 Determinación de las constantes cinéticas aparentes.	35
2.9 Efecto del 3HIBA en la actividad relativa de <i>Ec6PGDH</i> y <i>Go6PGDH</i>	36
2.10 Mediciones de dicróismo circular	36
2.11 Mediciones termodinámicas de la interacción proteína-ligando a través de microcalorimetría isoterma de titulación.....	36
2.12 Cristalización de <i>Go6PGDH</i>	37
3. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	38
3.1. <i>Busqueda de secuencias homólogas a la familia 6PGDH</i>	38
3.2. Alineamiento de secuencias	38
3.3. Superposición y árbol estructural	38
3.4. Construcción del árbol filogenético de la familia 6 fosfogluconato deshidrogenasa	39
3.5. Modelamiento por Homología de <i>Go6PGDH</i>	39
3.6. <i>Docking</i> molecular	40
3.7. Dinámica molecular	41
RESULTADOS	43
<i>EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE LA FAMILIA 6PGDH</i>	43
1. Análisis estructural de <i>Gm6PGDH</i>	43
2. Análisis filogenético y de motivos conservados en la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa	45
Capítulo II	53

<i>EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y GENERACIÓN DE MUTANTES DE Ec6PGDH Y Go6PGDH</i>	53
1. Subclonamiento de <i>Go6PGDH</i> , <i>Ec6PGDH</i> y mutagénesis sitio dirigida de <i>Ec6PGDH</i>	53
2. Purificación y eliminación del tag de histidina de <i>Go6PGDH</i> y <i>Ec6PGDH</i>	55
<i>EFFECTO DEL 6-FOSFOGLUCONATO EN LA ACTIVIDAD DE Ec6PGDH Y Go6PGDH</i>	59
1. Estudios cinéticos en condición de velocidad inicial	59
2. Dependencia de la actividad de <i>Ec6PGDH</i> y <i>Go6PGDH</i> versus la concentración de 6PG .	63
3. Estudios de unión de 6PG a <i>Ec6PGDH</i> y <i>Go6PGDH</i> por medio de Calorimetría de titulación isotérmica	65
4. Efecto del 3HIBA en la actividad relativa de <i>Ec6PGDH</i> y <i>Go6PGDH</i>	67
<i>IMPLICANCIA EN LA PREFERENCIA POR DINUCLEÓTIDOS DE LOS MOTIVOS NRX₃K y DVX₃A EN Ec6PGDH</i>	68
1. Caracterización cinética de mutantes del motivo NRX ₃ K de <i>Ec6PGDH</i>	68
2. Estudios de unión de NAD y NADP a <i>Ec6PGDH</i> , silvestre y mutantes, por medio de calorimetría de titulación isotérmica	72
<i>INTERACCIÓN DE 6PG Y DINUCLEÓTIDOS CON RESIDUOS DEL SITIO ACTIVO DE Go6PGDH</i>	76
1. Co-cristalización de <i>Go6PGDH</i> con 6PG y NAD.....	76
2. Modelamiento por homología de <i>Go6PGDH</i>	78
3. <i>Docking</i> molecular: interacción de <i>Go6PGDH</i> con 3HIBA, 6PG, NAD y NADP	80
4. Dinámica molecular: Interacción de <i>Go6PGDH</i> con NAD, NADP y 6PG.....	82
DISCUSIÓN.....	89
1. <i>EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE LA FAMILIA 6PGDH</i>	89
2. <i>EFFECTO DEL 6PG EN LA ACTICVIDAD DE ENZIMAS CON UNO Y DOS HEMIDOMINIOS</i>	92
3. <i>IMPLICANCIA DE LOS MOTIVOS NRX₃K y DVX₃A en Ec6PGDH EN LA PREFERENCIA POR DINUCLEÓTIDOS</i>	94
4. <i>ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE Go6PGDH</i>	98
CONCLUSIONES	101
REFERENCIAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las 3HIBADH como representantes de la superfamilia β HADH.....	3
Figura 2. Reacción de oxidación de 6PG.....	5
Figura 3. Vías centrales del metabolismo de <i>E. coli</i> y representación estructural de NAD y NADP.....	6
Figura 4. Estructura y diagrama de topología de <i>Ec6PGDH</i>	9
Figura 5. Estructura de <i>Gm6PGDH</i>	12
Figura 6. Origen de la 6PGDH dimérica.....	14
Figura 7. Esquema resumen de la evolución de la familia 6PGDH	16
Figura 8. Diseño de partidores según Kit Genetailor.....	24
Figura 9. Ensayo de actividad de la proteasa TEV.....	30
Figura 10. Espectro H-RMN del producto de la síntesis 3HIBA.....	31
Figura 11. Protocolo Software Gen5.....	33
Figura 12. Empacamiento de hemidominios de <i>Ec6PGDH</i> y <i>Go6PGDH</i>	44
Figura 13. Superposición estructural de dominios de <i>Hs3HIBADH</i> , <i>Gm6PGDH</i> , <i>Ec6PGDH</i>	46
Figura 14. Árbol estructural de la superfamilia β HADH y estados oligoméricos.....	49
Figura 15. Árbol filogenético de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa.....	52
Figura 16. Subclonamiento de <i>Go6PGDH</i>	54
Figura 17. Cromatograma de secuenciación para las mutantes de <i>Ec6PGDH</i> , N33D, N33D-K38A, N33D-R34V-K38A.....	54
Figura 18. Purificación de <i>Go6PGDH</i> y <i>Ec6PGDH</i> silvestre y mutantes.....	56
Figura 19. Espectros de dicroísmo circular de las proteínas <i>Go6PGDH</i> y <i>Ec6PGDH</i> silvestre y mutantes.....	58
Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de <i>Go6PGDH</i> , <i>Ec6PGDH</i> y la mutante N33D-R34V-K38A de <i>Ec6PGDH</i>	58
Figura 21. Dependencia de las constantes cinéticas de <i>Ec6PGDH</i> para NADP con la	

concentración de 6PG.....	61
Figura 22. Dependencia de las constantes cinéticas de <i>Ec</i> 6PGDH para NAD con la concentración de 6PG.....	61
Figura 23. Dependencia de las constantes cinéticas de <i>Go</i> 6PGDH para NADP con la concentración de 6PG.....	62
Figura 24. Dependencia de las constantes cinéticas de <i>Go</i> 6PGDH para NAD con la concentración de 6PG.....	62
Figura 25. Comportamiento cinético de <i>Ec</i> 6PGDH para 6PG.....	64
Figura 26. Comportamiento cinético de <i>Go</i> 6PGDH para 6PG.....	64
Figura 27. Calorimetría de titulación isotérmica de <i>Ec</i> 6PGDH y <i>Go</i> 6PGDH con 6PG.....	66
Figura 28. Efecto de 3HIBA en la actividad relativa de <i>Ec</i> 6PGDH y <i>Go</i> 6PGDH.....	67
Figura 29. Comportamiento cinético de las mutantes de <i>Ec</i> 6PGDH, N33D, N33D-K38A y N33D-R34VK38A.....	70
Figura 30. Titulación de <i>Ec</i> 6PGDH con NADP y NAD.....	73
Figura 31. Titulación de la mutante N33D de <i>Ec</i> 6PGDH.....	74
Figura 32. Titulación de la mutante N33D-K38A de <i>Ec</i> 6PGDH con NADP.....	75
Figura 33. Fotografía de los cristales de <i>Go</i> 6PGDH en estado apo y complejado con NAD y 6PG.....	77
Figura 34. Modelo por homología de la 6PGDH de <i>Gluconobacter oxydans</i>	77
Figura 35. Evaluación del modelo de <i>Go</i> 6PGDH.....	79
Figura 36. Interacción de 6PG con residuos de <i>Go</i> 6PGDH.....	81
Figura37. Interacción de NAD y NADP con residuos de <i>Go</i> 6PGDH.....	81
Figura 38. Representación RMSD de la cadena principal de <i>Go</i> 6PGDH versus tiempo de simulación.....	84
Figura 39. Puentes de hidrógeno por residuo que interactúan con 6PG en el sistema <i>Go</i> 6PGDH NAD/6PG.....	86
Figura 40. Puentes de hidrógeno por residuo que interactúan con NAD en el sistema <i>Go</i> 6PGDH NAD/6PG.....	87

Figura 41. Puentes de hidrógeno por residuo que interactúan con NADP en el sistema <i>Go6PGDH</i> NADP/6PG.....	88
Figura 42. Bolsillo de unión a NAD y 6PG en <i>Go6PGDH</i>	97
Figura 43. Motivos de residuos que contribuyen al sitio activo en la familia 6PGDH.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de <i>Ec6PGDH</i> y de 6PGDHs que se han documentado KM Para NAD.....	12
Tabla 2. Reactivos utilizados.....	19
Tabla 3. Estructuras encontradas en el PDB de la superfamilia β HADH.....	48
Tabla 4. Parámetros cinéticos de <i>Ec6PGDH</i> y <i>Go6PGDH</i>	60
Tabla 5. Parámetros termodinámicos de la unión de 6PG a <i>Ec6PGDH</i>	66
Tabla 6. Constantes catalíticas a 2 mM de 6PG, para NAD y NADP de <i>Go6PGDH</i> , <i>Ec6PGDH</i> silvestre y mutantes.....	71
Tabla 7. Parámetros de unión de sustratos a <i>Ec6PGDH</i> y N33D- <i>Ec6PGDH</i>	73
Tabla 8. Energías de interacción de docking molecular.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔH	Cambio de entalpía
3HIBA	3-hidroxisobutirato
6PG	6-fosfogluconato
6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
<i>Ec</i>6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Escherichia coli</i>
<i>Gm</i>6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Geobacter metallireducens</i>
<i>Go</i>6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Hs</i>3HIBA	3-hidroxisobutirato de <i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
k_{cat}	Constante catalítica
K_d	Constante de disociación
K_M	Constante de Michaelis Menten
<i>Lm</i>G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADP	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RMSD	Root Mean Square Desviation
SCOP	Clasificación estructural de proteínas
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
βHA	Beta hidroxiaácido
βHADH	Beta hidroxiaácido deshidrogenas

RESUMEN

La superfamilia β -hidroxiácido deshidrogenasas (β HADH) son enzimas oligoméricas que catalizan la oxidación dependiente de NAD o NADP de diversos β -hidroxiácidos (β HA). Cada subunidad está compuesta por un dominio N-terminal de plegamiento tipo Rossmann, que posee en el loop β 2- α 2 los motivos, NRX₃K o D[V/L]X₃[V/A] que constituyen el bolsillo de unión de la región ribosa-adenina del dinucleótido y un dominio C-terminal o helicoidal que es importante para la unión al β HA. Este dominio puede estar conformado de sólo 6 alfa hélices, como ocurre en el caso de las 3-hidroxisobutirato deshidrogenasa (3HIBADH) o por dos repeticiones del mismo patrón de seis alfa hélices, como en las 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en que a cada unidad de seis alfa hélices se le ha denominado hemidominio.

La gran mayoría de los miembros de la familia 6PGDH que han sido estudiados, son de carácter dímérico, poseen el motivo NRX₃K, y muestran una estricta preferencia por NADP, como ocurre en el caso de la 6PGDH de *Escherichia coli*. Además, en el hemidominio duplicado, la última alfa hélice se desempaca de su subunidad e interactúa en el sitio activo de la subunidad adyacente, formando el bolsillo de unión a 6PG. Esta característica es particular de los representantes de la familia 6PGDH.

Recientemente, apareció en el PDB la estructura de una 6PGDH putativa de *Geobacter metallireducens* (*Gm6PGDH*), sin caracterización asociada. A diferencia de las otras 6PGDHs, esta proteína posee sólo un hemidominio en el dominio C-terminal y tiene asociación tetramérica como las 3HIBADH, además posee el motivo de secuencia DLX₃A en el loop β 2- α 2. La ausencia de densidad electrónica en regiones de loops y especialmente en el extremo C-terminal de la estructura impidió corroborar si en esta enzima había contribución intersubunitaria de residuos en el sitio activo. La aparición de esta información, modifica el estado del arte sobre la evolución de la familia 6PGDH.

Este trabajo de tesis se enfocó en analizar la evolución de los determinantes de la especificidad por sustratos, en dos representantes de la familia 6PGDH: las enzimas de *E. coli* y la 6PGDH de *Gluconobacter oxydans* (*Go6PGDH*, de un hemidominio helicoidal).

Se realizó un árbol estructural de las enzimas clasificadas según SCOP a.100.1.1, en donde se ve que *Gm6PGDH*, se encuentra más relacionada con el resto de las 6PGDHs. Esto implica que las 6PGDHs de hemidominio único habrían sido originadas desde otras β HADHs por adquisición de residuos que le confieren especificidad por 6PG. Luego de esto se realizó un árbol filogenético, enraizado con 3HIBADHs. La duplicación del hemidominio en las 6PGDHs es un evento más ancestral que la diversificación de enzimas con motivos variados en el loop β 2- α 2. Esto sugiere que todos los representantes de la familia 6PGDH tendrían elementos de estructura secundaria del dominio helicoidal contribuyendo en el sitio activo de subunidades adyacentes.

Se subclonaron las enzimas *Go6PGDH* y *Ec6PGDH* y se caracterizó la preferencia por dinucleótidos, y por los β HAs, 6PG y 3 hidroxisobutirato (3HIBA). Ninguna enzima presentó actividad por 3HIBA, sin embargo estudios de inhibición por ese ligando, mostró que a concentraciones elevadas se logra inhibir hasta un 5 y 30 % de la actividad relativa de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*, respectivamente. Se caracterizó el comportamiento de los parámetros cinéticos para NAD y NADP en ambas enzimas, variando la concentración de 6PG. Interesantemente en todos los casos se obtuvo constantes catalíticas similares al tener el sitio activo saturado de 6PG, independiente si la enzima posee uno o dos hemidominios C-terminales. Se comparó la preferencia por dinucleótidos en ambas enzimas. *Ec6PGDH* resultó ser estrictamente preferente por NADP (1715 veces), consistente con la presencia del motivo NRX₃K. Para *Go6PGDH*, que posee el motivo DRX₃V, la enzima mostró preferente por NAD (16 veces).

Con el propósito de evaluar la implicancia del motivo NRX₃K en la preferencia por dinucleótidos de *Ec6PGDH*, se mutó por el motivo DVX₃A. La mutante triple presentó un aumento de la K_M para NADP de 400 veces y una disminución de la k_{cat} de 300 veces. Para NAD en cambio, la k_{cat} , con respecto a la enzima silvestre, aumentó 4 veces, sin embargo la K_M , no presentó variaciones.

Finalmente, se generó un modelo por homología de *Go6PGDH* que fue simulado mediante dinámicas moleculares en presencia de sus sustratos. Esto permitió evaluar los residuos implicados en la unión a los dinucleótidos además de determinar la contribución de la alfa hélice 6 del hemidominio C-terminal en la composición de los sitios activos de

las subunidades adyacentes. El residuo D30 forma puentes de hidrógeno estables con el 2'-OH de la región ribosa-adenina del NAD. En la región difosfato del NAD el loop $\beta 1-\alpha 1$, contribuye con residuos cuya cadena principal estabilizarían la unión al dinucleótido. En el caso del NADP, R31 ubicado en el motivo del loop $\beta 2-\alpha 2$ y R10 del loop $\beta 1-\alpha 1$, estabilizan al dinucleótido. Además, durante las dinámicas se forman interacciones estables entre los residuos R322 y H328 de la alfa hélice 6 con el 6PG y en algunos casos con NAD y NADP, ubicados en el sitio activo complementario, tal cual ocurre en *Ec6PGDH*, sustentando nuestra hipótesis que los determinantes de unión por 6PG en la familia 6PGDH se habrían generado previo a la duplicación del hemidominio C-terminal.

ABSTRACT

The β -hydroxyacid dehydrogenase superfamily (β HADH) is constituted by oligomeric enzymes which catalyze NAD or NADP dependent oxidation of diverse β -hydroxyacids (β HA). Each subunit is composed by an N-terminal domain of Rossmann-like fold that possesses NRX₃K or D[V/L]X₃[V/A] motifs in the β 2- α 2 loop, these motifs constitute the binding pocket of the ribose-adenin region of the dinucleotide and a C-terminal or helical domain which is important for the binding of β HA. The C-terminal domain can be conformed by just 6 α -helixes, as it occurs in the case of the 3-hydroxybutirate dehydrogenase (3HIBADH), or by two repetitions of the same 6 alpha helixes pattern, as in the 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH), where each unit of 6 alpha helixes is called a hemidomain.

Most members of the 6PGDH family which have been studied are of dimeric character, possess the NRX₃K and demonstrate a strict preference for NADP, as it occurs in the case of the 6PGDH from *Escherichia coli*. In addition, in the second hemidomain, the last alpha helix interacts in the active site of the adjacent subunit, forming the 6PG binding pocket. This characteristic is particular of the representatives from the 6PGDH family.

Recently, a putative structure of the 6PGDH from *Geobacter metallireducens* (*Gm6PGDH*) without associated characterization appeared in the PDB database. In contrast with other 6PGDH, this protein has only one hemidomain in its C-terminal domain and a tetrameric association, like the 3HIBADH, also it possesses the DLX₃A motif in the β 2- α 2 loop. The absence of electronic density in the loop regions and especially in the C-terminal end of the structure prevented to corroborate if in this enzyme there was intersubunitary contribution of residues in the active site. This information modifies the state of the art regarding the evolution of the 6PGDH family

This thesis focused on analyzing the evolution of the determinants of substrate specificity in two representatives of the 6PGDH family: The enzymes from *E.coli* and the 6PGDH from *Gluconobacter oxydans* (*Go6PGDH*, of one helical domain). An structural tree was built from the classified enzymes in accordance to SCOP a.100.1.1, in which it

can be seen than *Gm6PGDH* is more closely related with the rest of the 6PGDHs and is grouped with other β HADHs. This implies that single domain 6PGDHs would have been originated from other β HADHs by the acquisition of residues that confer 6PG specificity. After this, a phylogenetic tree was built, rooted with 3HIBADHs. The duplication of the hemidomain present in the 6PGDHs is a more ancestral event than the enzyme diversification with different motifs in the β 2- α 2 loop. This suggests that all the representatives from the 6PGDH family would have secondary structure elements of the helical domain that participate in the site of adjacent subunits.

The enzymes *Go6PGDH* y *Ec6PGDH* were subcloned. Their preferences for dinucleotides and for β HA, 6PG, and 3HIBA was characterized. None of the enzymes presented activity with 3HIBA, however, inhibition studies for this ligand showed that at high concentrations it achieved an inhibition up to 5 and 30% of the relative activity of *Go6PGDH* and *Ec6PGDH* respectively. The behavior of the kinetic parameters of NAD and NADP while varying 6PG concentration was characterized for both enzymes. Interestingly, similar catalytic constants were obtained when the active site was saturated with 6PG, independent of whether the enzyme possesses one or two C-terminal hemidomains. The preference for dinucleotides in both enzymes was compared. *Ec6PGDH* resulted strictly preferred for NADP (1715 fold), which is consistent with the presence of the NRX₃K motif. For *Go6PGDH*, which possesses a DRX₃V motif, the enzyme showed a preference for NAD (16 fold)

With the purpose of evaluating the implication of the NRX₃K motif in the preference for dinucleotides of *Ec6PGDH*, it was replaced with DVX₃A. The triple mutant presented an increase K_M for NADP of 400 folds and a decrease of k_{cat} of 300 folds. For NAD, the k_{cat} in respect with the wild type enzyme increased 4 folds, however the K_M remained unchanged.

Finally, a model by homology of *Go6PGDH* was generated through simulation of molecular dynamics in the presence of its substrates. This permitted to evaluate the residues implicated in the binding to the dinucleotides and also to determine the contribution of the C-terminal hemidomain's 6 alpha helix in the composition of the active sites of the adjacent subunits. The D30 residue forms stable hydrogen bonds with the 2'-

OH of the ribose-adenin region from NAD. In the diphosphate region of NAD, the $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop contributes with residues whose principal chain stabilizes the binding to the dinucleotide. In case of the NADP, R31, located in the motif of the $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop, and R10, from the $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop, stabilize the dinucleotide. Also, during the simulations, there are interactions formed between the residues R322 and H328 from the 6 alpha helix with the 6PG, and in some cases with NAD and NADP, located in the complementary active site, the same way it occurs in *Ec6PGDH*, which sustains our hypothesis that the determinants of 6PG binding in the 6PGDH family were generated before the appearance of the duplicated C-terminal domain.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas están conformadas de dominios que en sí son arreglos tridimensionales de elementos de estructura secundaria capaces de plegarse autónomamente y que constituyen la unidad evolutiva estructural que define a una familia de proteínas y así jerárquicamente a una superfamilia y fold determinado [1,2]. En el caso de las enzimas, la evolución de los dominios conlleva, en el caso más interesante, a la aparición de familias de homólogos con nuevas funciones enzimáticas, determinando cambios en la red metabólica y en su regulación.

Las enzimas pueden ser clasificadas conformando familias y superfamilias de homólogos. Las enzimas de una familia comparten el criterio de poseer un mismo *fold*, teniendo un origen evolutivo común, en general presentan una misma función y han sido originadas por eventos de especiación [3]. Una superfamilia de proteínas corresponde a un conjunto de familias que, teniendo baja identidad entre sus secuencias, comparten entre sí un *fold* común y funciones biológicas similares entre ellas [3]. La evolución de los dominios de una proteína incluye eventos de pérdida, duplicación y combinación con otros dominios para formar nuevas enzimas [4], la combinación de dominios permite formar proteínas multidominio. Estos eventos tienen efectos sobre la estructura terciaria y conformación oligomérica de las enzimas, influyendo en la función que éstas cumplen, además, definen la historia evolutiva y funcional de las superfamilias de enzimas y han sido ubicuos en la evolución del metabolismo [5]. En el caso de enzimas oligoméricas cuyos sitios activos están compuestos por más de una subunidad, la duplicación de dominios puede permitir un cambio en el número de subunidades necesarias para constituir una enzima funcional. Por su parte, los cambios de especificidad por sustratos, que ocurren generalmente debido a cambios en los patrones de secuencia específicos para su reconocimiento, pueden afectar la función que cumple la vía metabólica donde está implicada la enzima.

En el caso de las deshidrogenasas del metabolismo central, la producción de equivalentes de reducción, alimenta el anabolismo o la producción de energía dependiendo

de la especificidad de estas enzimas por NADP o NAD. Por ejemplo, en la vía de las pentosas fosfato, la rama oxidativa produce NADPH e intermediarios de biosíntesis. En este trabajo de tesis se estudiará la evolución de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) desde el punto de vista de su plegamiento y los determinantes estructurales implicados en el reconocimiento de sustratos y actividad enzimática, usando como modelos las enzimas de *Escherichia coli* y *Gluconobacter oxydans*.

1. SUPERFAMILIA DE ENZIMAS β -HIDROXIÁCIDO DESHIDROGENASAS

La 6PGDH es miembro de la superfamilia β -hidroxiácido deshidrogenasas (β HADH), enzimas que catalizan la oxidación, dependiente de NAD o NADP, de hidroxilos ubicados en el carbono 3 de diversos β -hidroxiácidos (β HA), cuya estructura general se muestra en la figura 1A [6]. Las enzimas de esta superfamilia están compuestas por dos dominios: El dominio N-terminal, de aproximadamente 170 aminoácidos, el cuál presenta un plegamiento tipo Rossmann (conformado por una sábana beta central, de 6 hebras paralelas, empaçada por 7 alfa hélices [7]). Este dominio está implicado en el sitio de unión al dinucleótido. Por su parte, el dominio C-terminal o helicoidal, implicado en la unión al β HA, puede estar conformado de sólo seis alfa hélices (figura 1C) o bien por dos repeticiones del mismo patrón de seis alfa hélices (figura 4). En todos los miembros con estructura conocida, siempre se observan empaçados con un eje de simetría doble y por esta razón, en este trabajo hemos denominado hemidominio a este bloque de seis alfa hélices.

Entre los miembros de la superfamilia que han sido caracterizados cinéticamente podemos encontrar las siguientes actividades β HADH: 3-hidroxisobutirato deshidrogenasa [8], 6-fosfogluconato deshidrogenasa [9], D-fenilserina deshidrogenasa, tartronato semialdehído reductasa [10], L-serina deshidrogenasa [11] y 3-hidroxiopropionato deshidrogenasa [12]. Esta superfamilia fue descrita y acuñado su nombre por primera vez en el año 1996 por Hawes y cols [13], donde los autores establecieron similitudes entre las enzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Escherichia coli*, *Ovis aries* y

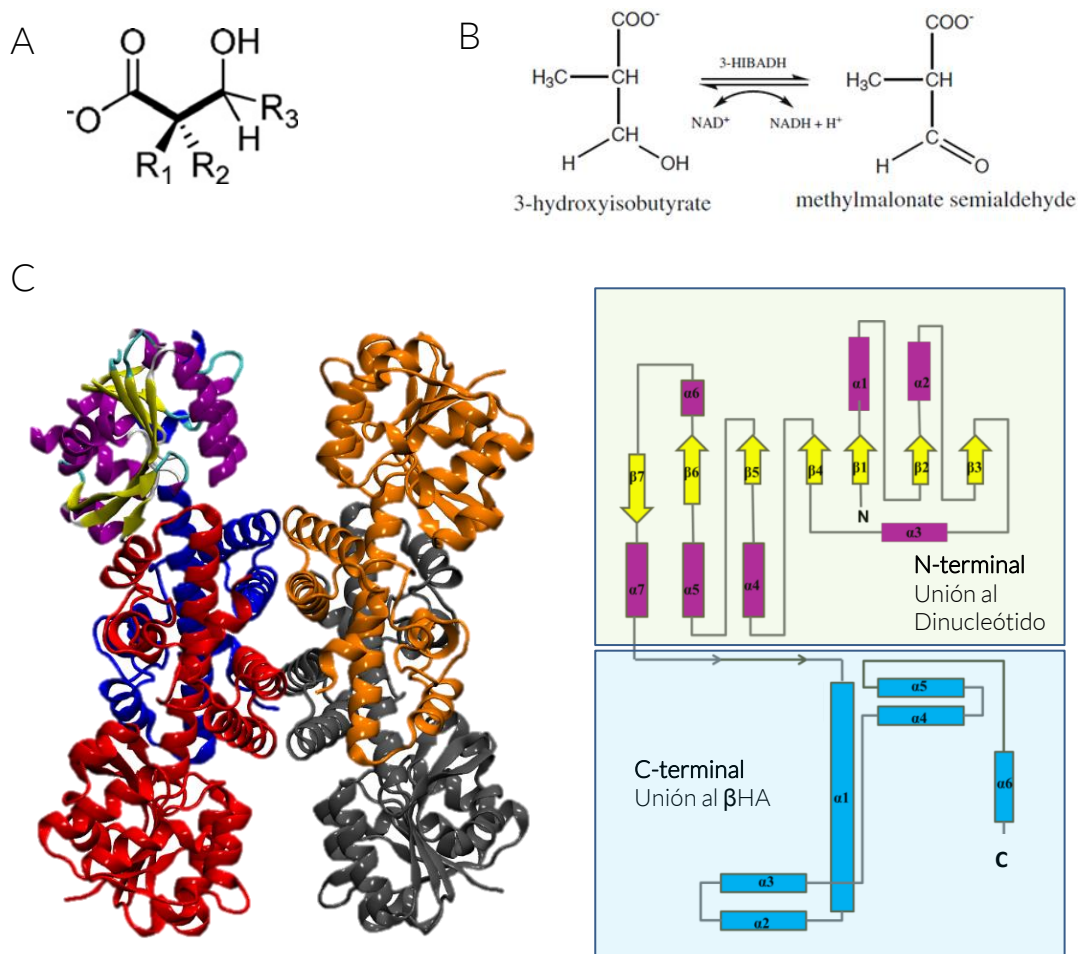


Figura 1. Las 3HIBADH como representantes de la superfamilia. (A) Estructura general de los β -hidroxiácidos (β HA). (B) Reacción de las 3-hidroxisobutirato deshidrogenasas. (C) Izquierda; Se representa la estructura de la 3HIBADH de humano (PDBid: 2I9P). En rojo, gris, naranja y azul se representa cada subunidad, en amarillo y púrpura se representa el plegamiento tipo Rossmann del dominio N-terminal de la cadena azul. Derecha; diagrama de topología de las β HADH. La Región N-terminal se colorea según sus elementos de estructura secundaria, la región C-terminal está coloreada de azul.

Saccaromyces cerevisiae y las 3-hidroxisobutirato deshidrogenasa (3HIBADH) de *Pseudomonas aeruginosa* y *Rattus norvegicus*. Se observó más de 30% de residuos conservados en un alineamiento que para las 6PGDHs incluía sólo los primeros aproximadamente 320 aminoácidos, es decir lo correspondiente a su dominio N-terminal y al primer hemidominio.

De acuerdo a Howes y cols [13], las 3-hidroxisobutirato deshidrogenasas (E.C. 1.1.1.31), son los homólogos más emparentados con las 6PGDHs. Sin embargo, los autores no muestran filogenias a nivel de superfamilias ni otros antecedentes similares han sido reportados en literatura. Estas enzimas tetraméricas, oligomerizan mediante el empaquetamiento de sus hemidominios, conformando un dímero de dímeros (figura 1 C). Realizan la oxidación, dependiente de NAD o NADP, de 3-hidroxisobutirato (3HIBA) hacia metilmalonato semialdehído (figura 1B), reacción que es parte del catabolismo de valina [12]. En estas enzimas, el hemidominio C-terminal es primordial para la unión del 3HIBA [14]. Hasta la fecha se han resuelto por cristalografía de proteínas 4 estructuras de 3HIBADH, correspondientes a las enzimas de *Homo sapiens*, *Thermus thermophilus*, *Geobacter sulfurreducens* y *Salmonella thyphimurium* (PDBid: 2I9P; 1WP4; 3PDU; 3G0O), respectivamente. De ellas, las primeras tres han sido determinadas en presencia de su cofactor y ninguna ha sido cristalizada con 3HIBA. Interesantemente, sólo la estructura de la 3HIBADH de humano (*Hs3HIBADH*) muestra una molécula de NAD en el sitio de unión del dinucleótido (no publicado). En la vecindad del 2'-OH de la ribosa adyacente a la adenina en el NAD, esta enzima posee los residuos D69, V70 y A74, en el loop α 2- β 2. En cambio, las 3HIBADH de *G. sulfurreducens* y *T. thermophilus* que presentan un NADP cristalográfico poseen los residuos N, R y K en la región correspondiente, en torno al 2'-fosfato del NADP. Se ha evaluado la función que cumple el residuo D69 en la 3HIBADH humana mutándolo por arginina, resultando principalmente en una pérdida de actividad por NAD [13]. Sin embargo hasta la fecha no hay estudios en los que se haya evaluado por mutagénesis el poder discriminatorio de los motivos NRX₃K y D[V/L]X₃A, en la especificidad por cofactor. Esta información es relevante en cuanto al poder de discriminación por NAD o NADP que puede conferir la presencia de estos residuos en el bolsillo de reconocimiento a la región ribosa-adenina del dinucleótido. Con respecto al sitio de unión al β -hidroxiácido, se sabe que una lisina está implicada en oxidación del

hidroxilo en la posición 3 del β HA y reducción del cofactor, pero no se tiene claridad acerca del rol de otros aminoácidos que participarían de interacciones directas con 3HIBA. Alineamientos de secuencia y de estructura muestran que el bolsillo de unión al 3HIBA o β HA es homólogo en todos los representantes de las β HADHs, sugiriendo que las β HADHs presentan un mecanismo catalítico común [13].

2. FAMILIA 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA

Las 6-fosfogluconato deshidrogenasas (E.C. 1.1.1.44) son enzimas que realizan la descarboxilación oxidativa, dependiente de NADP o NAD, de 6-fosfogluconato (6PG) oxidando el 3-OH o β -OH (figura 2), hacia la formación de ribulosa-5-P y NADPH [9].

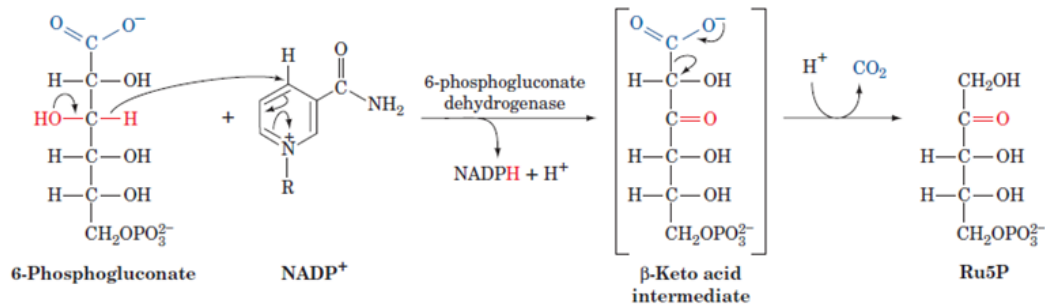


Figura 2. Reacción de oxidación de 6PG. Reacción enzimática de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *E.coli*. Tomada de Voet y Voet [15].

Contexto metabólico de las 6PGDHs: Rama oxidativa de la vía de las pentosa-fosfato

La vía de las pentosas fosfato constituye una de las 3 posibles rutas metabólicas que llevan a la oxidación de glucosa a piruvato, las otras corresponden a la ruta Embden-Meyerhof, y la ruta Entner-Doudoroff (Figura 3A, [16]). La vía de las pentosas-fosfato está conformada de dos partes: la rama oxidativa (oxidative pentose-phosphate pathway, oxPPP) y la rama no oxidativa. La primera es la responsable de oxidar irreversiblemente glucosa-6-fosfato produciendo ribulosa-5-P y dos moléculas de NADPH (en algunos organismos también genera NADH) [17]. La rama no oxidativa por su parte, utiliza ribulosa-5-P, generado en la oxPPP, que puede ser isomerizada a ribosa-5-P o bien, epimerizado a xilulosa-5-P. Ribosa 5-P es un metabolito primordial para la síntesis de nucleótidos e histidina. Por otro lado xilulosa 5-P junto a ribosa-5-P, forman dos

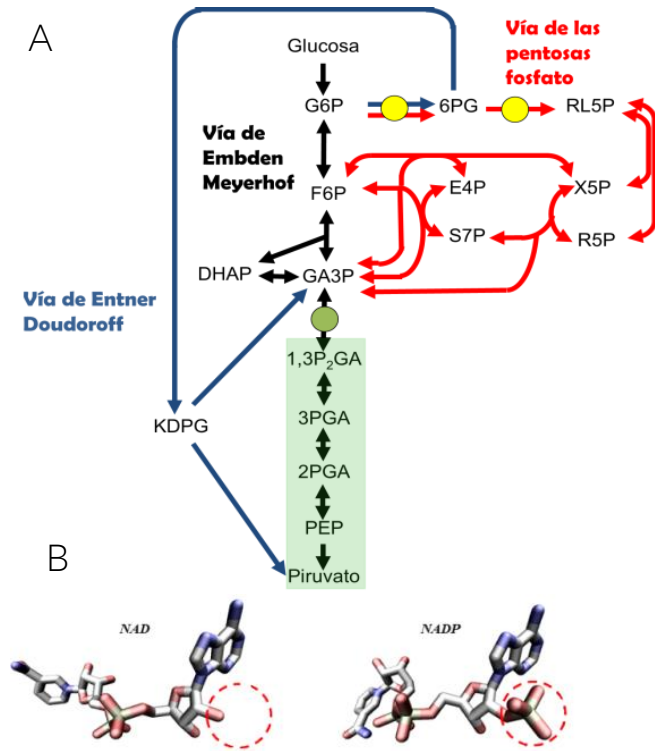


Figura 3. Vías centrales del metabolismo de *E. coli* y representación estructural de NAD y NADP. (A) En azul se representa la vía Entner-Doudoroff, en rojo la vía de pentosas-fosfato y en negro la vía Embden-Meyerhof, dentro de ésta se enmarca en sombra verde la segunda mitad de la glucólisis (B) Diferencias estructurales entre NAD y NADP, izquierda y derecha respectivamente.

de 7 y 3 carbonos, que son precursores de eritrosa-4-P, el que es usado para la síntesis de aminoácidos aromáticos [17]. A diferencia de la oxPPP, se sabe que el flujo de carbono a través de la rama no oxidativa es reversible [15].

En la oxPPP, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), que corresponden, respectivamente, a la primera y tercera enzima de la vía, juegan un rol primordial en la formación de poder reductor en la célula [17]. Las deshidrogenasas en general usan como agente reductor NAD o NADP. Estas moléculas poseen potenciales redox estándar equivalentes, sin embargo, la diferencia estructural entre NAD y NADP (Figura 3B), un grupo fosfato esterificado en el extremo 2'-OH de la ribosa adyacente a la adenina [18], condiciona el reconocimiento específico por parte de las enzimas que los utilizan. En este sentido, las deshidrogenasas de oxPPP en la mayoría de los organismos han sido reportadas como NADP específicas o capaces de unir ambos dinucleótidos con similar eficiencia [19]. En el caso de las deshidrogenasas de oxPPP de *E. coli* se les responsabiliza por la generación de más de un tercio del NADPH necesario para la biosíntesis, cuando se usa glucosa como fuente de carbono [20,21]. Sin embargo, únicamente para *EcG6PDH* se ha logrado cuantificar que la constante de especificidad por NADP es alrededor de 500 veces más específica que la de NAD [22]. Para *Ec6PGDH* en cambio, la información acerca del uso y discriminación por NAD o NADP es sólo cualitativa.

De acuerdo con Cornish-Bowden [23], la preferencia de una enzima por dos sustratos alternativos (mutuamente excluyentes, que reconocen el mismo sitio de unión), está dada por el cociente de sus constantes de especificidad (k_{cat}/K_M) para cualquier par de concentraciones equimolares de estos sustratos. Por lo tanto, la preferencia de NADP sobre NAD puede cuantificarse indicando cuantas veces mayor es la constante de especificidad del primero sobre el segundo. Con respecto a los valores observados para los cocientes se pueden definir tres niveles de preferencia de un sustrato por otro: si el cociente resulta ser mayor o igual a 100 se habla de enzimas estrictamente preferentes, si está entre 100 y 10 se habla de preferencia, y si están entre 10 y 1 se habla de enzimas duales [24]. No se ha realizado un estudio comparativo en 3HIBADHs y 6PGDHs en cuanto a su preferencia por

NADP y NAD, que permita establecer si existen los patrones de secuencia asociados a la especificidad por dinucleótidos.

La oxidación de G6P es una reacción que es común tanto a la oxPPP como a la vía de Entner-Doudoroff. Dado que la rama no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato son un conjunto de reacciones cuya aparición fue evolutivamente independiente del metabolismo de las pentosa fosfato [25,26], es probable que el surgimiento de la función 6PGDH haya permitido el establecimiento de la rama oxidativa como una nueva vía metabólica (figura 3). La comprensión de la historia evolutiva de las 6PGDHs en relación con la aparición y evolución de la especificidad por 6PG y por dinucleótidos, necesariamente implica el análisis comparativo de los homólogos (ortólogos y parálogos) de la superfamilia a la que las 6PGDHs pertenecen, como se describirá más adelante [26,27].

Estructura y función de la familia 6PGDH

Dentro de la superfamilia β HADH, las 6PGDHs han sido las más ampliamente estudiadas en cuanto a sus aspectos estructurales, mecanismo catalítico y rol en el metabolismo celular. En la actualidad (julio, 2014) se pueden encontrar en la base de datos del PDB las estructuras de 6PGDH con hemidominios duplicados de 8 especies, incluyendo *Klebsiella pneumoniae* [9], *Saccharomyces cerevisiae* [28], *Ovis aries* [29], *Lactococcus lactis* [30], *Geobacillus stearothermophilus* [31], *Trypanosoma brucei* [32] y *Escherichia coli* [9] y *Homo sapiens* [33].

Las 6PGDHs de hemidominios duplicados son enzimas diméricas, cuyos monómeros de aproximadamente 470 aminoácidos poseen un peso molecular cercano a 52 kDa, presentando un dominio N-terminal y 2 hemidominios de 6 hélices en el dominio C-terminal, que incluye α -6, tal como se muestra en el diagrama de topología de la figura 4. Para la 6PGDH de *Geobacillus stearothermophilus*, *Gs6PGDH*, se ha logrado determinar las K_M de NADP y NAD, las que corresponden a 17 y 3500 μ M, respectivamente [31]. Esta preferencia por NADP es consistente con la presencia de los aminoácidos N, R y K en loop α 2- β 2, de unión a la región ribosa-adenina del dinucleótido, al igual que lo observado en las 3HIBADH mencionado anteriormente.

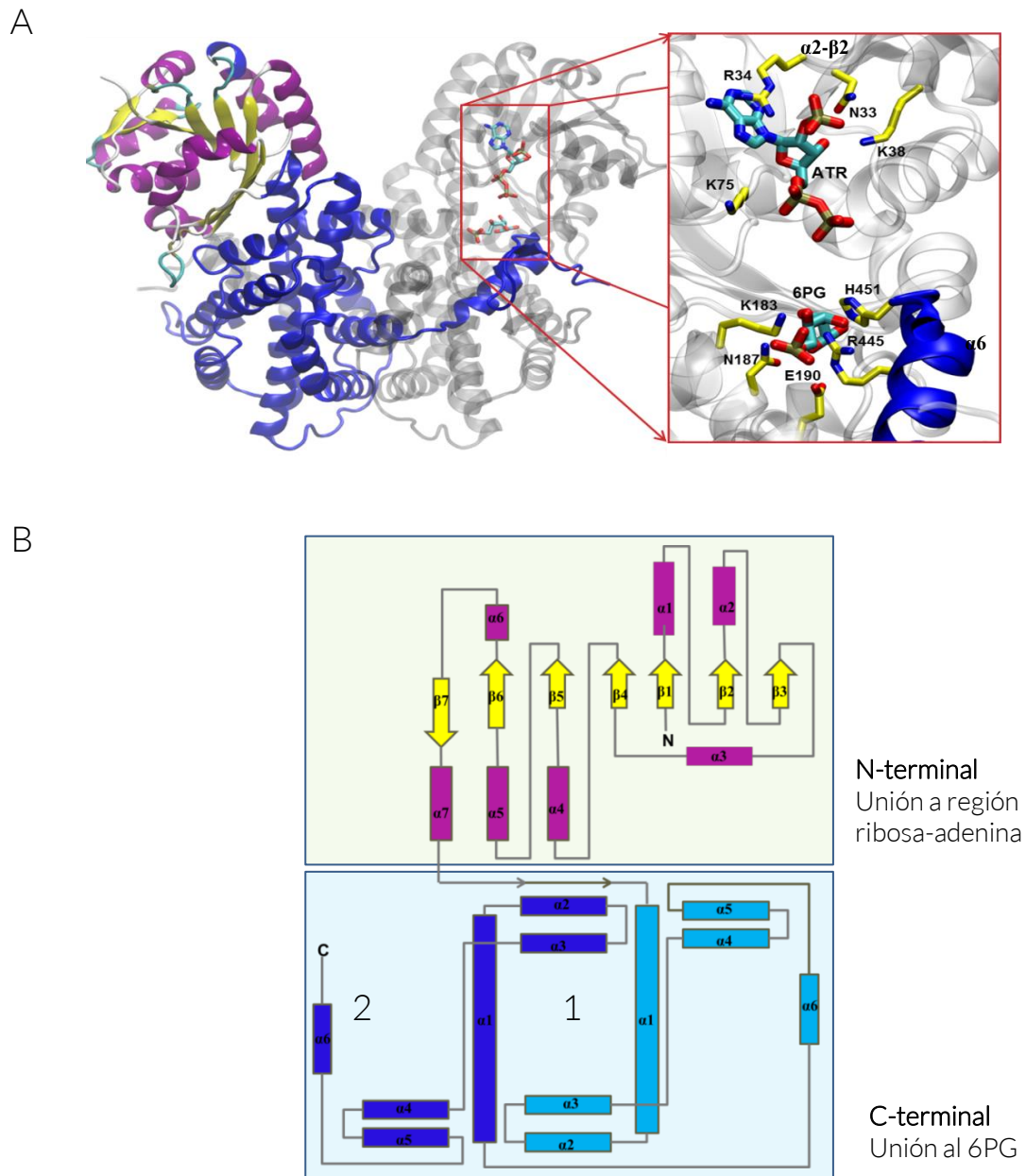


Figura 4. Estructura y diagrama de topología de *Ec6PGDH*. (A) Se representa la estructura de la *Ec6PGDH*. (Izquierda) En azul y gris se representa cada subunidad de *Ec6PGDH*, en amarillo y púrpura se representa el plegamiento tipo Rossmann del dominio N-terminal de la cadena azul. (Derecha) Se representan los aminoácidos N33, R34, K38, que interactúan con parte de la molécula de NADP (ATR, molécula que corresponde a NADP sin región ribosa-nicotinamida). Los residuos K183, N187, E190, R445, H451 interactúan con 6PG. (B) Diagrama de topología de *Ec6PGDH*, región N-terminal coloreada según elementos de estructura secundaria, región C-terminal coloreada según hemidominio 1 (azul claro) y hemidominio 2 (azul oscuro).

En 1976, Veronese y cols [34] fueron los primeros en realizar una caracterización cinética y estructural de la enzima de *E. coli*, ellos reportaron K_M para NADP y 6PG de 33 y 50 μM , respectivamente. Para NAD en cambio, la información es ambigua ya que estos autores señalan no observar actividad probando concentraciones superiores a 1 mM de NAD, pero no especifican la concentración usada.

La estructura de la *Ec6PGDH* ha sido determinada por cristalografía de proteínas [9]. Los residuos N33, R34 y K38 del dominio N-terminal participan de interacciones directas con el fosfato esterificado en el 2'-OH de la ribosa adyacente a la adenina del dinucleótido, (figura 4; [9]). El residuo R34 a su vez interactúa con la adenina del dinucleótido mediante empacamiento tipo π [2,35]. En el caso de NAD, la ausencia de las cargas negativas del 2'-fosfato causaría que las cargas positivas presentes en R34 y K38 no contribuyan con la energía de unión, la cual favorece la discriminación por NADP sobre NAD. De hecho, mutaciones de los residuos homólogos a R34 y K38 por A en 6PGDH de *O. aries*, reducen en 2 órdenes de magnitud la eficiencia catalítica de la enzima, afectando principalmente la K_M para NADP [36].

El dominio C-terminal está implicado en la unión al 6PG. En todas las estructuras de 6PGDHs se observa que la última α -hélice (α -6) del segundo hemidominio se desempaca del resto del dominio y se empaca en la subunidad adyacente (Figura 4, [9]). Entonces, el bolsillo de unión al 6PG se forma entre la primera y cuarta hélice del primer hemidominio y la última alfa hélice (α -6), del segundo hemidominio proveniente del extremo C-terminal de la otra subunidad. Los residuos N102, S128, K183, N187, E190 en una cadena y H451, en α -6 de la subunidad adyacente, interactúan con los hidroxilos centrales del 6PG (figura 4). En la 6PGDH de *Ovis aries* se mutaron los residuos homólogos a K183 y E190, permitiendo identificarlos como fundamentales para la oxidación del 3-OH del 6PG y descarboxilación del intermediario oxidado, respectivamente [37]. Por otra parte, los residuos Y191, K260, R287 de una cadena y R445 en α 12 de la subunidad adyacente, tienen relevancia en la interacción con el fosfato del 6PG (Figura 4 [9]).

6PGDHs con un sólo hemidominio C-terminal

En los años 70 y 80 aparecieron reportes de enzimas más pequeñas, con actividad 6PGDH, capaces de usar NAD o NADP como cofactor (enzimas duales, Tabla 1. cuadros celestes). Estos reportes de purificaciones no estaban asociados al clonamiento del gen y a los análisis de secuencia que permitieran correlacionar la especificidad por dinucleótidos con motivos de especificidad [38-43]. Estos estudios mostraban enzimas tetraméricas, con monómeros de aproximadamente 32 kDa, similar a lo observado con 3HIBADHs. Sumado a esto, para las especies *Pseudomonas multivorans* [39], *Methylophilus methylotrophus* [43], y *Methylobacillus flagelatum* [44] se ha documentado la existencia de isoformas de 50 y 30 kDa aproximadamente, con actividades que sugieren preferencia por NADP y NAD, respectivamente. Recién el 2010 fue clonada y expresada de manera recombinante la 6PGDH NAD preferente de *Gluconobacter oxydans* por Rauch y cols [41], lo que permitiría corroborar que las 6PGDHs de sólo un hemidominio presentan residuos importantes para la especificidad por 6PG, homólogos a K197 y E213 descritos anteriormente. Sin embargo, no se han reportado evidencias de que en el bolsillo de unión a 6PG haya presencia de elementos de estructura secundaria provenientes de otra subunidad, tal cual ocurre con residuos de la α -6 en el sitio activo de *Ec6PGDH* y el resto de las 6PGDH con hemidominios dupliados.

En el PDB (marzo, 2012), se depositó la estructura de una 6PGDH putativa de *Geobacter metallireducens* (*Gm6PGDH*), que muestra una asociación tetramérica (4E21; figura 5, sin caracterización asociada). Esta enzima ha sido denominada por sus autores PDB como una enzima NAD-dependiente. A pesar de aquello la estructura no presenta NAD o 6PG y tampoco se ha reportado la caracterización de su actividad 6PGDH o la preferencia por dinucleótidos. *Gm6PGDH* corresponde a una proteína de 358 aminoácidos, cuyo dominio C-terminal posee un solo hemidominio de 6 alfa hélices y posee un 50% de identidad de secuencia con la 6PGDH de *Gluconobacter oxydans* además de presentar los residuos clave para la interacción con 6PG, como K y E, que apoyan su asignación como 6PGDH. *Gm6PGDH* posee el motivo DLX₃A en el loop β 2- α 2 del dominio N-terminal que permite suponer que no poseería preferencia por NADP.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de *Ec6PGDH* y de 6PGDHs que se han documentado K_M para NAD.

6PGDH	NADP		NAD	
	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})
<i>Escherichia coli</i>	49	21	-	-
<i>Termotoga maritima</i>	10	325	380	325
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	17	-	3500	-
<i>Pseudomonas c</i>	20	-	500	-
<i>Pseudomonas multivorans</i>	20	-	200	-
<i>Gluconobacter oxydans</i>	440	23	64	23
<i>Leuconostoc lactis</i>	-	-	320	-

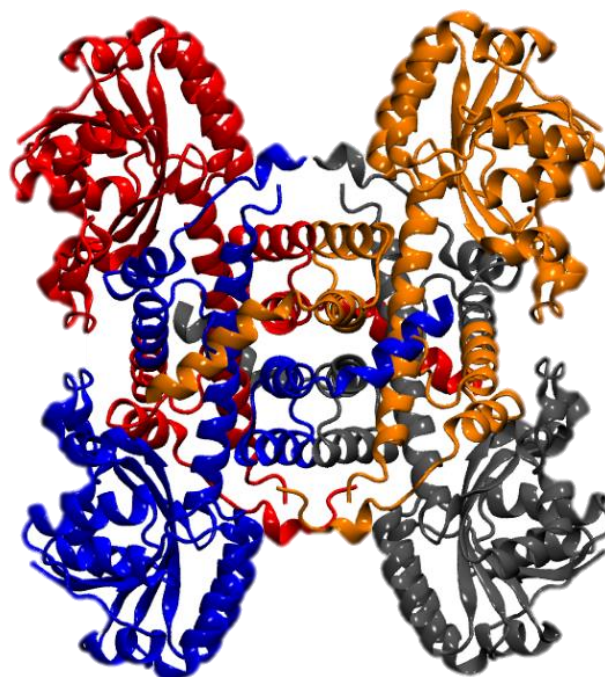


Figura 5. Estructura de *Gm6PGDH*. 6PGDH de *Geobacter metallireducens*, (PDBid: 4E21) estructura tetramérica coloreada por subunidades.

A pesar de que la estructura de 6PGDH de *G. metallireducens* posee la misma topología que las 3HIBADHs y otras β HADH, difiere de ellas, en que la alfa hélice terminal se desempaca de la subunidad a la que pertenece, estableciendo interacciones con la subunidad vecina (Figura 5). Sin embargo, en la región C-terminal de cada cadena en el PDB, los últimos 20 aminoácidos no muestran densidad electrónica, dejando pendiente la conclusión acerca de la contribución intersubunitaria del sitio de 6PG puede ser un rasgo conservado en las 6PGDHs independiente de la presencia de uno o dos hemidominios en el C-terminal.

Aunque se han reportado relaciones evolutivas y estructurales entre las 3HIBADHs y las 6PGDHs de hemidominios duplicados [13], no se han realizado estudios evolutivos y filogenéticos que vinculen a éstas con las 6PGDH de un hemidominio. Una revisión realizada en el año 2006 por los autores de SCOP [45] estableció que las 6PGDHs provienen directamente de una duplicación del dominio C-terminal de las 3HIBADHs (Figura 6). De esta forma, a partir de las 3HIBADH, se generaron 6PGDH homodiméricas cuyos monómeros poseen un dominio C-terminal con dos hemidominios de 6 alfa hélices. Esta hipótesis evolutiva, que es parte de una nueva categoría de anotación, búsqueda y clasificación de estructuras de proteínas de la reciente base de datos SCOP2 [46], corresponde al estado del arte que se tiene sobre esta superfamilia de enzimas.

Tanto las 6PGDHs de hemidominios simple y duplicado, poseen elementos de estructura secundaria que se desempacan de una subunidad e interactúan con la subunidad adyacente. Esta característica estructural no está presente ni en las 3HIBADHs ni en el resto de las β HADHs. Por lo tanto, un evento de duplicación como lo plantea Andreeva y Murzin [45] no es suficiente para explicar los cambios estructurales involucrados en la transición desde las 3HIBADHs a las 6PGDHs.

Es posible plantear que el primer evento evolutivo habría sido la especialización de un C-terminal capaz de unir 6PG, principalmente con el desempacamiento y extensión de sus extremos C-terminal hacia el sitio activo de las cadenas adyacentes. Luego en la duplicación para conformar 6PGDH diméricas en algunas especies.

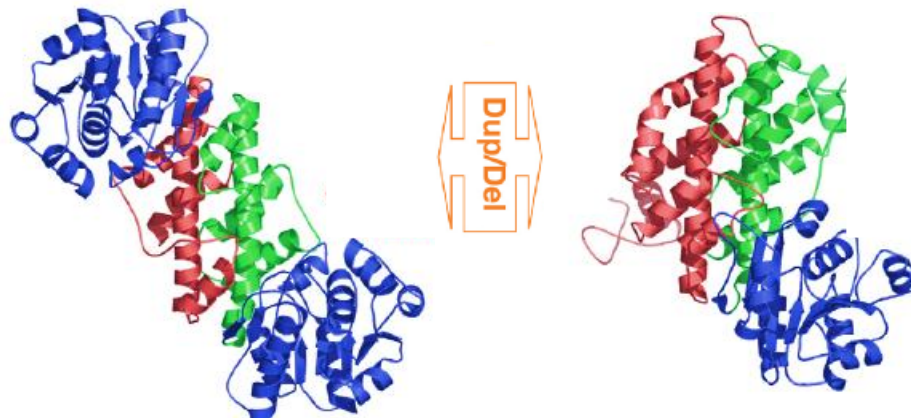


Figura 6. Origen de la 6PGDH dimérica. Figura adaptada de Adreeva y cols [45]. Izquierda, se representa el dímero de 3HIBADH. Derecha, se representa una cadena de 6PGDH. En azul se colorea el dominio N-terminal de cada proteína. En rojo y verde se colorean los dominios C-terminales de cadenas adyacentes de las 3HIBADHs. El dominio C-terminal de las 6PGDH está coloreado en torno a las diferentes subunidades del dímero de la 3HIBADH.

Un esquema de esta propuesta se muestra en la figura 7, donde tanto *Go6PGDH* como *Gm6PGDH* así como todas las 6PGDHs de cadena corta, serían parte de una de las dos ramas principales de las 6PGDHs. Las 6PGDHs de esta rama presentarían el motivo de unión a la región adenina-ribosa D[V/L]X₃A en el dominio N-terminal que permite suponer la capacidad de unir preferentemente NAD, similar a lo que se observa en las 3HIBADHs y β HADH que contienen un aspártico en este motivo y que han sido caracterizadas como enzimas NAD-preferentes. De esta manera la enzima antes descrita, *Go6PGDH*, homóloga a *Gm6PGDH*, pueden ser un excelente candidato para determinar su estructura en presencia de 6PG y observar el extremo C-terminal, al igual que evaluar junto a *Ec6PGDH* su preferencia por dinucleótidos, como representantes de miembros de la familia con distintos motivos de unión en el loop α 2- β 2 del dominio N-terminal.

La especificidad por sustratos en la familia 6PGDH estaría gobernada por eventos evolutivos ocurridos en los dos dominios que conforman el plegamiento de la superfamilia β HADH. Esta tesis presenta dos focos: uno será establecer relaciones de estructura-función que permitan comparar los sitios de 6PG en enzimas con uno o dos hemidominios. Esto fue evaluado mediante análisis bioinformático, análisis filogenético, cinética enzimática, modelamiento y simulaciones moleculares. El segundo foco será entender la relación entre la preferencia por NAD y NADP y la presencia de distintos motivos de secuencia en α 2- β 2. Para dar respuesta a esta interrogante, se realizaron mutaciones sitio dirigidas en *Ec6PGDH*. Los efectos de estas mutantes fueron evaluadas por medio de cambios en la especificidad para cada cofactor por medio de estudios de cinética enzimática e ITC. Además, se determinó la preferencia por dinucleótidos de *Go6PGDH*, se generaron cristales de proteínas, se modeló su estructura y se evaluaron por medio de dinámicas moleculares otros residuos implicados en la discriminación por cofactores.

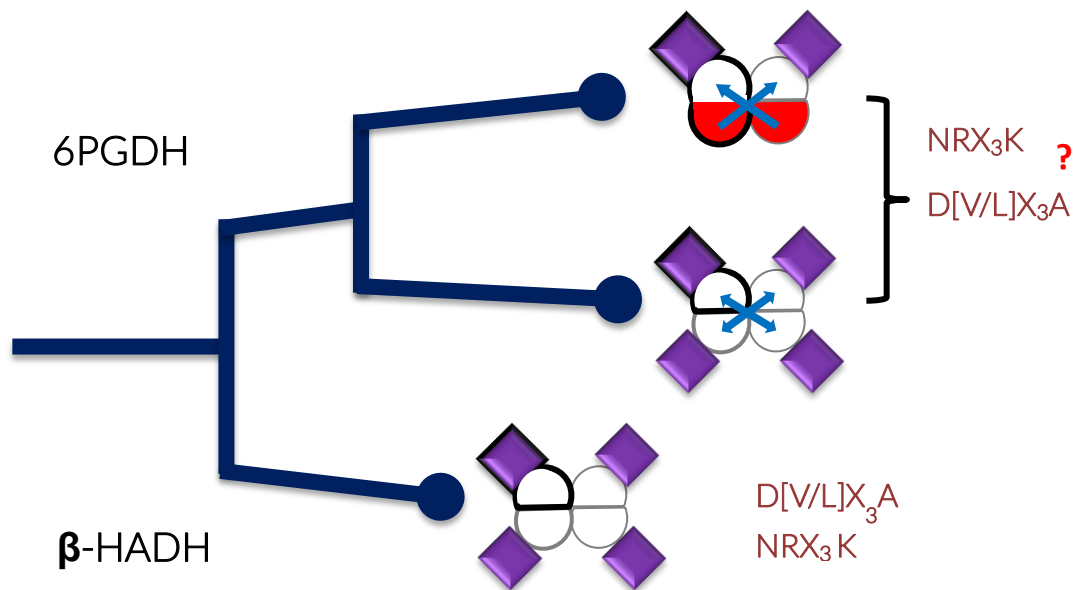


Figura 7. Esquema resumen de la evolución estructural de la familia 6PGDH. A los costados de cada rama se muestran las conformaciones oligoméricas de cada tipo de enzima. En cuadrados morados se representa el dominio N-terminal, los semicírculos blancos corresponden a hemidominios de las β HADH, los semicírculos rojos representan los hemidominios duplicados en las 6PGDH. El contorno negro representa la subunidad de cada oligómero. En flechas azules se representa la contribución intersubunitaria de hemidominios adyacentes. Al costado de las figuras oligoméricas se muestra los motivos en el loop β 2- α 2, NRX₃K y D[V/L]X₃A.

HIPÓTESIS

En la evolución de las 6PGDHs, *la subunidad adyacente contribuye con determinantes de especificidad por 6PG* independiente de la presencia de uno o dos hemidominios C-terminal; mientras que *la especificidad por dinucleótidos está determinada por los motivos en el loop β 2- α 2* en el dominio N-terminal.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los determinantes de especificidad por sustratos de 6PGDHs con uno o dos hemidominios C-terminal, tanto variantes silvestres como mutantes del loop β 2- α 2, mediante enfoques cinéticos, estructurales y bioinformáticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la evolución estructural de la familia 6PGDH e identificar residuos determinantes de especificidad por dinucleótidos y co-sustratos.
2. Expresar y purificar *Go6PGDH* y *Ec6PGDH*.
3. Estudiar el efecto del 6PG sobre la actividad y preferencia por dinucleótidos, así como el efecto de 3HIBA en *Go6PGDH* y *Ec6PGDH*.
4. Caracterizar la preferencia por dinucleótidos en mutantes del motivo NRX₃K del loop β 2- α 2 de *Ec6PGDH*.
5. Estudiar la interacción de 6PG y dinucleótidos con residuos del sitio activo de *Go6PGDH*.

MATERIALES

1. REACTIVOS

Tabla 2. Reactivos utilizados.

Proveedor	Insumos
Becton Dickison (NJ-EEUU)	Peptona
Biorad (CA-EEUU)	Bradford
Biotium (CA-EEUU)	Gel Red
Calbiochem (NJ-EEUU)	PMSF, Glicina, Tween-20, 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, MgCl ₂ , NaCl, NiSO ₂ , Imidazol.
New England Biolabs®Inc (MA-EEUU)	<i>DpnI</i> , 1Kb ADN Ladder, T4 ADN Ligasa, EcoRV
OMEGA Bio-tek (GA-EEUU)	E.Z.N.A (miniprep kit)
Biotium	GelRed™
Stratagene	PfuUltraII Fusion Polymerase
Fermentas	XhoI, NdeI
Sigma Aldrich	β-mercapto-etanol, BSA, NAD(P), 6PG, standard M.W. Metil (S)-(+)-3-hidroxi-2-metilpropionato, TCEP
TCL (STGO-CHILE)	TEMED
US Biological (MA-EEUU)	IPTG, Kanamicina, Tetraciclina, ampicilina
Winkler (STGO-CHILE)	Glicerol

Biolabs	Estándar de M.W. cod. P77085
Biosonda	Estándar de M.W. 10-200 KDa

Se utilizó agua miliQ que posee una resistencia de 18,2 ohm.

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)), P_{Lys}S, Amp^r, 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* DH5α (F⁻ ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1endA1 *hsdR17* (rk⁻ rk⁺) *poa supE44 λ⁻ thi⁻ 1 gyrA96 relA1 tonA*).

3. VECTORES

El vector pET-TEV que contuvo el gen *gnd* (*Ec6PGDH*), variantes silvestre y mutantes, y el gen *gox1705* (*Go6PGDH*) se utilizó para la sobreexpresión de estas enzimas. El vector posee un tamaño aproximado de 7200 pares de bases y contiene un gen que confiere resistencia a kanamicina. Los genes *gnd* y *gox1705* fueron clonados entre los sitios de corte de las endonucleasas NdeI (permite la conservación del codón de inicio) y XhoI, en marco de lectura con la secuencia de hexa histidinas, además de un sitio de corte para TEV en la región N-terminal. Las variantes mutantes de *gnd* se obtuvieron por medio de mutagénesis sitio dirigida sobre el mismo vector, procedimiento que será explicado más adelante.

El vector pBluescript II KS(+) se usó para el subclonamiento del gen *gox1705*, este vector posee en su sitio multiple de clonamiento un sitio de corte para EcoRV, ubicado en el gen de la β-galactosidasa.

4. PARTIDORES MUTAGÉNICOS Y DE SUBCLONAMIENTO

Los partidores mutagénicos para introducir mutaciones en el gen *gnd* fueron los siguientes:

Asparragina 33 por Aspártico:

5' GTTATACCGTCTCTATTTTCGACCGTTCCCGTGA 3'

3' TTCGGCACCAATATGGCAGAGATAAAAGTTG 5'

Lisina 38 por Alanina:

5' TCTATTTTCGACCGTTCCTGAGGCGACGGGAAGAAGTGATT 3'

3' CGGCTCCAATATGGCAGAGATTAAGCTGGCAAGGGCACTC 5'

Arginina 34 por Valina:

5' ATACCGTCTCTATTTTCGACGTTTTCCCGTGAGCA 3'

3' TTCGGCACCAATATGGCAGAGATAAAAGCTG 5'

Los tripletes subrayados corresponden a los codones de los aminoácidos reemplazados. Los partidores mutagénicos K38A fueron utilizados sobre el templatado mutante *gnd*-N33D y a su vez los partidores para sustituir la arginina 34 por valina fueron utilizados sobre la doble mutante *gnd*-N33D-K38A.

Se usó el siguiente par de partidores de subclonamiento con motivo de levantar el gen *gox1705* proveniente del vector pASK-IBA3 plus. Los partidores poseen zona de apareamiento al extremo N-terminal del gen y sitio de corte para NdeI (letras ennegrecidas) y una zona de apareamiento a la región C-terminal del gen, un codón de término y sitio de corte para XhoI (Letras ennegrecida).

5' **CATATGCGGATCGGAATCATCGGACTG** 3' NdeI (Partidor de avance)

5' **CTCGAGTTATTTCTTTTCGACGTGTCCGCCG** 3' XhoI (Partidor reverso)

MÉTODOS

1. MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

1.1. 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 el 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 antibióticos, el medio sólido fue calentado hasta lograr una temperatura estimada de 65°C, se agregaron los antibióticos hasta una concentración final de 50 ng/ul.

1.2. 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:

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

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.

1.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Volúmenes de 1 ul 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 kpb. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 80 V (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad, CA-EEUU).

1.4. 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, capacidad eléctrica 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 0,1 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.

1.5. Mutagénesis sitio dirigida

Para las mutaciones sitio específicas se utilizó el sistema Genetailor™ de Invitrogen (CA-EEUU). El procedimiento consiste en la amplificación por PCR del plásmido pET-TEV que contiene el fragmento de interés. Se utiliza un par de partidores, uno de ellos contiene el codón mutagénico (Figura 8). El procedimiento utiliza como molde el plásmido de doble hebra proveniente de una cepa DH5α, la cual es metilada específicamente en el nucleótido de adenina en la secuencia GACT [24]

Luego de la reacción de amplificación, se somete la mezcla de PCR a digestión con la enzima DpnI, la cual reconoce metilaciones en la secuencia GACT, degradando así los plásmidos parentales. Los productos PCR lineales fueron transformados en células DH5α, las cuales recircularizan los amplicones, formando de esta manera nuevamente el plásmido, pero con la mutación deseada.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 25 μ l. La mezcla de reacción contenía 2,5 μ l de amortiguador PCR 10 X, 30 ng de plásmido, 1 μ l de ambos oligonucleótidos (1 μ M final para cada uno); 0,25 μ l de la mezcla de deoxinucleótidos 25 mM, 0,5 μ l (1,5 U) de la enzima Pfu Ultra II Fusion HS ADN®, y por último 19,5 μ l de agua miliQ estéril. Las reacciones de mutagénesis se realizaron en un termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-100® (MJ Research, Waltham-EEUU). Se utilizó un protocolo que consistía de una etapa inicial de denaturación a 95 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 20 segundos a 95 °C; 20 segundos de alineación a la temperatura de apareamiento de los partidores utilizados y una etapa de extensión a 72 °C por 2 minutos. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, resultando por lo general en una única banda de amplificación con una migración electroforética cercana a los 7,2 Kb, correspondiente al tamaño del vector pET-TEV-*gnd* en su forma lineal.

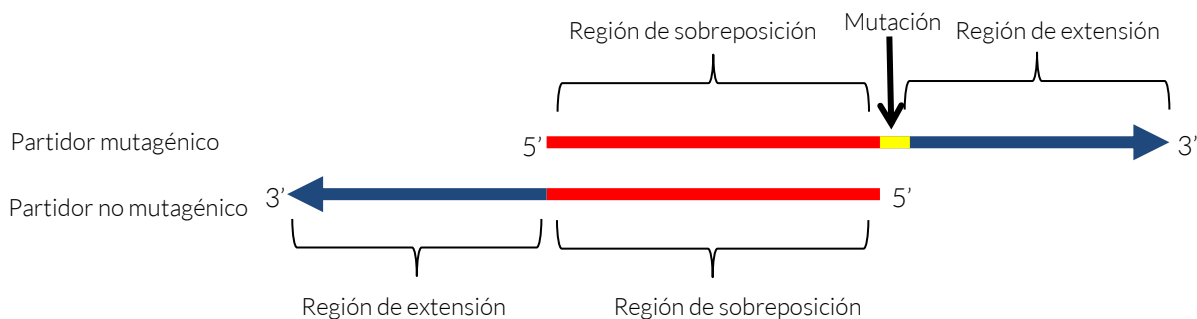


Figura 8. Diseño de partidores según Kit Genetailor. En Azul se representa la región de extensión, en rojo se señala la región de complementariedad y en amarillo, el codón mutagénico. Los partidores para cada mutación se encuentran detallados en la sección de materiales.

Usando cada reacción de PCR, se transformó células electrocompetentes de *E.coli* DH5 α obteniéndose colonias en todos los casos. Tres colonias resultantes de cada transformación fueron sometidas a extracción de ADN plasmidial mediante kit de miniprep (Omega). Muestras de 50 ng/ μ l en 15 μ L 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 *gnd* en nuestro vector de expresión. Los cromatogramas de secuenciación fueron analizados con el programa Geneious v4.8 y las secuencias finales fueron contrastadas con la secuencia

silvestre del gen *gnd* de *E. coli* para corroborar la adquisición de la mutación y descartar la presencia de mutaciones espúreas.

Usando el protocolo de mutagénesis descrito, se procedió primero a realizar la mutante simple N33D, luego sobre el plasmidio mutado la segunda mutación K38A y consecutivamente la mutación R44V.

1.6. Subclonamiento de la 6 fosfogluconato deshidrogenasa de *Gluconobacter suboxydans* y de *Escherichia coli*.

La 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Gluconobacter suboxydans* fue donada por el Dr. Uwe Deppenmeier del Institute für Mikrobiologie und Biotechnologie de la Universidad de Bonn, Alemania. El gen de esta enzima, *gox1705*, venía contenido en el vector de expresión pASK-IBA3plus cuyo promotor es inducible por tetraciclina y que posee una secuencia codificante para estreptavidina fusionado en el extremo C-terminal de la proteína, sin poseer una región de corte entre esta proteína y el gen de la enzima. Tanto el sistema de expresión como de purificación de este vector se aleja de los métodos empleados en nuestro laboratorio, por otro lado nos resultó relevante para los fines de nuestra investigación, obtener la proteína fusionada en el extremo N-terminal con una secuencia de corte de la proteasa TEV seguido de una región enriquecida en histidinas para facilitar la purificación.

El subclonamiento se realizó desde el vector pASK-IBA3plus al vector pET-TEV. Para esto se realizó un PCR usando partidores flanqueantes de las zonas N y C terminal del gen, en cuyos extremos 5' se encontraban las secuencias de reconocimiento para las enzimas de digestión NdeI y XhoI (partidor forward y reverse, respectivamente, detallados en la sección de materiales). El producto PCR se purificó desde la electroforesis de gel de agarosa y se incubó con 1 U de T4 Ligasa y 30 ng del vector pbluescripII, que fue previamente digerido con EcoRV, enzima de digestión que genera extremos romos, durante 16 horas a 20°C. El producto de la ligación se electroporó en células electrocompetentes de *E.coli* DH5 α , luego se plaqueó en agar solido en presencia de 50 μ g/ml Ampicilina y 15 μ g/ml X-gal. Se seleccionaron las colonias resistentes a estos antibióticos de coloración azul a las que se les purificó el ADN plasmidial. Los Plasmidios

purificados fueron incubados con enzimas NdeI y XhoI, posteriormente se corrió un gel de agarosa y se purificó una banda correspondiente al fragmente de *gox1705* con los respectivos extremos de las enzimas de restricción, el cual fue incubado con T4 ligasa y el vector pET-TEV, previamente digerido con NdeI y XhoI, durante 16 horas a 20°C. Los productos de ligación fueron electroporados en células *E. coli* DH5 α , las células fueron plaqueadas en agar LB sólido con resistencia a kanamicina. Las colonias que presentaron resistencia a kanamicina, se les purificó sus plasmidios, siendo enviados a secuenciar por Macrogen Inc. (Maryland, EEUU), utilizando los partidores universales del promotor y terminador del fago T7.

Finalmente los plasmidios pET-TEV-*gox1705* que resultaron positivos fueron transformados en la cepa *E. coli* BL21(DE3) adecuadas para la expresión y purificación de proteínas.

Para el procedimiento de subclonamiento de *gnd*, gen de la 6PGDH de *E. coli*, se utilizó el mismo protocolo anteriormente expuesto, con la diferencia que *gnd* fue extraído directamente desde el genoma de *E.coli*.

1.7. Test de inducción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *G. suboxydans* y *E. coli*

Los plasmidos pET-TEV-*gox1705* y pET-TEV-*gnd* silvestre y mutantes fueron electrotransformados en cepas BL21 (DE3) Tet^r que fueron cultivadas en placas de agar LB en presencia de kanamicina y tetraciclina. Para cada cepa transformada con sus respectivos vectores de expresión se seleccionaron cuatro colonias al azar, las cuales fueron incubadas en 3 mL de medio LB suplementados con los antibióticos correspondientes a 37 °C durante toda la noche. Luego de esperar el crecimiento de las colonias, éstas fueron inoculadas en 50 mL de medio LB líquido en presencia de 50 μ g/ml de tetraciclina y kanamicina. Se monitoreó el crecimiento del cultivo hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5, instancia donde se recolectaron 25 ml de inóculo y traspasados a otro recipiente (como control sin inducción). Los 25 ml restantes fueron inducidos con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37 °C para el caso de *gnd* y de 4 horas a 37°C y 16 horas a 20°C para el caso de *gox1705*. Posteriormente se centrifugó a 850 x g por 10 minutos ambos

cultivos para obtener un debris celular, las cuales fueron resuspendidas en 2 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM y sonicados para lisar las células. Nuevamente se centrifugaron las muestras a 18000 x g, a 4 °C por 30 minutos, luego se determinó la concentración de proteínas y se cargaron ambos extractos (inducidos y no inducidos) en un gel de poliacrilamida al 11,5 %.

2. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE *Gs6PGDH* y *Ec6PGDH* SILVESTRE Y MUTANTES

2.1. Purificación de proteasa TEV, *Gs6PGDH* y *Ec6PGDH* mutantes y silvestre .

Purificación de Gs6PGDH, Ec6PGDH, proteína silvestre y mutante

Se inocularon 50 ml de un cultivo crecido durante la noche anterior de la cepas de *E. coli* BL21 (DE3) tet^r transformada con los plásmidos pET-TEV-*gnd* silvestre y mutantes (según sea el caso), en 1 L de medio LB suplementado con tetraciclina (20 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Cada cultivo, se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5. Luego, fue inducido con IPTG 1 mM y se mantuvo la agitación por 4 horas más. Pasado este tiempo, las células fueron colectadas por centrifugación a 8.000 x g por 30 minutos a 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5810R utilizando un rotor F-34. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron suspendidas en un volumen equivalente al 10 % del volumen inicial del medio LB, con el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 y 40 mM de imidazol, al cual se le suplementó el inhibidor de proteasa, PMSF a una concentración final de 1 mM. 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 aplicaron 12 pulsos con una amplitud de 40 % de 15 segundos con 1 minuto de pausa entre cada pulso en hielo. Luego, el extracto obtenido se centrifugó a 18000 x g, a 4 °C por 30 minutos en una centrifuga BOECO M-240R. La cepa *E. coli* BL21 transformada con pET-TEV-*gox1705* fue sobreexpresada de igual forma que *Ec6PGDH* con la diferencia que la inducción se realizó durante 16 horas a 20°C.

Los extractos de cada proteína se sometieron a una cromatografía de afinidad a Ni⁺² por medio de una columna HisTrap™ HP de 5 ml de la empresa GE Healthcare (Sweden).

Cargado el extracto, la columna fue lavada con 5 volúmenes de solución de resuspensión y eluida en un gradiente de 40 a 500 mM de imidazol. A las fracciones con mayor actividad 6PGDH se colectaron y se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford [48]. Para chequear la homogeneidad de la preparación de la enzima, se realizó un análisis de SDS-PAGE, comprobando la pureza de cada una de las fracciones.

Purificación de la Proteasa TEV

Para la proteasa TEV se usó el mismo método de purificación que las 6PGDHs de *E. coli* y de *G. oxydans*. El pellet de la inducción de la cepa con la proteasa TEV fue resuspendido en una solución de Tris-HCl 50mM pH 8.0, 500 mM de NaCl, 40 mM de imidazol y 5 mM de β -mercaptoetanol. Se tomó la precaución de incluir agente reductor en cada solución de purificación. El extracto de proteínas fue cargado en una columna HisTrap HP de 5ml, luego de recolectar el frente se realizó un lavado con la misma solución de amortiguación de la resuspensión del pellet. La proteína se eluyó por medio de un gradiente de imidazol, de 40 a 500 mM, se obtuvieron dos *peaks* que contenían la proteína, el segundo resultó ser la proteasa en mayor estado de homogeneidad. La proteína se dializó durante 2 horas en una solución que contuvo Tris-HCl 50mM pH 8,0, 300 mM de NaCl, 1 mM de TCEP y 0,5 mM de EDTA para quelar metales divalentes remanentes del proceso de purificación que pueden afectar la actividad de la enzima. La enzima se conservó en glicerol al 50 % a -80°C en una concentración final de 1 mg/ml hasta su posterior uso.

2.2. Determinación de la concentración de proteínas

Fue llevada a cabo por el método de Bradford [48]. Para algunos experimentos se usó la determinación de absorbancia intrínseca de triptófanos a 280 nm para obtener la concentración de proteína en agua. Se usaron los coeficientes de absortividad molar en agua de $59250\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para *Ec6PGDH* silvestre y mutantes, y $39420\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para *Go6PGDH* entregados por el servidor ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

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

El análisis de las masas moleculares sobre 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 en proporción 3:1 con un amortiguador de carga 4 X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 4 % v/v, SDS 8 % p/v, β-mercapto-etanol 2,8 mM y azul de bromofenol 4 %) y se calentaron a 100 °C por 5 minutos.

Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 11,5 %. Las electroforesis se realizaron a corriente constante de 30 mA por 1 hora aproximadamente, hasta el momento antes de la caída del frente de corrida (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad, CA-EEUU). Como amortiguador de corrida 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, y 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 peso molecular SigmaMarker™ Low Range (Sigma) que contiene 7 proteínas patrón de una masa molecular: 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14,2 kDa.

2.4. Proteólisis de cola de histidina

La remoción de la cola de hexa histidina de *Ec6PGDH* fue llevada a cabo por la proteasa de TEV. Para estudiar las condiciones óptimas de corte se utilizaron razones molares proteasa:sustrato de 1:10, 1:20 y 1:30, a temperaturas de 4°, 20° y 30°C, siguiendo la reacción a los tiempos 0, 1, 2, 4 horas y *overnight* (figura 9A). La reacción se realizó con 200 µg de 6PGDH en un volumen final de 200 µL en una solución de Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 0,5 mM y TCEP 1 mM. Se tomaron alícuotas en los tiempos mencionados y se detuvo la reacción agregando reactivo de carga 4X e hirviendo la muestra 5 minutos a 100 °C. El seguimiento de la reacción se realizó mediante Western blot (figura 9B).

SDS-PAGE y Western Blot

Los geles fueron preparados al 12% de acrilamida y fueron corridos a 90 V durante el gel concentrador y a 120 V durante el gel separador. La electrotransferencia fue realizada a 600 mA totales a 4 °C. La membrana fue bloqueada con leche al 5% y lavada con TBS-T. Se utilizó Ni-NTA conjugado a peroxidasa, el cual fue incubado 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue lavada con TBS-T 0,05% y fue revelada utilizando una solución con 18 mg de 4-cloro-1-naftol, 6 mL de metanol, 24 mL de Tris Salino y 60 μL H_2O_2 30%. La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa ImageJ.

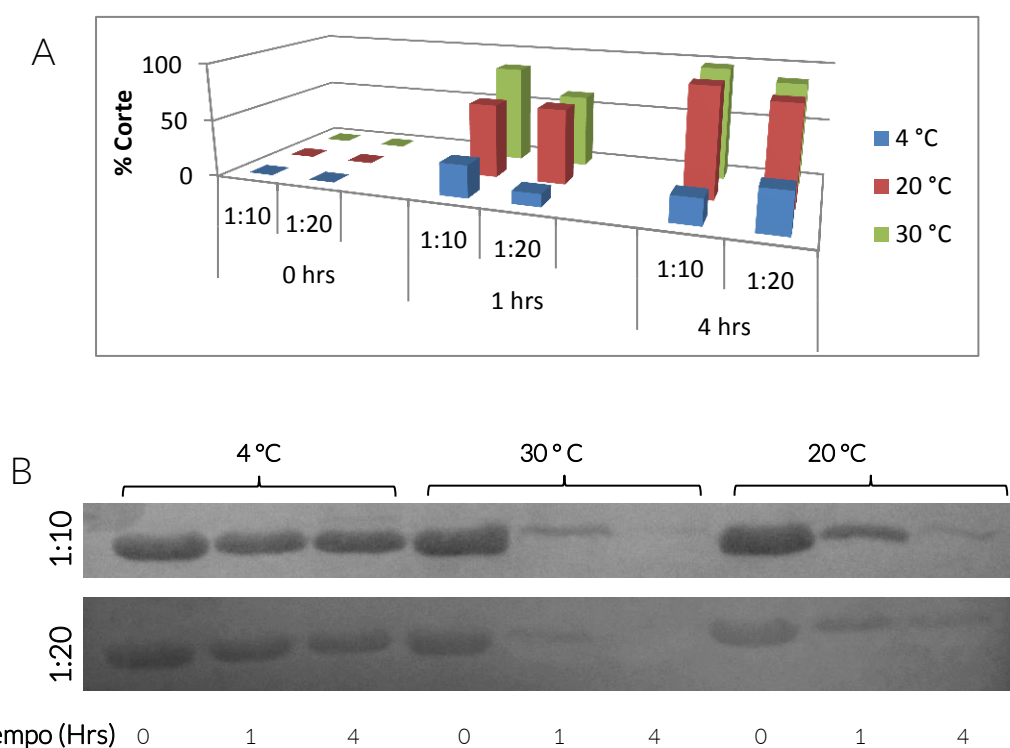


Fig. 9. Ensayo de actividad de la proteasa TEV. Distintas temperaturas, tiempos de reacción y relaciones molares de la proteasa y el sustrato fueron usadas en el ensayo. **(A)** Cuantificación de bandas mediante el programa ImageJ, tiempo 0 hrs fue considerado arbitrariamente como 0% de actividad. **(B)** Western blot utilizando Ni^{+2} - NTA-HRP, las bandas representan proteínas que no fueron proteolizadas.

2.5 Síntesis de 3-hidroxisobutirato

La síntesis del 3 hidroxisobutirato, integralmente desarrollada en esta tesis, se llevó a cabo gracias a las facilidades de equipamiento otorgada en los laboratorios de Química Bioinorgánica del profesor Patricio Iturriaga y en el laboratorio de Físicoquímica de

Polímeros de la profesora Marcela Urzúa. Ambos laboratorios del Departameto de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Para la síntesis de 3HIBA se utilizó el ester Metil (S)-(+)-3-hidroxi-2-metilpropionato obtenido de Sigma Aldrich. Un volumen de 1 ml del ester se sometió a hidrólisis básica con un 5% de exceso molar de NaOH en agua como medio de reacción. La reacción se mantuvo a reflujo durante 24 horas a 37°C. El producto de la reacción se congeló usando nitrógeno líquido y se realizó un secado seco por medio de un proceso de liofilización. La sal del ácido 3HIBA fue disuelto en agua y titulado con HCl_(ac) concentrado hasta alcanzar pH 7,0.

El proceso de síntesis química tuvo un rendimiento superior al 95 %, esto fue corroborado, al igual que la integridad de la molécula, por medio de resonancia magnética nuclear de protones, H-RMN, figura 10. En la figura se representan las señales espectroscópicas de los protones con los respectivos multiplicidades que indican la cantidad de protones. A 1 ppm se observa la señal de los protones del 2-metil a 2,4 ppm se aprecia el protón del carbono 2 de la molécula. Y en el desplazamiento de 3,4 y 3,6 ppm aparecen los cuádrupletes del carbono 3. A 4,8 ppm se observa la señal propia del intercambio H₂O/D₂O. El resto de las señales corresponden a trazas de acetato de etilo que quedaron presentes luego de la preparación de la muestra.

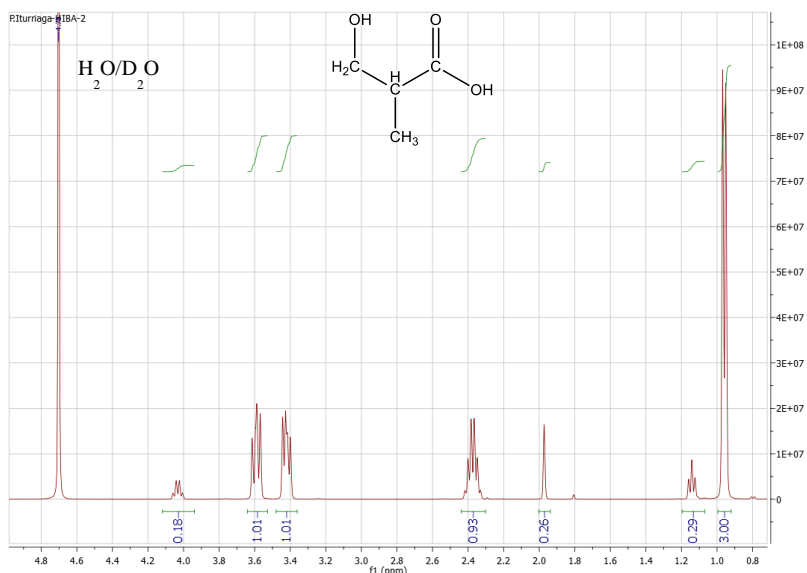


Figura 10. Espectro H-RMN del producto de la síntesis de 3HIBA. En el eje de las ordenadas se representa la intensidad de la señal, en las abscisas, el desplazamiento químico. Se muestran las señales integradas para los hidrógenos presentes en el 2-metil, en carbono 2 y en el carbono 3 del 3HIBA.

2.6 Titulación de sustratos

Todos los sustratos (NADP, NAD y 6PG) fueron llevados a pH cercano a 7,0. La concentración se determinó mediante el cambio de absorbancia hasta la formación de NAD(P)H monitoreado a 340 nm, en una mezcla de reacción que contenía a la propia *Ec6PGPDH* previamente purificada para el caso del NADP y 6PG, o a *LmG6PDH* (Sigma-Aldrich) para el caso del NAD. Se utilizó una concentración de co-sustrato al menos 20 veces mayor, lo cual garantiza que más del 99,9% del sustrato a titular se convierta a producto. Una vez que la ha consumido todo el sustrato, la diferencia entre las absorbancias inicial y final de la mezcla de reacción, $\Delta\text{Abs } 340 \text{ nm}$, se utilizó para determinar la concentración (C) real de los sustratos mediante la ecuación 1:

$$\text{Abs}_{280} = C \cdot \epsilon \cdot I \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde, ϵ es el coeficiente de extinción molar del NADPH e I, es el paso óptico de la cubeta (1 cm). Debido a que el valor del coeficiente de extinción del NADPH de 6220 U.A. $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 340 nm [49] fue determinado en condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura distintas a las usadas en estas mediciones, es que se optó por utilizar un coeficiente de extinción aparente determinado para nuestras condiciones de trabajo de 5186 U.A. $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [22]. Preparados de esta manera, los sustratos se conservaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.7 Determinación de la actividad enzimática de *Go6PGDH* y *Ec6PGDH* silvestre y mutante

La actividad enzimática de *Ec6PGDH* se determinó en un mezcla de reacción que contenía: amortiguador Tris-HCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, NADP 0,4 mM, 6PG 2 mM a pH 8,0. Para el caso de *Go6PGDH* a diferencia de NADP se usó 0.4 mM de NAD. Durante la reacción enzimática, se monitoreó la formación de NADPH a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por medio del aumento en la absorbancia a 340 nm. Utilizando el coeficiente de extinción de 5186 U.A. $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, se calculó la actividad de la enzima como el número μmoles de NADPH formados por minuto y por volumen de enzima (ml) lo que equivale a una unidad de enzima (U).

Los ensayos cinéticos se realizaron en un espectrofotómetro Biotek Synergy 2 UV-visible a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, con dos inyectores utilizando placas Nunc® de 96 pocillos (modelo

269620), las cuales tienen propiedades adecuadas de transmitancia y baja adsorción de proteínas.

Se generó un protocolo a través del software Gen5 del espectrofotómetro, para realizar las mediciones cinéticas. La secuencia de pasos se aprecia en la figura 11. En todos los casos, la reacción siempre fue desencadenada con la adición de enzima. Se realizaron tres réplicas para cada concentración, con cinéticas de 30 segundos a una tasa de adquisición de datos, que resultaba en 334 observaciones totales: unas cada 9 centésimas de segundo. Se midió la absorbancia a 340 nm antes y al final del experimento con el propósito de calcular el sustrato consumido. Adicionalmente, el espectrofotómetro midió la longitud del paso óptico de cada pocillo para normalizar las mediciones a una longitud de paso óptico de 1 cm.

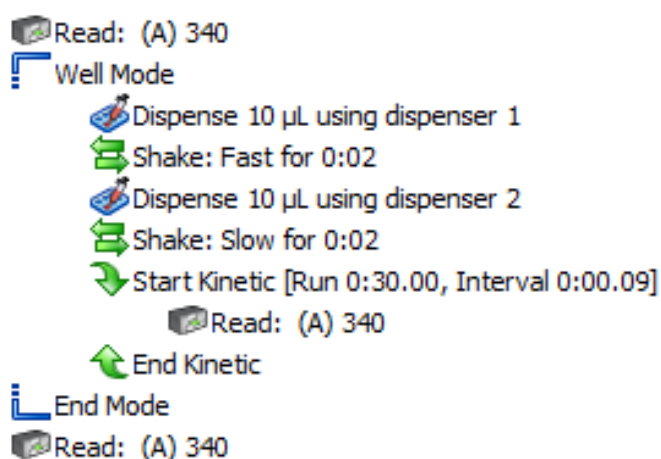


Figura 11. Protocolo software Gen5. Instrucciones creadas en el software del espectrofotómetro para realizar las mediciones cinéticas. Los iconos pequeños representan los diferentes pasos efectuados para cada medición. En el dispensador 1 se coloca la enzima, la cual es inyectada al pocillo que contiene la mezcla de reacción, seguido de un paso de agitación por 10 segundos. En el dispensador 2 se coloca el 6PG, la cual es inyectado para desencadenar la reacción. Este paso es seguido de una segunda agitación por 2 segundos. Finalmente se realiza la cinética. Esta secuencia se repite para cada pocillo de la placa.

Se realizaron mediciones de curva de progreso para NAD y NADP en condiciones de velocidad inicial a distintas concentraciones de 6PG. La concentración de sustrato consumido no superó el 5% del total. En los ensayos cinéticos para las 6PGDHs de *E. coli* y *G. oxydans* se usó una solución amortiguadora que contenía Tris 25 mM pH 8,0, 10 mM de MgCl₂ y 100 mM de NaCl a 25°C . Las concentraciones de enzimas variaron de acuerdo al rango de concentración de sustratos usados en las cinéticas. En casos de baja concentración de 6PG se usó hasta un máximo de 50 nM y 500 nM de *Ec6PGDH* en curvas de NADP y NAD respectivamente. Para *Go6PGDH* por su parte, se usó una concentración máxima de 20 nM para cinéticas con ambos cofactores. En cinéticas a concentraciones altas de 6PG, tanto para *Ec6PGDH* como para *Go6PGDH* se utilizó 5 nM de enzima, independiente del tipo de cofactor implicado en las curvas de progreso.

En las mediciones de velocidad inicial para *Ec6PGDH* a distintas concentraciones de sustrato, se utilizaron mezclas con 12 concentraciones de NADP, cubriendo un rango para este sustrato de 2 a 850 µM. Estos ensayos se realizaron a concentraciones fijas de 6PG que iban desde 2 hasta 0,025 mM. En el caso de las mediciones con NAD, se usó un rango de concentración desde 0,5 hasta 45 mM de NAD, por sobre la cota superior de concentración de este nucleótido se observa el artefacto óptico “difusión de luz” [50], descartándose esos puntos. El rango de concentración de 6PG usado fue desde 0,5 hasta 22,5 mM.

En las mediciones de velocidad inicial de NAD y NADP para *Go6PGDH* se usó un rango de concentración para los dinucleótidos desde 5 hasta 500 µM combinadas de concentraciones de 6PG entre 5 y 2,5 mM. Para las cinéticas en las que se usó combinaciones menores de 6PG (entre 2 a 0.25 mM) las concentraciones de NAD y NADP usadas variaron de 10 a 1000 µM y de 25 a 2000 µM, respectivamente.

Para los ensayos de velocidad inicial de las mutantes de *Ec6PGDH*, se utilizaron rangos de 1 hasta 10 mM de NADP y entre 1 y 45 mM de NAD a la concentración fija de 2 mM de 6PG.

En la determinación de los parámetros cinéticos para 6PG se utilizaron rangos de concentración del azúcar entre 5 y 1500 μM para el caso de *Go6PGDH* y 5 y 1000 μM para *Ec6PGDH*, esto a concentraciones saturantes de NAD y NADP respectivamente.

2.8 Determinación de las constantes cinéticas aparentes.

Las constantes cinéticas tanto de la enzima silvestre como mutantes, se calcularon a partir de mediciones de velocidad inicial (V_0) a diferentes concentraciones de sustrato (S) (ver resultados), ajustando a los datos el modelo cinético de Michaelis-Menten descrito por la ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{MAX} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Ecuación 2})$$

En donde,

$$V_{MAX} = k_{cat} \times E_T \quad (\text{Ecuación 3})$$

En la ecuación 2, La K_M es la constante de Michaelis, cuyo significado corresponde a la concentración de sustrato a la cual $V_0 = \frac{1}{2} V_{MAX}$. La V_{MAX} por su parte, es la velocidad máxima que puede alcanzar la reacción catalizada por la enzima y a su vez, equivale al producto de la constante catalítica k_{cat} por la concentración de enzima total $[E]_T$. Específicamente, la k_{cat} se calcula por medio de la ecuación:

$$k_{cat}(s^{-1}) = \frac{V_{MAX} \times PM_{(6PGDH)} \times 0.001}{60} \quad (\text{Ecuación 4})$$

V_{MAX} es la velocidad máxima expresada en unidades de $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de enzima; PM es el peso molecular de la enzima 6PGDH expresado en g/mol; 0,001 el factor de conversión para convertir los g/mol en mg/ μmoles y 60 el factor de conversión para convertir los minutos a segundos. Finalmente, la k_{cat} se expresa en s^{-1} .

Los ajustes a los datos cinéticos fueron realizados en el programa SigmaPlot 11.0

2.9 Efecto del 3HIBA en la actividad relativa de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*

Se determinó el efecto de la concentración de 3HIBA en la actividad relativa de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*. Cada ensayo de actividad enzimática contuvo el tampón Tris 25 mM pH 8,0, 100 mM de NaCl y 10 mM de MgCl₂ además de 0,1 mM de 6PG y 5 mM de NADP, para el caso de *Ec6PGDH* y 0,6 mM de 6PG y 5 mM de NAD, para *Go6PGDH*. Se usaron concentraciones de 3HIBA desde 0,1 hasta 60 mM. Para cada ensayo a concentración fija de 3HIBA, se determinó el promedio de la actividad enzimática, que fue normalizada por la actividad en ausencia del inhibidor y graficado versus la concentración del 3HIBA.

2.10 Mediciones de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron determinados en un espectropolarímetro JASCO J-815 del laboratorio de Biofísica Molecular, del Instituto de Física de São Carlos, de la Universidad de São Paulo. Se midió en el rango de UV-lejano (200 a 300 nm) usando una celda con 1 mm de paso óptico. Las muestras contenían Tris-HCl 50mM, pH 8,0, MgCl₂ 5 mM y concentraciones de proteínas de 5 y 10 μ M. Cada medición comprendió el promedio de 8 determinaciones de espectro. Los datos fueron determinados en términos de elipticidad observada, en unidades de miligrados.

2.11 Mediciones termodinámicas de la interacción proteína-ligando a través de microcalorimetría isoterma de titulación

En esta tesis se realizaron estudios de interacción de la unión de NAD(P) y 6PG a *Go6PGDH* y *Ec6PGDH*, en este último caso tanto las enzimas silvestre como mutantes. Previo a cada experimento las enzimas se purificaron por afinidad al tag de hexa histidina, y el que se eliminó por digestión proteolítica con la proteasa TEV. Las proteínas fueron re purificadas por filtración en gel, usando una columna preparativa 16/60 Sephacryl S-200 GE, lo que permitió por un lado, eliminar agregados e impurezas como también mudar la solución de solución inicial por 50 mM de HEPES pH 7,5 y 0,05 mM de TCEP, condición que resultó adecuada para los experimentos de ITC con *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*. El *stock* de ligandos fue diluido en la misma solución de purificación por exclusión molecular de las enzimas. Es muy relevante descartar cambios de entalpía dependientes de la interacción

de la solución en la celda y la solución en la jeringa a medida que se va realizando la titulación, por tal motivo tanto la celda como el inyector deben poseer la misma matriz analítica.

En la titulación de *Ec6PGDH* con 6PG, NADP y NAD la celda contuvo 13,5 μM , 22,5 μM y 20 μM de enzima, respectivamente. Las jeringas de inyección de muestra conteniendo 417 μM de 6PG, 500 μM de NADP y 1 mM de NAD en la misma solución de la proteína. En cada experimento fueron realizadas un total de 30 inyecciones de 8 μl de titulante en intervalos de 300 segundos. Para la titulación de ligandos con la mutante N33D de *Ec6PGDH* la celda contuvo 30 μM de la enzima para el caso de la titulación con NADP y 40 μM de enzima para la titulación con NAD, en una solución de 50 mM de Hepes pH 7,5 y 0,05 mM de TECP. La jeringa contuvo volúmenes de 800 μM de NADP y NAD para cada experimento. Para cada ligando se realizaron un total de 35 inyecciones de 8 μl de titulante en intervalos de 300 segundos.

En la titulación de la mutante N33D-K38A de la 6PGDH de *E. coli* con NADP. La celda contuvo 40 μM de proteína en una solución de 50 mM Hepes pH 7.5 y 0,05 mM de TCEP. La jeringa contenía 1 mM de NADP. Un total de 29 inyecciones de 9 μl de titulante fueron realizadas en un intervalo de 300 segundos.

2.12 Cristalización de *Go6PGDH*

Se ensayaron experimentos de cristalización de *Go6PGDH* en estado apo, y co-cristalización con NAD, 6PG y 3HIBA. El método utilizado fue difusión de vapor por gota sentada, con un volumen de 80 μl de solución madre en el reservorio y una mezcla de 0,8 μl de muestra por 0,8 μl de solución del reservorio de la gota. Se ensayaron 6 *kits* de cristalización, ensayando 3 concentraciones de proteína distintas, 5, 12 y 15 mg/ml. El crecimiento de los cristales fueron observadas al microscopio de luz y por medio de un seguimiento en línea hasta los 3 meses. La condición más favorable al crecimiento de cristales, se optimizó mediante la ampliación de la matriz de concentración del agente precipitante y sal. Se obtuvieron cristales de geometría hexagonal para la enzima en estado apo y en presencia de NAD y 6PG.

3. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

3.1. Búsqueda de secuencias homólogas a la familia 6PGDH

Con motivo de incluir organismos distintos a nivel taxonómico se realizó una búsqueda de homólogos de *Ec6PGDH* y de *Go6PGDH*, ambas proteínas parte de la superfamilia β -hidroxiácido deshidrogenasa con el programa blastp 2.2.22 utilizando la matriz de sustitución *BLOSUM62* [51], en la base de datos de secuencias no redundantes UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

La búsqueda se hizo teniendo en cuenta las diversas variantes de 6PGDH que presentaban distintos motivos en el loop β 2- α 2, además de la presencia de uno o dos hemidominios en la región C-terminal.

3.2. Alineamiento de secuencias

De las secuencias encontradas se eligió un total de 66 secuencias, no redundantes y ubicuas a todas las clases y representantes de los distintos grupos de especificidad. Dichas secuencias se alinearon usando el programa ClustalX 2.0.12 [52]. En primera instancia se creó un perfil estructural en base a un alineamiento de las estructuras de los PDBs 3FWN y 4E21. Contra el perfil estructural se alinearon un grupo de 10 secuencias de 6PGDH, con uno y dos hemidominios en la región C-terminal, generando un nuevo perfil de alineamiento. Las secuencias restantes fueron alineadas contra el perfil anterior, usando la matriz de sustitución *BLOSUM62* e iterando en cada paso del alineamiento. Finalmente se realizó un alineamiento múltiple para reordenar posiciones.

El alineamiento de secuencias generado, fue usado para la construcción de un árbol filogenético de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

3.3. Superposición y árbol estructural

Se hizo una búsqueda en la base de datos Protein Data bank de las estructuras clasificadas según SCOP como la familia de dominio C-terminal 6-fosfogluconato y 3-hidroxisobutirato deshidrogenasa (a.100.1.1). Para incluir estructuras que carecían de

clasificación pero que correspondían a la clasificación estructural según SCOP, se usó la función de búsqueda por similitud 3D [53]. Estructuras correspondientes a 6-fosfogluconato deshidrogenasas, 3-hidroxisobutirato deshidrogenasas, tartronato semialdehído reductasa, serina deshidrogenasa y β hidroxíácido deshidrogenasas sin caracterizar, fueron superpuestas usando el programa STAMP 1.2 [54] de multiseq 2.1 [55] integrado en el programa VMD 1.9.1 [56]. 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 (ecuación 5) para cada átomo de A con respecto a B en sus coordenadas cartesianas .

$$RMSD = \sqrt{\sum_i^n \frac{(X_{Ai}-X_{Bi})^2}{n} + \frac{(Y_{Ai}-Y_{Bi})^2}{n} + \frac{(Z_{Ai}-Z_{Bi})^2}{n}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

3.4. Construcción del árbol filogenético de la familia 6 fosfogluconato deshidrogenasa

Para la construcción de éste árbol filogenético se utilizó el programa Mr Bayes 3.2.0 [57] usando el modelo evolutivo WAG, un modelo empírico a partir de la comparación de un gran número de alineamientos de secuencias de proteínas solubles. Como archivo de entrada se usó un alineamiento de 63 taxás de 6-fosfogluconado buscadas y alineadas por las metodologías descritas previamente en 3.1 y 3.2. Se utilizó como grupo externo 3 secuencias de 3-hidroxisobutirato deshidrogenasas. Para la tasa de variación entre los sitios se asumió una distribución gama. El número de generaciones fue ajustado a 10 millones de árboles con una frecuencia de muestreo cada 1000 generaciones. Fueron descartados el 10% de los árboles generados.

3.5. Modelamiento por Homología de *Go6PGDH*

En la actualidad, no se encuentra la estructura cristalográfica de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Gluconobacter oxydans*, por tal motivo se utilizó la metodología de modelamiento por homología para obtener una representación tridimensional de esta.

Se usó como templado la estructura de 6 fosfogluconato deshidrogenasa de *Geobacter metallireducens* PDBid:4E21 (*Gm6PGDH*), enzima que presenta el mayor parentesco evolutivo a la *Go6PGDH* dentro de las 6PGDH encontradas en el PDB.

La estructura de *Gm6PGDH* carecía de densidad electrónica en la región C-terminal y en varios loops a lo largo de la proteína. Para obtener estas regiones se usó la función automodel de Modeller 9.11 que permitió completar la estructura además de modelar el tetrámero de esta enzima en presencia de ambos ligandos [53]. A pesar de esto, el extremo C-terminal del templado no quedó bien modelado, por lo que la siguiente estrategia fue construir un templado quimérico donde los dominios N y C terminales fueron tomados de la *Gm6PGDH* y la región terminal del dominio C-terminal fue tomada de la estructura cristalográfica de *E. coli* (PDBid: 3FWN). El porcentaje de identidad de *Go6PGDH* con *Gm6PGDH* es de 50% y el porcentaje de identidad de la región cola del dominio C-terminal de *Go6PGDH* con la misma región de *Ec6PGDH* es de un 39%.

Como alineamiento para la construcción del modelo se utilizó el generado para la construcción del árbol filogenético. Se usó la función automodel [58] para la generación de los modelos usando el templado quimérico *Ec6PGDH* y *Gm6PGDH*. Los modelos fueron evaluados mediante los servidores web ProSA [59] y Verify 3D[60]. Se modeló el dímero que mantiene contribución inter cadenas entre ellos, con el motivo de disminuir el computo para las simulaciones moleculares. El tetrámero fue reconstruido por medio de superposición estructural con el PDBid 4E21 y fue minimizado usando el campo de fuerza GROMOS presente en el programa Swisspdb viewer [61].

3.6. Docking molecular

El acoplamiento molecular o *docking* constituye una herramienta que permite modelar la interacción proteína-ligando. En este trabajo de tesis se realizó el acoplamiento de los ligandos NAD/NADP, 6PG y 3HIBA al modelo generado de *Go6PGDH*. Para esto se usó el programa autock Vina [62]. Por medio del programa autodock tools el modelo de *Go6PGDH* se le agregó hidrógenos y se guardó en un formato apto para las simulaciones de *docking*. Para cada ligando se generó una grilla que permite hacer un posicionamiento inicial de los ligandos y que delimita el espacio de interacción posible entre las moléculas

y la proteína. Como no es posible realizar un *docking* de más de un ligando a la vez, se acopló primero los β HA y luego los dinucleótidos. Las conformaciones obtenidas se analizaron por medio del *software* Pymol y se seleccionaron los ligandos que presentaron una coordinación con energías de interacción favorables. En un mismo PDB se incluyó el modelo por homología de *Go6PGDH* y los ligandos acoplados en el proceso. Se calcularon las distancias de interacción de aminoácidos importantes con los ligandos posicionados a través del programa VMD.

3.7. Dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular, que permiten calcular las contribuciones de energías de enlace, ángulos, diedros, van der *waalls* y coulombicas en un sistema proteico, así se pueden estudiar las interacciones entre *Go6PGDH* y 6PG y NAD durante un determinado tiempo. Se usó el programa NAMD 2.9 [63] utilizando el campo de fuerza AMBER para lípido y proteínas, y el modelo TIP3P para las moléculas de agua del sistema. El sistema de simulación consiste en el dímero de *Go6PGDH* que presenta en uno de los sitios activos las moléculas de 6PG y NAD acopladas previamente por *docking* molecular, adicional a esto, se posicionaron moléculas de Na^+ que permitieron equilibrar las carga neta del sistema [64], el que fue simulado en una caja de moléculas de agua. Para mantener el sistema estable e impedir la exclusión de átomos producto de la simulación, se impusieron condiciones periódicas de borde, que permite replicar el sistema en todas las direcciones. Esto significa que si producto de la simulación una molécula sale del sistema espacial, es posible incorporarla por el extremo opuesto, permitiendo mantener el sistema estable durante toda la simulación.

Previo a realizar las dinámicas el sistema fue minimizado. Este proceso corresponde a la búsqueda de la conformación que sea más estable, haciendo que la energía entre los átomos sea la menor posible. Posteriormente, el equilibrado tiene como objetivo llevar al sistema a una temperatura constante de 300 K. Se realizaron 5000 pasos de minimización y de equilibrado, finalmente el sistema fue simulado durante 10 nanosegundos.

Se analizaron los cambios estructurales que fue adoptando la proteína y los dominios de esta durante el transcurso de la simulación por medio del cálculo de RMSD. Se calculó

adicionalmente el RMSD de los ligandos durante el transcurso de la dinámica. Se analizó la formación de puentes de hidrógeno entre la proteína, 6PG y NAD, para esto se recurrió a la extensión de VMD Hbonds 1.2, además de utilizar un script en lenguaje Tcl/Tk facilitado por un colaborador que permitió determinar y cuantificar los puentes de hidrógeno por residuo durante la trayectoria de la dinámica molecular. Se consideraron los puentes de hidrógeno directos que se forman entre dos átomos a una distancia menor o igual a 3.2 Å y un ángulo inferior a 60° entre el donante y el aceptor del hidrógeno.

RESULTADOS

Capítulo I

EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE LA FAMILIA 6PGDH

1. Análisis estructural de *Gm6PGDH*

SCOP define a la superfamilia a.100.1 “dominio C-terminal tipo 6-fosfogluconato deshidrogenasa” como enzimas que presentan un dominio N-terminal de plegamiento tipo Rossmann y un dominio C-terminal helicoidal que varía en arquitectura dependiendo del tipo de familia SCOP. Dentro de las familias de a.100.1 se encuentra la familia a.100.1.1 “dominio C-terminal 3-hidroxisobutirato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa”. Se buscó en el PDB las estructuras pertenecientes a esta familia considerando la definición estricta de SCOP (Tabla 3). La estructura de la 6PGDH putativa de *Geobacter metallireducens* (PDBid: 4E21), a pesar de poseer una arquitectura similar a las 3HIBADH, sus elementos de estructura secundaria en el dominio C-terminal se disponen de manera distinta. En la figura 12 se muestra la estructura de *Gm6PGDH* y las interfaces de interacción entre los hemidominios de cada cadena, los cuales conforman un dímero y un tetrámero. La interfaz donde se establece la interacción entre dos subunidades, está dada por la asociación de los hemidominios complementarios rojo y azul (Figura 12, B), formando un dímero. La interfaz de asociación entre los pares de hemidominios complementarios rojo-azul y naranja-gris forman un tetrámero (figura 12, A). Si se superponen los dominios helicoidales de subunidades adyacentes de *Gm6PGDH* (cadena roja y azul) con el dominio C-terminal de *Ec6PGDH*, coloreada en verde (figura 12, D), es posible comprender que los hemidominios del dímero complementario de la enzima de *G. metallireducens* son equivalentes al dominio C-terminal duplicado de una cadena de *Ec6PGDH*. Este dominio posee una arquitectura simétrica, siendo uno de los ejes de simetría, el centro de las primeras alfa hélices de cada hemidominio C-terminal.

Las estructuras de las 6PGDHs de dos hemidominios, 3HIBADHs y *Gm6PGDH*, se diseccionaron en sus respectivos dominios N-terminal y hemidominios C-terminal. En la

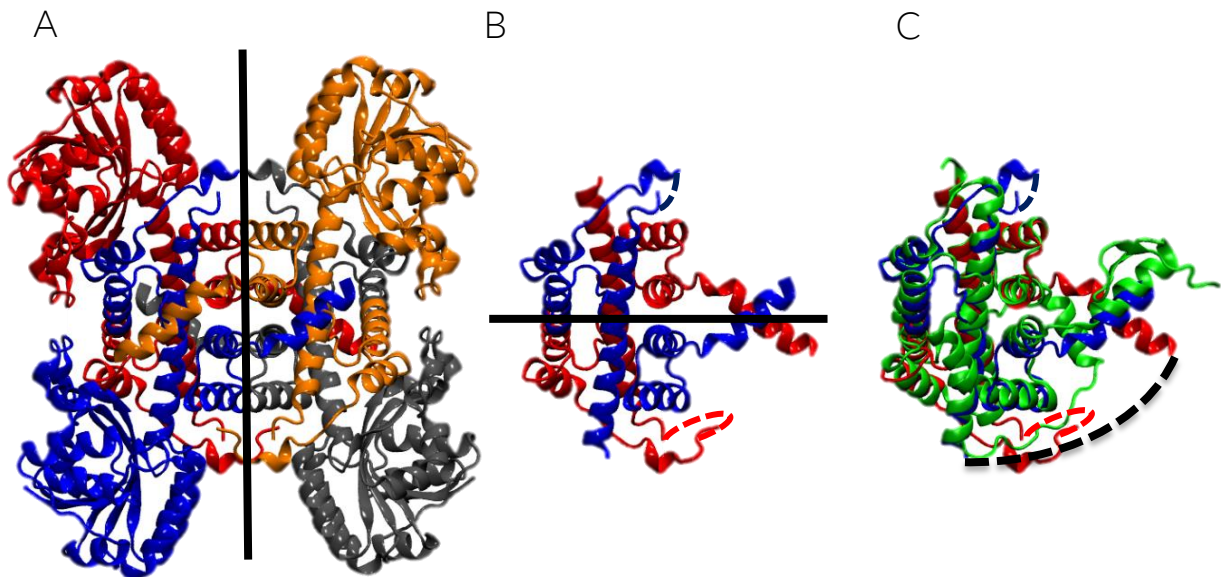


Figura 12. Empacamiento de hemidominios de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*. (A) 6PGDH de *Geobacter metallireducens* (PDBid: 4E21), estructura tetramérica coloreada por subunidades. El eje vertical representa la interfaz de dímeros complementarios (rojo-azul y gris-naranja). (B) Dominios helicoidales complementarios de las subunidades roja y azul de *Gm6PGDH*. El eje horizontal representa uno de los ejes de simetría y la interfaz dada entre los hemidominios complementarios. En líneas punteadas azul y rojo se completan los loops en que hay ausencia de densidad electrónica. (C) Superposición estructural de hemidominios complementarios de *Gm6PGDH* con el dominio helicoidal de una cadena de *Ec6PGDH*. En línea punteada negra se esquematiza la unión de los hemidominios rojo y azul, simbolizando el evento de duplicación-fusión.

figura 13 A, se muestra la superposición estructural de *Ec6PGDH*, *Gm6PGDH* y *Hs3HIBADH*, como representantes del resto de las estructuras de la superfamilia. En el dominio de plegamiento tipo Rossmann, las 6PGDHs presentan elementos estructurales que interactúan con el hemidominio de la subunidad complementaria, para el caso de un dímero de *Gm6PGDH* (en cuadrado resaltado, interacción naranja-naranja), y con el segundo hemidominio de *Ec6PGDH*, aunque, en menor medida (en cuadrado resaltado, interacción verde-negro). Al superponer el primer hemidominio del dominio C-terminal de *Ec6PGDH* con los dominios C-terminales de la *Hs3HIBADH* y *Gm6PGDH* se ve una correspondencia estructural, salvo hasta la última alfa hélice (figura 13B). La alfa hélice terminal de las 3HIBADHs se disponen hacia el eje de simetría y centro del dominio C-terminal. Las alfas hélices terminales del primer hemidominio de *Gm6PGDH* y del dominio C-terminal de *Ec6PGDH*, en cambio, se disponen distales del centro o eje de simetría del dominio C-terminal. Al superponer el segundo hemidominio del dominio C-terminal de *Ec6PGDH* con los dominios C-terminales de las otras β HADHs (figura 13C), se aprecia que *Hs3HIBADH* carece de una región terminal prolongada y dispuesta de forma desempacada del centro del dominio helicoidal, como sí ocurre con las 6PGDHs, no importando en éstas si poseen uno o dos hemidominios en el dominio C-terminal. Se observa que la alfa hélice terminal de *Ec6PGDH* se prolonga más que la región C-terminal de *Gm6PGDH*, debido a que esta última carece de densidad electrónica en su estructura cristalográfica.

2. Análisis filogenético y de motivos conservados en la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa

2.1. Búsqueda de estructuras, alineamiento y árbol estructural de la familia SCOP a.100.1.1

Las estructuras de la familia SCOP a.100.1.1 (Proteínas con dominio C-terminal 3-hidroxisobutirato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa) corresponde justamente a la superfamilia β -hidroxiácido deshidrogenasa denominada en 1996 por *Hawes y cols* [13]. Estos autores establecieron relaciones para estas proteínas sólo en base

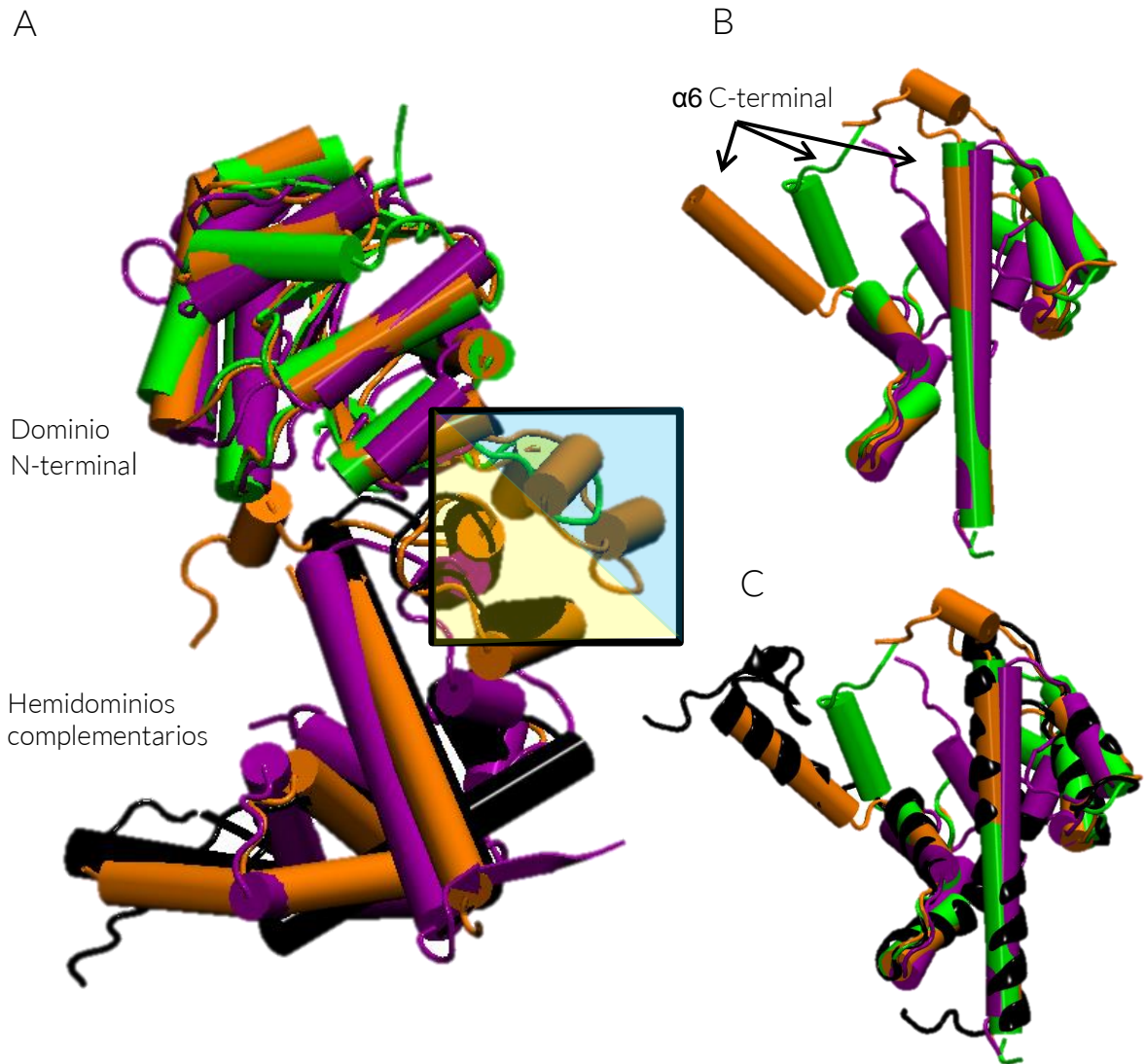


Figura 13. Superposición estructural de dominios de *Hs3HIBADH*, *Gm6PGDH* y *Ec6PGDH*. (A) Se representa una superposición en *cartoon* de los dominios N-terminal y hemidominios complementarios de *Ec6PGDH* (verde el dominio N-terminal; negro el hemidominio complementario), de *Gm6PGDH* (naranja) y de *Hs3HIBADH* (morado). En el cuadrado, se resalta la interacción interdominios que ocurre en las 6PGDHs entre elementos de estructura provenientes del dominio N-terminal (región sombreada azul), con elementos del hemidominio complementario (región sombreada amarillo). (B) Superposición estructural del primer hemidominio del dominio C-terminal de *Ec6PGDH* (verde) con el hemidominio helicoidal de *Hs3HIBADH* (morado) y de *Gm6PGDH* (naranja). (C) Superposición de los elementos estructurales de (B) con el segundo hemidominio de *Ec6PGDH*, representado en *new cartoon* negro.

a alineamientos de secuencia aminoacídica y relacionando las funciones enzimáticas. La característica común del bolsillo de unión a 6PG en las 6PGDHs, es la presencia de una lisina importante para el mecanismo de oxidación del β HA [8, 10, 37], tal cual se describe en la introducción. Con el objetivo de observar características estructurales que distinguen a las enzimas pertenecientes a la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa dentro de la superfamilia β -hidroxiácido deshidrogenasa y a los caracteres que confieren la especificidad por los cofactores NAD o NADP en esa familia, se realizó una búsqueda de estructuras pertenecientes a la superfamilia β HADHs.

Además de la clasificación SCOP, se usó la función 3D similarity presente en la base de datos del Protein Data Bank, con el motivo de encontrar proteínas homólogas a la familia a.100.1.1 que no se encuentran catalogadas en SCOP [53]. En la tabla 3, se muestran los resultados de la búsqueda, clasificados según la función enzimática otorgada por los autores del PDB, el organismo al que pertenecen, si tiene o no cofactor como ligando cristalográfico y la secuencia en el loop β 2- α 2. Las enzimas denominadas como 6-fosfogluconato deshidrogenasa, son las únicas que poseen uno (resaltado en amarillo) o dos (resaltado en verde) hemidominios helicoidales en la región C-terminal. Interesantemente, las enzimas en amarillo corresponden a un grupo de enzimas que no han sido enzimáticamente caracterizados, por lo tanto no se sabe si efectivamente corresponden a 6PGDH como fueron denominadas por los autores del PDB, o bien pueden oxidar otro β HA. Las 6PGDHs resaltadas en verde, por otro lado, son enzimas estructural y cinéticamente bien caracterizadas, todas tienen presente el motivo estructural NRX₃K, esto se correlaciona con la fuerte preferencia por NADP que ellas ostentan. En el caso de las 6PGDHs de *Homo sapiens*, *Escherichia coli* y *Ovis aries*, se ha reportado su estructura cristalográfica en presencia de NADP(H) o ATR (molécula de NADP sin la región nicotinamida).

Se realizó un alineamiento estructural de las proteínas representadas en la tabla 3. De cada estructura de la tabla se trabajó sólo con la cadena A. En el caso de las 6PGDHs cuyo dominio C-terminal se encuentra constituido por dos hemidominios, se truncaron de tal manera de dejar todas las enzimas con sólo el primer hemidominio. En la figura 14, se representa el árbol de semejanza estructural a partir de la superposición de estructuras de la

superfamilia β HADH, usando como grupo externo la enzima propanoato deshidrogenasa (familia SCOP a.100.1.10, rama roja). De las estructuras putativamente asignadas como 6PGDHs, resaltadas en amarillo en la tabla 3, sólo la 6PGDH de *Geobacter metallireducens* agrupa más próxima con las 6PGDH de 2 hemidominios (rama azul). A pesar de esto, en el loop β 2- α 2 no está presente el patrón de secuencia NRX₃K.

Para cada rama principal se muestra el alineamiento de los residuos en la hélice α 1 del primer hemidominio, involucrados en la oxidación del β hidroxilado, especificados como motivo catalítico en la introducción. Lisina es un aminoácido estrictamente conservado en la superfamilia β HADH, que participa del mecanismo de oxidación del hidroxilo ubicado en el carbono tres de los diversos β hidroxilados. Las ramas amarilla, verde y celeste no logran diferenciarse como clados específicos de acuerdo a la función enzimática reportada por los autores PDB. La rama 6PGDH se logra definir por la presencia de un ácido glutámico siete residuos río abajo de la lisina. En la figura 14 se muestran los 2 eventos estructurales que acompañan el origen de la especificidad de 6PG por sobre otros β HA. El primer evento (nodo circular de color rojo) da origen a la familia 6PGDH por medio de la aparición de residuos como el ácido glutámico en el motivo catalítico y la extensión del

Función denominada PDB	PDB	Organismo	Ligando en cristal	Motivo	Publicación
3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3G00	<i>Salmonella typhimurium</i>		DLNPGA	-
3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3PDU	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	NADP	NRNPAK	-
3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	219P	<i>Homo sapiens</i>	NAD	DVFPDA	-
3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	2CVZ	<i>thermus thermophilus HB8</i>	NADP	NRTFEK	(2005) J.Mol.Biol. 352: 905-917
Tartronate semialdehyde reductase	1VPD	<i>Salmonella typhimurium</i>		DRNPEA	(2009) J Struct Funct Genomics 10: 249-253
L-Serine dehydrogenase	3CKY	<i>Eubacterium barkeri</i>		DLMEAN	(2008) J.Mol.Biol. 382: 802-811
L-Serine dehydrogenase	3OBB	<i>pseudomonas aeruginosa</i>		DLVQSA	(2012) J.Biol.Chem. 287: 1874-1883
Oxidoreductase	3L6D	<i>Pseudomonas putida</i>		NRSPGK	-
b-Hydroxyacid dehydrogenase	1136	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	NAP	GRSPS	-
Oxidoreductase	3QHA	<i>Mycobacterium avium 104</i>		DIRIEA	-
6-phosphogluconate dehydrogenase	4GBJ	<i>Dyadobacter fermentans</i>		NRTASK	-
6-phosphogluconate dehydrogenase	4E21	<i>Geobacter metallireducens</i>		DLNVNA	-
6-phosphogluconate dehydrogenase	3QSG	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>		DAASA	-
6-phosphogluconate dehydrogenase	4GWK	<i>Homo sapiens</i>		NRTVSK	(2012) Cancer Cell 22: 585-600
6-phosphogluconate dehydrogenase	2JKV	<i>Homo sapiens</i>	NADP	NRTVSK	(2012) Cancer Cell 22: 585-600
6-phosphogluconate dehydrogenase	2ZYG	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		NRSREK	(2009) J.Struct.Biol.
6-phosphogluconate dehydrogenase	3FWN	<i>Escherichia coli</i>	ATR	NRSREK	(2009) J.Struct.Biol.
6-phosphogluconate dehydrogenase	2ZYA	<i>Escherichia coli</i>		NRSREK	(2009) J.Struct.Biol.
6-phosphogluconate dehydrogenase	1PGJ	<i>Trypanosoma brucei</i>		NRTYSK	(1998) J.Mol.Biol. 282: 667-681
6-phosphogluconate dehydrogenase	2IYO	<i>Lactococcus lactis</i>		NRTTSK	(2007) FEBS J. 274: 275
6-phosphogluconate dehydrogenase	2W90	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>		NRLREK	(2009) Acta Crystallogr., Sect.F 65: 450
6-phosphogluconate dehydrogenase	2P4Q	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		NRTQSK	(2007) Bmc Struct.Biol. 7: 38-38
6-phosphogluconate dehydrogenase	1PGO	<i>Ovis aries</i>	NADPH	NRTVSK	(1994) Structure 2: 651-668
6-phosphogluconate dehydrogenase	1PGP	<i>Ovis aries</i>		NRTVSK	(1994) Structure 2: 651-668

Tabla 3. Estructuras encontradas en el PDB de la superfamilia β HADH. Por cada estructura se representa el nombre designado por los autores (en amarillo se representan las 6PGDHs putativas de un hemidominio, en verde aquellas de dos hemidominios), el código PDB, organismo, presencia de NAD(P) en la estructura cristalográfica y el motivo en el loop β 2- α 2.

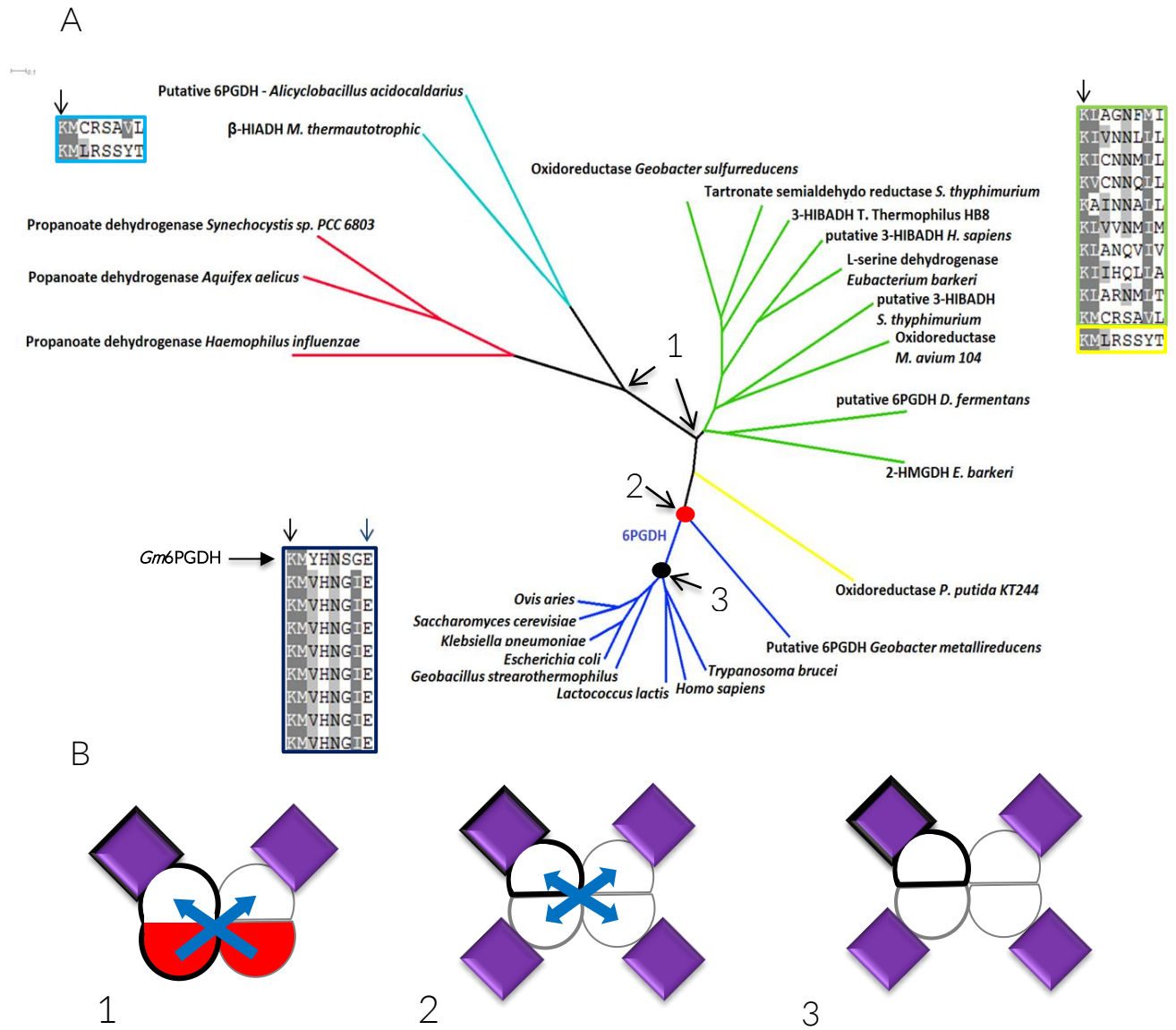


Figura 14. Árbol estructural de la superfamilia β HADH y estados. (A) La rama azul representa las 6 fosfogluconato deshidrogenasa. Otros colores representan las ramas principales del dendograma. Para algunas ramas se muestra un alineamiento de residuos conservados presentes en el sitio activo. La lisina (señalada por flechas negras) es ubicua a todos los miembros de la superfamilia. El ácido glutámico (señalado por flecha azul) está solo presente en las 6PGDHs incluyendo *Gm6PGDH*. Como grupo externo se usó a las propanoato dehidrogenasa (rama roja) pertenecientes a la superfamilia SCOP a.100.1. En los nodos rojo y negro se mapean los dos principales eventos evolutivos-estructurales de la familia 6PGDH. (B) En números se señalan los 3 estados estructurales de la superfamilia β HADH y las respectivas estructuras oligoméricas, en ellas se representan esquemáticamente el dominio N-terminal (cuadrados morados) y los hemidominios del dominio C-terminal (semicírculos blancos y rojos representan hemidominios simples y duplicados, respectivamente). El contorno negro define la subunidad de una estructura oligomérica. Las flechas azules corresponden a la contribución intersubunitaria de residuos de hemidominios adyacentes en el sitio activo de una subunidad.

hemidominio de cada subunidad, cuyos residuos lograrían interactuar con el sitio activo adyacente. El segundo evento (nodo circular de color negro) corresponde a la duplicación del hemidominio C-terminal, conformando así 6PGDH de carácter dimérico como la *Ec6PGDH*. Por lo tanto, la familia 6PGDH que es parte de la superfamilia β HADH, está conformada por dos subfamilias, la subfamilia de 6PGDH de dominio C-terminal con un hemidominio y la subfamilia 6PGDH de hemidominio duplicado.

2.2 Análisis filogenético de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa

Para el estudio evolutivo de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa se usó el programa Mr. Bayes 3.2.0. Se realizó un alineamiento de secuencias de 66 taxas, el cual sirvió de archivo de entrada para generar el árbol filogenético mediante inferencia bayesiana. Se usó como grupo externo, las 3-Hidroxisobutirato deshidrogenasas, con el fin de enraizar el árbol.

En el árbol, filogenético de la figura 15 el ancestro ya poseería la extensión del C-terminal. La primera bifurcación corresponde al evento de duplicación del hemidominio helicoidal C-terminal, lo que implicó que algunas 6PGDHs pasaran de ser tetrámeros, como el resto de las β HADHs, a dímeros, cuya conformación oligomérica es propia de esta subfamilia dentro de la superfamilia. En cada rama principal se puede, a su vez, evidenciar la segregación en ramas secundarias correlacionadas con motivos de secuencia en el loop β 2- α 2 representados en el alineamiento a la derecha de la figura. El motivo NRX₃K cuyos residuos positivos permiten interactuar con el 2'-fosfato de la región adenina-ribosa del NADP, y el motivo D[V/L]X₃A que en ausencia de residuos positivos probablemente indique falta de preferencia por tal cofactor. De acuerdo con las taxas de la rama 1 (figura 15) la duplicación del hemidominio helicoidal es observada en eucariontes y bacterias. En la rama 2, de representantes de sólo un hemidominio en la región C-terminal, encontramos sólo enzimas pertenecientes a bacterias. En la rama 4, cuyo hemidominio fue duplicado, las enzimas poseen un motivo DVX₃N y corresponden sólo a organismos del reino *Fungi*. La hipótesis más parsimoniosa sugiere que el motivo ancestral habría correspondido a uno que no posee R y K y por lo tanto, no habría discriminado por el uso de NADP.

Un aspecto interesante de la familia 6PGDH, es la presencia de distintas isoenzimas en un mismo organismo. Las bacterias de *Bacillus megaterium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Methylobacillus flagellatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus anthracis*, *Streptomyces avermitilis*, poseen 6PGDHs de uno y dos hemidominio, con motivos D[V/L]X₃A y NRX₃K, respectivamente. Esto se puede correlacionar a los estudios realizados para algunas de las especies mencionadas [38-44], en donde se reportaron caracterizaciones bioquímicas de isoenzimas de alto y bajo peso molecular en un mismo organismo y que diferían en cuanto a la actividad específica por cofactor. La subdivisión de enzimas de un sólo hemidominio con motivo NRX₃K, solo se encontrarían presente en las especies de la rama 5. Con respecto a enzimas del reino *Fungi*, que son parte de la sub rama de enzimas de hemidominios duplicados y con un motivo DVX₃N en el loop β 2- α 2, provienen de especies como *Emericella nidulans*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae* y *Trichophyton tonsurans* que también poseen isoenzimas de hemidominio duplicado con motivo NRX₃K (rama 3, figura 15). En el caso de *Metarhizium acridum*, interesantemente posee una 6PGDH con un sólo hemidominio, con un motivo de DVX₃A (enzima no incluida en el árbol) y dos enzimas con hemidominios duplicados, de motivos putativos de unión para NADP y NAD (rama 3 y 4, respetivamente).

Las 6PGDHs pertenecientes a plantas se dividen en dos ramas, ambas de hemidominios duplicados con el motivo NRX₃K, en una rama se encuentran las 6PGDHs de plastidios y en otra rama se encuentran 6PGDHs citosólicas. Un ejemplo de esto ya fue reportado filogenéticamente y constituye una evidencia de endosimbiosis [66].

A partir de estos resultados decidimos estudiar un representante bacteriano de cada subfamilia: En el caso de las de hemidominio duplicado, la enzima de *E. coli*, aunque presenta estructura conocida, su caracterización por la preferencia de cofactores es incompleta, (aunque se le considere específica por NADP). En el caso de las de un hemidominio, la enzima de *Go6PGDH* aunque se ha demostrado por caracterización cinética que es preferente por NAD, no se ha estudiado estructuralmente, para ella ni para ningún representante de la subfamilia, la interacción con sus sustratos en el sitio activo.

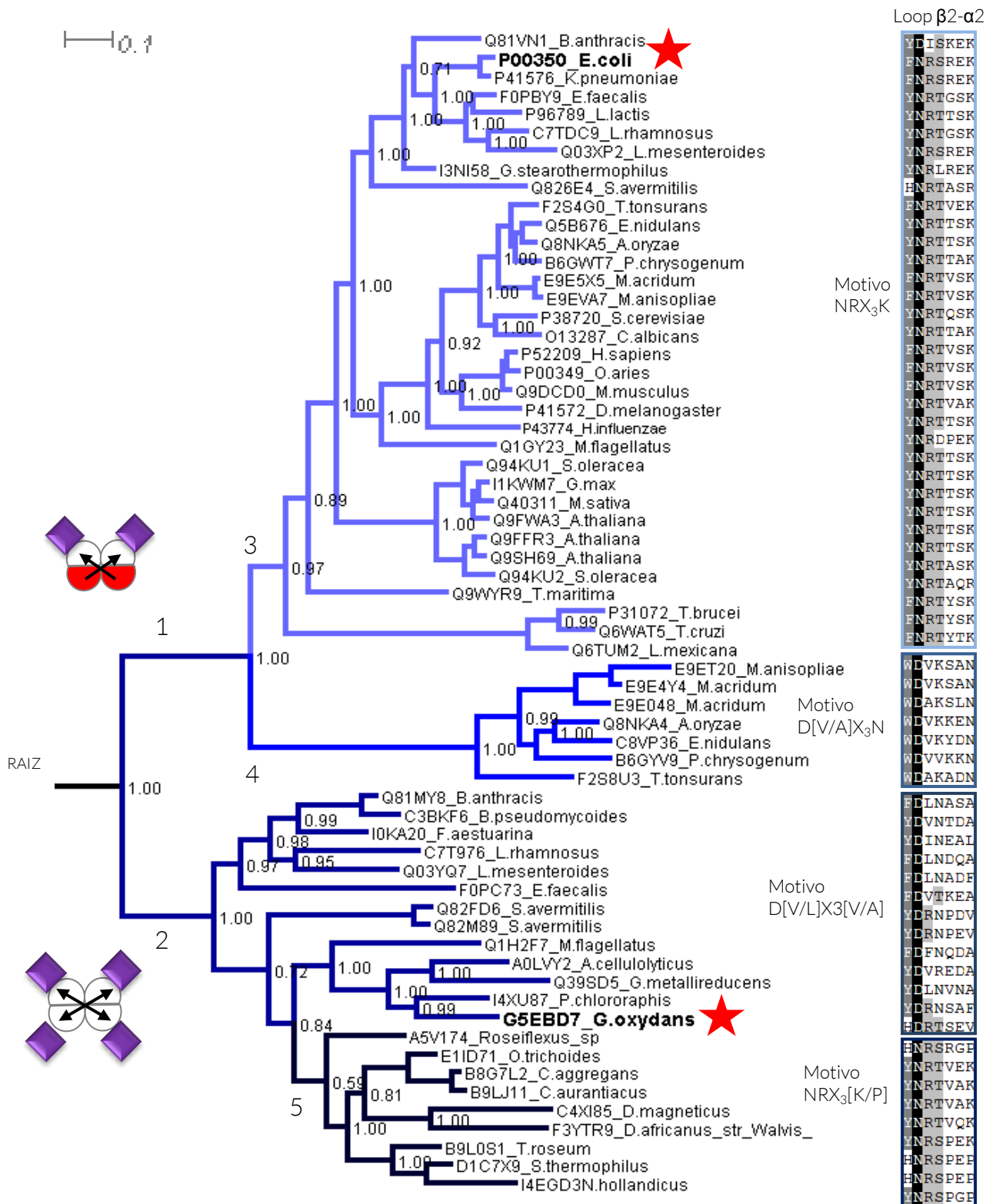


Figura 15. Árbol filogenético de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa. 3-hidroxi isobutirato deshidrogenasa fue usado como grupo externo enraizante (Rama Negra). La familia 6 fosfogluconato deshidrogenasa está dividida en dos ramas principales, aquellas que poseen un hemidominio duplicado (rama 1) y aquellas que no lo presentan (rama 2). Dentro de cada rama es posible observar ramas subdivididas de acuerdo a la presencia de los motivos NRX_3K y $D[V/A]X_3A$ en el loop $\beta 2-\alpha 2$. (ramas celeste, azul claro, azul y azul oscuro). Las estrellas rojas representan los dos miembros de las 6PGDHs estudiadas en este trabajo de tesis.

Capítulo II

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y GENERACIÓN DE MUTANTES DE Ec6PGDH Y Go6PGDH

Acorde a los resultados filogenéticos obtenidos, las 6PGDHs de *E. coli* y *G. oxydans*, fueron los casos de estudio escogidos, en donde es posible evaluar la conformación del bolsillo de unión a 6PG y las especificidades por dinucleótidos. Se hace entonces necesario expresar y purificar enzimas estables para obtener resultados en dicha dirección.

1. Subclonamiento de Go6PGDH, Ec6PGDH y mutagénesis sitio dirigida de Ec6PGDH

El gen *gox1705* correspondiente a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Gluconobacter oxydans* fue subclonado en el vector pET-TEV. El tamaño del gen está en torno a las 1000 pb, el extremo 5' del gen fue empalmado en correcto marco de lectura con una región codificante para hexa histidinas, y un sitio de corte para la proteasa TEV, entre la región codificante para la proteína y la secuencia de seis histidinas. Una vez obtenido el clon positivo, se envió una muestra de 5 ng/μl de ADN plasmidial en 15 a 20 μl a secuenciar a MacroGen™, para observar el resultado del empalme y desechar la presencia de mutaciones espúreas. En la figura 16 se documentan las etapas de amplificación de *gox1705* del vector original, subclonamiento en el vector intermediario pBluescriptII y luego escisión del fragmento desde el vector del subclonamiento hasta la ligación en el vector pET-TEV.

Usando los procedimientos descritos en Materiales y Métodos sección 1.5, se obtuvo las mutantes N33D, N33D-K38A y N33D-R34V-K38A de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Escherichia coli*. Los plasmidios mutantes fueron secuenciados por MacroGen™. En la figura 17 se muestran los resultados de secuenciación en los codones mutados.

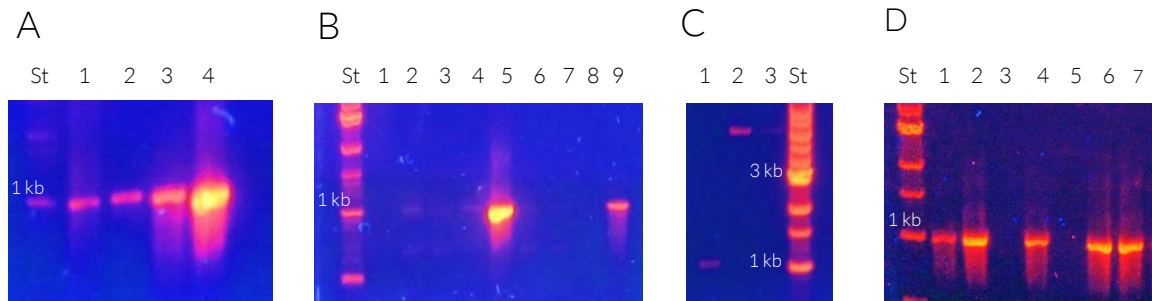


Figura 16. Subclonamiento de *Go6PGDH* (A) PCR Clonamiento *gox1705* desde vector pASK-3iba (carril 4), carril 1 2 y 3 Control corresponden a control positivo. (B) PCR de colonias con ligación *gox1705* con PBS, carril 9 control positivo. (C) carril 1 *gox1705* ligado desde vector PBS con y escindido con NdeI y XhoI, carril 2 y 3 vector pET-TEV escindido con NdeI y XhoI. (D) Carril 2-7 PCR colonia con ligación pET-TEV con *Gox1705*, carril 1 control positivo *Gox1704*.

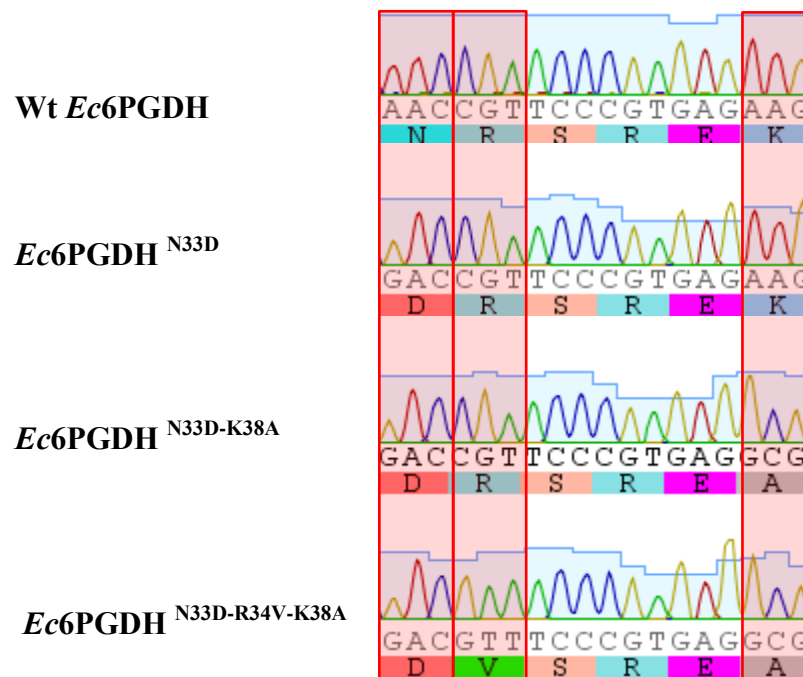


Figura 17. Cromatograma de secuenciación para las mutantes de *Ec6PGDH* N33D, N33D-K38A y N33D-R34V-K38A. Se muestran los cromatogramas de secuenciación en la región del loop $\beta 2$ - $\alpha 2$ para cada mutante (simple, doble, triple) y de la proteína silvestre. En rectángulos rojos se resaltan los aminoácidos mutagenizados.

2. Purificación y eliminación del tag de histidina de *Go6PGDH* y *Ec6PGDH*

2.1 Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

La proteasa TEV fue purificada a homogeneidad usando como sistema de expresión el vector pET-TEV y una columna cromatográfica por afinidad a histidina. Se tomó la precaución de usar, en cada paso de purificación, 5 mM de β mercaptoetanol debido al contenido de cisteínas tanto en el sitio activo como expuestas a solvente de la proteasa. La enzima (1 mg/ml) se conservó a -80°C a en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, 100 mM de NaCl, 1mM de TCEP y 50% de glicerol. En la figura 18C se muestra un gel SDS-PAGE con las etapas de purificación. Se usó una elución en gradiente de imidazol, observándose siempre dos picos cromatográficos correspondientes a la proteasa TEV, el primero en presencia de impurezas de pesos moleculares superiores e inferiores, en el segundo pico se evidenció la elución de la proteasa TEV sin las impurezas antes mencionadas.

La enzimas *Go6PGDH* y *Ec6PGDH* variante silvestre y mutantes, también fueron sobreexpresadas en el vector pET-TEV de manera que la secuencia de hexa-histidinas que permite purificar las proteínas producidas puede ser removida por digestión con la proteasa TEV. A partir de 1 a 2L de cultivo, se obtiene cerca de 100 mg de extracto de proteína total, los que fueron cargados por la columna de afinidad y lavados con 10 volúmenes de 40 mM imidazol. La elución se realizó en gradiente de concentración de imidazol (40 a 500 mM de imidazol) o por etapas, en la que se eluye proteína a concentraciones discretas de imidazol. Las 6PGDHs de *E. coli* y *G. oxydans* eluyen a 250 mM de imidazol. En la figura 18.A se muestran los resultados de purificación de la enzima *Ec6PGDH*, en los carriles se aprecian las distintas etapas del procedimiento, contiguo al gel se muestran los eluidos de las enzimas mutantes N33D, N33D-K38A-R34V, purificadas a homogeneidad. En la figura 18 B se representa un gel de purificación de la enzima 6PGDH de *G. oxydans*.

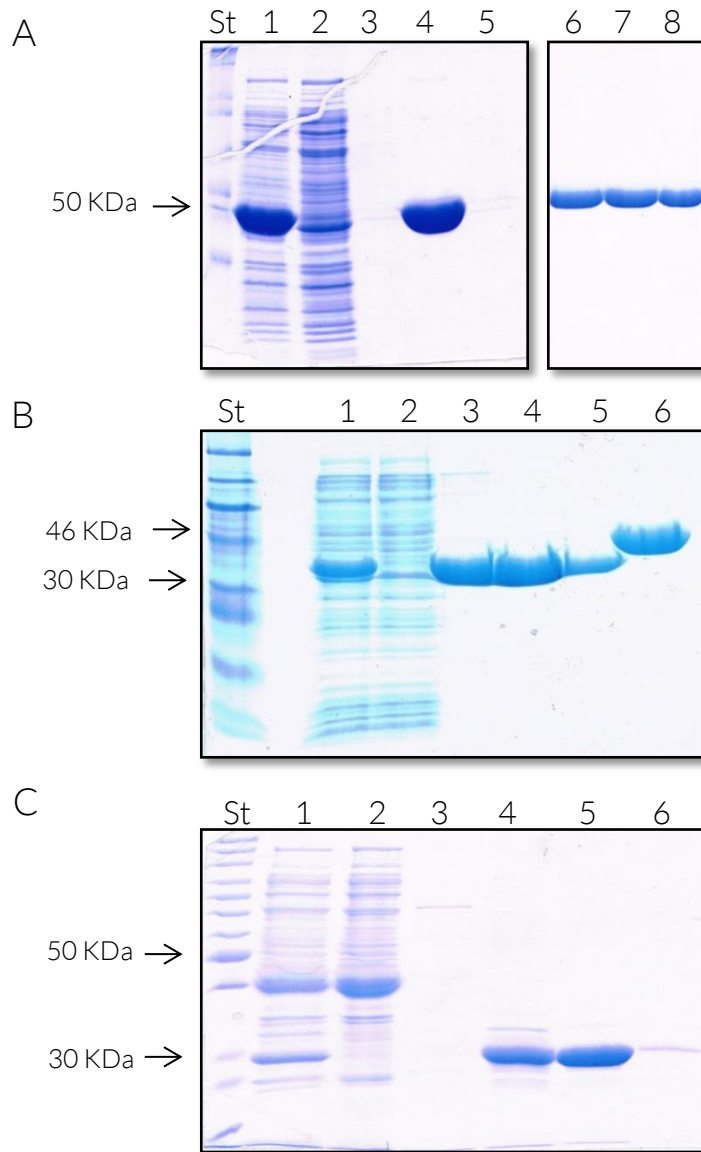


Figura 18. Purificación de *Go6PGDH* y *Ec6PGDH* silvestre y mutantes. (A) Gel de purificación de *Ec6PGDH* proteínas silvestre y mutantes. Carriles: (St) Estándar de peso molecular Biosanda 10-200 KDa. (1) Extracto crudo. (2) Frente de columna de purificación. (3) Lavado 40 mM de Imidazol. (4) Elución de *Ec6PGDH* (5) Lavado 500 mM Imidazol. (6) Elución *Ec6PGDH* N33D (7) Elución *Ec6PGDH* N33D-K38A (8) Elución de *Ec6PGDH* N33D-R34V-K38A. (B) Gel de purificación de *Go6PGDH*. Carriles: (St) Estándar de peso molecular Biolabs P77085. (1) Extracto crudo. (2) Frente de columna. (3) Elución 40 mM de imidazol. (4) Elución 50 mM de imidazol. (5) Lavado 500 mM Imidazol. (6) *Ec6PGDH* (C) Gel de purificación proteasa TEV.(St) Estándar de peso molecular Biosonda 10-200 Kda. (1) Extracto crudo. (2) Frente de corrida. (3) Lavado 40 mM de imidazol. (4) Primer peak de elución de TEV (5) Segundo peak de elución de TEV. (6) Lavado de 500 mM de imidazol.

Para evaluar el efecto de las mutaciones en la estructura secundaria se comparó los espectros de dicroísmo circular de las 6PGDHs de *G. oxydans* y *E. coli*, silvestre y mutantes (figura 19). Los espectros de las mutantes muestran que no se producen alteraciones en el contenido de la estructura secundaria de las proteínas mutantes con respecto a la proteína silvestre. Los espectros de *Go6PGDH* y *Ec6PGDH* difieren, debido al menor contenido de estructura helicoidal por mol de la primera enzima, disminuyendo la señal característica para alfas hélices en los mínimos a 208 y 220 nm. En paralelo se analizó la estabilidad estructural de la mutante triple y las enzimas silvestres de *E. coli* y *G. oxydans* por medio del seguimiento del dicroísmo circular a 220 nm al aplicar una rampa de temperatura 2°C/min. Esto permite hacer un seguimiento de la estructura secundaria de la proteína, en un rango de temperatura de 25 a 90 °C. Para un experimento que representa el promedio de 8 mediciones se determinó una Tm de 59 °C para la 6PGDH de *E. coli*. La mutante triple N33D-R34V-K38A de *Ec6PGDH* mostró una Tm de 58°C. Por su lado, la enzima de *G. oxydans* cuya Tm fue de 65°C (figura 20), la observación de 4 posibles estados podrían indicar un caso de desplegamiento y disociación más complejo debido al estado oligomérico.

2.2 Ensayos de corte con proteasa TEV

Se realizaron en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM de TCEP, EDTA 0,5 mM en un volumen final de reacción de 45 ml. Se utilizaron distintas proporciones de sustrato y enzima a tres temperaturas y tres tiempos de reacción. Se realizó un *western blot* utilizando Ni⁺² - NTA-HRP, que identifica al tag de histidina de *Ec6PGDH*, para cuantificar el proceso de corte. Se cuantificó la eficiencia de corte usando el programa ImageJ. La primera observación es que a 4°C la reacción es más lenta que a 20 y 30°C sin encontrarse notables diferencias entre ellas, a 20°C se observó menos agregación de proteína cortada por la proteasa TEV. A cuatro horas de reacción a temperatura ambiente ya casi la totalidad de la proteína fue proteolizada, el rendimiento de la reacción de corte siempre alcanzó un valor en torno al 60% para el caso de *Ec6PGDH* silvestre y mutantes. Se estableció como protocolo la incubación por cuatro horas a temperatura ambiente, usando una proporción molar de proteasa TEV: proteína sustrato de 1:20, en amortiguador Tris y en presencia de 1 mM de TCEP como agente reductor.

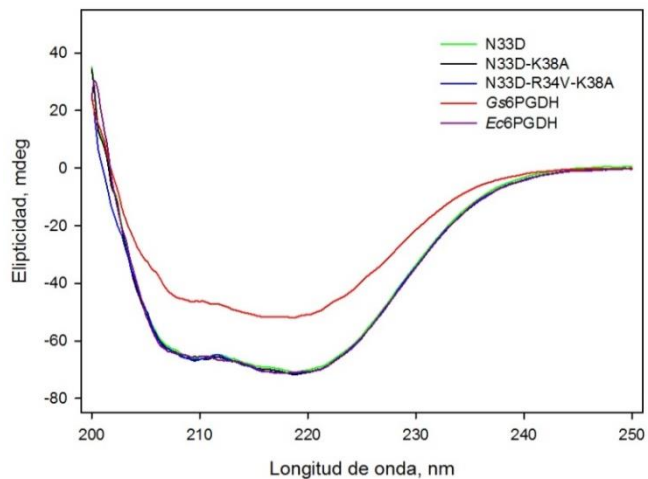


Figura 19. Espectros de dicroísmo circular de las proteínas *Go6PGDH* y *Ec6PGDH*, silvestre y variantes mutagenizadas. La concentración de proteína usada para cada experimento fue de 10 μM . Se grafica la elipticidad observada e mili grados en función de la longitud de onda.

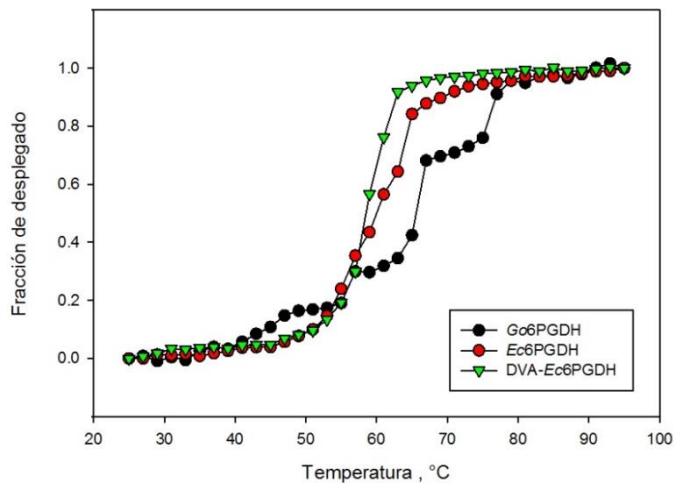


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de *Go6PGDH*, *Ec6PGDH* y la mutante N33D-R34V-K38A (DVA) de *Ec6PGDH*. Se midió la elipticidad observada a 222 nm en una rampa de 25 a 90 $^{\circ}\text{C}$ con una tasa de incremento de temperatura de 2°C cada 5 min.

Capítulo III

EFFECTO DEL 6-FOSFOGLUCONATO EN LA ACTIVIDAD DE Ec6PGDH Y Go6PGDH

Una vez purificadas las enzimas representantes de las subfamilias con uno y dos hemidominios, así como las formas mutantes, se procedió a caracterizar los parámetros cinéticos de las enzimas silvestres en relación con la especificidad por dinucleótido y la saturación por 6PG.

1. Estudios cinéticos en condición de velocidad inicial

Previo a cada ensayo cinético, las enzimas purificadas fueron diluidas hasta obtener una concentración enzimática de stock entre 200 hasta 500 nM para ambas enzimas. La concentración final en el pocillo de reacción varió también desde 5 hasta 50 nM, en volúmenes de 0,2 a 0,3 ml de reacción por pocillo. En la solución stock que contenía 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 2 mM de β mercaptoetanol, 10 mM de $MgCl_2$ y 100 mM de NaCl, la actividad se mantiene estable relativa a los tiempos de ensayos e incubaciones. La pendiente inicial de la curva se calculó en un intervalo de tiempo que asegurara un consumo de sustrato menor al 5 % del total, y mostrara un comportamiento lineal de la velocidad inicial con respecto a la concentración de sustrato. Con los datos obtenidos del conjunto de curvas de progreso se graficaron curvas de velocidad inicial a distintas concentraciones de NAD, NADP y 6PG. Estos datos se ajustaron a un modelo hiperbólico, obteniéndose los parámetros cinéticos según la ecuación de Michaelis-Menten, con los que se calculó la constante de especificidad, k_{cat}/K_M , para cada dinucleótido.

1.1 Efecto en la concentración de 6PG en la actividad de Ec6PGDH

Se estudió el comportamiento de los parámetros cinéticos aparentes para NADP y relativos a distintas concentraciones de 6PG, el ajuste de estos datos permite determinar el valor de las constantes cinéticas k_{cat} y K_M reales para Ec6PGDH y Go6PGDH.

Para *Ec6PGDH* al aumentar la concentración de 6PG de 0,1 mM a 2 mM (figura 21) , los valores de k_{cat}^{app} para NADP aumentaron de manera hiperbólica mientras que se observó una disminución hiperbólica para los valores de K_M^{app} de NADP. La saturación por 6PG permite disponer de una enzima que es catalíticamente activa a menores concentraciones relativas de NADP. Los ajustes para ambas curvas al alcanzar la saturación de 6PG, permiten obtener el valor en la asíntota para k_{cat} es igual a $41,8 \text{ s}^{-1}$ y para la K_M es de $16,8 \text{ }\mu\text{M}$. Con estos valores es posible calcular el cociente k_{cat}/K_M para NADP, resultando en $2,5 \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$,

Se estudió también el comportamiento de los parámetros cinéticos aparentes para NAD en *Ec6PGDH*, frente al incremento del 6PG. En la figura 22, los datos de K_{cat}^{app} para NAD a distintas concentraciones de 6PG fueron tentativamente ajustados a un comportamiento sigmoideo. A pesar de las diferencias en el comportamiento cinético cuando el dinucleótido carece del 2'fosfato, el valor en la asíntota resulta similar, siendo $45,6 \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, los valores de K_M , al saturar el sitio con 6PG, no parece mostrar una tendencia, siendo todos muy cercanos a 30 mM. Por lo tanto se calculó el promedio resultando en $32500 \text{ }\mu\text{M}$, con propósito de obtener la constante de especificidad para NAD a concentración saturante de 6PG, k_{cat}/K_M , siendo de $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$,

Con los valores de las constantes de eficiencia para NADP y NAD se obtiene la preferencia por dinucleótido como $k_{cat}/K_M^{NADP}/k_{cat}/K_M^{NAD}$. *Ec6PGDH* resulta ser 1715 veces más preferente por NADP que por NAD (tabla 4).

Tabla 4. Parámetros cinéticos de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*.

	K_M^{NADP} (μM)	k_{cat}^{NADP} (s^{-1})	$[k_{cat}/K_M]^{NADP}$ ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)	K_M^{NAD} (μM)	k_{cat}^{NAD} (s^{-1})	$[k_{cat}/K_M]^{NAD}$ ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)	$[k_{cat}/K_M]^{NADP}$ / $[k_{cat}/K_M]^{NAD}$
<i>Ec6PGDH</i>	$16,8 \pm 0,5$	$40,5 \pm 0,9$	2,4	32500 ± 1700	$45,7 \pm 5,5$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	1715
<i>Go6PGDH</i>	$285,5 \pm 24,9$	$41,4 \pm 2,8$	0,14	$20,1 \pm 32$	$47,4 \pm 1,2$	2,4	0,06

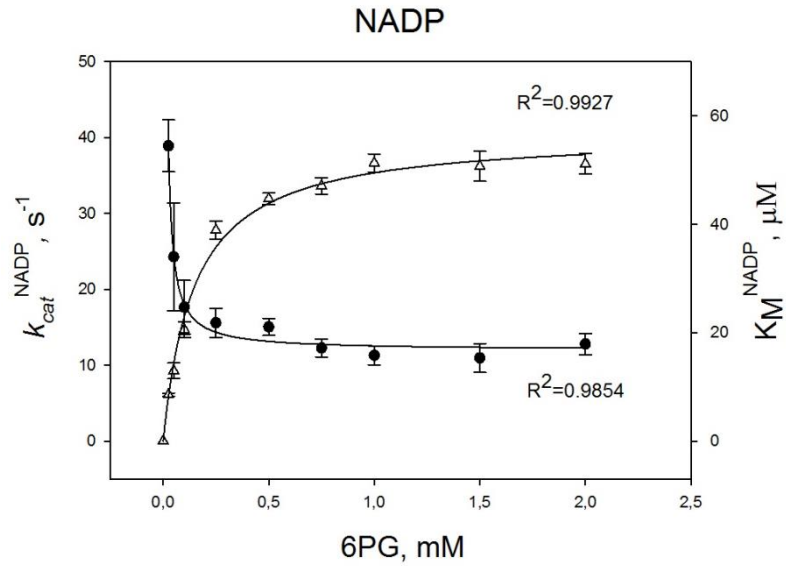


Figura 21. Dependencia de las constantes cinéticas de *Ec6PGDH* para NADP con la concentración de 6PG. Los puntos negros y triángulos representan el valor medio de K_M y k_{cat} , respectivamente, obtenidas en cada experimento individual variando la concentración de NADP a una concentración fija de 6PG. Las barras representan la desviación estándar de las constantes cinéticas obtenidas para tres experimentos distintos, por cada concentración de 6PG.

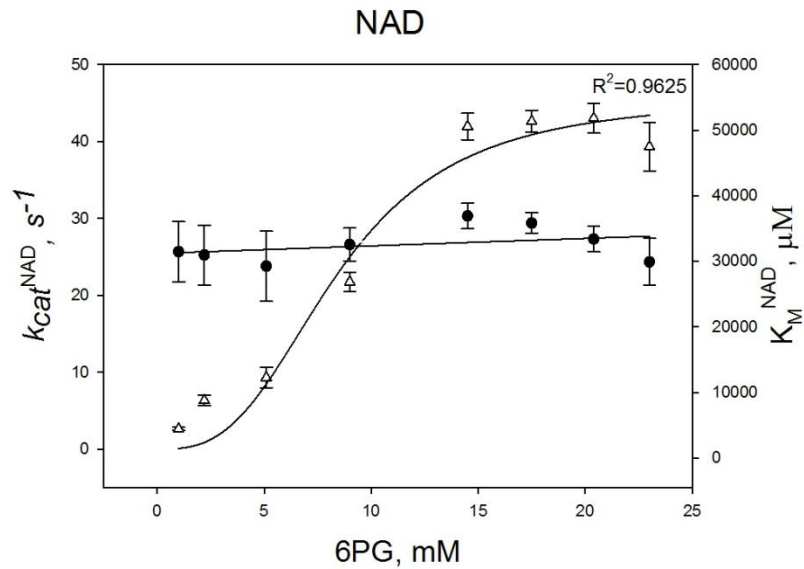


Figura 22. Dependencia de las constantes cinéticas de *Ec6PGDH* para NAD con la concentración de 6PG. Los puntos negros y triángulos representan el valor medio de K_M y k_{cat} , respectivamente, obtenidas en cada experimento individual variando la concentración de NAD a una concentración fija de 6PG. Las barras representan la desviación estándar de las constantes cinéticas obtenidas para tres experimentos, por cada concentración de 6PG.

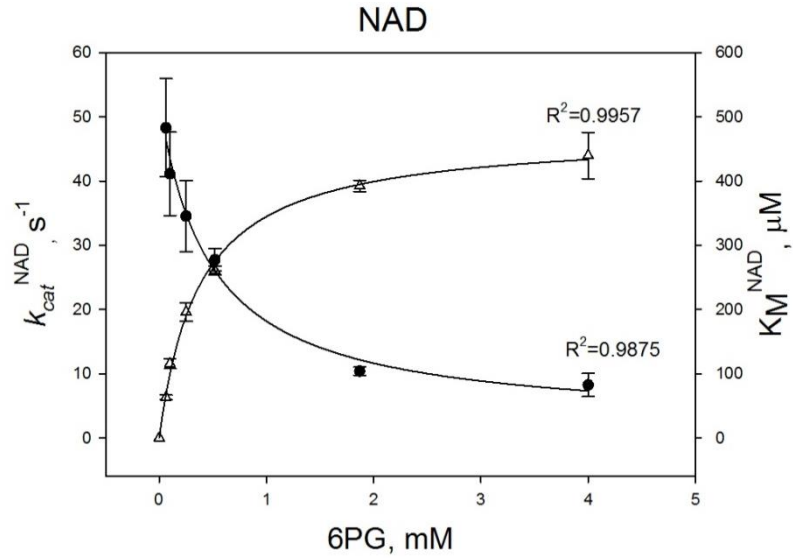


Figura 23 Dependencia de las constantes cinéticas de *Go6PGDH* para NAD con la concentración de 6PG. Los puntos negros y triángulos representan el valor medio de K_M y k_{cat} , respectivamente, obtenidas en cada experimento individual variando la concentración de NAD a una concentración fija de 6PG. Las barras representan la desviación estándar de las constantes cinéticas obtenidas para tres experimentos, por cada concentración de 6PG.

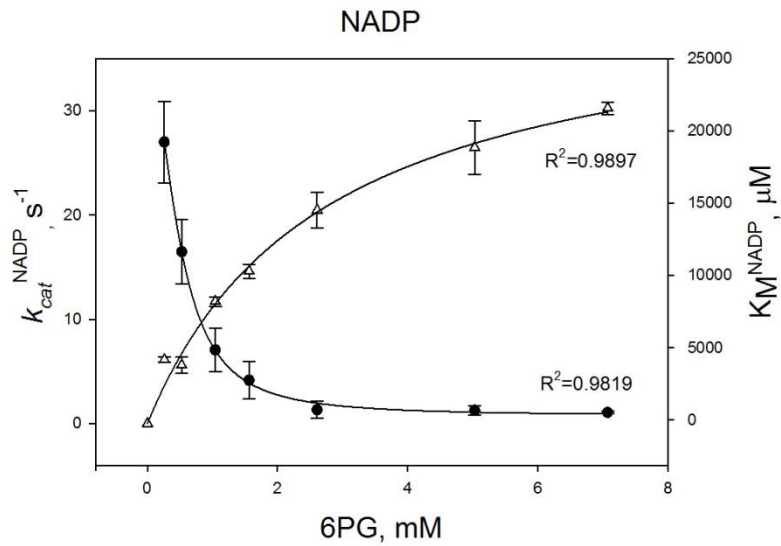


Figura 24. Dependencia de las constantes cinéticas de *Go6PGDH* para NADP con la concentración de 6PG. Los puntos negros y triángulos representan el valor medio de K_M y k_{cat} , respectivamente, obtenidas en cada experimento individual variando la concentración de NADP a una concentración fija de 6PG. Las barras representan la desviación estándar de las constantes cinéticas obtenidas para tres experimentos, por cada concentración de 6PG.

1.2 Efecto en la concentración de 6PG en la actividad de *Go6PGDH*

Al igual que *Ec6PGDH*, se realizaron estudios cinéticos para NADP y NAD en condiciones de velocidad inicial para determinar los parámetros cinéticos aparentes a distintas concentraciones de 6PG. En la figura 23, se muestra el comportamiento de k_{cat}^{app} y K_M^{app} para NAD frente a la saturación por 6PG. k_{cat} crece hiperbólicamente, estimándose un valor de $47,4 \text{ s}^{-1}$ en condiciones saturantes de 6PG. Los valores aparentes de K_M fueron ajustados a un decaimiento hiperbólico, resultando en un valor de $20,1 \text{ }\mu\text{M}$ en la saturación del 6PG. De esta forma, el valor de la constante de especificidad de *Go6PGDH* para NAD, corresponde a $2,4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (figura 23).

Para NADP, el comportamiento de los parámetros cinéticos al aumentar la concentración de 6PG presenta las mismas tendencias que con NAD. El valor obtenido para k_{cat} fue de $41,4 \text{ s}^{-1}$ en condiciones saturantes de 6PG. Los valores relativos de K_M se ajustaron a un comportamiento sigmoideo de tres parámetros, obteniéndose en la asíntota un valor de $285,5 \text{ }\mu\text{M}$. La constante de especificidad para NADP resultó ser de $0,14 \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$ (figura 24).

Tomando los valores de las constantes de especificidad para NAD y NADP en *Go6PGDH*, se calculó la preferencia por NADP por sobre NAD, resultando ser 0,06 (tabla 4). El recíproco de este número, indica que *Go6PGDH* es 16,6 veces preferente por NAD.

2. Dependencia de la actividad de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH* versus la concentración de 6PG

Se graficó también el comportamiento de la velocidad inicial de *Ec6PGDH* con respecto al incremento de 6PG, a una concentración saturante de 2 mM de NADP, los datos fueron mejor representados por un comportamiento sigmoideo (figura 25). Se obtuvo una constante catalítica para 6PG de $42,9 \text{ s}^{-1}$ y una $K_{0,5}$ de $75,8 \text{ }\mu\text{M}$. Este valor de k_{cat} es similar a la que se obtiene para NADP al saturar *Ec6PGDH* con 6PG (figura 21). La concentración de 6PG con la que se obtiene la mitad del valor de la k_{cat} de NADP en la saturación con 6PG resultó ser de $146,7 \text{ }\mu\text{M}$. Este valor es el doble de la $K_{0,5}$ obtenida para 6PG.

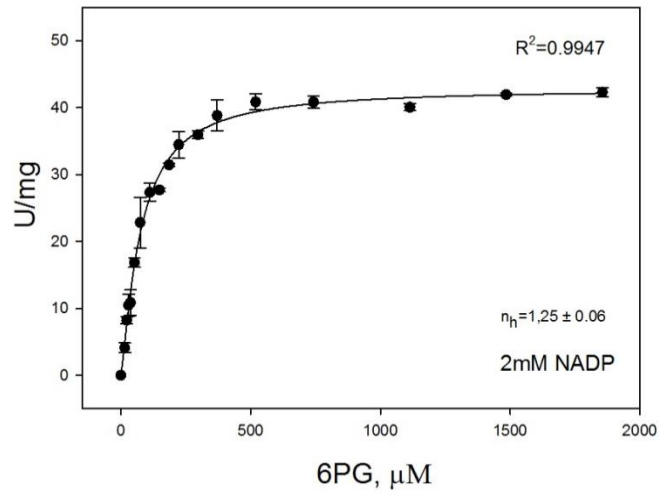


Figura 25. Comportamiento cinético de *Ec6PGDH* para 6PG. Se muestra la actividad específica en U/mg, en condiciones de velocidad inicial, en presencia de 2 mM de NADP. Las barras representan la desviación estándar para tres mediciones realizadas.

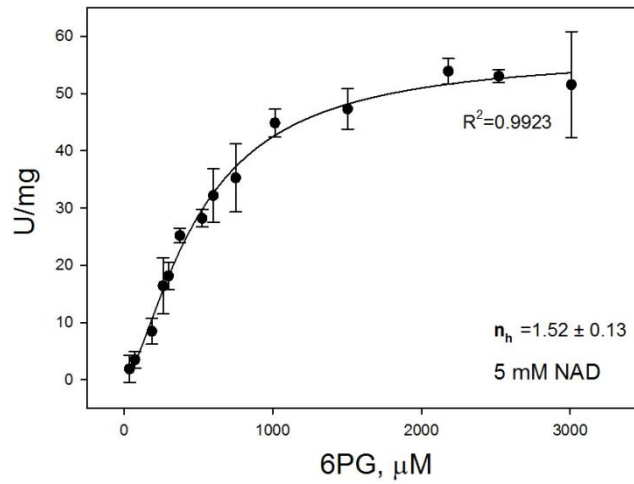


Figura 26. Comportamiento cinético de *Go6PGDH* para 6PG. Se muestra la actividad específica en U/mg, en condiciones de velocidad inicial, en presencia de 5 mM de NAD. Las barras representan la desviación estándar para tres mediciones realizadas.

El comportamiento cinético de la 6PGDH de *G. oxydans* para 6PG a una concentración de 5 mM de NAD se muestra en la figura 26. Los datos se ajustaron a un modelo sigmoideo, obteniéndose una constante de *hill* de 1,52. La constante catalítica para 6PG resultó ser de 44,5 s⁻¹ y la K_{0,5} de 497 μM. Al realizar la misma comparación con el comportamiento cinético de *Go6PGDH* para NAD (figura 23). Se obtiene que el valor de 6PG necesario para alcanzar la mitad de la *k_{cat}* de NAD en la saturación del co-sustrato es de 375,2 μM, valor comparable a la K_{0,5} de 6PG.

3. Estudios de unión de 6PG a *Ec6PGDH* y *Go6PGDH* por medio de Calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica que permite obtener los parámetros de unión y termodinámicos de un proceso de unión proteína ligando. Se intentó entender estos aspectos asociados a la unión de 6PG en las 6PGDH de *E. coli* y *G. oxydans*.

Se determinaron los parámetros de unión de 6PG a *Ec6PGDH*. La energía libre de unión fue de 18,8 Kcal mol⁻¹ por monómero. La constante de disociación fue de 10,7 μM siendo un valor menor que la K_M para 6PG a una concentración saturante de NADP. Los detalles de los parámetros termodinámicos y de unión se encuentran representados en la tabla 5.

Para el caso de la unión de 6PG a *Go6PGDH*, se obtuvieron resultados preliminares que vale la pena analizar. El tiempo de inyección de 300 segundos no fue suficiente para alcanzar el equilibrio en cada medición, lo que impide obtener valores fidedignos para este experimento. Sin embargo, es posible estimar las tendencias de ellos. De la figura 27 se infiere que la entalpía de unión para este caso es mucho menor que en la unión de 6PG a *Ec6PGDH*. Por otro lado, se necesita una razón molar de titulante y enzima mayor para lograr la forma hiperbólica de curva, que en el caso de *Ec6PGDH*, por lo que es probable que la constante de disociación sea mucho mayor.

Proteína	Ligando	K_d (μM)	ΔH_o (Kcal mol^{-1})	$T\Delta S_o$ (cal mol^{-1})	Sitios/Monómero
<i>Ec6PGDH</i>	6PG	$10,7 \pm 0,2$	$-19,8 \pm 0,9$	-1095	$0,98 \pm 0,04$

Tabla 5. Parámetros termodinámicos de la unión de 6PG a *Ec6PGDH*

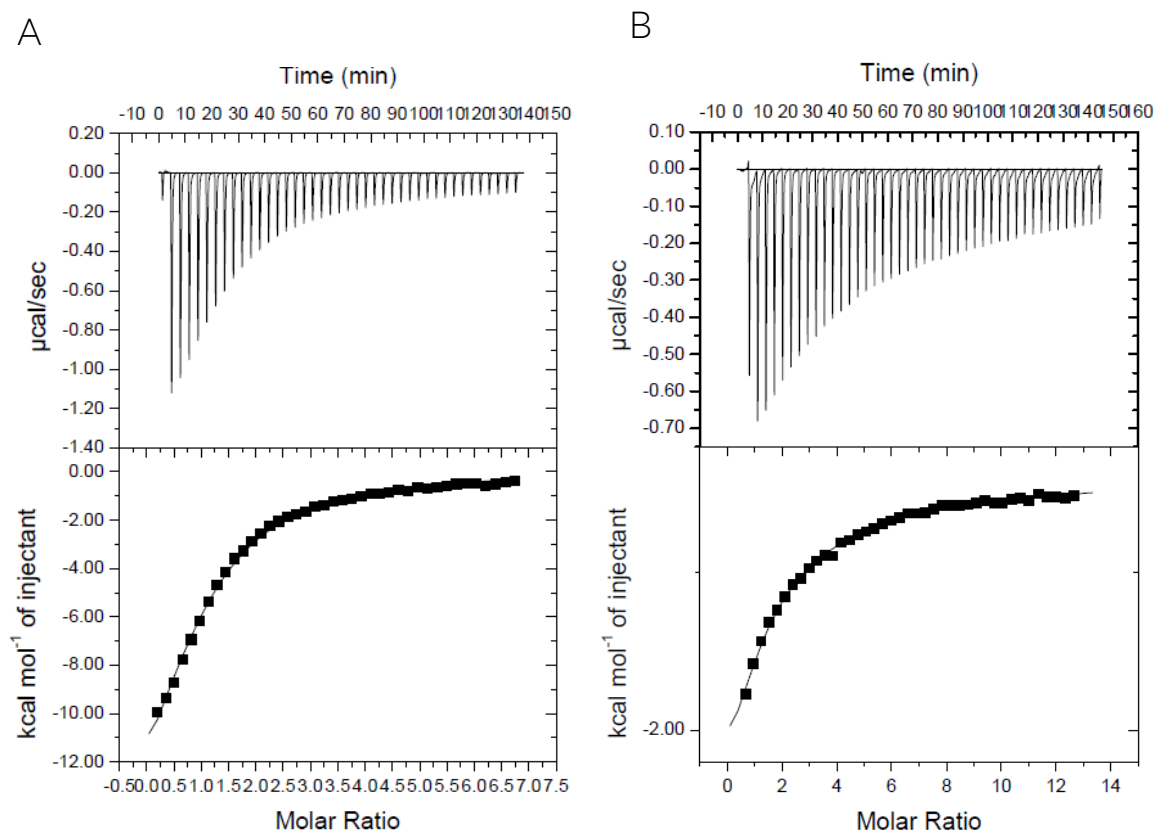


Figura 27 Calorimetría titulación isotérmica de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH* con 6PG. (A) Titulación de *Ec6PGDH* con 6PG a 25°C. La celda contenía 13,5 μM de *Ec6PGDH* en una solución de 50 mM Hepes pH 7.5. La jeringa contenía 417 μM de 6PG. Un total de 41 inyecciones de 7 μl de titulante fueron realizadas cada intervalos de 300 segundos. Panel superior muestra los datos crudos de ITC, en el panel inferior se muestra la integración de los picos superiores luego de la sustracción del control de titulación con la solución amortiguadora en la celda y 6PG en el inyector. (B) Titulación preliminar de *Go6PGDH* con 6PG a 25 °C. La celda contenía un total de 80 μM de proteína. La jeringa contenía una concentración inicial de 2 mM de 6PG. Se realizaron un total de 44 inyecciones de 6 μl de titulante, en un tiempo de 300 segundos de inyección. En el panel superior se muestra el cambio de calor en el tiempo en cada inyección de titulante, se ve que no se logra alcanzar el equilibrio en cada medición. Radio molar representa la proporción molar de Titulante/Enzima.

4. Efecto del 3HIBA en la actividad relativa de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*

Las enzimas no presentaron actividad 3HIBADH. Sin embargo se probó el efecto inhibitorio de 3HIBA sobre la actividad de 6PGDH en las enzimas de *E. coli* y *G. oxydans* (Figura 28). Para *Ec6PGDH* sólo se observó una inhibición de un 5% a 60 mM de 3HIBA. Interesantemente, para *Go6PGDH*, la inhibición sobre la actividad relativa fue de un 30 % a la mayor concentración del β HA usada.

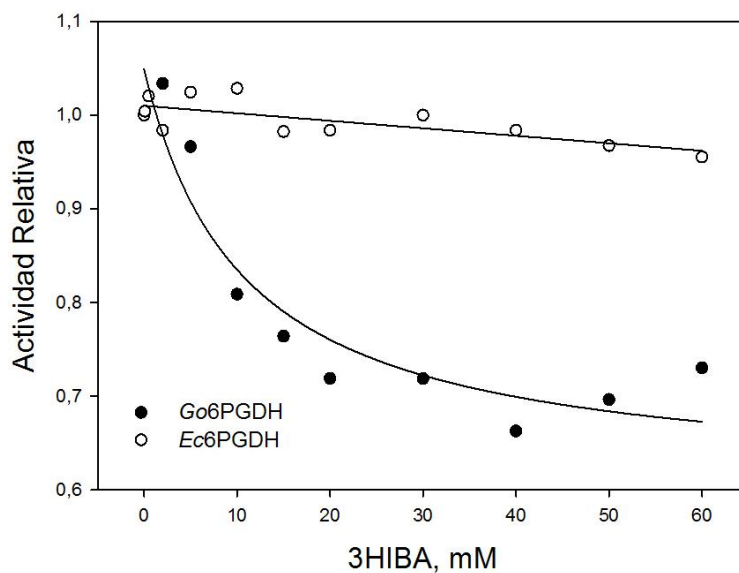


Figura 28. Efecto de 3HIBA en la actividad relativa de *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*. Se grafica la actividad relativa de *Ec6PGDH* (puntos blancos) y *Go6PGDH* (puntos negros) en presencia de concentraciones crecientes de 3HIBA. Cada punto representa un promedio de dos ensayos de actividad específicas independientes. Los datos obtenidos para *Ec6PGDH* se ajustaron a un modelo lineal, para *Go6PGDH* en cambio, los puntos fueron ajustados a un modelo de decaimiento hiperbólico.

Capítulo IV

IMPLICANCIA EN LA PREFERENCIA POR DINUCLEÓTIDOS DE LOS MOTIVOS NRX₃K y DVX₃A EN *Ec6PGDH*

A concentraciones saturantes de 6PG la *Ec6PGDH* muestra una preferencia estricta por NADP (1715 veces, ver tabla 4). En esta tesis se propuso estudiar la importancia del motivo NRX₃K en esta propiedad. Por medio de mutagénesis sitio dirigida se reemplazó el motivo silvestre por el motivo DVX₃A que se encuentra en enzimas homólogas preferentes por NAD, particularmente en la 3HIBADH de humano. La racional del diseño de las mutantes consistió primero en mutar la N33 por ácido aspártico, pues este residuo está estrictamente presente en homólogos de la rama 2 y 4 (figura 15). El siguiente paso fue eliminar gradualmente las cargas positivas del motivo silvestre por residuos apolares. Se mutó K38 por alanina para eliminar la interacción de este residuo con el 2'-fosfato de la región ribosa-adenina del NADP. El reemplazo de R34 se realizó al final, ya que se ha visto que este residuo establece no sólo interacciones electrostáticas con el 2'-fosfato del NADP sino también interacciones tipo π con la adenina de los dinucleótidos [9], es decir, su remoción debiera afectar más allá de la interacción con el grupo fosfato.

1. Caracterización cinética de mutantes del motivo NRX₃K de *Ec6PGDH*

Para cada mutante, se realizaron mediciones de la actividad enzimática para NAD y NADP, a 2 mM de 6PG, que se encuentra dentro del rango fisiológico de este metabolito en *E. coli* [66]. En todos los casos, hubo una fuerte caída de la actividad enzimática con NADP, resultando en una reversión de la preferencia de NADP a NAD. Las mutantes dobles y triples muestran un incremento en la constante catalítica para NAD. Sin embargo, incluyendo a la mutante simple, N33D, que logra disminuir la K_M para NAD a la mitad con respecto a la enzima silvestre, las mutaciones no conducen a la obtención de constantes de Michaelis-Menten del orden micromolar, como se observa en enzimas preferentes por NAD de la superfamilia β HADH, como se expone en la introducción, tabla 1.

1.1. Reemplazo de asparragina 33 por aspártico

La actividad de la mutante simple con NADP se vio tan afectada que a las concentraciones de sustrato ensayadas solo se pudo obtener el tramo inicial de la curva de Michaelis-Menten (Figura 29). Sin embargo, de la pendiente, es posible obtener el coeficiente de especificidad para NADP que resultó ser de $6,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}\mu\text{M}$. Si consideramos las constantes de preferencia de la tabla 6, *Ec6PGDH* es $3,6 \times 10^4$ veces más eficiente para oxidar 6PG con NADP que la mutante simple. La actividad con NAD, con respecto a la silvestre, se vio favorecida, probablemente por la interacción de un puente de hidrógeno entre el ácido aspártico y el hidroxilo en la posición 2' de la ribosa, fenómeno que ocurriría en *Go6PGDH* y que se evidencia más adelante con las dinámicas moleculares de esta tesis. Se obtuvo una K_M de $1224 \mu\text{M}$, es decir 2,5 veces menor a la K_M para NAD de la enzima silvestre. La constante catalítica de NAD para esta mutante resultó ser de $9,1 \text{ s}^{-1}$, lo que corresponde a un aumento del 50% de la k_{cat} de NAD para *Ec6PGDH* (tabla 6). El cociente de las constantes de especificidad de NADP versus NAD para la *Ec6PGDH-N33D*, resulta ser 0,09, lo que indica que es una enzima 11,1 veces más preferente por NAD que por NADP.

1.2. Reemplazo de lisina 38 por alanina

Para esta mutante fue posible obtener los parámetros cinéticos tanto para NAD como para NADP. La constante catalítica para NADP se afectó de manera importante, resultando ser $0,08 \text{ s}^{-1}$, 506 veces menor que la k_{cat} de la enzima silvestre. La K_M para NADP fue de $7116 \mu\text{M}$, esto es 423 veces más que la K_M de *Ec6PGDH* para el mismo sustrato (Figura 29). Para NAD, la incorporación de alanina por lisina sobre la mutante simple significó en un importante incremento de la K_M desde aproximadamente $12000 \mu\text{M}$ a $43000 \mu\text{M}$ (Tabla 6). La k_{cat} , sin embargo, pasó de ser $9,2 \text{ s}^{-1}$ (mutante simple) a $12,6 \text{ s}^{-1}$. Comparando los coeficientes de eficiencia catalítica de NADP y NAD, esta mutante seguiría siendo preferente por NAD.

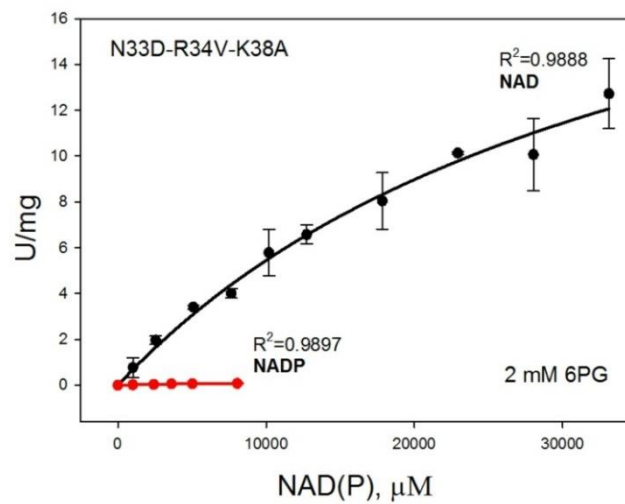
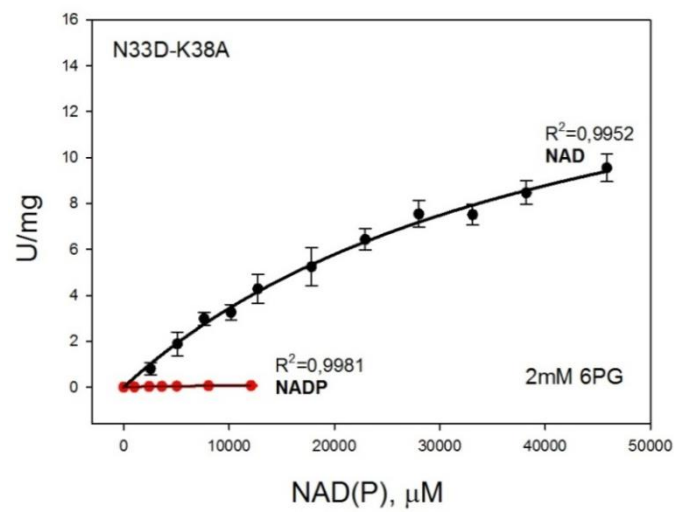
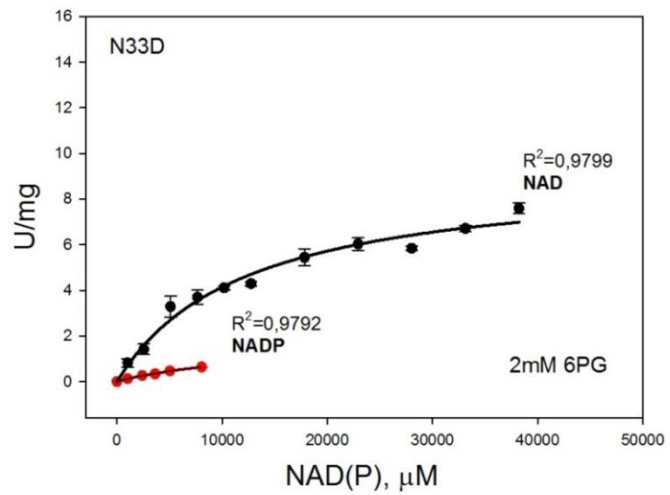


Figura 29. Comportamiento cinético de las mutantes N33D, N33D-K38A y N33D-K38A-R34V de *Ec6PGDH*. Gráficos de actividad en condiciones de velocidad inicial para cada mutante en presencia de 2 mM de 6PG, para NAD (negro) y NADP (rojo).

Tabla 6. Constantes catalíticas, a 2 mM de 6PG, para NAD y NADP de *Go6PGDH* y *Ec6PGDH*, silvestre y mutantes.

	K_M^{NADP} (μM)	k_{cat}^{NADP} (s^{-1})	$[k_{cat}/K_M]^{\text{NADP}}$ ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)	K_M^{NAD} (μM)	k_{cat}^{NAD} (s^{-1})	$[k_{cat}/K_M]^{\text{NAD}}$ ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)	$[k_{cat}/K_M]^{\text{NADP}} / [k_{cat}/K_M]^{\text{NAD}}$
<i>Ec6PGDH</i>	17,9	45,6	2,5	30449	6,3	$2,1 \cdot 10^{-4}$	12312
N33D	-	-	$6,7 \cdot 10^{-5}$	12244	9,2	$7,5 \cdot 10^{-4}$	0,09
N33D-K38A	7176	0,08	$1,1 \cdot 10^{-5}$	43178	12,6	$2,9 \cdot 10^{-4}$	0,038
N33D-R34V-K38A	7225	0,15	$2,1 \cdot 10^{-5}$	36629	25,4	$6,9 \cdot 10^{-4}$	0,03

1.3. Reemplazo de arginina 34 por valina

Los resultados obtenidos con esta mutante fueron muy similares a los obtenidos con la mutante doble. Para NAD la K_M a diferencia de la constante catalítica no varía significativamente. La k_{cat} para NAD, no obstante, se incrementa a 25 s^{-1} , correspondiendo a un aumento de 4 veces la k_{cat} de la enzima silvestre. Esta mutante mantiene el mismo comportamiento catalítico para NADP que la mutante doble. El cociente entre las constantes de especificidad de NADP y NAD es de 0,03, lo que implica que continúa siendo preferente por NAD (33,3 veces).

2. Estudios de unión de NAD y NADP a *Ec6PGDH*, silvestre y mutantes, por medio de calorimetría de titulación isotérmica

Se ensayaron experimentos de ITC con 6PG, NADP y NAD para *Ec6PGDH* silvestre y mutantes. Las K_d de unión de 6PG y NADP para la enzima silvestre, resultaron ser prácticamente iguales, de 10,9 y 10,7 μM , respectivamente (tabla 7). En ambos casos se ajustó a un modelo de unión de un único sitio. Los parámetros de unión para 6PG y NADP de *Ec6PGDH* y N33D-*Ec6PGDH* son reportados en la tabla 7.

En el caso de la mutante N33D-*Ec6PGDH*, la constante de disociación con NADP aumenta en la mutante a 35,6 μM , (figuras 30 y 31). Por medio de esta metodología, no fue posible medir unión con NAD tanto para la enzima silvestre como para las mutantes. Por lo tanto, en los rangos que el microcalorímetro permite determinar constantes de afinidad, se pudo cuantificar únicamente una pérdida leve de afinidad por NADP.

Fue posible realizar experimentos de ITC con la mutante doble N33D-K38A (figura 32), pero al intentar ajustar los datos al modelo, no fue posible obtener los parámetros de unión. Sin embargo, es de relevancia mencionar que la constante de afinidad se encontraría al menos por sobre el doble de la constante de afinidad para la mutante simple, acuerdo a los rangos de concentración y la relación molar de titulante-proteína explorados en este experimento. Para el caso de la unión con NAD, al igual que en *Ec6PGDH* no fue posible evidenciar unión (datos no mostrados).

Proteína	Ligando	K_d (μM)	ΔH_o (Kcal mol^{-1})	$T\Delta S_o$ (cal mol^{-1})	Sitios/Monomer
Ec6PGDH	NADP	$10,9 \pm 0,3$	$-9,9 \pm 0,2$	-262,5	$0,86 \pm 0,02$
	6PG	$10,7 \pm 0,2$	$-19,8 \pm 0,9$	-1095	$0,98 \pm 0,04$
N33D-Ec6PGDH	NADP	$35,6 \pm 0,4$	$-2,5 \pm 0,3$	-297,5	$1,22 \pm 0,11$

Tabla 7. Parámetros de unión de sustratos de 6PGDH a *Ec6PGDH* y *N33D-Ec6PGDH*

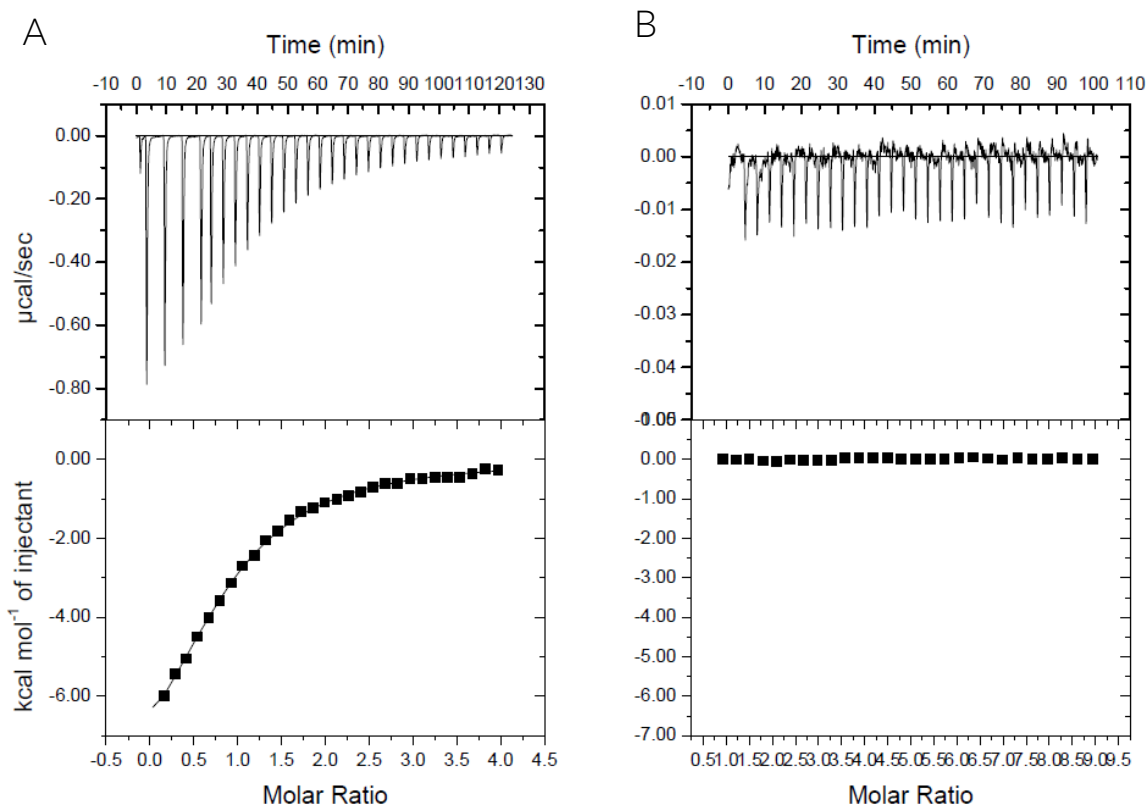


Figura 30. Titulación de *Ec6PGDH* con NADP y NAD. (A) Titulación de *Ec6PGDH* con NADP, la celda contenía $22,5 \mu\text{M}$ de *Ec6PGDH* en 50 mM de HEPES pH 7.5. La jeringa contenía $500 \mu\text{M}$ de NADP en la misma solución de la proteína. Un total de 30 inyecciones de $8 \mu\text{l}$ de titulante fueron realizadas en intervalos de 300 segundos. (B) Titulación con NAD, la celda contenía $20 \mu\text{M}$ de *Ec6PGDH* en 50 mM de HEPES pH 7.5. La jeringa contenía 1 mM de NAD. Un total de 30 inyecciones de $8 \mu\text{l}$ de titulante fueron realizadas en un intervalo de 300 segundos. Los paneles superiores representan los datos crudos de ITC, en el panel inferior se muestra la integración de los picos superiores luego de la sustracción del control de titulación con la solución amortiguadora y NADP o NAD. Radio molar representa la proporción molar de Titulante/Enzima.

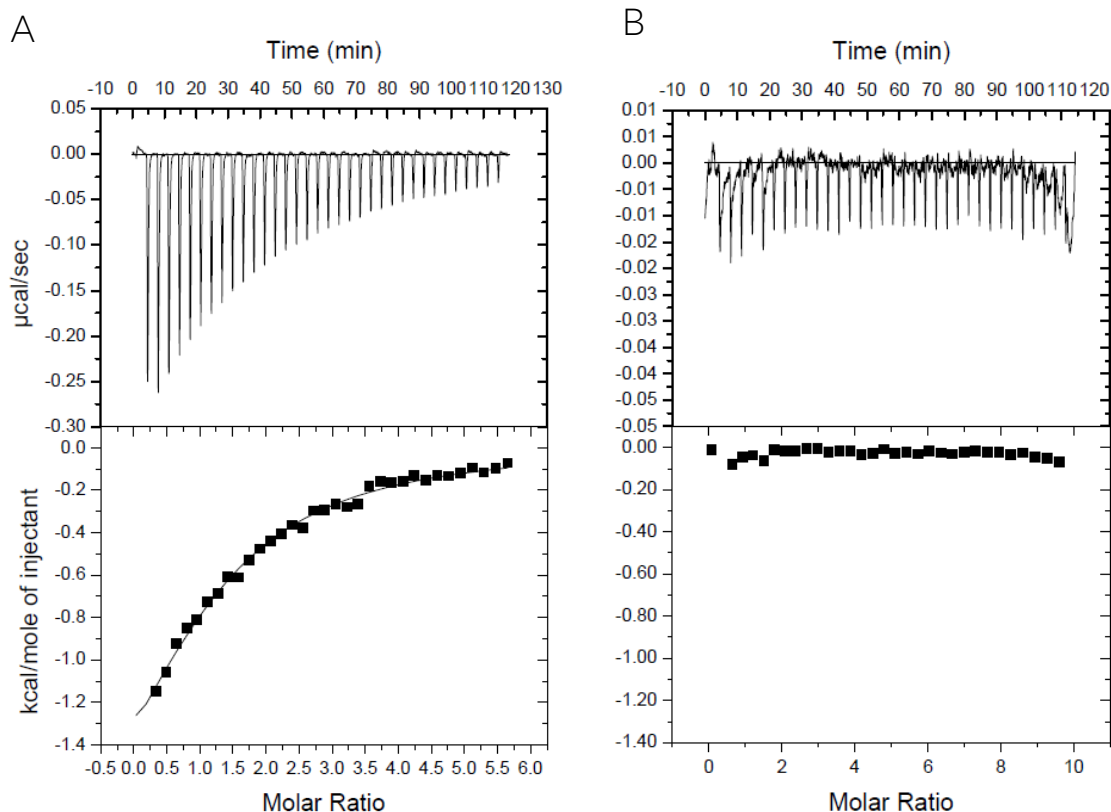


Figura 31. Titulación de la mutante N33D de *Ec6PGDH* con NADP y NAD. (A) Titulación con NADP, la celda contenía 30 μM de N33D-*Ec6PGDH* en 50 mM Hepes pH 7.5 y 0,05 mM de TECP. La jeringa contenía 800 μM de NADP. Un total de 35 inyecciones de 8 μl de titulante fueron realizadas en un intervalo de 300 segundos. (B) Titulación con NAD, la celda contenía 40 μM de N33D-*Ec6PGDH* en 50 mM de Hepes pH 7.5. La jeringa contenía 0,8 mM de NAD. Un total de 35 inyecciones de 8 μl de titulante fueron realizadas en un intervalo de 300 segundos. Los paneles superiores representan los datos crudos de ITC, en los paneles inferiores se muestra la integración de los picos superiores luego de la sustracción del control de titulación con la solución amortiguadora y NADP o NAD. Radio molar representa la proporción molar de Titulante/Enzima.

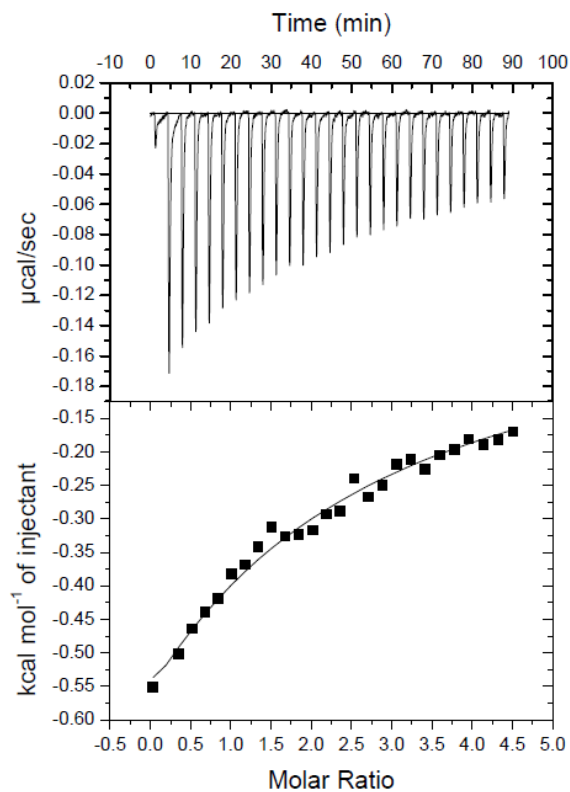


Figura 32. Titulación de la mutante N33D-K38A de *Ec6PGDH* con NADP. La celda contenía 40 μM de proteína en 50 mM Hepes pH 7.5 y 0,05 mM de TCEP. La jeringa contenía 1 mM de NADP. Un total de 29 inyecciones de 9 μl de titulante fueron realizadas en un intervalo de 300 segundos. Panel superior muestra los datos crudos de ITC, en el panel inferior se muestra la integración de los picos superiores luego de la sustracción del control de titulación con la solución amortiguadora y NADP. Radio molar representa la proporción molar de Titulante/Enzima.

Capítulo V

INTERACCIÓN DE 6PG Y DINUCLEÓTIDOS CON RESIDUOS DEL SITIO ACTIVO DE Go6PGDH

No se ha reportado la estructura cristalográfica de *Go6PGDH* en presencia de sus sustratos. Por ende, sus propiedades cinéticas y de unión no pueden ser discutidas en términos de interacciones con residuos del sitio activo. Particularmente, la contribución de un elemento de estructura del hemidominio adyacente es un aspecto crucial a dilucidar respecto a la evolución estructural de la superfamilia.

1. Co-cristalización de *Go6PGDH* con 6PG y NAD

Los cristales de *Go6PGDH* fueron obtenidos por el método de difusión de vapor en gota sentada. La solución del reservorio madre contenía 2 M de sulfato de amonio y 5% v/v de 2-propanol como agente precipitante. En el pocillo se depositó la proteína a una concentración de 15 mg/ml, en una solución 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 2 mM de DTT y se mezcló en una razón de 1:1 con la solución del reservorio. Luego de montar las gotas, la placa de cristalización se dejó en una sala a 18°C. A las 24 horas ya aparecieron los primeros cristales, y luego de una semana se observó el máximo tamaño de crecimiento (figura 33). Se congelaron en N₂ líquido cristales de *Go6PGDH* incubados con NAD y 6PG, a la espera de ser difractados.

Se intentaron obtener cristales de *Go6PGDH* con 3HIBA y NADP en la misma condición y otras condiciones ofrecidas por diferentes kits de cristalización (variando sales, agentes precipitantes y otros componentes), a 15 y 5 mg/ml de proteína, sin embargo solo se obtuvieron formas cristalinas amorfas o agujas de cristales, que eventualmente pueden ser optimizados.

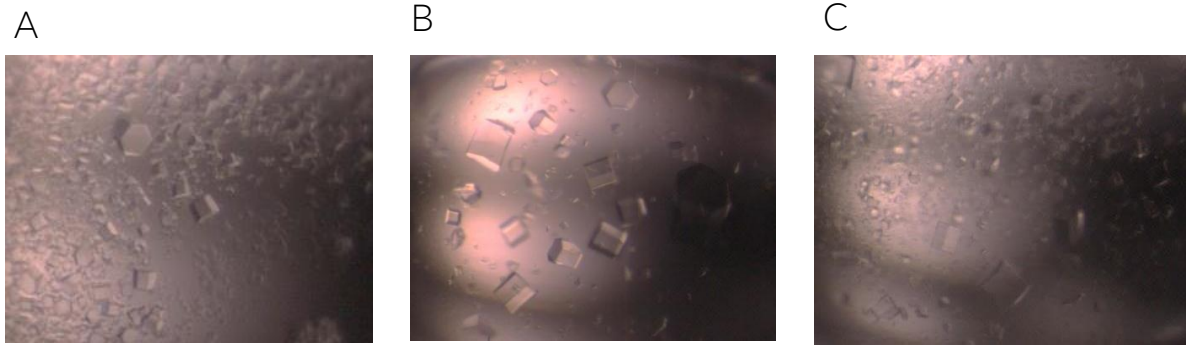


Figura 33. Fotografía de los cristales de *Go6PGDH*, en estado apo y complejo con NAD y 6PG. Cristales de *Go6PGDH* crecidos con 2 M de sulfato de amonio y 5% v/v de 2-propanol. En A se observan formas cristalinas apo de *Go6PGDH*, en B y C se observan cristales de la enzima en complejo con 1,2 mM de NAD y 2 mM de 6PG respectivamente. La imagen fue tomada 3 días después de montar la gota.

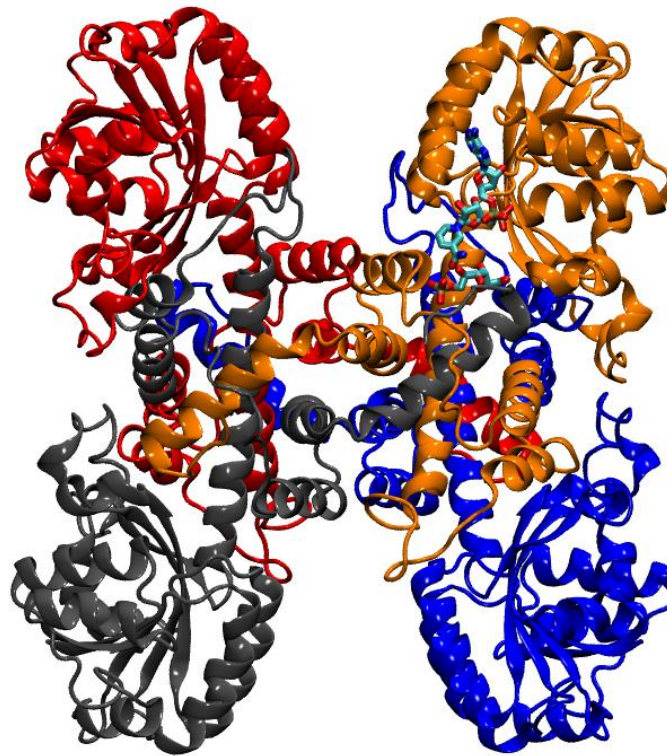


Figura 34. Modelo estructural de la enzima 6PGDH de *Gluconobacter oxydans*. Se representa la estructura tetramérica de *Go6PGDH* coloreada por cada cadena. La representación tridimensional fue obtenida con el programa VMD, en formato NewCartoon.

2. Modelamiento por homología de *Go6PGDH*

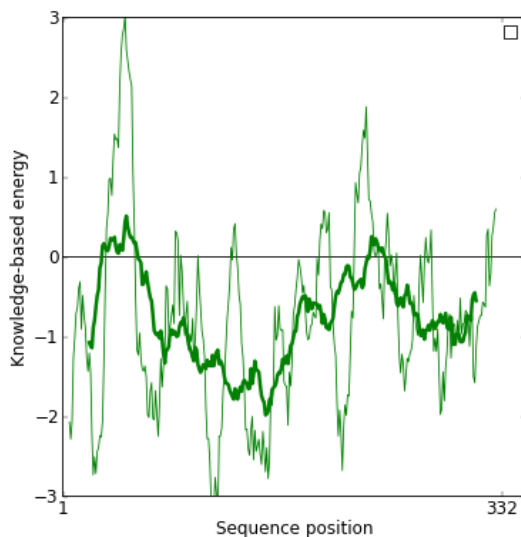
El modelo se construyó usando como templado los PDBs de la 6PGDH de *Geobacter metallireducens* (PDBid 4E21) y la 6PGDH de *E. coli* (PDBid: 3FWN). *Go6PGDH* posee un 50% de identidad de secuencia con *Gm6PGDH* y un 39% de identidad con *Ec6PGDH* en la $\alpha 6$ C-terminal. Lamentablemente, en el pdb 4E21 se encuentran regiones que carecen de densidad electrónica, las que corresponden a los loops $\alpha 1-\alpha 2$, $\alpha 3-\alpha 4$, además de los residuos 326 al 336 del dominio helicoidal la proteína ($\alpha 6$).

Usando la función *loopmodel* de modeller, se pudo completar los loops mencionados en la estructura de 4E21, esto se realizó en presencia de 6PG y NAD superpuestos estructuralmente en los cuatro sitios activos, a modo de que no se posicionaran cadenas laterales en espacio de los ligandos. La región C-terminal de 4E21 no se estructuró de manera adecuada (datos no mostrados), esto se corroboró usando el servidor PrDOS (Protein Disorder prediction System). Por tal motivo se realizó un alineamiento de la región C-terminal de *Go6PGDH* con las regiones C-terminal del resto de las estructuras de 6PGDH depositadas en el PDB. Se seleccionó la región C-terminal de *Ec6PGDH*, para modelar el extremo C-terminal de la 6PGDH de *G. oxydans*. Se construyó el dímero quimérico cuyo dominio N y C terminal corresponden a la enzima *Gm6PGDH* y la $\alpha 6$ del hemidominio duplicado de *Ec6PGDH* para usar de templado para el modelamiento por homología de *Go6PGDH*.

Para la generación del modelo, se usó el alineamiento múltiple generado para el árbol filogenético de la familia 6PGDH, de manera de incorporar información evolutiva. Se extrajo las secuencias alineadas de *Gluconobacter oxydans*, *Geobacter metallireducens* y *E. coli* y se modeló usando la función *automodel* de modeller, eligiéndose el modelo cuyo score fuera mayor y poseyera el mínimo valor del DOPE evaluador. El tetrámero fue reconstruido por medio de superposición estructural del dímero modelado con *Gm6PGDH* (Figura 34). La energía de la estructura del tetrámero se minimizó usando el campo de fuerza GROMOS96 43B1 [61] implementado en el programa Swiss-PdbViewer.

La calidad del modelo se evaluó mediante dos metodologías: la primera fue utilizar ProSA [59]. Los resultados se muestran en la figura 35.A, se representan los valores de

A



B

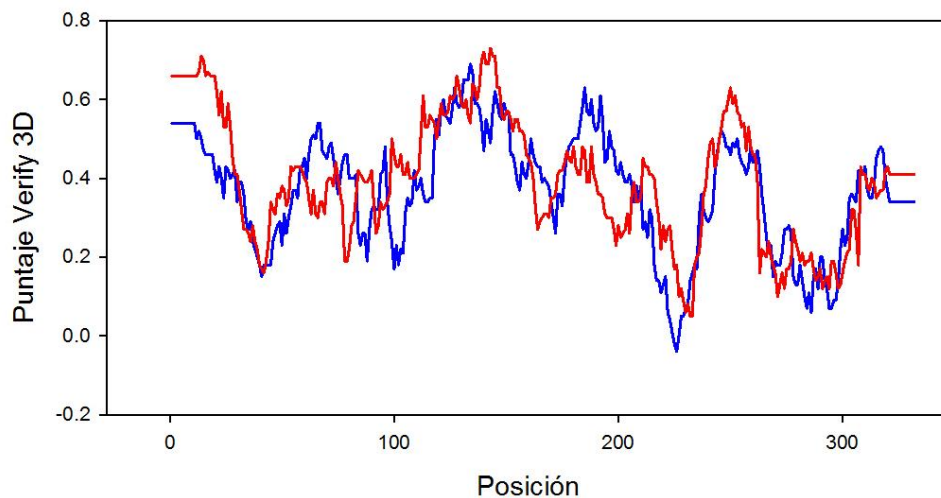


Figura 35. Evaluación del modelo de Go6PGDH. (A) Resultado energético por residuo del análisis de ProSA. En verde claro se representan los valores pseudo energéticos en una ventana de 10 residuos, para cada posición del modelo, en verde oscuro se representan las pseudo energías promedio usando una ventana de 40 residuos. (B) Puntaje otorgado por Verify3D versus la posición de la secuencia del modelo tridimensional obtenido. En azul se representa el modelo, en rojo el templado quimérico.

pseudo energía por residuo en ventanas de 10 y 40 aminoácidos. En la ventana de 40residuos, cerca del 90% de las posiciones se encuentran bajo el umbral (valor 0, figura 35A). La segunda metodología empleada fue el programa Verify3D [60], que permite analizar la compatibilidad del modelo tridimensional con la estructura primaria de la proteína. El resultado se muestra en la figura 35B El programa otorga un valor de pseudoenergía para cada aminoácido promedio en una ventana de 20 residuos, valores por sobre 0 corresponden a residuos bien modelados. En nuestro caso, se obtiene un 97,2 % de los residuos en esta condición.

3. Docking molecular: interacción de Go6PGDH con 3HIBA, 6PG, NAD y NADP

Para posicionar los ligandos de Go6PGDH, NAD(P) y 6PG, se usó el método de *docking* molecular. Las simulaciones fueron realizadas por medio del software Autodock Vina. Como no es posible realizar un posicionamiento simultáneo de los dos ligandos fue necesario primero realizar un *docking* con el β -hidroxiácido, y sobre el complejo resultante, realizar el acoplamiento con NADP o NAD. Para todas las simulaciones se obtuvieron 9 posibles conformaciones asociadas a valores relativos de energía de unión en kcal/mol y el RMSD que resulta de la comparación de todos los ligandos. En la tabla 8 se muestra el detalle de estos valores para las moléculas NAD, NADP, 6PG y 3HIBA, que presentaron menor valor de energía y una conformación similar a sus homólogos cristalográficos.

El resultado de la interacción de 6PG con Go6PGDH, arrojó que la mejor conformación del ligando presenta una energía de unión de -5,3 Kcal/mol. Las interacciones de los residuos que en este complejo son realizadas con 6PG se representan en la figura 36. Se puede observar que el hidroxilo posicionado en el carbono 3 del β -hidroxiácido se orienta a 3 Å hacia la lisina 197. Por otro lado los residuos histidina 328 y arginina 322, parte del extremo C-terminal del hemidominio de la subunidad adyacente se orientan hacia los hidroxilos 4 y 5' (H328) del grupo fosfato ubicado en el carbono 6 del 6PG (R322).Las interacciones con los cofactores NADP y NAD, arrojaron conformaciones con valores de energía más negativo que el caso del 6PG, debido a la mayor presencia de

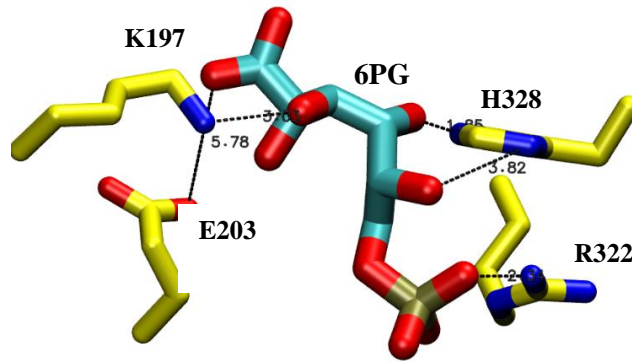


Figura 36. Interacción de 6PG con residuos de *Go6PGDH*. Zoom del bolsillo de unión a 6PG en *Go6PGDH*. K197 y E203 corresponden a residuos relevantes para la oxidación de 6PG y descarboxilación del carboxilato del sustrato. Histidina 328 y arginina 322 son residuos parte de la región C-terminal del hemidominio de la subunidad adyacente, que contribuye con residuos en el sitio activo.

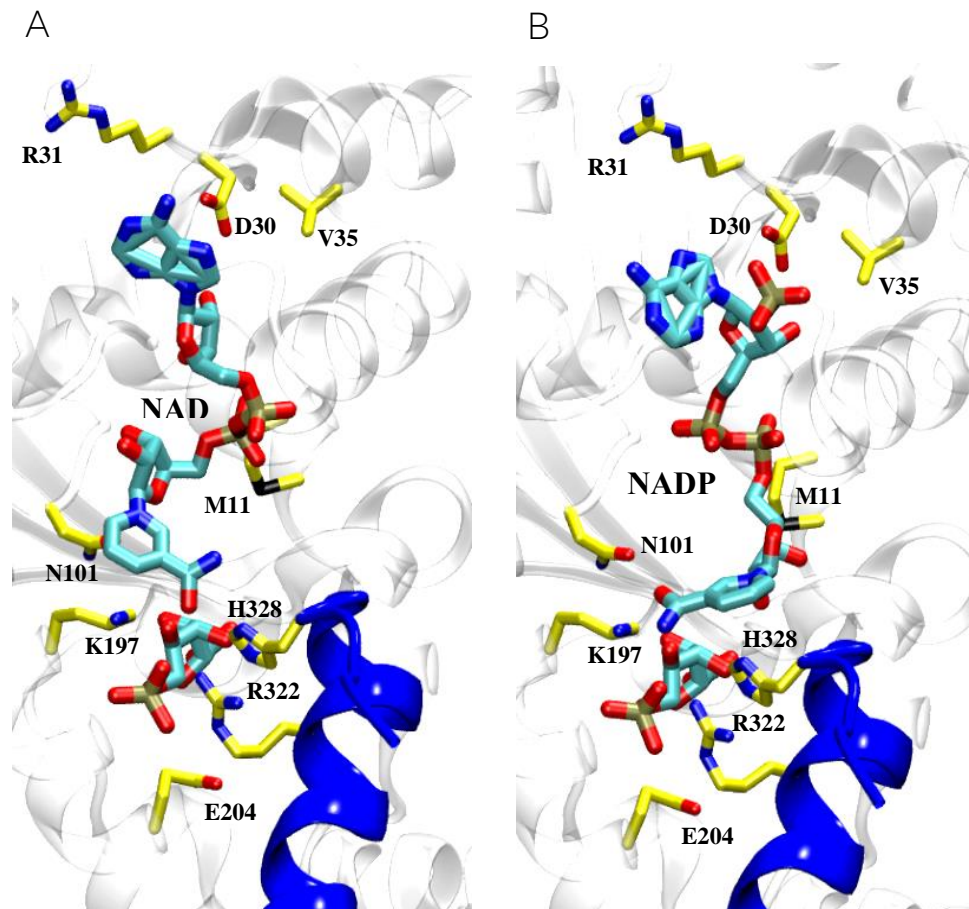


Figura 37. Interacción de NAD y NADP con residuos de *Go6PGDH*. Zoom del sitio activo de *Go6PGDH*. Adicional a los residuos que interactúan con el β hidroxiácido, se muestra el motivo de discriminación por dinucleótidos DRX3V y las interacciones que forman con los cofactores NAD (A) y NADP (B). En azul se representa la región C-terminal aportada por el hemidominio de l subunidad adyacente.

interacciones, sin embargo la gran mayoría de las conformaciones de éstos, no se ha visto en estructuras cristalográficas homólogas de la familia. De las simulaciones se seleccionó una conformación para cada dinucleótido, los valores obtenidos se encuentran representados en la tabla 8. En la figura 37 se muestra la representación del *docking* molecular de NAD y NADP, en ambos casos la región adenina-ribosa se orienta hacia el loop $\beta 2$ - $\alpha 2$. La *Go6PGDH* presenta la secuencia DRX₃V y forma parte de la rama 2 que presenta mayoritariamente un motivo D[V/L]X₃[A/V]. Esto es consistente con los resultados de estudios enzimáticos para esta proteína. El aspártico 30 cumple un rol importante en la interacción con el hidroxilo 2'(3,2 Å) de la ribosa parte de la región adenina del NAD, este residuo puede ser responsable de interactuar con el 2'-OH del NAD y de la repulsión con el grupo fosfato esterificado en la misma posición del NADP.

El *docking* molecular de 6PG y NAD permitió el posicionamiento de estos ligandos con el objetivo de iniciar estudios de dinámica molecular de esta enzima y evaluar interacciones de *Go6PGDH* con NAD y NADP durante trayectorias de 10 nanosegundos.

Tabla 8. Energías de interacción de *docking* molecular. Se muestran los valores de la energía de interacción de NAD, NADP, 6PG y 3HIBA y los valores de RMSD resultantes de las simulaciones usando autodock Vina.

Molécula	kcal/mol	RMSD
6PG	-5,3	2,314
NAD	-6,5	3,260
NADP	-6,4	3,976
3HIBA	-3,4	3,522

4. Dinámica molecular: Interacción de *Go6PGDH* con NAD, NADP y 6PG

4.1. Estabilidad conformacional de los sistemas de simulación

Las dinámicas moleculares fueron analizadas en primera instancia observando el RMSD de cada conformación con respecto a la estructura inicial, durante el tiempo de simulación, por medio de la función RMSD trajectory tool v3.0 incluido en VMD. En la figura 38 se representa el RMSD de cada cadena del tetrámero de *Go6PGDH* para los sistemas con

NADP y 6PG, así como NAD y 6PG. Para ambos casos se ven RMSD promedios en torno a los 3 Å, las cadenas principales de ambos sistemas logran estabilizarse luego de los 2 nanosegundos.

4.2. Puentes de Hidrógeno

Para este análisis se empleó el programa Hbonds 1.2 (VMD 1.9.1) como parte de un script creado en lenguaje Tcl/Tk para el cálculo del número en promedio y total de puentes de hidrógeno por residuo durante la trayectoria de dinámica molecular [67]. Se consideraron los puentes de hidrógeno directos, que se forman entre dos átomos a una distancia menor a 3,5Å entre el donante y el aceptor del hidrógeno, con un ángulo superior a 120° entre el donante, el hidrógeno y el aceptor, respectivamente.

4.2.1 Sistema *Go6PGDH* NAD/6PG

Se grafican en las figuras 39, 40 y 41, el curso temporal de los puentes de hidrógeno formados durante la simulación entre los ligandos y la cadena lateral y cadena principal de residuos que contribuyen con interacciones. En el caso del 6PG el patrón de puentes de hidrógeno establecidos durante la simulación es bastante similar en ambas subunidades, tanto para los enlaces formados por la cadena principal como las cadenas laterales. Las interacciones formadas por las cadenas laterales de K197 (residuo catalítico), N201, Y205 y S277 son importantes en la estabilización del ligando en la proteína. En ambas cadenas hay interacción estable de residuos que provienen de la alfa hélice final de la subunidad adyacente del dímero complementario, R322 y H328. Este resultado es relevante pues muestra que las interacciones formadas entre la región $\alpha 6$ y el ligando 6PG perduran durante el tiempo de simulación.

En el caso de NAD, figura 40, los puentes de hidrógeno estarían ubicados en tres zonas de la proteína. Una zona corresponde a la región que se ha denominado en este trabajo de tesis como loop $\beta 2$ - $\alpha 2$, el cual participa en la unión de la región ribosa-adenina del NAD. El residuo D30 es fundamental en establecer interacciones con el extremo 2'-OH. La otra región relevante corresponde al primer loop de la proteína, llamado p-loop o loop $\beta 1$ - $\alpha 1$. Ha sido identificado la importancia de esta zona en la unión a dinucleótidos en otras

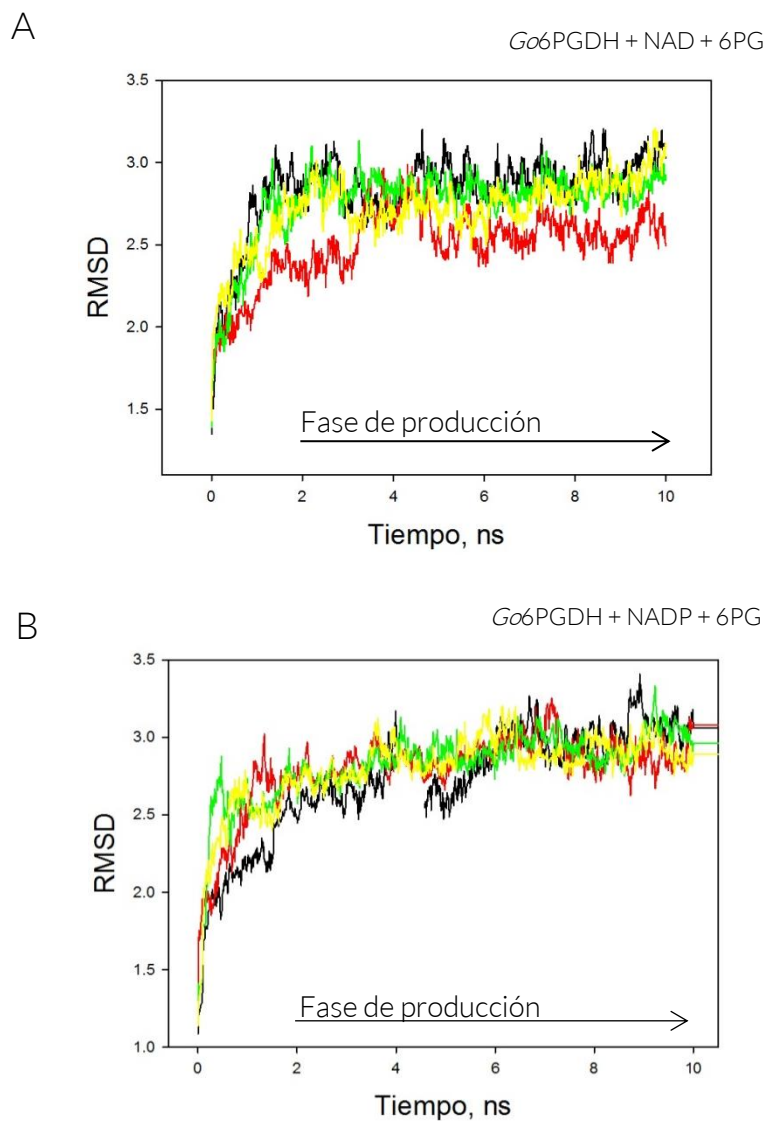


Figura 38. Representación RMSD de la cadena principal de *Go6*PGDH versus tiempo de simulación para los sistemas NAD/6PG (A) y NADP/6PG (B). En líneas coloreadas se representa la trayectoria RMSD por cadena principal de *Go6*PGDH para cada sistema. En negro se representa la cadena A, en rojo la cadena B, en verde la cadena C y en amarillo la cadena D.

deshidrogenasas [68]. Mutaciones de residuos en esta región están implicados en cambios de especificidad [69,70]. La cadena principal de los aminoácidos L8, G9 y M11 establecen interacciones con la región difosfato. R10 por su parte puede establecer puentes de hidrógeno con la región difosfato del NAD a través de su cadena principal como de su cadena lateral. Este residuo es ampliamente conservado en 6PGDH que presentan el motivo D[V/L]X₃A y no así en secuencias de 6PGDH que presentan motivo NRX₃K. La tercera región corresponde a la alfa hélice C-terminal del hemidominio de la subunidad adyacente, esta zona conforma un tipo de tapa del sitio activo (figura 40). Los residuos R322 y H328 pueden interactuar tanto con el 6PG como con la región nicotinamida.

4.2.2 Sistema *Go*6PGDH NADP/6PG

Para este sistema se analizaron los puentes de hidrógenos formados con NADP y 6PG. En el caso de éste último, los resultados fueron similares a el sistema anterior, en cambio, con NADP, se pierden interacciones que se forman entre *Go*6PGDH y NAD. Sin embargo es interesante la estabilización del NADP que ocurre durante la simulación por medio de los residuos R31 del loop β 2- α 2 y R10 del p-loop. La arginina 31 parece participar en la conformación de dos tipos de enlaces, uno es el empaquetamiento tipo π que se da con la adenina del NADP y la atracción electrostática que ocurre con el fosfato que se encuentra esterificado en el hidroxilo 2' de la ribosa del cofactor. R10 a diferencia de las interacciones que se forman en el sistema con NAD (exclusivamente con la región difosfato del dinucleótido), en el caso de NADP las interacciones transitan entre el fosfato 2' y el difosfato de este cofactor (Figura 41).

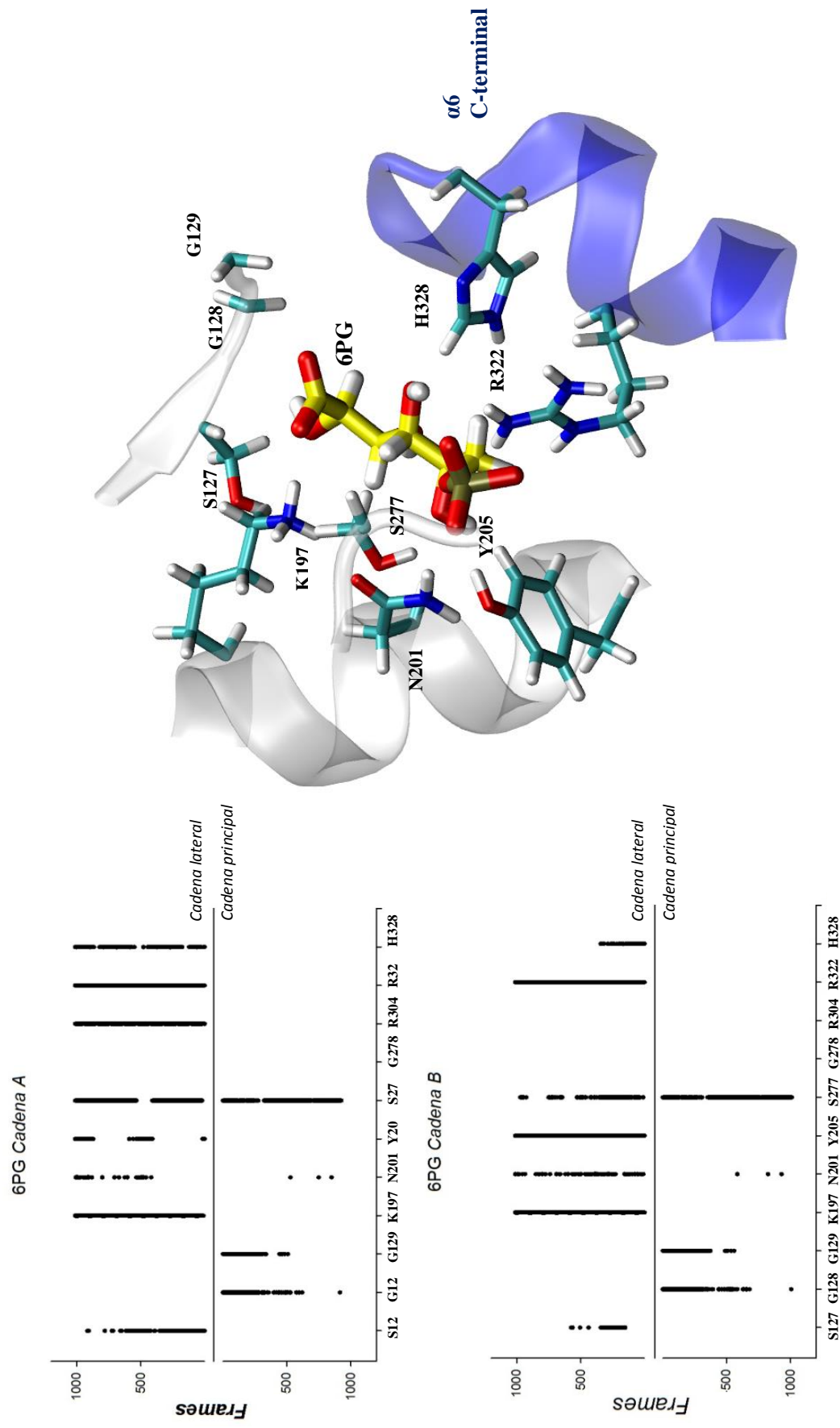
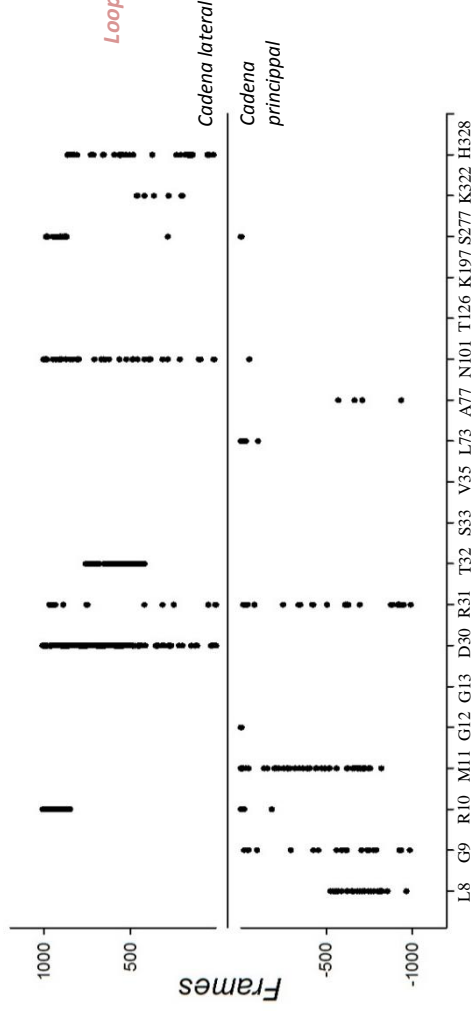


Figura 39. Puentes de hidrógeno por residuo que interactúan con 6PG en el sistema Go6PGDH NAD/6PG. En los gráficos se muestran puntos que corresponden al establecimiento de un puente de hidrógeno entre un residuo determinado (eje x) con el ligando 6PG de la cadena A (gráfico superior) y cadena B (gráfico inferior) durante 10 nanosegundos de simulación, que son representados en frames (un frame equivale a un femtosegundo). Para ambos gráficos se muestran los puentes de hidrógenos en los que hay participación de la cadena lateral y cadena principal de los residuos mostrados (mitad superior e inferior, respectivamente). A la derecha se visualizan los residuos que interactúan con el 6PG en el último frame de simulación.

NAD Cadena A



NAD Cadena B

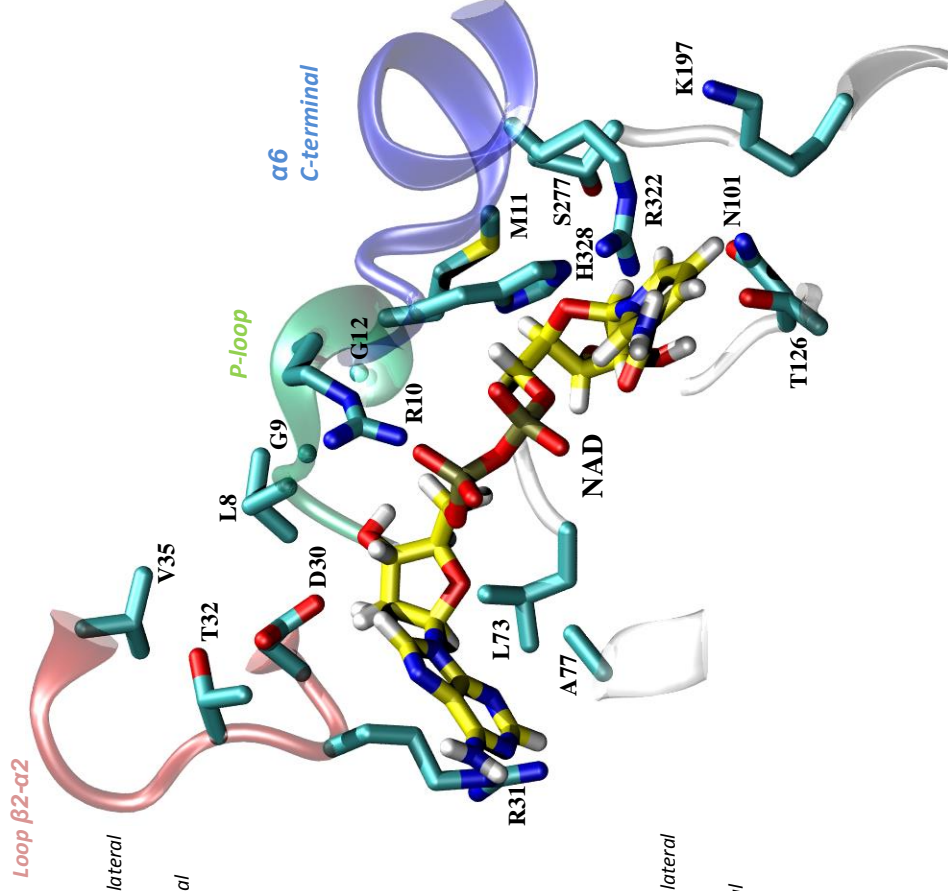
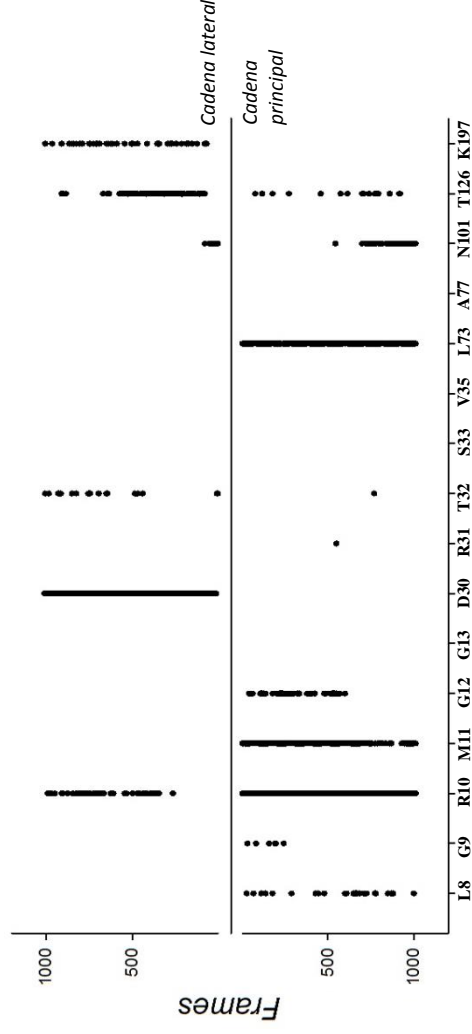


Figura 40. Puentes de hidrógeno por residuo que interactúan con NAD En el sistema Go6PGDH NAD/6PG. En los gráficos se muestran puntos que corresponden al establecimiento de un puente de hidrógeno entre un residuo determinado (eje x) con el ligando NAD de la cadena A (gráfico superior) y cadena B (gráfico inferior) durante 10 nanosegundos de simulación, que son representados en frames (un frame equivale a un femtosegundo). Para ambos gráficos se muestran los puentes de hidrógenos en los que hay participación de la cadena lateral y cadena principal de los residuos mostrados (mitad superior e inferior, respectivamente). A la derecha se visualizan los residuos que interactúan con el NAD de la cadena A en el último frame de simulación. Los hidrógenos no se representan con motivo de simplificar la figura.

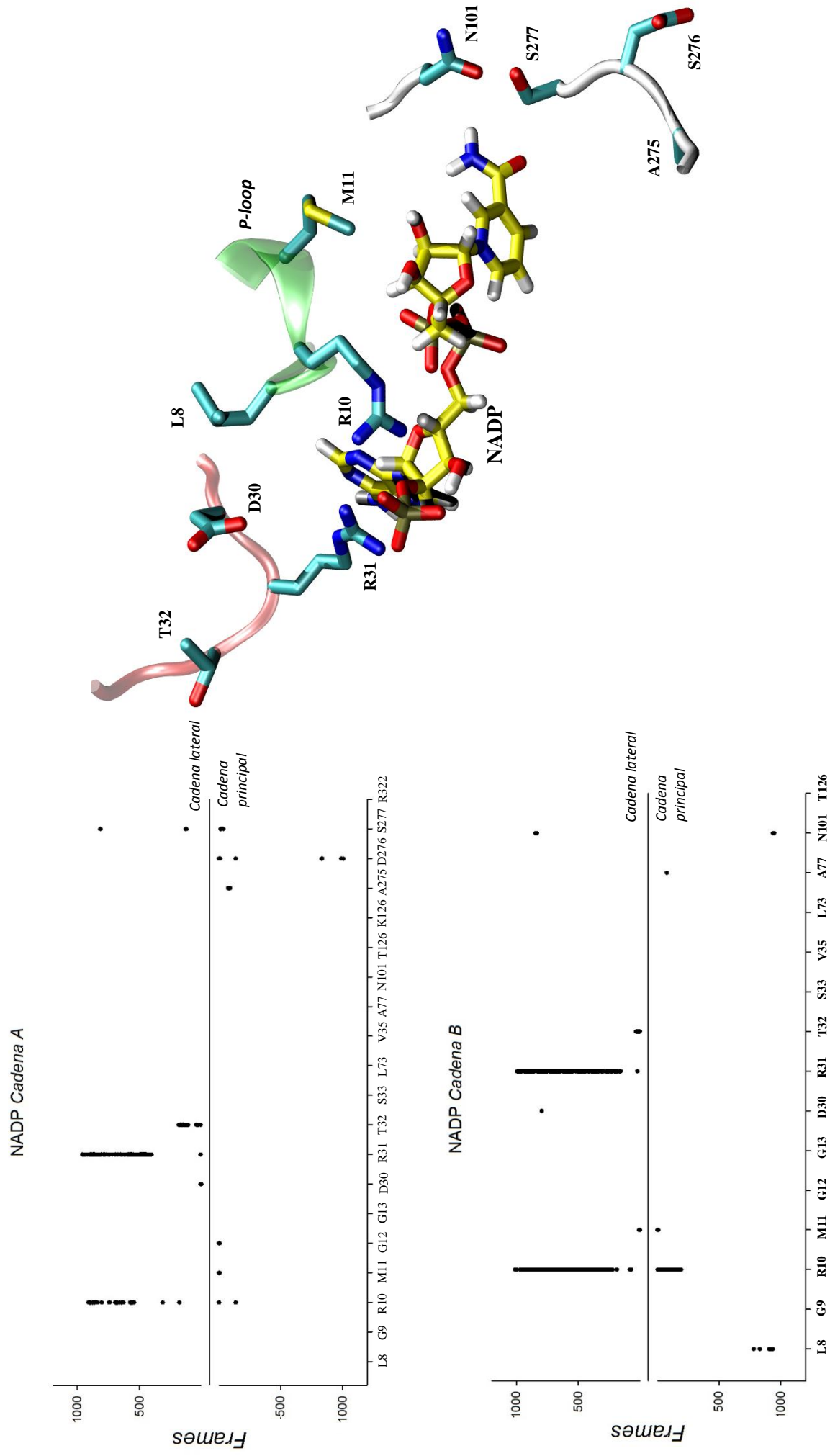


Figura 41. Puentes de hidrógeno por residuo que interactúan con NADP en el sistema G6PGDH NADP/6PG. En los gráficos se muestran puntos que corresponden al establecimiento de un puente de hidrógeno entre un residuo determinado (eje x) con el ligando NADP de la cadena A (gráfico superior) y cadena B (gráfico inferior) durante 10 nanosegundos de simulación, que son representados en frames (un frame equivale a un femtosegundo). Para ambos gráficos se muestran los puentes de hidrógenos en los que hay participación de la cadena lateral y cadena principal de los residuos mostrados (mitad superior e inferior, respectivamente). A la derecha se visualizan los residuos que interactúan con el NADP de la cadena A en el último frame de simulación. Los hidrógenos no se representan con motivo de simplificar la figura.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la evolución estructural de la familia 6PGDH, se evaluó el comportamiento cinético de *Ec*6PGDH y *Go*6PGDH usando NAD o NADP como sustratos para la oxidación de 6PG, se determinó la preferencia por dinucleótidos en mutantes del motivo NRX₃K de *Ec*6PGDH y finalmente se modeló la estructura de *Go*6PGDH para poder estudiar mediante dinámica molecular las interacciones con sus sustratos. Los resultados se contextualizan desde dos puntos de vista. Uno es la relación entre la especificidad por dinucleótidos y la presencia de motivos conservados en el dominio N-terminal de la superfamilia β HADH. El segundo guarda relación con las consecuencias de la duplicación del hemidominio C-terminal sobre el comportamiento cinético y la conformación del bolsillo de unión al 6PG.

1. EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE LA FAMILIA 6PGDH

Por medio de diversas metodologías se pudo analizar, en el contexto de la evolución estructural, los eventos de duplicación y cambio en el motivo conservado del loop β 2- α 2 de la familia 6PGDH. En el trabajo no se aborda el mecanismo genético de evolución, sino sólo evidencias de los estadios estructurales en la evolución de la familia. A grandes rasgos se describen tres estados evolutivo-estructurales (figura 14). El primero se da en el nivel de superfamilia, corresponde a una enzima que posee un dominio N-terminal, que presenta motivos que podrían discriminar preferentemente por uno u otro cofactor, y un dominio C-terminal de un sólo hemidominio de 6 alfa hélices. En el siguiente estado el dominio helicoidal se desempaca y adquiere una región terminal prolongada, capaz de establecer interacciones con el sitio activo de la subunidad adyacente; el dominio N-terminal es capaz de establecer interacciones con el hemidominio helicoidal de la subunidad complementaria (figura 13). El área de interacción que se da entre estos dos últimos dominios mencionados en *Gm*6PGDH, es mayor que en 6PGDH de hemidominios duplicados. Es probable que estas interacciones le confieren estabilidad a la estructura cuaternaria en enzimas tetraméricas, y que se harían menos necesarias en enzimas de hemidominios duplicados. Finalmente, en el tercer estado evolutivo ya ha ocurrido la duplicación del hemidominio helicoidal, modificando el estado de asociación oligomérica, de un tetrámero a un dímero,

pero conservándose el empaquetamiento de cuatro hemidominios del estado anterior. Al ocurrir el evento de duplicación fusión, el hemidominio duplicado logra complementar la interfaz que se da entre dímeros adyacentes de las 6PGDHs pequeñas, de tal manera que las nuevas 6PGDH conservan el empaquetamiento de dos hemidominios C-terminales en un sólo dominio helicoidal (figura 12). El segundo y tercer estado, equivalen a las ramas principales de la filogenia de las 6PGDHs, y se les denomina como subfamilias de uno y dos hemidominios. Probablemente la duplicación del dominio helicoidal repercutió sobre la estabilidad y vía de plegamiento de la enzima (figura 20).

Las primeras 6-fosfogluconato deshidrogenasas de bacteria y eukarya, cuyas estructuras fueron resueltas por medio de cristalografía de rayos X, corresponderían a enzimas diméricas cuya repetición de seis alfa hélices presentan dos ejes de simetría. Esta particularidad estructural fue reportada por primera vez en 1995, mediante la esquematización de un diagrama de topología de la 6PGDH de *Ovis aries* [29]. Hasta esa fecha existía evidencia en literatura, de enzimas que presentaban actividad 6PGDH, pero que a diferencia de las enzimas de estructura conocida, las subunidades presentaban pesos moleculares más bajos y conforman tetrámeros. En el 2012 la estructura de *Gm6PGDH* fue depositada en el PDB, haciendo finalmente posible sugerir la estructura del estado intermediario en la evolución de la familia. Sin embargo, tal antecedente no fue incluido en la revisión de Andreeva y cols [45], realizada el 2006. Más aún, una nueva reedición en el 2013 de la base de datos de SCOP [46], tampoco considera la existencia de un estado intermediario. Por lo tanto, el presente trabajo actualiza el estado de conocimiento que se encuentra en literatura sobre la evolución de la familia 6PGDH.

El árbol filogenético se divide en dos ramas principales (rama 1 y 2, figura 15), correspondientes a ambas subfamilias de 6PGDH (con uno y dos hemidominios). En la subfamilia 6PGDH con C-terminal de hemidominio único (rama 2, figura 15), sólo se encuentran representantes de bacterias. La otra rama principal del árbol filogenético de la familia 6PGDH, corresponde a la subfamilia de las 6PGDH de cadena larga. En la primera división de la subfamilia de hemidominios duplicados, el nodo que la divide da origen a una rama exclusiva de fungi (rama 4, figura 15), que presenta únicamente el motivo D[V/L]X₃[N], la otra rama principal de esta subfamilia (rama 3, figura 15), incluye

6PGDHs bacterianas y de los reino animal, vegetal y protista, todas presentan el motivo NRX₃K.

Las especies fungi incluidas en el análisis filogenético, interesantemente, todas poseen isoenzimas con hemidominio duplicado que presentan el motivo D[V/L]X₃[A], y 6PGDH de hemidominios simples con el mismo motivo. En particular, *Metarzia acridum*, posee 3 isoenzimas, dos con dominio helicoidal duplicado que presentan motivos D[V/L]X₃[A] y NRX₃K, respectivamente, y una enzima de hemidominio simple que presenta un motivo D[V/L]X₃[A]. El segundo nodo de la subfamilia de 6PGDH con hemidominios duplicados, da origen a protistas en una rama y en la otra a diversas especies, que incluyen alfa proteobacterias, termotogales, levaduras, mamíferos, plantas, actinobacterias y gamaproteobacterias entre otros. La distribución de los diversos clados implica que en la evolución de los genes de esta enzima habría ocurrido eventos de adquisición de genes de 6PGDH eucarióticos desde bacterias vía transferencia horizontal [71]. Otro aspecto que se desprende de la filogenia de las 6PGDHs, es la presencia en beta proteobacterias de 6PGDHs de ambas subfamilias, similar a lo que ocurre con fungi, pero en este caso corresponden a 6PGDHs con dominios duplicados que presentan motivos de unión a NADP y 6PGDHs de hemidominios simples con motivos de unión para NAD. Para el caso de la subfamilia de 6PGDH de un hemidominio, el nodo que origina enzimas con especificidad por NADP ocurriría en eventos posteriores a la duplicación del hemidominio. (rama 5, figura 15).

Estas coincidencias sugieren la hipótesis de que la aparición de las 6PGDHs es posterior a LUCA, por lo que la rama oxidativa de la vía de las pentosa fosfato no sería parte de un organismo ancestral, sugiriendo que la aparición de la función 6PGDH desde enzimas capaces de oxidar otros βHAs, habría sido crucial para el origen de la vía de las pentosa fosfato. Todo esto es consistente con una posterior búsqueda bibliográfica de 6PGDH en arqueas ya que este dominio aparentemente carece de enzimas de la rama oxidativa de la vía de las pentosas salvo el género *Halobacterium*, que únicamente posee 6PGDH [72]. Interesantemente, estas enzimas presentan sólo un hemidominio en el C-terminal y motivos de dualidad o preferencia por NAD, D[V/L]X₃[A/V/L] en el loop β2-α2. La rama de la subfamilia 6PGDH de cada corte se divide en ramas secundarias que

presentan mayoritariamente el motivo D[V/L]X₃[A], esto ocurre hasta el tercer nodo de división en el árbol, donde da origen a una rama de 6PGDH que posee el motivo de preferencia por NADP. Esto junto con la evidencia de la 6PGDHs del genero *Halobacterium* sugieren que la familia 6PGDH habría primero surgido de la especiación de una enzima β HADH de carácter NAD preferente, determinado en el dominio Rossmann y que adquirió especificidad por 6PG a través de residuos que son parte del motivo catalítico KMXHNXXE y la extensión de la región terminal en el dominio helicoidal, capaz de contribuir con residuos en el sitio activo de subunidades adyacentes. Es probable que la evolución de la especificidad por 6PG en β HADH permitió la conexión de la rama oxidativa con la rama no oxidativa contribuyendo a la conformación de la vía de las pentosas fosfato en el metabolismo central.

2. EFECTO DEL 6PG EN LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS CON UNO Y DOS HEMIDOMINIOS

Ambas enzimas silvestres estudiadas en este trabajo de tesis ya habían sido caracterizadas parcialmente. En 2010 se resolvió la estructura para *Ec6PGDH* [9]. En dicho trabajo se determinaron los parámetros cinéticos para NADP y 6PG en una concentración saturante de 6PG (2 mM), pero no se reportaron parámetros para NAD, ni tampoco en estudios posteriores. También en 2010, se publicaron los resultados de los parámetros cinéticos para NAD y NADP a una concentración no saturante de 6PG (5 mM) para *Go6PGDH* [41], por lo tanto ya se contaba con evidencia de la preferencia de esta enzima por NAD. Nuestra enzima fue facilitada por los autores de ese estudio.

Nuestra interrogante, entonces, se enfocó en cuantificar el poder discriminatorio por NAD y NADP en estas enzimas y observar el comportamiento de los parámetros cinéticos de NAD y NADP cuando se va saturando el sitio activo con 6PG, en enzimas que difieren en la presencia de uno o dos hemidominios y en el motivo β 2- α 2.

El comportamiento de los parámetros cinéticos de NADP para *Ec6PGDH* y de NAD y NADP para *Go6PGDH*, frente al incremento de 6PG, fue ajustado a un comportamiento hiperbólico creciente para las k_{cat} e hiperbólico decreciente para K_M (figura 21, 23, 24). Es interesante que al saturar los sitios activos con el β HA, se obtienen constantes catalíticas

similares independiente de la enzima y del cofactor que se use para la oxidación del 6PG. En condiciones de saturación las K_M , a diferencia de las k_{cat} , sí varían desde el rango micromolar a milimolar. Interesantemente en *Go6PGDH*, la concentración de 6PG con la que se alcanza la mitad del valor de k_{cat} en la saturación, es menor para NAD, que para NADP. La concentración de 6PG para alcanzar el doble del valor de la K_M en la saturación, es similar en ambos dinucleótidos. Cuando la 6PGDH de *E. coli* usa NAD como cofactor, se necesita saturar con mayor concentración de 6PG los sitios activos, para obtener un valor de k_{cat} similar a la k_{cat} de NADP en la saturación.

Los comportamientos observados en *Ec6PGDH* con NADP y *Go6PGDH* con NAD y NADP se pueden asociar a comportamiento en donde las enzimas forman un complejo ternario [72]. Esto quiere decir que la entrada de sustratos y salida de los productos puede ocurrir de manera ordenada o secuencial, o bien, puede ser al azar. Para establecer esto, sería necesario estudiar la inhibición por producto. Este aspecto no fue abordado en esta tesis, sin embargo, los experimentos de ITC muestran que tanto 6PG como NADP se pueden unir a la enzima libre, de manera independiente con constantes de disociación de 10,7 y 10,9 μM , respectivamente. Tomando en su conjunto los resultados, sugerimos que *Ec6PGDH* posee un mecanismo cinético de tipo desordenado. Esta propuesta difiere de lo expuesto por los autores que determinaron la estructura cristalográfica de *Ec6PGDH*, quienes proponen que la enzima tiene mecanismo ping-pong [9]. El que ambas enzimas posean un comportamiento similar, al saturar el sitio activo con 6PG, propone que el mecanismo podría ser conservado, tanto en representantes con uno o dos hemidominios C-terminal.

Las cinéticas de 6PG para *Ec6PGDH* y *Go6PGDH*, presentan un mejor ajuste al comportamiento sigmoideo, mostrando coeficientes de Hill similares, 1,25 para *Ec6PGDH* y 1,52 para *Go6PGDH* (figura 25 y 26). Esto nos sugiere que la conformación oligomérica permitiría un nivel de comunicación entre los sitios de 6PG en ambas enzimas. Las constantes catalíticas en ambos sistemas alcanzan un valor similar (42,9 y 44,5 s^{-1}). Los valores de $K_{0,5}$, en cambio difieren, de 75 μM para el caso de *Ec6PGDH* a 497 μM para *Go6PGDH*. Estos resultados se correlacionan con los resultados preliminares de ITC, que

sugieren que la afinidad de la *Ec6PGDH* por 6PG sería mucho mayor que la de *Go6PGDH*.

Si bien ambas enzimas son específicas por 6PG y no presentan actividad por 3HIBA, incluso a concentraciones por sobre 50 mM (datos no mostrados), pareciera ser que la enzima de hemidominio duplicado además de poseer mayor afinidad por 6PG, es más insensible a la inhibición por 3HIBA *Go6PGDH* (30 % de inhibición a 50 mM, figura 28). Es probable que en el sitio activo *Go6PGDH* aun se conserven interacciones propias de 3HIBADHs que con la duplicación del hemidominio en la familia se hayan perdido.

3.IMPLICANCIA DE LOS MOTIVOS NRX₃K y DVX₃A en *Ec6PGDH* EN LA PREFERENCIA POR DINUCLEÓTIDOS

Nuestros resultados muestran que para *Ec6PGDH* el cociente de las constantes de especificidad de NADP y NAD es de 1715, lo que indica que es una enzima fuertemente preferente por NADP. Para el caso de *Go6PGDH* el mismo cociente pero respecto de NAD es 16,6, indicando que es una enzima preferente por NAD, en lo que respecta a su especificidad por sustrato. Esta característica bien podría ser atribuida a los residuos del loop $\beta 2-\alpha 2$ que interactúan con el 2'-fosfato en el caso de NADP o con el 2'-OH del NAD. Es consistente el carácter fuertemente específico del motivo NRX₃K por NADP atribuido para *Ec6PGDH* y otras 6PGDH que lo presentan. Sin embargo, es difícil proponer que el motivo D[V/L]X₃A, esté relacionado con preferencia por NAD, pues no existen más caracterizaciones de representantes de la familia 6PGDH con estas características, para afirmar esto. En *Go6PGDH*, es probable que la presencia de R31 en el loop $\beta 2-\alpha 2$, le confiera la capacidad de unir NADP con mayor afinidad que enzimas con el motivo. D[V/L]X₃A. Esto tendría que ser evaluado con mutaciones en ese residuo ya sea por alanina o por residuos como V o L, presentes en el motivo, que establezcan únicamente interacciones apolares con la adenina del cofactor y prescindan de formar interacciones con el 2'-fosfato, exclusivo del NADP.

La racionalidad de las mutaciones se realizó bajo los siguientes argumentos. El reemplazo de asparragina por ácido aspártico debiese tener una fuerte implicancia sobre la unión a NADP, debido al impedimento electrostático que se daría entre este residuo y las

dos cargas negativas del 2'-fosfato. En la estructura cristalográfica de *Ec6PGDH* la lisina 38 interactúa con el 2'-fosfato del ATR, por lo que el reemplazarlo por residuos apolares podría también afectar la afinidad por NADP. La mutación de R34V, en cambio, podría no sólo discriminar exclusivamente por la preferencia por NADP pues, este residuo es parte de enzimas con la secuencia DRX₃V y que agrupan con 6PGDHs de la rama 2 del árbol filogenético (figura 15), las cuales presentan mayoritariamente el motivo D[V/L]X₃[V/A]. Siendo ésta arginina común con el motivo NRX₃K, su presencia podría también discriminar por el uso de NAD. Por otro lado, en enzimas homólogas de la superfamilia que poseen preferencia por NAD, se ha visto la presencia de aminoácidos de cadenas laterales hidrofóbicas, esto se correlaciona con los resultados filogenéticos obtenidos en el capítulo I. Por lo tanto, la idea de mutar el motivo NRX₃K altamente conservado en 6PGDHs NADP específicas, por el motivo DVX₃A se fundamentó en obtener una enzima con residuos homólogos a los de la 3HIBADH humana, la que es preferente por NAD, además de ser la única enzima de la superfamilia cuya estructura ha sido determinada con este dinucleótido.

Al mutar el motivo NRX₃K de *Ec6PGDH* por el motivo DVX₃A presente en la 3HIBADH de humano, enzima cristalizada con NAD, se logra revertir la preferencia de por dinucleótidos (figura 29). En la tabla 6 se muestran los parámetros cinéticos a 2 mM de 6PG, considerando esta concentración como representativa fisiológica. Sin embargo es importante comparar en la saturación, pues como se vio, los parámetros cinéticos de *Ec6PGDH* se ven modificados al variar la concentración de 6PG. Es probable que las mutantes posean un comportamiento similar

La mutante del motivo, N33D-*Ec6PGDH*, disminuye la K_M de la enzima silvestre a una tercera parte y aumenta en un tercio el valor de la k_{cat} , para NAD. Para NADP en cambio, la constante de especificidad disminuye en cinco órdenes de magnitud. Por lo tanto, con una sola mutación se logra una *Ec6PGDH* mutante, preferente por NAD. A pesar de aquello, la K_M resulta ser alrededor de 5 veces mayor que la concentración fisiológica de NAD en *E. coli*. Con las mutantes doble y triple (N33D-K38A y N33D-R34V-K38A de *Ec6PGDH*) se observa el valor de la K_M para NAD de la enzima silvestre. La k_{cat} en cambio, aumenta a 12, 6 s⁻¹ y a 25,4 s⁻¹ para la mutante doble y triple, respectivamente.

Las mutantes del motivo $\beta 2-\alpha 2$, si bien logran revertir la especificidad de la enzima silvestre, tornándola más preferente por NAD que con NADP, no podría ser usada como variante NADH productora en el metabolismo de *E. coli*, debido a su elevada K_M . Otros residuos estarían implicados en la afinidad por NAD, tal vez entre aquellos del loop $\beta 2-\alpha 2$ no estudiados en este trabajo. Los aminoácidos serina y treonina son estrictamente conservados 2 residuos río arriba de N en el motivo $\beta 2-\alpha 2$ de 6PGDH que presentan el motivo NRX₃K (rama 3 y 5, figura 15). Por su parte, en esta posición las enzimas que presentan el motivo D[V/L]X₃[A/V], poseen asparragina o lisina. Es probable que estos aminoácidos, debido a su longitud puedan establecer puentes de hidrógeno con el 2'-OH. Otra posibilidad es mutar K38 por otros residuos distintos a alanina (evaluada en esta tesis) que están presentes en enzimas de la rama 4 o 2 de la filogenia (figura 15). Otra zona importante en la discriminación por dinucleótidos en enzimas de esta superfamilia, corresponde al loop $\beta 1-\alpha 1$, denominado como p-loop. Se aprecia una arginina conservada en enzimas que presentan el motivo D[V/L]X₃[A/V], la cual participa de interacciones estables que estabilizan el NAD en la región difosfato. Este residuo no se encuentra presente en 6PGDHs con el motivo NRX₃K, por lo que mutar por ese residuo sobre la mutante triple de *Ec*6PGDH constituye otra estrategia de diseño racional en pos de obtener un incremento en la afinidad por NAD.

La preferencia estricta por NADP en representantes de la familia 6PGDH, estaría determinada por la presencia del motivo NRX₃K. Los residuos de este motivo estarían actuando como una verdadera pinza electrostática, sosteniendo al NADP en la región ribosa-adenina, por medio de interacciones con el 2'-fosfato con la adenina del dinucleótido [12]. Para el caso del NAD en cambio, no podemos asegurar que la presencia del motivo D[V/L]X₃[A/V] confiera afinidad a la enzima. Los residuos que estabilizan al NAD estarían distribuidos en otras zonas del bolsillo de unión al dinucleótido (loop $\beta 1-\alpha 1$, $\beta 2-\alpha 2$ y región C-terminal, figura 42) y no fundamentalmente en el loop $\beta 2-\alpha 2$ como ocurre en *Ec*6PGDH con NADP. Sería necesario caracterizar las 6PGDH de otras ramas para poder correlacionar los niveles de preferencia por uno u otro dinucleótido con la de agrupación en distintas ramas principales en el árbol filogenético de la familia 6PGDH.

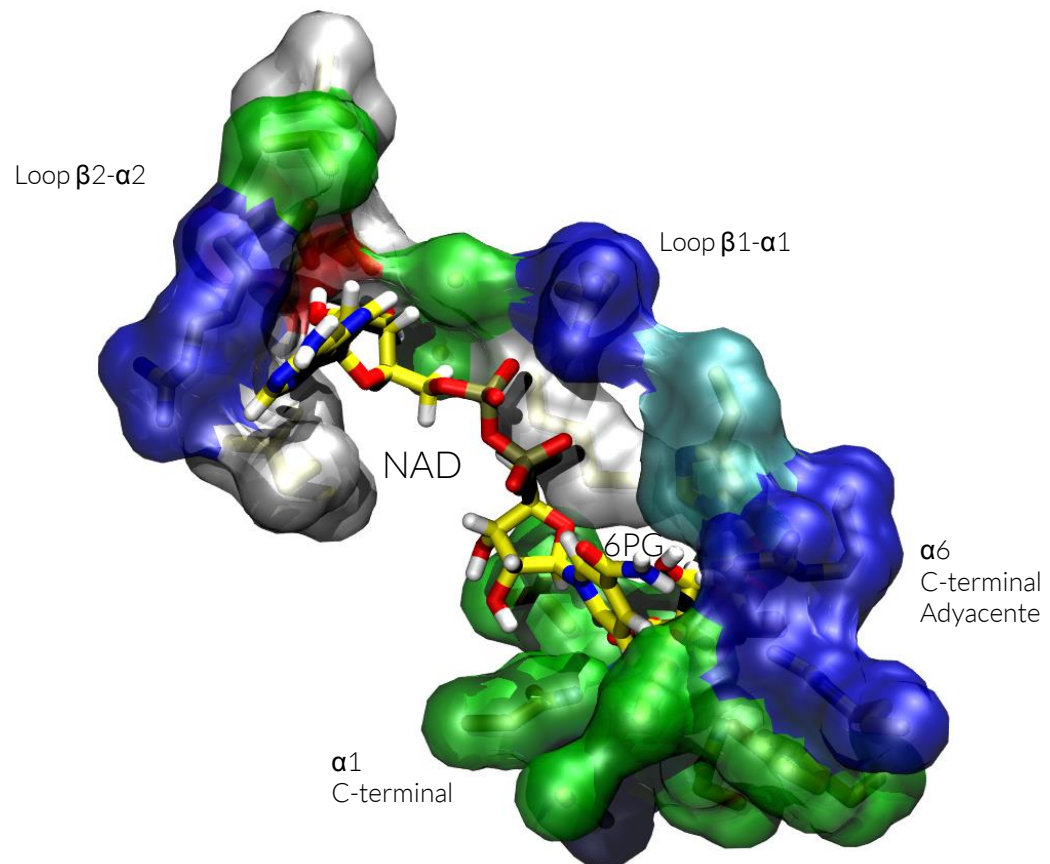


Figura 42. Bolsillo de unión a NAD y 6PG en *Go6PGDH*. Los residuos están representados en *Surf* y coloreados según el tipo de aminoácido. Éstos provienen del loop $\beta 1-\alpha 1$, $\beta 2-\alpha 2$ y de la $\alpha 6$ del hemidominio de la subunidad complementaria.

4. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE *Go6PGDH*

La obtención de una estructura para *Go6PGDH* con 6PG y dinucleótidos, resulta fundamental en este trabajo de tesis, pues permitiría entender las propiedades cinéticas obtenidas para esta enzima y correlacionarlas con las interacciones que se dan con los residuos del sitio activo. Por otro lado, comprender como se conforma el bolsillo de unión al 6PG, es un aspecto que no ha sido esclarecido aún en las 6PGDH de un sólo hemidominio y que constituye una de las preguntas pendientes en la descripción de la historia evolutiva de la superfamilia.

Aunque se obtuvieron cristales de *Go6PGDH* en estado apo y complejados con NAD, 6PG, hasta la fecha no se ha podido difractar. En vista de esta situación, se hizo necesario modificar la estrategia y se privilegió realizar un modelamiento por homología de la estructura de *Go6PGDH*. El *docking* se realizó con la intención de posicionar tanto dinucleótidos como 6PG. Si bien hay estructuras homólogas que presentan dinucleótidos en sus PDBs, esta metodología se tornó atractiva en vista que se desconoce totalmente la contribución del hemidominio complementario en la unión a sustratos en enzimas 6PGDH de un sólo hemidominio. Además, no existen PDBs en la superfamilia que contengan 3HIBA cristalográfico por lo que no es posible comparar con el patrón de interacciones de 6PG. El modelo que se obtuvo para la *Go6PGDH*, junto con el posicionamiento de los ligandos, reafirman los resultados obtenidos en el capítulo I de esa sección, de que hay intercambio de elementos de estructura secundaria de hemidominios adyacentes que contribuyen con residuos en la interacción con 6PG (figura 36 y 37)

Se simularon dos sistemas de *Go6PGDH*: con los ligandos 6PG y NAD; con los ligandos 6PG y NADP. Se cuantificaron los puentes de hidrógenos con 6PG, NAD y NADP. Los puentes de hidrógeno que se forman entre la enzima y 6PG provienen de dos subunidades de la proteína. La $\alpha 6$ de la subunidad adyacente contribuye con 2 o 3 puentes de hidrógeno durante el tiempo de simulación, correspondiendo a la cuarta parte del total de interacciones que estabilizan el β HA. En la figura 39 se cuantifican las interacciones por residuo, durante el tiempo de simulación, para las dos cadenas analizadas R332 e H328 aportan con puentes de hidrógeno estables. Lo importante de este resultado es que nos dice que el empaquetamiento de la $\alpha 6$ en la subunidad adyacente es estable en el tiempo y las

interacciones que se forman con residuos de esta subunidad y 6PG perduran durante la simulación. Es probable que estas interacciones sean ubicuas en todos los representantes de la familia 6PGDH, debido a la presencia prácticamente conservada de estos dos residuos (figura 43).

Las interacciones con NAD y NADP, se pueden clasificar de acuerdo con su proveniencia desde 3 zonas distintas de la proteína. Una zona es el loop $\beta 2-\alpha 2$, que no amerita discusión pues se ya se ha abordado la implicancia de éste en la discriminación por los dinucleótidos, y los resultados apuntan todos a la misma dirección. La otra zona de interacción proviene del loop $\beta 1-\alpha 1$ (p-loop). En el caso del NAD, todos los residuos del p loop contribuyen, en mayor a menor medida, a la formación de puentes de hidrógeno desde la cadena principal a la región difosfato con este ligando. Mención especial tiene la R10, que en nuestras simulaciones hemos visto que puede formar puentes de hidrógeno tanto desde su cadena principal como su cadena lateral, con el NAD (figura 40). Este resultado nos permitió darnos cuenta que la R del p-loop es un residuo conservado en las 6PGDHs con motivo D[V/L]X₃[V/A] y no en aquellas deshidrogenasa de la rama 3 del árbol filogenético (figura 43). En el caso del NADP en cambio, el único residuo del p-loop que forma puentes de hidrógeno es la R10, en las dinámicas pareciera verse forzada a transitar entre unión con el 2'-fosfato y la región difosfato del NADP. Finalmente, la tercera región corresponde a la $\alpha 6$ de la subunidad adyacente, que si bien establece interacciones con el 6PG, debido a la proximidad también cumpliría en general en acomodar y estabilizar la región nicotinamida de los dinucleótidos. Esto tiene relevancia, pues corresponde a la zona donde ocurre la catálisis enzimática.

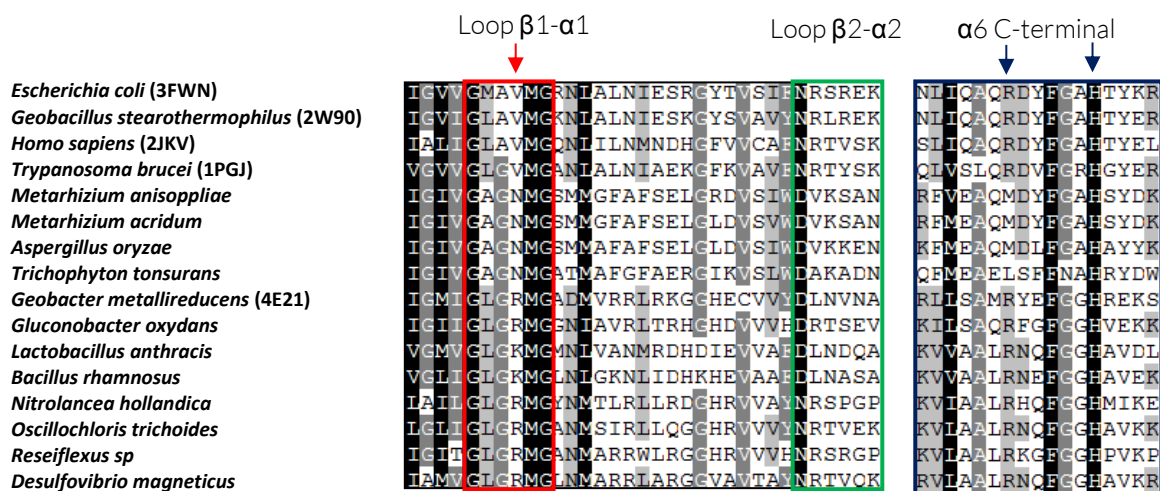


Figura 43. Motivos que contribuyen al sitio activo en la familia 6PGDH. Se muestra el alineamiento de un total de 16 secuencias de 6PGDHs, se tomaron 4 secuencias de cada una de las ramas principales de la filogenia de la familia. En rectángulo rojo se muestra el loop $\beta 1-\alpha 1$, en flecha roja se señala la posición de R10. En rectángulo verde se identifican los residuos propios del loop $\beta 2-\alpha 2$. En rectángulo azul se señala la conservación de los residuos parte de la $\alpha 6$ de enzimas con uno o dos hemidominios en el dominio C-terminal, en flechas azules se muestran los residuos que se analizaron en las dinámicas moleculares.

CONCLUSIONES

Evolución estructural de la familia 6PGDH

En la historia evolutiva de la superfamilia β HADH, el origen de la familia 6PGDH coincide con la aparición de elementos de estructura secundaria en el sitio activo, que son contribuidos desde subunidades adyacentes. En esta familia la duplicación del hemidominio C-terminal habría ocurrido de manera previa a la segregación de los motivos del loop β 2- α 2, que estarían implicados en la especificidad por cofactor.

Expresión y purificación de Go6PGDH y Ec6PGDH silvestre y mutantes

Las proteínas purificadas a homogeneidad, de Go6PGDH y Ec6PGDH son activas y estables, en tanto que las mutaciones en el loop β 2- α 2 de Ec6PGDH no afectan el contenido de estructura secundaria.

Efecto del incremento del 6PG en la actividad de Ec6PGDH y Go6PGDH con NADP y NAD

El incremento del 6PG modula la preferencia por dinucleótidos en enzimas con distintos motivos en el loop β 2- α 2, independiente de la presencia de uno o dos hemidominios C-terminal. Sólo en el caso de Ec6PGDH, la tendencia del comportamiento de los parámetros cinéticos para NAD y NADP difiere en su dependencia con la concentración de 6PG.

Ambas enzimas alcanzan valores similares de actividad específica en la saturación del 6PG, independiente del cofactor utilizado.

Implicancia en la preferencia por dinucleótidos de los motivos NRX₃K y DVX₃A en Ec6PGDH

Ec6PGDH prefiere NADP sobre NAD 1715 veces. En cambio, la mutante del motivo del loop β 2- α 2 de Ec6PGDH, DVX₃A, es preferente por NAD 33 veces. Go6PGDH por su parte, posee preferencia por NAD 16,6 veces.

Interacción de 6PG y dinucleótidos con residuos del sitio activo de Go6PGDH

En el sitio activo de *Go6PGDH* existe contribución intersubunitaria de residuos provenientes de la alfa hélice 6 de hemidominios adyacentes (de la misma manera que ocurre en *Ec6PGDH*).

Los residuos del loop $\beta 1-\alpha 1$ y del $\beta 2-\alpha 2$ de *Go6PGDH* estabilizan la región difosfato y ribosa-adenina del NAD, respectivamente. En cambio, residuos en el loop $\beta 1-\alpha 1$ y $\beta 2-\alpha 2$ estabilizan al NADP principalmente por interacciones electrostáticas con el fosfato 2'.

REFERENCIAS

- [1] Wetlaufer, D. B. (1973). "Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(3): 697-701.
- [2] Forslund, K. and E. L. Sonnhammer (2012). "Evolution of protein domain architectures." *Methods Mol Biol* 856: 187-216.
- [3] Murzin, A. G., et al. (1995). "SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures." *J Mol Biol* 247(4): 536-540.
- [4] Yang, S. and P. E. Bourne (2009). "The evolutionary history of protein domains viewed by species phylogeny." *PLoS One* 4(12): e8378.
- [5] Kim, H. S., et al. (2013). "Widespread recruitment of ancient domain structures in modern enzymes during metabolic evolution." *J Integr Bioinform* 10(1): 214.
- [6] Njau, R. K., et al. (2001). "New developments in our understanding of the beta-hydroxyacid dehydrogenases." *Chem Biol Interact* 130-132(1-3): 785-791.
- [7] Rao, S. T. and M. G. Rossmann (1973). "Comparison of super-secondary structures in proteins." *J Mol Biol* 76(2): 241-256.
- [8] Chowdhury, E. K., et al. (1996). "3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Pseudomonas putida* E23: purification and characterization." *Biosci Biotechnol Biochem* 60(12): 2043-2047.
- [9] Chen, Y. Y., et al. (2010). "Conformational changes associated with cofactor/substrate binding of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Implications for enzyme mechanism." *J Struct Biol* 169(1): 25-35.
- [10] Reitz, S., et al. (2008). "Structural and kinetic properties of a beta-hydroxyacid dehydrogenase involved in nicotinate fermentation." *J Mol Biol* 382(3): 802-811.
- [11] Tchigvintsev A., Singer A., Brown G., Flick R., Evdokimova E., Tan K., Gonzalez C.F., Savchenko A., Yakunin A.F. (2012) Biochemical and structural studies of

uncharacterized protein PA0743 from *Pseudomonas aeruginosa* revealed NAD⁺-dependent L-serine dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 287(3): 1874-83.

[12] Yao, T., et al. (2010). "The catalytic property of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Bacillus cereus* on 3-hydroxypropionate." *Appl Biochem Biotechnol* 160(3): 694-703.

[13] Hawes, J. W., et al. (1996). "Structural and mechanistic similarities of 6-phosphogluconate and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenases reveal a new enzyme family, the 3-hydroxyacid dehydrogenases." *FEBS Lett* 389(3): 263-267.

[14] Lokanath, N. K., et al. (2005). "Crystal structure of novel NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8." *J Mol Biol* 352(4): 905-917.

[15] Voet D., Voet J.G. (2004). "Biochemistry". 4th ed. John Wiley & Sons , inc. Cap23. Página . 892-899.

[16] Fraenkel D.G. and Vinopal R.T. (1973). "Carbohydrate Metabolism in Bacteria". *Annual Reviews of Microbiology*. 27:69-100.

[17] Fraenkel, D. G. (1996). "Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology". 2nd ed. ASM Press. Washington, D.C. Glycolysis, p. 189–198

[18] Nelson, D.L., Cox M.M. (2006). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company. Cap 13, page 512-514.

[19] Fuhrer, T. and U. Sauer (2009). "Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism." *J Bacteriol* 191(7): 2112-2121.

[20] Csonka, L. N. and D. G. Fraenkel (1977). "Pathways of NADPH formation in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 252(10): 3382-3391.

[21] Sauer, U., et al. (2004). "The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 279(8): 6613-6619.

[22] Olavarria, K., et al. (2012). "The cofactor preference of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*--modeling the physiological production of reduced cofactors." *FEBS J* 279(13): 2296-2309.

[23] Cornish-Bowden. A (1975). "Fundamental of enzyme kinetics". Portland Press, London. p 105-108

[24] Muñoz R. "Rol de los residuos lisina -18 y arginine-50 en la preferencia por nicotinamida adenine dinucleótidos en la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli*". Tesis para optar al título de Bioquímico y Magister en Bioquímica. Universidad Andrés Bello.

[25] Martin, W. and C. Schnarrenberger (1997). "The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis." *Curr Genet* 32(1): 1-18.

[26] Kruger, N. J. and A. von Schaewen (2003). "The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation." *Curr Opin Plant Biol* 6(3): 236-246.

[27] Conway, T. (1992). "The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology." *FEMS Microbiol Rev* 9(1): 1-27.

He, W., et al. (2007). "Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1." *BMC Struct Biol* 7: 38.

[29] Adams, M. J., et al. (1994). "Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism." *Structure* 2(7): 651-668.

[30] Sundaramoorthy, R., et al. (2007). "Crystal structures of a bacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase reveal aspects of specificity, mechanism and mode of inhibition by analogues of high-energy reaction intermediates." *FEBS J* 274(1): 275-286.

- [31] Cameron, S., et al. (2009). "Geobacillus stearothermophilus 6-phosphogluconate dehydrogenase complexed with 6-phosphogluconate." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 65(Pt 5): 450-454.
- [32] Phillips, C., et al. (1998). "A 2.8 Å resolution structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: comparison with the sheep enzyme accounts for differences in activity with coenzyme and substrate analogues." *J Mol Biol* 282(3): 667-681.
- [33] Hitosugi, T., et al. (2012). "Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth." *Cancer Cell* 22(5): 585-600.
- [34] Veronese, F. M., et al. (1976). "Isolation and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Some comparisons with the thermophilic enzyme from *Bacillus stearothermophilus*." *Biochemistry* 15(18): 4026-4033.
- [35] Tetaud, E., et al. (1999). "6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*: a role for arginine residues in binding substrate and coenzyme." *Biochem J* 338 (Pt 1): 55-60.
- [36] Li, L. and P. F. Cook (2006). "The 2'-phosphate of NADP is responsible for proper orientation of the nicotinamide ring in the oxidative decarboxylation reaction catalyzed by sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase." *J Biol Chem* 281(48): 36803-36810.
- [37] Li, L., et al. (2006). "Importance in catalysis of the 6-phosphate-binding site of 6-phosphogluconate in sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase." *J Biol Chem* 281(35): 25568-25576.
- [38] Stournaras, C., et al. (1983). "6-phospho-D-gluconate dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. Properties and subunit structure." *Eur J Biochem* 130(2): 391-396.
- [39] Lee, Y. N. and T. G. Lessie (1974). "Purification and characterization of the two 6-phosphogluconate dehydrogenase species from *Pseudomonas multivorans*." *J Bacteriol* 120(3): 1043-1057.

- [40] Adachi, O. and M. Ameyama (1982). "6-Phospho-d-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*". *Methods in Enzymology*, Academix Press 89: 291-295.
- [41] Rauch, B., et al. (2010). "Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*." *Appl Microbiol Biotechnol* 88(3): 711-718.
- [42] Ohara, H., et al. (2004). "Purification and characterization of NAD-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Leuconostoc lactis* SHO-54." *J Biosci Bioeng* 98(2): 126-128.
- [43] Beardsmore A. J., et al. (1982). "Characterization of the Assimilatory and Dissimilatory Pathways of Carbon Metabolism during Growth of *Methylophilus methylotrophus* on Methanol". *Journal of General Microbiology*. 128:1423-1439.
- [44] Kiriuchin M.Y., et al. (1988). "Properties of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases of the obligate methylotroph *Methylobacillus flagellatum* KT". *FEMS Microbiology. Letters*. 52:199–204.
- [45] Andreeva, A. and A. G. Murzin (2006). "Evolution of protein fold in the presence of functional constraints." *Curr Opin Struct Biol* 16(3): 399-408.
- [46] Andreeva, A., et al. (2014). "SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining." *Nucleic Acids Res* 42(Database issue): D310-314.
- [47] Liu, H. and J. H. Naismith (2008). "An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol." *BMC Biotechnol* 8: 91.
- [48] Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- [49] Olavarría, K. (2012) "Impacto metabólico de la producción de NADH en la vía de las pentosas en *Escherichia coli*". Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Universidad de Chile.

- [50] Cavalieri RL and H.Z. Sable. (1973) "Enzymes of Pentose Biosynthesis". J Biol Chem. 248(8): 2815-2817.
- [51] Henikoff, S. and J. G. Henikoff (1992). "Amino acid substitution matrices from protein blocks." Proc Natl Acad Sci U S A 89(22): 10915-10919.
- [52] Larkin, M. A., et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics 23(21): 2947-2948.
- [53] Prlic, A., et al. (2010). "Pre-calculated protein structure alignments at the RCSB PDB website." Bioinformatics 26(23): 2983-2985.
- [54] Russell, R. B. and G. J. Barton (1992). "Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels." Proteins 14(2): 309-323.
- [55] Roberts, E., et al. (2006). "MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis." BMC Bioinformatics 7: 382.
- [56] Humphrey, W., et al. (1996). "VMD: visual molecular dynamics." J Mol Graph 14(1): 33-38, 27-38.
- [57] Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist (2001). "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees." Bioinformatics 17(8): 754-755.
- [58] Fiser, A., et al. (2000). "Modeling of loops in protein structures." Protein Sci 9(9): 1753-1773.
- [59] Wiederstein, M. and M. J. Sippl (2007). "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." Nucleic Acids Res 35(Web Server issue): W407-410.
- [60] Bowie, J. U., et al. (1991). "A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure." Science 253(5016): 164-170.
- [61] Van Gunsteren, W. F., Billeter S. R. (1996). "Biomolecular Simulations: The GROMOS96 Manual and User Guide". Zürich, VdF Hochschulverlag ETHZ.

- [62] Trott, O. and A. J. Olson (2010). "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." *J Comput Chem* 31(2): 455-461.
- [63] Phillips, J. C., et al. (2005). "Scalable molecular dynamics with NAMD." *J Comput Chem* 26(16): 1781-1802.
- [64] Mark, P., Nilsson, L. (2001) "Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K". *J. Phys. Chem. A.* 105:9954-9960.
- [65] Krepinsky, K., et al. (2001). "Purification and cloning of chloroplast 6-phosphogluconate dehydrogenase from spinach. Cyanobacterial genes for chloroplast and cytosolic isoenzymes encoded in eukaryotic chromosomes." *Eur J Biochem* 268(9): 2678-2686.
- [66] Bennett, B. D., et al. (2009). "Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*." *Nat Chem Biol* 5(8): 593-599.
- [67] Fuentealba M., Cabrera R. (2011). "Análisis de las interacciones de Glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa bacterianas con NADP y NAD mediante dinámica molecular". XXXIII Reunión anual de sociedad de bioquímica y biología molecular de Chile. Chillan, Chile.
- [68] Chen, R., et al. (1997). "Structural constraints in protein engineering--the coenzyme specificity of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase." *Eur J Biochem* 250(2): 578-582.
- [69] Chen, R., et al. (1997). "Structural constraints in protein engineering--the coenzyme specificity of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase." *Eur J Biochem* 250(2): 578-582.
- [70] Chen, R., et al. (1997). "Structural constraints in protein engineering--the coenzyme specificity of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase." *Eur J Biochem* 250(2): 578-582.
- [71] Maruyama, S., et al. (2008). "Origins of a cyanobacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase in plastid-lacking eukaryotes." *BMC Evol Biol* 8: 151.

[72] Soderberg, T. (2005). "Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes." *Archaea* 1(5): 347-352.

[73] Cleland, W. W. (1989). "Enzyme kinetics revisited: a commentary on 'The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions With Two or More Substrates or Products'." *Biochim Biophys Acta* 1000: 209-212.

Evolución de los determinantes estructurales de la especificidad de sustratos en la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa

Maturana, Pablo

-
- 01 Pablo Maturana Page 38
17/3/2016 21:17
-
- 02 Pablo Maturana Page 103
19/2/2016 1:37
-
- 03 Pablo Maturana Page 103
19/2/2016 1:37