

UCH-FC  
DOC-G  
R 741  
C. 1

**SITIO DE UNION DEL NUCLEOTIDO EN LA  
CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA  
DE HIGADO DE RATA.  
CARACTERIZACION MEDIANTE ESPECTROSCOPIA  
DE FLUORESCENCIA**

**TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE**  
En cumplimiento parcial de los requisitos para  
optar al grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

por

**MARIA CECILIA ROJAS GARRIDO**



01-0207341

Agosto de 1992

**Directores de Tesis:** Dr. Emilio Cardemil  
Dra. M. Victoria Encinas

**Profesor Patrocinante:** Dr. Octavio Monasterio

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada por la candidata:

MARIA CECILIA ROJAS GARRIDO

ha sido aprobado por la Comisión Informante de Tesis como parte de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con Mención en Química.

Directores de Tesis:

Dr. Emilio Cardemil

Dra. Ma. Victoria Encinas

Patrocinante de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Bruce Cassels

Dr. Eduardo Lissi

Dr. Raúl Morales

Dr. Eduardo Silva

Dr. Tito Ureta

*Emilio Cardemil*  
.....

*Ma. Victoria Encinas*  
.....

*Octavio Monasterio*  
.....

*Bruce Cassels*  
.....

*Eduardo Lissi*  
.....

*Raúl Morales*  
.....  
*Eduardo Silva*  
.....  
*Tito Ureta*  
.....

II.7	SEPARACION DE LOS PEPTIDOS TRIPTICOS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS DE FASE REVERSA	26
II.8	DETERMINACION DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LOS PEPTIDOS MODIFICADOS	27
II.9	DETERMINACIONES DE FLUORESCENCIA	28
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b>	32
III.1	MODIFICACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA CON REACTIVOS FLUORESCENTES ESPECIFICOS PARA SULFHIDRILO	32
III.1.1	Cinética de inactivación con 1,5-I-AEDANS y pirenil yodocetamida. Efecto de los sustratos.	32
III.1.2	Selectividad de las reacciones de modificación de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	34
III.1.3	Espectros de absorción de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica modificada.	39
III.2	PROPIEDADES FLUORESCENTES DE LAS SONDAS UNIDAS A LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA EN LOS ADUCTOS CON AEDANS, PIRENIL ACETAMIDA Y PIRENIL MALEIMIDA	41
III.2.1	Espectro de emisión del AEDANS unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	41
III.2.2	Espectros de emisión del pireno en los aductos de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica con pirenil yodoacetamida y pirenil maleimida.	43
III.2.3	Tiempo de decaimiento de la fluorescencia del AEDANS unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	43
III.2.4	Tiempos de decaimiento de la fluorescencia de la pirenil maleimida unida a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	45
III.2.5	Estudios de apagamiento de la fluorescencia.	48

Efecto de la acrilamida sobre la fluorescencia del AEDANS unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	48
Apagamiento por acrilamida de la fluorescencia del pireno unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	50
Apagamiento por NaI de la fluorescencia del pireno unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	53
III.2.6 Estudios de anisotropía de la fluorescencia del AEDANS unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica. Determinación del tiempo de correlación rotacional.	53
III.3 CARACTERISTICAS FLUORESCENTES DE LOS TRIPTOFANOS DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE RATA	56
III.3.1 Espectro de emisión.	56
III.3.2 Decaimiento de fluorescencia de la población de triptofanos.	56
III.3.3 Efecto de los sustratos sobre la intensidad de la emisión de los triptofanos.	57
III.3.4 Efecto de la acrilamida sobre la fluorescencia de los triptofanos de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica libre y saturada con los sustratos.	61
III.3.5 Efecto de los apagadores iónicos NaI y CsCl sobre la fluorescencia de los triptofanos.	63
III.3.6 Propiedades fluorescentes de los triptofanos en la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica modificada con AEDANS.	66
III.4 MODIFICACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA CON UN EXCESO MOLAR DE PIRENIL YODOACETAMIDA	68
III.4.1 Formación del excímero de pireno. Estequiometría de marcación.	68
III.4.2 Separación y purificación de los péptidos trípticos generados desde la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica modificada con dos moles de pirenil acetamida.	70
III.4.3 Determinación de la secuencia de aminoácidos de los péptidos marcados con pirenil acetamida.	72

III.5	MODIFICACION CON PIRENIL YODOACETAMIDA DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA OXIDADA CON ACIDO BIS-DITIONITROBENZOICO	75
III.5.1	Oxidación con ácido bis-ditionitrobenzoico de las dos cisteínas más reactivas de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	75
III.5.2	Unión del IDP a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica oxidada con ácido bis-ditionitrobenzoico.	76
III.5.3	Reacción de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica oxidada, con pirenil yodoacetamida en las condiciones en que se forma excímero.	78
III.5.4	Separación de los péptidos trípticos obtenidos a partir de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica oxidada y modificada con pirenil yodoacetamida.	79
IV.	DISCUSION	81
V.	BIBLIOGRAFIA	99
	AGRADECIMIENTOS	113

## RESUMEN

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (GTP/ATP: oxaloacetato carboxiliasa (transfosforilante), EC 4.1.1.32/49), es una enzima clave en la gluconeogénesis, que cataliza la descarboxilación de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato en presencia de un nucleótido de purina. En esta tesis se determinaron algunas características estructurales del sitio del GTP de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de hígado de rata, analizando tanto la emisión de sondas fluorescentes extrínsecas, como la fluorescencia de los triptofanos de la enzima.

El sitio del nucleótido de esta carboxiquinasa fue modificado selectivamente con los reactivos fluorescentes dirigidos a sulfhidrilo, 1,5-I-AEDANS, pirenil maleimida o pirenil yodoacetamida. En todos los casos se incorporó alrededor de un mol del reactivo por mol de enzima, y paralelamente ésta perdió su capacidad catalítica. La especificidad de la reacción se vió confirmada por la detección de un único péptido fluorescente después del tratamiento de cada uno de los aductos con tripsina. La enzima saturada con GDPMn, no se inactivó ni incorporó los marcadores fluorescentes. Estos resultados indican que existe una cisteína altamente reactiva en el sitio del nucleótido de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.

El máximo de la emisión fluorescente del AEDANS unido a la enzima, está desplazado hacia el azul con respecto a la emisión de este fluoróforo en agua, evidenciando un entorno de polaridad reducida para el sitio del GDP. En concordancia con este resultado, los estudios de apagamiento de la fluorescencia mostraron una accesibilidad limitada de la acrilamida a este sitio. Las determinaciones de anisotropía de la fluorescencia indicaron que el movimiento del AEDANS en el interior de la enzima no contribuye significativamente al tiempo de correlación observado.

El decaimiento de la pirenil maleimida unido a la carboxiquinasa presentó dos componentes, que podrían resultar de fluctuaciones estructurales en la proteína durante el tiempo de vida de fluorescencia de este fluoróforo. La acrilamida no afectó la intensidad de la fluorescencia ni los tiempos de decaimiento de esta sonda, en tanto que el yoduro apagó su fluorescencia dando un gráfico de Stern-Volmer no lineal. Con la carboxiquinasa modificada con AEDANS, se demostró que el NaI induce un cambio conformacional en la enzima.

Aumentando la temperatura y la concentración del modificador se pudo marcar con pirenil yodoacetamida una segunda cisteína del sitio del GDP de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica. La enzima así modificada contiene 2,17 moles de pirenil acetamida por mol de proteína y presenta la emisión fluorescente del excímero del pireno además de la fluorescencia monomérica. Se obtuvieron dos péptidos tripticos fluorescentes a partir de este aducto y éstos fueron secuenciados. Uno de los péptidos se encuentra marcado en la cisteína 288, que es el residuo más reactivo frente a pirenil yodoacetamida. El péptido que contiene el segundo residuo que forma el excímero, incluye las cisteínas 407 y 413. En este trabajo no fue posible definir cuál de estos residuos está modificado con pirenil yodoacetamida, pero se pudo demostrar que estas cisteínas se encuentran vecinas en la estructura tridimensional de la proteína nativa, puesto que además de formar excímero se oxidan a un disulfuro por reacción con ácido bis-ditio nitrobenzoico (DTNB). Estos experimentos también permitieron probar que la cisteína 288 es el tiol más reactivo frente a DTNB en la PEPCK de rata y que la cisteína vecina es la que le sigue en reactividad dentro del conjunto de 13 cisteínas que contiene la enzima.

Los estudios de la fluorescencia intrínseca, demostraron que el promedio de la población de triptofanos responsables de la emisión en esta enzima está sólo parcialmente accesible al solvente. El máximo de la emisión fluorescente de estos residuos se encontró a 335 nm y sólo una pequeña proporción de su fluorescencia fue apagada por NaI y CsCl.

La unión de los sustratos y productos nucleotídicos apagó notablemente la emisión

de los triptofanos de la carboxiquinasa. Además, el GDP, IDP e ITP disminuyeron notablemente el grado de desactivación por NaI de estos residuos. En conjunto, estos resultados inducen a pensar que la unión de los nucleótidos produciría un cambio conformacional en la carboxiquinasa. La disminución de la fluorescencia de los triptofanos por la unión de GDP, IDP o ITP, permitió calcular los valores de las constantes de disociación de estos sustratos desde la enzima.

## ABSTRACT

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP/ATP: oxaloacetate carboxy-lyase (transphosphorylating), EC 4.1.1.32/49) plays a key role in gluconeogenesis, catalyzing the nucleotide-dependent decarboxylation of oxaloacetate. In this work, some structural features were determined for the nucleotide site of the rat liver enzyme from the fluorescent properties of extrinsic probes as well as from tryptophan emission.

Reaction with the thiol-specific reagents 1,5-I-AEDANS, pyrenyl maleimide or pyrenyl iodoacetamide, resulted in complete loss of enzyme activity, concomitant with the incorporation of about one mole of the reagent per mole of enzyme. The specificity of the reaction was further supported by the detection of a single fluorescent peptide from the three trypsin-treated adducts. In all cases, GDPMn afforded complete protection from inactivation and labeling. These results showed the existence of a highly reactive cysteine at the nucleotide site of the enzyme.

The emission band of AEDANS bound to phosphoenolpyruvate carboxykinase was blue shifted relative to the emission of this probe in water, thus evidencing an environment of reduced polarity for the GDP site. Quenching studies showed limited accessibility for acrylamide to the AEDANS site and anisotropy determinations showed restricted mobility for this probe in the labeled enzyme.

The fluorescent decay of pyrenyl maleimide in the enzyme was biexponential, probably due to structural fluctuations of the protein during the fluorescence lifetime of the probe. Acrylamide addition did not affect the pyrene fluorescence while iodide decreased its emission giving a non linear Stern-Volmer plot. In the AEDANS modified enzyme, a conformational change induced by NaI was evidenced.

A second residue in the GDP site of phosphoenolpyruvate carboxykinase was modified with pyrenyl acetamide under conditions of higher temperature and reagent concentration. This adduct contained 2.17 moles of pyrenyl acetamide bound per mole of enzyme, and showed excimer fluorescence. Two fluorescent tryptic peptides were obtained from this adduct, and were sequenced. One of them was modified at cysteine 288, that is thus the most reactive thiol towards pyrenyl iodoacetamide in rat liver carboxykinase. The second peptide contained cysteines 403 and 407. The position of the labeled residue in this peptide could not be determined unequivocally but our results demonstrated that the two cysteines involved in excimer formation are vicinal in the structure of the native enzyme, since they are transformed to a dithiol by reaction with bis-dithionitrobenzoic acid (DTNB). These experiments also showed that cysteine 288 is the most reactive thiol towards DTNB and that the vicinal cysteine is the second most reactive residue in the enzyme.

Tryptophan fluorescence determinations of the native enzyme showed that the average of emitting residues is only partially accessible to the solvent. The emission maximum was found at 335 nm and only a small fraction of the fluorescence was quenched by NaI and CsCl. Intrinsic fluorescence was considerably decreased upon binding of the nucleotide substrate and products. Besides, GDP, IDP and ITP markedly reduced the degree of quenching by NaI. These results suggest that guanosine and inosine nucleotides induce conformational changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase. The dissociation constants of these ligands were determined from the observed fluorescence changes.

**ABREVIATURAS**

<b>AEDANS</b>	:	ácido 5 - [2- (acetamido) etil] amino] 1-naftalen sulfónico
<b>1,5-I-AEDANS</b>	:	ácido 5 - [2- (yodoacetamido) etil] amino] 1-naftalen sulfónico
<b>ATP</b>	:	trifosfato de adenosina
<b>DEAE</b>	:	dietil aminoetil
<b>DTT</b>	:	ditiotreitól
<b>DTNB</b>	:	ácido 5-5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)
<b>EtSH</b>	:	mercaptoetanol
<b>EDTA</b>	:	ácido etilendiamino tetraacético
<b>GDP</b>	:	difosfato de guanosina
<b>GTP</b>	:	trifosfato de guanosina.
<b>Hepes</b>	:	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico
<b>IDP</b>	:	difosfato de inosina
<b>ITP</b>	:	trifosfato de inosina
<b>I</b>	:	intensidad de la fluorescencia
<b>Ksv</b>	:	constante de apagamiento de Stern-Volmer
<b>kq</b>	:	constante bimolecular de apagamiento colisional

<b>Kd</b>	:	constante de disociación
<b>NADH</b>	:	nicotina adenina dinucleótido
<b>N-AcCis</b>	:	N-acetil cisteína
<b>OAA</b>	:	ácido oxaloacético
<b>PEPCK</b>	:	carboxiquinasa fosfoenolpirúvica
<b>PEP</b>	:	fosfoenol piruvato
<b>PA</b>	:	N-(1-pirenil) acetamida
<b>PIA</b>	:	N-(1-pirenil) yodoacetamida
<b>PM</b>	:	N-(1-pirenil) maleimida
<b>SDS</b>	:	dodecil sulfato de sodio
$\tau$	:	tiempo de decaimiento de la fluorescencia
<b>TEA</b>	:	trietanolamina
<b>Tris</b>	:	Tris(hidroximetil)amino metano
<b>Tes</b>	:	N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfónico
<b>TFA</b>	:	ácido trifluoroacético
<b>TNB</b>	:	anión tionitrobenzoato
<b>r</b>	:	anisotropía de la fluorescencia

## LISTA DE FIGURAS.

	Página
<b>Figura 1.</b> Electroforesis en presencia de SDS de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica eluída de GTP-agarosa.	21
<b>Figura 2.</b> Cinética de inactivación de la PEPCK con 1,5-I-AEDANS.	33
<b>Figura 3.</b> Cinética de inactivación de la PEPCK con pirenil yodoacetamida.	33
<b>Figura 4.</b> Cromatografía en una columna C18 de fase reversa de los péptidos trípticos de la PEPCK modificada con AEDANS.	37
<b>Figura 5.</b> Cromatografía en una columna C18 de fase reversa de los péptidos trípticos de la PEPCK modificada con pirenil maleimida.	38
<b>Figura 6.</b> Cromatografía en una columna C18 de fase reversa de los péptidos trípticos de la PEPCK modificada con pirenil yodoacetamida.	38
<b>Figura 7.</b> Espectro de absorción UV-visible de la PEPCK modificada con AEDANS.	39
<b>Figura 8.</b> Espectro de absorción UV-visible de la PEPCK modificada con pirenil maleimida.	40
<b>Figura 9.</b> Espectro de absorción UV-visible de la PEPCK modificada con pirenil yodoacetamida.	40
<b>Figura 10.</b> Espectro de emisión de la PEPCK modificada con AEDANS.	42
<b>Figura 11.</b> Máximos de la emisión fluorescente de la N-AcCis-AEDANS en función del parámetro ET 30.	42
<b>Figura 12.</b> Espectro de emisión de la PEPCK modificada con pirenil maleimida.	44

<b>Figura 13.</b> Espectro de emisión de la PEPCK modificada con pirenil yodoacetamida.	44
<b>Figura 14.</b> Determinaciones de fase y modulación de la fluorescencia del AEDANS unido a la PEPCK.	46
<b>Figura 15.</b> Determinaciones de fase y modulación de la fluorescencia de la pirenil maleimida unido a la PEPCK.	46
<b>Figura 16.</b> Apagamiento por acrilamida de la fluorescencia del AEDANS unido a la PEPCK.	49
<b>Figura 17.</b> Gráfico de Stern-Volmer para el apagamiento por NaI de la fluorescencia de la pirenil maleimida unido a la PEPCK.	54
<b>Figura 18.</b> Efecto del NaI sobre el espectro de emisión del AEDANS unido a la PEPCK.	54
<b>Figura 19.</b> Gráfico de Perrin para la fluorescencia del AEDANS unido a la PEPCK.	55
<b>Figura 20.</b> Espectro de emisión de los triptofanos de la PEPCK. Efecto del GDP.	58
<b>Figura 21.</b> Disminución de la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos en función de la concentración de GDP, IDP e ITP.	59
<b>Figura 22.</b> Gráficos de Stern-Volmer para el apagamiento de la fluorescencia de los triptofanos por acrilamida. Efecto de los nucleótidos.	62
<b>Figura 23.</b> Gráficos de Stern-Volmer para el apagamiento de la fluorescencia de los triptofanos por NaI. Efecto de los nucleótidos.	64
<b>Figura 24.</b> Efecto del CsCl sobre la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK.	65
<b>Figura 25.</b> Efecto del NaI sobre la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK modificada con AEDANS.	67
<b>Figura 26.</b> Efecto del IDP sobre la fluorescencia de los triptofanos en la PEPCK modificada con AEDANS.	67
<b>Figura 27.</b> Espectro de emisión del pireno en el aducto PEPCK: PA=1:2,2.	69

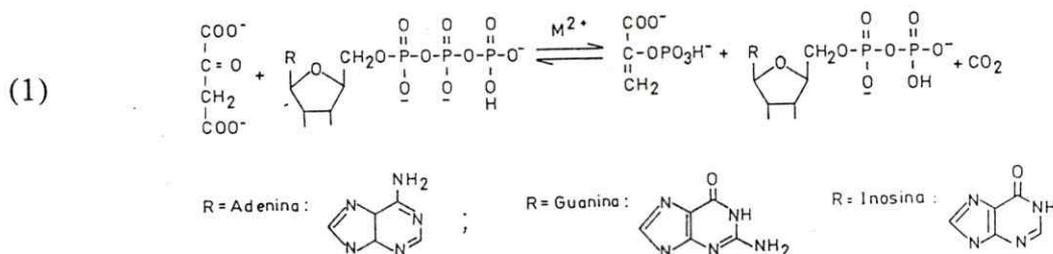
- Figura 28.** Cinética de formación del excímero de pireno en la reacción de la PEPCK con pirenil yodoacetamida. 69
- Figura 29.** Cromatografía en una columna C18 de fase reversa de los péptidos trípticos del aducto PEPCK:PA=1:2,2. 71
- Figura 30.** Cromatografía en una columna C4 de fase reversa de los péptidos trípticos del aducto PEPCK: PA=1:2,2. 71
- Figura 31.** Secuencia de los péptidos marcados con pirenil yodoacetamida en el aducto PEPCK:PA=1:2,2. 74
- Figura 32.** Cinética de liberación de tionitrobenzoato en la reacción de la PEPCK con DTNB. 77
- Figura 33.** Efecto del IDP sobre la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK oxidada con DTNB. 77
- Figura 34.** Espectro de emisión del pireno en la PEPCK oxidada con DTNB y modificada con pirenil yodoacetamida. 78
- Figura 35.** Cromatografía en una columna C18 de fase reversa de los péptidos trípticos obtenidos a partir de la PEPCK oxidada, modificada con pirenil yodoacetamida. 80
- Figura 36.** Cromatografía en una columna C4 de fase reversa de los péptidos trípticos obtenidos a partir de la PEPCK oxidada, modificada con pirenil yodoacetamida. 80
- Figura 37.** Distintas posibilidades de ubicación relativa de las cisteínas que forman el excímero. 88

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla I.</b> Purificación de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica citosólica de hígado de rata.	20
<b>Tabla II.</b> Estequiometría de marcación de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica con sondas fluorescentes.	35
<b>Tabla III.</b> Tiempos de decaimiento de fluorescencia de la pirenil maleimida unida a N-Acetil cisteína en distintos solventes.	47
<b>Tabla IV.</b> Efecto de la acrilamida y del yoduro sobre los tiempos de decaimiento de la fluorescencia de la pirenil maleimida unida a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	51
<b>Tabla V.</b> Constantes de apagamiento por acrilamida y yoduro de la fluorescencia de la pirenil maleimida unida a N-Acetil cisteína en distintos solventes.	52
<b>Tabla VI.</b> Constantes de disociación de los nucleótidos de guanina e inosina para la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.	60
<b>Tabla VII.</b> Degradación de Edman de los péptidos modificados con pirenil yodoacetamida.	73

## I. INTRODUCCION

La descarboxilación del ácido oxaloacético a ácido fosfoenolpirúvico (ecuación 1), es una reacción clave en la biosíntesis de glucosa a partir de piruvato, aminoácidos o intermediarios del ciclo de Krebs (Utter y Kolenbrander, 1972; Gancedo y Schwerzmann, 1976). Esta reacción es reversible y consiste en la transferencia de un grupo fosforilo desde un nucleótido a la forma enólica del piruvato. Es catalizada por las carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas (PEPCKs), GTP/ATP:oxaloacetato carboxilasa (transfosforilante) E.C. 4.1.1.32/49, enzimas que tienen un importante papel en la modulación de la gluconeogénesis.



Las carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Utter y Kolenbrander, 1972; Weldon y col., 1990) y requieren un nucleótido de purina (GTP, ITP o ATP) y un ion metálico bivalente ( $\text{Mn}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$ ) para su actividad.

Además de participar en la biosíntesis de glucosa a partir de precursores de 3 y 4 carbonos, en algunos organismos esta enzima participa en el catabolismo de aminoácidos (Urbina y Azavache, 1984) y en la fermentación de glucosa a succinato, (Engel y col. 1987).

Se han aislado carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas desde sistemas muy diversos, como el hígado de ave (Hebda y Nowak, 1982a), cerdo (Hung y Silverstein, 1978), rata

(Colombo y col., 1978), riñón de oveja (Barns y Keech, 1972a), *Saccharomyces cerevisiae* (Tortora y col., 1985), *Escherichia coli* (Medina y col., 1990), plantas  $C_4$  (Burnell, 1986) y *Trypanosoma cruzi* (Urbina, 1987). Este grupo de enzimas se ha purificado a homogeneidad y se ha encontrado que ellas presentan marcadas diferencias en su estructura cuaternaria y en la especificidad por el nucleótido. Según la fuente de que se obtenga la enzima, ésta reconoce distintos rasgos estructurales en la porción que corresponde a la base nitrogenada de este sustrato.

Las carboxiquinasas aisladas desde tejidos animales, utilizan exclusivamente nucleótidos de guanina o inosina y son monómeros de alrededor de 70 kDa (Utter y Kolenbrander, 1972). Por otra parte, las PEPCKs aisladas desde microorganismos y plantas son específicas para nucleótidos de adenina y la mayoría contiene entre 2 y 6 subunidades con masas moleculares entre 42 y 64 kDa (Müller y col., 1981; Burnell, 1986; Urbina, 1987; Osteras y col., 1991).

En animales se han descrito dos isoenzimas estructuralmente diferentes, citosólica y mitocondrial, que se pueden diferenciar por sus propiedades inmunológicas, carga y capacidad de ser moduladas por cambios hormonales y nutricionales (Ballard y Hanson, 1969; Watford y col., 1981; Hod y col., 1982). El hígado de rata contiene casi exclusivamente la isoenzima citosólica (Ballard y Hanson, 1969), al igual que el hígado de hamster (Nordlie y Lardy, 1963). En cambio en el hígado de ave (Hebda y Nowak, 1982a), la enzima se encuentra exclusivamente en las mitocondrias. Otros tejidos animales como el hígado de cerdo, conejo y humano, contienen cantidades apreciables de ambas isoenzimas (Nordlie y Lardy, 1963; Holten y Nordlie, 1965; Wieland y col., 1968; Brech y col., 1970).

Se ha determinado la estructura de los genes de las PEPCKs citosólica de hígado de rata (Beale y col., 1985), citosólica de riñón de pollo (Cook y col., 1986), mitocondrial de hígado de pollo (Weldon y col., 1990) y de *Drosophila melanogaster* (Gundelfinger y col., 1987) (dependientes de GTP), así como la estructura de los genes de las PEPCKs de *Saccharomyces cerevisiae* (Stucka y col., 1988), *E. coli* (Medina y col., 1990) y *Rhizobium* (Osteras y col., 1991) (dependientes de ATP). A partir de

las secuencias de los respectivos DNAs complementarios, se ha deducido la secuencia de aminoácidos de estas proteínas, encontrándose entre un 56 y un 84% de similitud para las PEPCKs dependientes de GTP. Las PEPCKs dependientes de ATP muestran alrededor de un 50% de similitud, mientras que no hay ninguna similitud significativa entre las PEPCKs de uno y otro grupo. Sin embargo, existen algunas secuencias conservadas en las PEPCKs de ambos grupos, que corresponden a secuencias postuladas como probables sitios de unión de los grupos fosforilo de los sustratos (secuencias de consenso)(Cook y col., 1986).

Las secuencias de consenso para la unión del nucleótido, han sido predichas basándose en los análisis estructurales cristalográficos descritos para el sitio del GTP del factor de elongación Tu de *E. coli* (Jurnak, 1985). Se ha comprobado que estas secuencias aparecen conservadas en una serie de otras proteínas que unen GTP (Dever y col., 1987), lo que induce a pensar que ellas contienen sitios similares para la unión del nucleótido. Recientemente se logró cristalizar el dominio catalítico de otra proteína que une GTP, la proteína p21, codificada por el gen Ha-ras humano, y se pudo resolver su estructura tridimensional por difracción de rayos X (Wittinghofer y Pai, 1991). En esta proteína efectivamente existen en el sitio del nucleótido, las secuencias de consenso que habían sido postuladas en base a las consideraciones anteriores.

Las dos secuencias de consenso para la unión de los fosforilos del nucleótido (Gli-X-X-X-X-Gli-Lis y Asp-X-X-Gli) aparecen en la estructura primaria de las PEPCKs de rata, pollo, levadura, *Trypanosoma brucei* y *Drosophila* (Cook y col., 1986; Alvear y col., 1992; Gundelfinger y col., 1987). La secuencia que fue postulada para el sitio de unión del PEP en base a comparaciones con el sitio de unión de este sustrato en otras proteínas (Cook y col., 1986) aparece también en las PEPCKs de rata y pollo (Cook y col., 1986; Weldon y col., 1990).

En el factor de elongación Tu de *E. coli* y en la proteína p21 existe una secuencia relacionada con la unión de la guanina (Asn-Lis-X-Asp). Se piensa que el carboxilato del ácido aspártico en esta secuencia interactuaría con el grupo amino de la base nucleotídica (Jurnak, 1985; Wittinghofer y Pai, 1991). Esta secuencia también aparece

en la estructura primaria de las PEPCKs citosólicas de rata y pollo con el residuo de ácido aspártico reemplazado por un triptofano (Asn-Lis-X-Trp) (Dever y col., 1987). Este hecho daría cuenta de la capacidad de estas enzimas de usar indistintamente nucleótidos de guanina o inosina, puesto que no existe en la proteína el punto de reconocimiento del grupo amino del anillo de la base púrica.

Cabe hacer notar que, aún cuando se ha informado la secuencia primaria de diversas carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas, se conoce poco acerca de la estructura de sus sitios activos. Considerando que no hay similitud significativa en las estructuras primarias de PEPCKs dependientes de GTP y ATP, pero que ciertas secuencias aparecen conservadas en los dos grupos de enzimas, podrían esperarse diferencias y similitudes en la estructura del sitio del nucleótido, determinadas por el plegamiento tridimensional de la proteína. Resulta particularmente interesante entonces, comparar el sitio del nucleótido de las carboxiquinasas dependientes de GTP y ATP.

Por otra parte, a diferencia de los escasos trabajos que se han descrito acerca de la caracterización de los sitios de unión y catalíticos de las PEPCKs, existen numerosos estudios cinéticos y estereoquímicos dedicados a la dilucidación de su mecanismo catalítico (Ash y col., 1990; Hwang y Nowak, 1989; Chen y col., 1991b; Sheu y col., 1984; Konopka y col., 1986; Jabalquinto y Cardemil, 1992).

En la carboxiquinasa de hígado de pollo, se ha obtenido importante información acerca de las restricciones geométricas del sitio activo, usando análogos de los sustratos fosforilados. Se ha logrado concluir que la enzima presenta un alto grado de especificidad con respecto al fosfoenolpiruvato, en la reacción de carboxilación. El análogo fluorado 3-Z-F-PEP es sustrato de la carboxiquinasa y presenta un valor de  $V_{max}/K_m$ , correspondiente a un 76% del de la reacción medida con el sustrato natural (Duffy y Nowak, 1984). Con 3-Z-Br-PEP, 3-E-F-PEP, E y Z fosfoenol  $\alpha$ -cetobutirato, no se pudo detectar actividad enzimática, aunque estos compuestos resultaron ser inhibidores competitivos con respecto al PEP (Duffy y Nowak, 1984; Duffy y col., 1982). Estudios de resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular demostraron que estos inhibidores

interactúan con el sitio activo de la enzima en forma diferente a los sustratos fosfoenolpiruvato y Z-F-fosfoenolpiruvato (Hwang y Nowak, 1989; Duffy y Nowak, 1985). Además, midiendo la reacción de carboxilación con 3-Z-F-PEP como sustrato, se determinó que el  $\text{CO}_2$  se adiciona a la cara 2-*si*, sobre el plano del C-3 del PEP, mientras que el  $\text{Mn}^{2+}$  interactúa con esta molécula desde la cara 2-*re* (Hwang y Nowak, 1986).

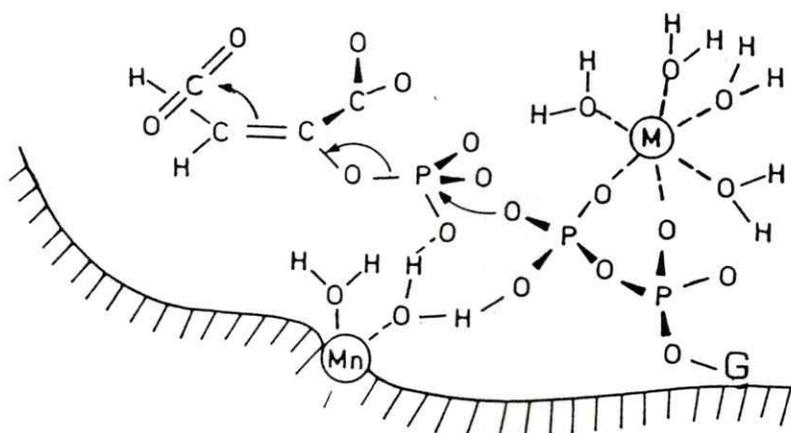
Por otra parte, no se han descrito análogos del oxaloacetato que sean utilizados como sustratos de alguna carboxiquinasa. Una gran variedad de análogos estructurales de este sustrato han sido ensayados como inhibidores de la PEPCK de pollo, con resultados negativos (Guidinger y Nowak, 1990). Una excepción la constituye el  $\beta$ -sulfopiruvato, que es inhibidor competitivo con respecto al oxaloacetato, en la PEPCK mitocondrial de pollo (Ash y col., 1990) y en la PEPCK de levadura (Jabalquinto y Cardemil, 1992). Las carboxiquinasas de hígado de rata y pollo catalizan la fosforilación de ácidos carboxílicos  $\alpha$ -sustituídos (Ash y col., 1990), de lo que se pudo inferir que el oxaloacetato es primero descarboxilado a la forma enólica del piruvato, y luego fosforilado por el MgGTP unido a la enzima. El GTP actúa como agente fosforilante de los ácidos glicólico y DL- $\beta$ -cloroláctico, en tanto que piruvato e hidroxipiruvato que no contienen un hidroxilo en el carbono  $\alpha$ , propio de la forma enólica del sustrato, no son fosforilados por la carboxiquinasa bajo las mismas condiciones (Ash y col., 1990).

Utilizando los tiofosfatos quirales, (Rp)-( $\beta, \gamma$ - $^{18}\text{O}, \gamma$ - $^{18}\text{O}$ )GTP $\gamma$ S y (Rp)-( $\beta, \gamma$ - $^{18}\text{O}, \gamma$ - $^{18}\text{O}$ )ITP $\gamma$ S, se pudo determinar el curso estereoquímico de la transferencia de fosforilo en las carboxiquinasas mitocondrial y citosólica respectivamente (Sheu y col., 1984; Konopka y col., 1986). La reacción procede con inversión neta de la configuración en el fósforo, ya que se forma (Sp)-( $^{18}\text{O}$ )-tiofosfoenolpiruvato en los dos casos. Estos resultados están de acuerdo con un mecanismo de desplazamiento simple en el cual el fosforilo es transferido directamente desde el nucleótido al enolpiruvato generado por descarboxilación del oxaloacetato.

Las carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas requieren en forma absoluta de dos moles de un ion metálico bivalente (Lee y col., 1981; Colombo y col., 1981). El papel del metal

en la catálisis se pudo conocer en detalle mediante estudios cinéticos y de resonancia magnética en las PEPCKs de rata y pollo (Colombo y col., 1981; Colombo y Lardy, 1981; Hebda y Nowak, 1982b). Los resultados cinéticos, así como los estudios de EPR y de la velocidad de relajación de los protones del  $\text{H}_2\text{O}$  unida al  $\text{Mn}^{2+}$  (PRR), indicaron que un mol de un metal de transición ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) se une directamente a la enzima actuando como activador en la transferencia del fosforilo. El metal unido a la enzima, interactúa con el fosforilo del sustrato enólico a través de la segunda esfera de coordinación (Colombo y col., 1981; Colombo y Lardy, 1981; Hebda y Nowak, 1982b). El otro ion metálico ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ ) se encuentra formando un complejo con la porción fosforilada del nucleótido, el cual se une a la enzima en un sitio diferente al del metal activador (Lee y Nowak, 1984).

En el esquema I, aparece la disposición espacial propuesta para los sustratos en el sitio activo de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica, así como algunos aspectos de la respectiva transformación catalítica deducidos a partir de los datos mecanísticos descritos anteriormente.



**ESQUEMA I**

Con respecto a la caracterización de aminoácidos del sitio activo de la enzima, la mayor parte de los estudios descritos se relaciona con la existencia de cisteínas altamente reactivas en esta zona. Todas las PEPCCKs estudiadas hasta la fecha, excepto la carboxiquinasa aislada de *E. coli* (Jabalquinto A.M., datos no publicados), son inactivadas por modificadores de grupos sulfhidrilo, como el ácido bis-ditionitrobenzoico, la N-etil maleimida o el yodoacetato (Barns y Keech, 1972b; Carlson y col., 1978; Makinen y Nowak, 1989). En la mayoría de los casos existen pruebas de que la modificación ocurre en o cerca del sitio de unión de los sustratos.

La carboxiquinasa de riñón de oveja presenta dos SH esenciales, uno relacionado con la carboxilación y otro en el sitio del GDP (Barns y Keech, 1972b). La PEPCCK de hígado de cerdo es inactivada por p-Cl-mercuribenzoato (Chang y Lane, 1966) y por 1,5-I-AEDANS, un reactivo fluorescente específico para tioles (Silverstein y col., 1979). La carboxiquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* se modifica específicamente con 1,5-I-AEDANS, en un sulfhidrilo del sitio del ATP (Encinas y col., 1990). Recientemente se demostró que el residuo modificado corresponde a la cisteína 364 (Alvear y col., 1992). Experimentos con DTNB y con reactivos específicos para ditiolos (arsenito-BAL y óxido de fenilarsina) indicaron que esta enzima contiene tioles vecinos y monotioles reactivos en la región de unión de los sustratos (Cardemil y col., 1990). Sin embargo, estos grupos tendrían un carácter no esencial desde el punto de vista de la catálisis puesto que su modificación no inactiva completamente la enzima. La presencia de dos sulfhidrilos espacialmente cercanos en el sitio del nucleótido de la carboxiquinasa de levadura también fue puesta en evidencia estudiando la interacción de la enzima con pirenil yodoacetamida, reacción en la que se forman cantidades considerables del excímero del pireno (Cardemil y col., 1990).

La química de sulfhidrilos de la carboxiquinasa citosólica de hígado de rata ha sido muy estudiada (Carlson y col, 1978; Lewis y col, 1989a,b). La enzima contiene 13 cisteínas, de las cuales dos se modifican selectivamente cuando se hace reaccionar la proteína con cantidades estequiométricas de DTNB (Carlson y col., 1978). Bajo estas condiciones se pierde completamente la actividad enzimática y se liberan dos moles de

tionitrobenzoato por mol de enzima, lo que demuestra que las dos cisteínas forman un puente disulfuro. Usando concentraciones más altas de DTNB, se encontró que hay en la enzima dos pares adicionales de cisteínas que pueden formar puentes disulfuro (Carlson y col., 1978). Un estudio más detallado reveló la presencia de una cisteína altamente reactiva frente a cumarinil maleimida y esencial para la actividad, que fue identificada como la cisteína 288 en la secuencia primaria (Lewis y col., 1989a). La hiperreactividad de esta cisteína es la responsable de la alta sensibilidad de la enzima al oxígeno (Colombo y col., 1978) y puede atribuirse a que este residuo presenta un pKa de 7,0 (Lewis y col., 1989a). Este valor es considerablemente más bajo que el pKa del grupo sulfhidrilo de la cisteína libre. Además, la cisteína 288 podría corresponder al residuo más reactivo con DTNB, cuya modificación inactiva la enzima. Sin embargo, este punto no ha sido demostrado en los trabajos descritos hasta la fecha.

Lewis y colaboradores (1989a), postulan que la cisteína 288 de la carboxiquinasa de rata se encontraría ubicada en o cerca del sitio del nucleótido en base al patrón de protección por los sustratos, frente a la modificación con cumarinil maleimida. Además, este residuo se encuentra en un segmento de la proteína ubicado entre dos de las secuencias de consenso propuestas para la unión del fosforilo del nucleótido (Cook y col., 1986). En conjunto, estos datos apuntan a la localización de la cisteína 288 en el sitio activo de la carboxiquinasa de rata. Las pruebas obtenida con otros reactivos modificadores, apuntan en el mismo sentido. Es así como el marcador por afinidad del sitio del nucleótido 5'-p-F-sulfonilbenzoil guanosina, inactiva la enzima de rata (Jadus y col., 1981). Aunque no se identificó el residuo modificado, éste es probablemente una cisteína, residuo que reacciona en forma específica con este modificador en la quinasa pirúvica (Tomich y col., 1981). Datos más recientes con el análogo de fotoafinidad 8-azido GTP demostraron que existen dos cisteínas vecinas en el sitio del nucleótido de la PEPCCK de rata, que forman un ditiol como resultado de la reacción de fotoafinidad (Lewis y col., 1989b).

Por otra parte, no se detectó la presencia de tioles vecinos en el sitio activo de la carboxiquinasa de hígado de pollo (Makinen y Nowak, 1989) a diferencia de lo que

ocurre con las PEPCKs de rata y levadura. La carboxiquinasa de pollo contiene una cisteína altamente reactiva frente a DTNB o yodoacetato cuya modificación suprime la actividad enzimática (Makinen y Nowak, 1989). Estudios de EPR en la enzima modificada con un marcador de espín derivado del yodoacetato, demostraron que este residuo no se encuentra en el sitio activo sino sólo cerca de él y que no tiene participación directa en la catálisis (Makinen y Nowak, 1989). Pruebas recientes obtenidas con el modificador o-ftalaldehído, indican que la cisteína 31 y la lisina 39 de la PEPCK mitocondrial de pollo forman parte del sitio del oxaloacetato/fosfoenolpiruvato (Chen y col., 1991a). El péptido que lleva el par cisteína-lisina reactivo está parcialmente contenido en el dominio de unión propuesto para el PEP en esta enzima (Cook y col., 1986). Este par de residuos se encuentran espacialmente próximos, condición necesaria para que se forme un anillo de isoindol entre los grupos amino y sulfhidrilo de la enzima y el modificador o-ftalaldehído. Además, los autores demostraron que el yodoacetato reacciona con una cisteína diferente de la cisteína 31 (Chen y col., 1991a). Recientemente se informó que la cisteína 273 de la PEPCK mitocondrial de pollo, reacciona en forma específica con el análogo del nucleótido, GDP dialdehído (Nowak y col., 1992).

Además de la participación de residuos de cisteína, se ha inferido la existencia de residuos de lisina, arginina e histidina en o cerca del sitio de unión de los sustratos de diversas PEPCKs (Malebrán y Cardemil, 1987; Cheng y Nowak, 1989 a,b; Saavedra y col., 1988). Dado que tres de los sustratos de la enzima son compuestos fosforilados, es probable que los grupos guanidinio y amino de estos residuos contribuyan a estabilizar sus cargas negativas. En numerosas otras enzimas se ha demostrado la presencia de argininas en los sitios de unión de nucleótidos u otros sustratos fosforilados (Choi y Mc. Cormick, 1981; Eun y Miles, 1984). Además, las secuencias de consenso que han sido propuestas para la unión de los nucleótidos y el fosfoenolpiruvato en las PEPCKs citosólicas de rata y pollo, incluyen residuos de arginina y lisina (Cook y col., 1986; Dever y col., 1987).

Usando fenilglioxal como reactivo modificador, se pudo demostrar la existencia de dos residuos de arginina en el sitio activo de la PEPCK de pollo, que participarían

en la activación del  $\text{CO}_2$  (Cheng y Nowak, 1989a). Por otra parte, en la carboxiquinasa de levadura se demostró la existencia de argininas altamente reactivas en el sitio del  $\text{Mn}^{+2}$  y de los sustratos fosforilados (Malebrán y Cardemil, 1987). Los datos obtenidos con ATP dialdehído en esta última enzima están de acuerdo con la existencia de una lisina en el sitio del nucleótido (Saavedra y col., 1988). Por otra parte, la modificación de la lisina 141 de la enzima de pollo con piridoxal fosfato, inactivó totalmente la enzima, siendo la reacción completamente inhibida por los sustratos fosforilados (Guidinger y Nowak, 1991; Nowak y col., 1992). Finalmente, se ha descrito la participación de una histidina funcional en o cerca del sitio del fosfoenolpiruvato de la PEPCK mitocondrial de hígado de ave, usando dietilpirocarbonato como modificador (Cheng y Nowak, 1989b).

Una metódica alternativa a las anteriormente mencionadas para el estudio de la estructura de proteínas es la espectroscopía de fluorescencia. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para obtener información acerca de la estructura y la dinámica de estas macromoléculas (Lakowicz, 1983). Esta información se puede obtener midiendo la fluorescencia intrínseca de la proteína (de los triptofanos o tirosinas) o alternativamente incorporando a ésta una molécula fluorescente extrínseca unida a un sitio de interés. La fluorescencia, tanto en estado estacionario como resuelta en el tiempo del fluoróforo en estudio, puede proporcionar información acerca de su entorno local, sus propiedades de movilidad, accesibilidad al solvente y acerca de las propiedades hidrodinámicas de la proteína y de sus complejos con ligandos (Lakowicz, 1983; Lakowicz, 1986).

En general, interesan tres tipos de fenómenos asociados a la fluorescencia: la emisión, la desactivación de la emisión (disminución de la fluorescencia por efecto de una molécula apagadora) y la variación de la anisotropía debido a difusión rotacional.

La fluorescencia de los triptofanos ha sido utilizada para detectar perturbaciones conformacionales en proteínas, pues es muy sensible a cambios en las características del microentorno (Beechem y Brand, 1985; Alcalá y col., 1987b). El grado de exposición

al solvente, así como las interacciones específicas entre el indol y los distintos grupos polares de la proteína, pueden cambiar la posición de la banda de emisión de los triptofanos (Burstein y col., 1973; Jameson y col., 1987). El valor de los tiempos de decaimiento de la fluorescencia de estos residuos también depende de múltiples factores, como la cercanía de residuos apagadores (histidina, arginina, metionina y cisteína) y el grado de solvatación (Beecham y Brand, 1985; Alcalá y col., 1987b). De hecho, en distintas proteínas, los valores de tiempo de decaimiento de los triptofanos varían en un rango muy amplio, que va entre 10 y 0,02 ns (Beechem y Brand, 1985). Tanto el máximo como la intensidad de la emisión fluorescente de estos residuos en una proteína, pueden verse afectados por la unión de ligandos pequeños, asociación con otras proteínas o por factores que lleven a su desnaturación (Pearce y Hawrot, 1990; Berger y Evans, 1991; Lakowicz, 1983; Beechem y Brand, 1985; Grinvald y Steinberg, 1976).

Por otra parte, la posición del espectro de emisión de algunas sondas fluorescentes extrínsecas presenta marcados desplazamientos al cambiar la polaridad del solvente (Hudson y Weber, 1973; Dodiuk y Kosower, 1977; Kosower y col., 1983; Puri y col., 1985). Por esta razón, fluoróforos como los amino naftalenosulfonatos han sido muy utilizados para inferir polaridad en sistemas biológicos (Azzi, 1975; Franzen y col., 1980; First y Taylor, 1989; Encinas y col., 1990). Además, estas sondas presentan un tiempo de decaimiento de fluorescencia relativamente largo, apropiado para estudios de apagamiento y determinaciones de tiempos de correlación rotacional (Encinas y col., 1990; Leavis y col., 1984).

Para los derivados del pireno, el decaimiento de la fluorescencia depende marcadamente del microentorno. La presencia de H<sub>2</sub>O, etanol o acrilonitrilo afecta los valores de tiempo de decaimiento de este fluoróforo (Encinas y col., 1989) y además, la fluorescencia del pireno es apagada por diversos aminoácidos como triptofano, histidina y metionina (Encinas y Lissi, 1985b; Encinas y Lissi, 1986; Encinas, M.V., datos no publicados). Por otra parte, la incorporación de dos residuos de pireno a sitios adyacentes de una proteína puede llevar a la formación de cantidades variables de un dímero del pireno en el estado excitado (excímero), cuya fluorescencia en muchos casos cambia debido a

interacciones con otras proteínas o moléculas pequeñas. Por ejemplo, la fluorescencia del excímero que se forma en la tropomiosina marcada con pirenil yodoacetamida ha permitido estudiar el mecanismo de la asociación entre cadenas en esta proteína (Graceffa y Lehrer, 1980; Burtnick y col., 1988; Ishii y Lehrer 1990). En conjunto, estas propiedades del cromóforo del pireno lo hacen apropiado para detectar fluctuaciones conformacionales en proteínas (Kouyama y Mihashi, 1981; Kurtenbach y Verjovski-Almeida, 1985).

Por otra parte, los estudios de desactivación o apagamiento permiten detectar el grado de exposición de un grupo fluorescente al solvente y por lo tanto informan acerca de su ubicación en la proteína (Eftink y Ghiron, 1981). El apagador desactiva los fluoróforos expuestos y si puede penetrar o difundir en la matriz de la proteína, desactivará también residuos interiores (Somogyi y col., 1985; Richelli y col., 1987). Esto último depende de la estructura del apagador. Los apagadores iónicos como  $I^-$  y  $Cs^+$  se encuentran altamente hidratados en la solución y esto junto con su carga, les impide el acceso a regiones interiores de la proteína (Burstein y col., 1973; Lehrer, 1971). Por ejemplo, en la lisozima del bacteriófago T4, que contiene tres triptofanos, se ha demostrado que la eficiencia de la desactivación por yoduro se correlaciona con el grado de exposición de estos residuos, que ha sido determinado por estudios cristalográficos (Harris y Hudson, 1990). Los efectos locales de carga afectan marcadamente la eficiencia de los apagadores iónicos (Lehrer, 1971).

Las moléculas neutras como el oxígeno o la acrilamida, pueden moverse hacia el interior de la proteína aprovechando las fluctuaciones estructurales que dejan espacios en la matriz (Eftink y Ghiron, 1984). El oxígeno es un apagador no selectivo, que difunde fácilmente al interior de la proteína y apaga eficientemente fluoróforos muy embebidos en ella (Lakowicz y Weber, 1973). La acrilamida, en cambio es una molécula más grande y su difusión puede presentar un grado de dificultad variable (Eftink y Ghiron, 1976a, 1977). De hecho, los triptofanos de distintas proteínas presentan constantes de apagamiento por acrilamida que fluctúan entre  $4 \times 10^9$  y  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Eftink y Ghiron, 1976a). En general, las constantes de apagamiento por acrilamida



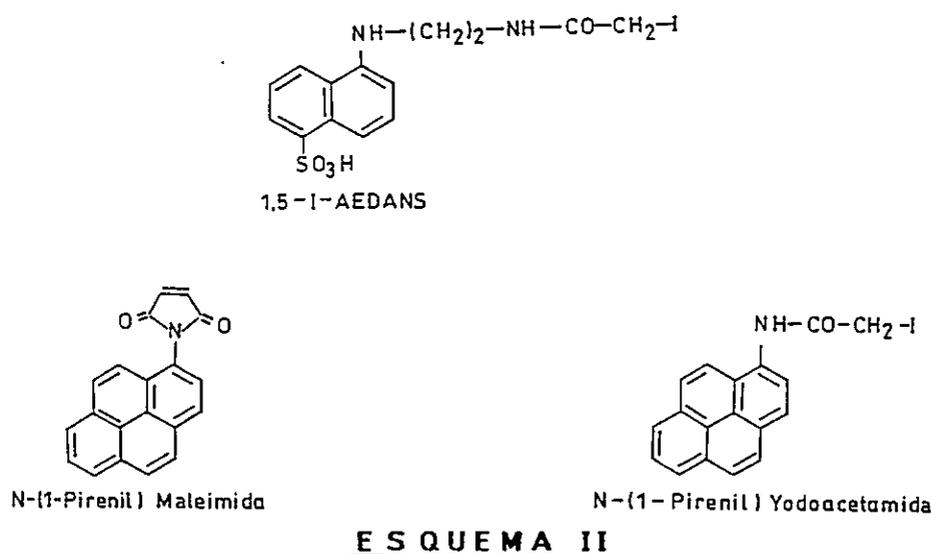
representan un promedio de las constantes de los fluoróforos expuestos e interiores. Además, es importante considerar que la eficiencia del apagamiento por acrilamida puede verse muy afectada por la polaridad del entorno en el que ocurre el encuentro fluoróforo-desactivador (Encinas y col., 1983; Eftink y col., 1987; Encinas y Lissi, 1985a). Las determinaciones de la eficiencia del apagamiento en compuestos modelo disueltos en distintos solventes, pueden tomarse como referencia para interpretar los datos obtenidos con la proteína (Encinas y col., 1990; Eftink y Ghiron, 1976b; Richelli, 1990).

El trabajo que se describe en esta tesis, se refiere a la caracterización del sitio del nucleótido de una PEPCCK perteneciente al grupo dependiente de GTP, la PEPCCK citosólica de hígado de rata, y forma parte de un estudio dirigido a comparar los sitios del ATP y del GTP en PEPCCKs con distinta especificidad. Recientemente, se han descrito las propiedades fisicoquímicas del sitio del ATP de la PEPCCK de levadura modificada con AEDANS y con pirenil acetamida (Encinas y col., 1990; Cardemil y col., 1990), y también se ha demostrado que el ATP induce un cambio conformacional al unirse a la carboxiquinasa de *E.coli* (Encinas y col., 1992).

Específicamente, nos propusimos explorar la posibilidad de unir covalentemente una sonda fluorescente a residuos de cisteína en el sitio del GTP de la carboxiquinasa de hígado de rata. Estos residuos constituyen un blanco apropiado, puesto que hay pruebas de que varias cisteínas de esta enzima forman parte del sitio del nucleótido y que una de ellas es hiperreactiva con derivados de la maleimida y con DTNB (Lewis y col., 1989a; Carlson y col., 1978).

La modificación química ha sido ampliamente usada para identificar grupos funcionales o bien para marcar sitios de interés en proteínas. La principal desventaja de esta aproximación es la falta de especificidad frente a las numerosas clases de grupos reactivos que contienen estas macromoléculas. Sin embargo, controlando las condiciones de reacción, muchas veces se puede restringir la reactividad de un modificador a un único tipo de residuo y obtener considerable información acerca de su funcionalidad.

Con respecto a los modificadores que son utilizados en esta tesis (esquema II), dos son derivados de la yodoacetamida (1,5-I-AEDANS y pirenil yodoacetamida) que reaccionan específicamente con sulfhidrilos de enzimas (Franzen y col., 1980; Kouyama y Mihashi, 1981; Burtnick y col., 1988). Además, se ha demostrado que la yodoacetamida reacciona a pH neutro con tioles y no con los grupos amino o hidroxilo de residuos de aminoácido (Means y Feeney, 1971). Del mismo modo, se han descrito numerosos casos de marcación específica de proteínas en residuos de cisteína, con derivados de la maleimida (Saito-Nakatsura y col., 1987; Graceffa y Lehrer, 1980; Burtnick y col., 1988; Kurtenbach y Verjovski-Almeida, 1985). En ningún caso se detectó la adición de otros nucleófilos de las proteínas al doble enlace de la maleimida, en competencia con el ataque de los grupos sulfhidrilo.



Otro punto importante es la especificidad en cuanto a marcar el residuo de interés dentro del conjunto de las 13 cisteínas que contiene la PEPCK de rata. Se ha demostrado que la cisteína más reactiva de esta enzima reacciona con concentraciones estequiométricas de derivados de la maleimida, a pH 7 y 0°C, a una velocidad tal que su cinética no puede ser determinada por métodos convencionales (Lewis y col., 1989a). Las otras cisteínas

de la enzima presentan una reactividad mucho menor, puesto que no se marcan con cumarinil maleimida bajo las condiciones anteriores (Lewis y col., 1989a). Estos antecedentes entonces, hacen factible la marcación específica de una cisteína del sitio del nucleótido de la PEPCK de rata, hecho que se comprobó durante el desarrollo de este trabajo.

En la enzima así modificada, se determinaron las propiedades de fluorescencia de las sondas y estos estudios fueron complementados con determinaciones de la fluorescencia de los triptofanos. La PEPCK de hígado de rata contiene 16 triptofanos (Beale y col., 1985), una población demasiado heterogénea para hacer estudios que permitan identificar el comportamiento de residuos particulares. Sin embargo, las propiedades de fluorescencia del promedio de esta población permitieron identificar distintas conformaciones de la enzima.

En resumen, los objetivos de esta tesis podrían enumerarse como sigue:

- 1) Introducir una marca fluorescente en una o más cisteínas del sitio de GTP de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de hígado de rata.
- 2) Procurar conocer, a través de la determinación de las propiedades de fluorescencia de la sonda, algunas características fisicoquímicas de este sitio como la polaridad y accesibilidad a apagadores, así como averiguar la movilidad de la sonda a través de determinaciones de la anisotropía.
- 3) Contribuir a conocer la naturaleza del sitio de GTP, mediante la identificación de el o los residuos modificados en la secuencia primaria de la PEPCK.
- 4) Estudiar las características de fluorescencia de los triptofanos de la enzima, con el objeto de comparar la conformación de la enzima libre, unida a los nucleótidos y modificada con las sondas fluorescentes.

Nuestros resultados permitieron demostrar que el sitio del GTP de la PEPCK de hígado de rata presenta una polaridad reducida con respecto al agua y una baja accesibilidad a la acrilamida. Además, nuestros datos indicaron que el núcleo de naftaleno sulfonato, unido covalentemente a este sitio, presenta una movilidad restrin-

gida en la proteína. Junto con esto pudimos identificar algunos residuos de aminoácido del sitio del GTP así como su disposición espacial. Específicamente, la modificación de la enzima con pirenil yodoacetamida permitió demostrar que la cisteína 288 y la cisteína 407 ó la cisteína 413, forman parte del sitio del GTP y se encuentran vecinas en la estructura tridimensional de la enzima.

Las determinaciones de la fluorescencia intrínseca permitieron medir la unión de los nucleótidos a través de cambios en la intensidad de la emisión.

Finalmente, pudieron hacerse comparaciones con las características descritas para el sitio del ATP de la carboxiquinasa de levadura.

## II. METODOS

### II.1 REACTIVOS

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.: GDP, IDP, ITP, malato deshidrogenasa, NADH, PEP, Sephacryl S-200, 1,5-I-AEDANS, Tes, Hepes, Tris-HCl, DTT, 2-mercaptoetanol, DEAE-Sephacel, GTP-agarosa, sulfato de protamina,  $MnCl_2$ ,  $KHCO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ , cloruro de guanidinio.

La pirenil yodoacetamida se obtuvo de Molecular Probes y la pirenil maleimida de Fluka.

La N-AcCis-PM y la N-AcCis-AEDANS, fueron gentilmente facilitadas por los Drs. M.V. Encinas y E. Cardemil.

La hidroxilapatita y la acrilamida fueron de Bio-Rad Labs.

Los siguientes reactivos se obtuvieron en Merck : TEA, EDTA, sacarosa, sulfato de amonio, bicarbonato de amonio, NaCl, KCl, glicerol, solventes de calidad espectroscópica y para HPLC.

El Sephadex G-10 fue de Pharmacia.

Se usó tripsina Boehringer, de calidad para secuenciación.

### II.2 PURIFICACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA CITOSOLICA DE HIGADO DE RATA

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica se purificó a homogeneidad desde el hígado de rata, según el método descrito (Colombo y col., 1978), con algunas modificaciones. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C. Las soluciones fueron desaireadas y saturadas con nitrógeno antes de ser usadas.

La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente, mediante la relación de absorbancias a 280 y 260 nm (Lane, 1957), excepto en la enzima homogénea cuya concentración fue determinada utilizando el coeficiente de extinción molar a 280 nm descrito para esta enzima:  $1,15 \times 10^5$  (Lewis y col., 1989a).

Las ratas (variedad Sprague Dawley) fueron mantenidas por 24 horas en ayunas antes de ser sacrificadas, con el objeto de inducir la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica citosólica del hígado (Ballard y Hanson, 1969). Los hígados pueden guardarse congelados a  $-18^\circ\text{C}$  hasta 3 meses. Después de descongelarlos, éstos se secaron, se procesaron en una moladora de carne y luego se homogeneizaron en un aparato de Potter con dos volúmenes del amortiguador de extracción (TEA-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, sacarosa 0,25 M). El homogeneizado se filtró a través de gasa y se le agregó sulfato de protamina hasta una concentración de 1,5 mg/mL. La solución se agitó 2 minutos y se centrifugó por 1,5 horas a  $12.000 \times g$ .

El extracto fue fraccionado con sulfato de amonio (Colombo y col., 1978). La fracción que precipita entre 42 y 62% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y que contiene la PEPCK, fue suspendida en Tris-HCl 20 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, DTT 10 mM y dializada durante la noche contra la misma solución conteniendo DTT 0,5 mM.

Después de ajustar la conductividad de la muestra a 1 mMho, ésta fue aplicada a columnas de DEAE-Sephacel equilibradas en Tris-HCl 20 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, (conductividad 1 mMho). Se aplicaron 28 mg de proteína por mL del intercambiador. La columna se lavó con 10 volúmenes del amortiguador anterior, eliminándose la mayor parte de la hemoglobina de la muestra. La PEPCK fue eluída con una gradiente lineal de 0-0,1M de NaCl en el mismo amortiguador.

Las fracciones que contenían la enzima fueron concentradas por ultrafiltración y aplicadas a una columna de Sephacryl S-200 (4,8 x 67 cm) equilibrada en Tris-HCl 30 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM. La filtración se llevó a cabo con un flujo de 1 mL/min. Las fracciones con actividad enzimática se concentraron y guardaron a  $4^\circ\text{C}$  después de agregarles DTT 10 mM.

La muestra se volvió a filtrar en Sephacryl S-200 bajo las mismas condiciones,

procedimiento que permitió separar la carboxiquinasa de otras proteínas de bajo peso molecular que no se resuelven en las etapas posteriores. La enzima eluída de esta columna se equilibró en fosfato de potasio 10 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM (conductividad 1 mMho) y fue aplicada a una columna de hidroxilapatita (Biogel HTP) equilibrada en el mismo amortiguador. Después de lavar con 10 volúmenes de columna, la PEPCK fue eluída con un gradiente de fosfato de potasio pH 7,0 desde 10 a 250 mM, conteniendo EDTA 1 mM y DTT 1 mM.

La última etapa de la purificación fue una cromatografía de afinidad en agarosa-hexano-GTP. Este procedimiento se llevó a cabo según las condiciones descritas (Brinkworth y col., 1981), salvo la elución con KCl que se realizó en ausencia de  $MnCl_2$ .

La muestra eluída de hidroxilapatita se equilibró en Tes 10 mM, pH 7,2, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v, DTT 0,1 mM (conductividad 200  $\mu$ Mho). Se ajustó la absorción a 280 nm de esta solución hasta un valor de 0,3 y se agregó  $MnCl_2$  hasta una concentración de 0,55 mM. La columna se equilibró en el mismo amortiguador con  $MnCl_2$  0,55 mM.

Después de aplicar la muestra, se eliminaron las proteínas contaminantes con KCl 0,15 M en el mismo amortiguador. Finalmente la PEPCK fue eluída con KCl 1 M en Tes 10 mM, pH 7,2, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v, DTT 0,1 mM.

En la tabla I aparece el rendimiento y purificación de las distintas etapas de la secuencia de purificación. Partiendo de 1.300 g de hígado se obtienen 11 mg de PEPCK homogénea en 15-20 días. La enzima pura, eluída de GTP-agarosa, se puede guardar a 4° C por 7-10 días, a una concentración de 2 mg/mL.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica eluída de GTP-agarosa, presentó una actividad específica de 27-30  $\mu$ moles de oxaloacetato formados por min y por mg de proteína, a 30°C, valor que corresponde a la actividad específica descrita para la PEPCK homogénea de hígado de rata (Ballard y Hanson, 1969; Lewis y col., 1989a). La electroforesis de la enzima eluída de GTP-agarosa, en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemli, 1970), muestra una sola banda con la migración esperada para una proteína de masa molecular de alrededor de 69.000 (figura 1).

**TABLA I. PURIFICACION DE LA CARBOXIQUINASA  
FOSFOENOLPIRUVICA CITOSOLICA DE HIGADO DE RATA**

Procedimiento	Proteínas totales (mg)	Vol. (ml)	Ut	U/mg	R %	P
EXTRACTO	76.608	1.600	2336	0,03	100	1,0
pp 42/62% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	32.340	330	1617	0,05	69	1,7
DEAE-Sephacel	1.031	1.227	982	0,95	42	32
Sephacryl I	122	55	778	5,9	33	197
Sephacryl II	91	65	590	6,4	25	213
Hidroxilapatita	43	95	430	9,9	18	330
GTP-agarosa	11	16	310	28	13	933

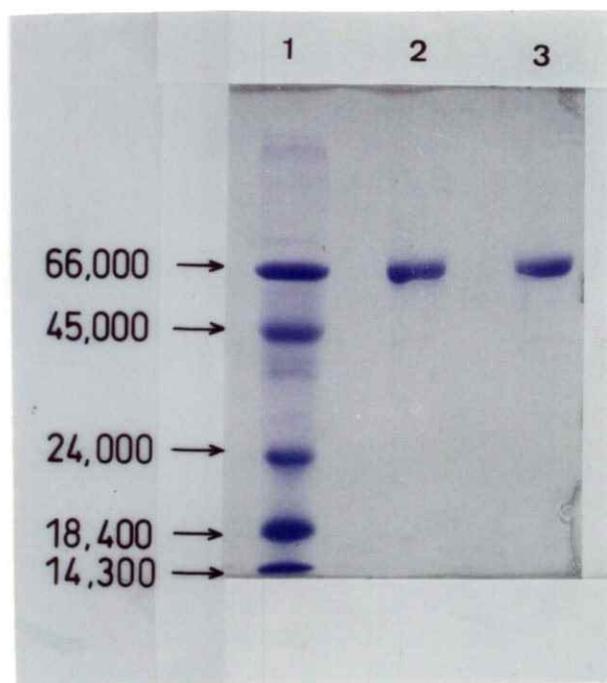
R = rendimiento

P = purificación

U = unidades. Una unidad corresponde a los  $\mu$ moles de oxaloacetato formados por minuto.

Ut = unidades totales

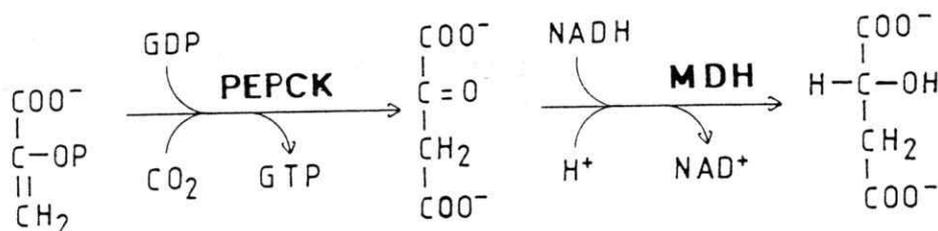
pp = precipitado



**Figura 1.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS (Laemli, 1970). La muestra aplicada en 1 contiene los siguientes estándares: albúmina de bovino, MM 66.000; albúmina de huevo, MM 45.000;  $\beta$ -lactoglobulina, MM 18.400 (subunidad); tripsinógeno, MM 24.000 y lisozima, MM 14.300. Las muestras aplicadas en 2 y 3 contienen 10  $\mu$ g de PEPCK (rata) eluída de GTP-agarosa.

### II.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La actividad de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica se midió en el sentido de la carboxilación del fosfoenolpiruvato, acoplando la reacción de esta enzima con la reacción catalizada por la deshidrogenasa málica y determinando espectrofotométricamente la desaparición de NADH (Colombo y col., 1978).



El medio de reacción contenía amortiguador Hepes 50 mM pH 7,0, concentraciones saturantes de los sustratos (0,1 mM de GDP, 2,2 mM de  $\text{MnCl}_2$ , 3,6 mM de PEP, 50 mM de  $\text{KHCO}_3$ ), 0,27 mM de NADH, 3 unidades de malato deshidrogenasa y 0,02-0,06 unidades de PEPCK, en un volumen final de 1 mL. La reacción se inició agregando el PEP a la mezcla preincubada a 30°C. La velocidad de formación de oxaloacetato a partir del PEP, bajo estas condiciones, es igual a la disminución de la absorbancia a 340 nm debida al NADH.

La PEPCK eluida de hidroxilapatita contiene una concentración de fosfato de potasio que hace precipitar el  $\text{Mn}^{+2}$  presente en el medio de ensayo. Por esta razón se agregó a éste GDP 1 mM para determinar la actividad de la carboxiquinasa en el eluido de esta columna.

## II.4 MODIFICACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA CON REACTIVOS FLUORESCENTES DIRIGIDOS A GRUPOS SULFHIDRILO

La enzima proveniente de GTP-agarosa fue dializada exhaustivamente contra TEA-HCl 50 mM pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v, con el objeto de eliminar el DTT de la solución. Este amortiguador había sido previamente desaireado y saturado con nitrógeno. Las reacciones de modificación de la carboxiquinasa con 1,5-I-AEDANS, pirenil maleimida y pirenil yodoacetamida, se hicieron en este medio de reacción. Las soluciones de modificador se prepararon en el momento de usarlas y se mantuvieron protegidas de la luz.

La proteína modificada fue separada del reactivo modificador residual por diálisis contra TEA-HCl 50 mM pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v o bien por filtración en una columna de Sephadex G-10 (1 x 25 cm), equilibrada con el mismo amortiguador.

La modificación con 1,5-I-AEDANS se llevó a cabo a 0°C y se inició por adición de una alícuota de la solución concentrada del reactivo a 2-3 mL de la enzima dializada contra el amortiguador de reacción. Las concentraciones finales de 1,5-I-AEDANS y de PEPCCK fueron de 20-70  $\mu\text{M}$  y de 5-20  $\mu\text{M}$  respectivamente. La solución de 1,5-I-AEDANS se preparó en TEA-HCl 50 mM pH 7,3 y su concentración se determinó espectrofotométricamente usando el coeficiente de extinción molar descrito para este fluoróforo a 337 nm (6.100; Hudson y Weber, 1973).

A distintos tiempos después de la adición del modificador, se sacaron alícuotas del medio de reacción, se diluyeron en EtSH 0,1 M y se le determinó la actividad enzimática a esta solución. Cuando la actividad residual fue de un 15 a 20% de la actividad inicial, se detuvo la reacción agregando EtSH hasta una concentración final de 0,4 M.

La modificación con pirenil maleimida se hizo a 0°C y pH 7,3, (Lewis y col., 1989a). Se preparó una solución de PM en dimetilformamida y su concentración se midió espectrofotométricamente después de diluirla con TEA-HCl 50 mM pH 7,3, usando el coeficiente de extinción molar a 343 nm, (40.000; Wu y col., 1976). El medio

de reacción contenía concentraciones equimolares de enzima y PM (16-23  $\mu\text{M}$ ). Después de 0,5-1,0 minuto de reacción, cuando la enzima se había inactivado en un 90-95%, se agregó EtSH hasta una concentración final de 0,4 M y se separó la enzima marcada de la sonda libre.

La marcación de la carboxiquinasa con pirenil yodoacetamida, se llevó a cabo bajo dos condiciones diferentes de reacción, que permitieron obtener aductos de distinta estequiometría. La solución de PIA se preparó en dimetilformamida y su concentración se determinó espectrofotométricamente a 344 nm, en una dilución del reactivo en TEA-HCl 50 mM pH 7,3. ( $\epsilon = 22.000$ ; Kouyama y Mihashi, 1981).

El aducto PEPCK:PA=1:1,1 se obtuvo haciendo reaccionar la enzima (12  $\mu\text{M}$ ) con PIA (18  $\mu\text{M}$ ) a 0°C. Después de 15 minutos de reacción quedaba alrededor de un 18% de actividad residual y en este momento se detuvo la reacción agregando EtSH 0,4 M.

El aducto PEPCK:PA=1:2,2 se obtuvo incubando a 20°C, por 10 minutos, una solución que contenía PEPCK (3  $\mu\text{M}$ ) y PIA (15  $\mu\text{M}$ ). Resultó importante mantener estos valores de concentración además de la relación estequiométrica entre ambos reaccionantes, ya que a concentraciones más altas de la enzima y de PIA el medio de reacción se vuelve opalescente. La aparición de la banda del excímero ( $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ ) en el espectro de emisión del pireno en la mezcla de reacción ( $\lambda_{\text{exc}} = 344 \text{ nm}$ ) permitió controlar la incorporación de un segundo mol de reactivo a la carboxiquinasa. Cuando la emisión del excímero no aumentó con el tiempo, se agregó EtSH 0,4 M para detener la reacción y se dializó la muestra para eliminar el derivado de pireno libre.

## II.5 DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA DE MARCACION CON LOS MODIFICADORES FLUORESCENTES DE GRUPOS SULFHIDRILO

Para determinar la estequiometría de marcación, la proteína modificada fue concentrada al vacío en bolsas de colodión de Schleicher y Schuell (límite de exclusión, 25.000 Da) hasta una concentración de 2-3 mg/mL y dializada exhaustivamente contra TEA-HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v, para eliminar el exceso de reactivo modificador.

La concentración de la carboxiquinasa se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm,  $\epsilon=115.000$  (Lewis y col., 1989a). El AEDANS unido a la proteína se cuantificó a 337 nm usando un coeficiente de extinción molar de 6.100 (Hudson y Weber, 1973). Para pirenil maleimida y pirenil yodoacetamida se utilizaron los coeficientes de extinción molar de 40.000 y 22.000 respectivamente (Wu y col., 1976; Kouyama y Mihashi, 1981). Cabe hacer notar que se han descrito diversos valores para el coeficiente de extinción de la pirenil maleimida, que varían entre 23.000 y 40.000 (Graceffa y Lehrer, 1980; Burtnick y col., 1988; Wu y col., 1976).

Los derivados del pireno y el AEDANS absorben a 280 nm, por lo cual la absorción de la solución de proteína a esta longitud de onda se corrigió por esta contribución antes de calcular la concentración de la PEPCK. La corrección se hizo utilizando la relación entre la absorción a 344 nm ( $A_{344}$ ) y a 280 nm ( $A_{280}$ ) para cada derivado de pireno. Para pirenil yodoacetamida, se cumple que la relación  $A_{344}/A_{280}$  es de 1,15, en tanto que para pirenil maleimida este cociente es de 1,59. El valor del coeficiente de extinción molar a 280 nm para el AEDANS es de 908 (Hudson y Weber, 1973).

Los espectros de absorción UV-visible de la PEPCK modificada con AEDANS, pirenil maleimida y pirenil yodoacetamida, así como los espectros de absorción de la N-AcCis-AEDANS y N-AcCis-PM, fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu-160.

## **II.6 TRATAMIENTO CON TRIPSINA DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA MODIFICADA**

La PEPCK modificada covalentemente con 1,5-I-AEDANS, PM y PIA, fue tratada con cloruro de guanidinio, EDTA y DTT en Tris base, según la metodología descrita (Mayes, 1984). Los sulfhidrilos de las cisteínas fueron carboximetilados con ácido yodoacético (Mayes, 1984) y la enzima fue dializada contra  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM pH 9,0. Durante este procedimiento apareció un precipitado que se demostró que correspondía a la enzima modificada. El precipitado fue arrastrado desde el cono de diálisis y recogido por centrifugación.

Se agregó un 1% de tripsina (Boehringer, calidad para secuenciación) con respecto al peso de la proteína y la suspensión se incubó por 12 horas a 37°C. Este procedimiento disolvió completamente la proteína precipitada, dando una mezcla de péptidos que se resolvieron por HPLC en columnas de fase reversa.

## **II.7 SEPARACION DE LOS PEPTIDOS TRIPTICOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION EN FASE REVERSA**

Los péptidos tripticos fueron separados en un cromatógrafo Merck-Hitachi equipado con un detector de UV, usando una columna 100-RP 18 de fase reversa (LiChrosphere 4 mm x 25 cm, Merck) equilibrada en TFA 0,05%. Las muestras se centrifugaron a 3.000 x g antes de ser inyectadas.

En cada cromatografía se inyectaron a la columna entre 3 y 11 nmoles de la mezcla de péptidos, en porciones sucesivas de 180  $\mu\text{L}$ . Se hizo pasar por 12 segundos entre una y otra inyección, TFA 0,05% a un flujo de 1 mL/min. Los péptidos fueron eluidos con el mismo flujo, mediante una gradiente lineal trifásica de acetonitrilo en TFA 0,05% (Lewis y col., 1989a) : 0-25% desde los 5 a los 45 minutos, 25-35% desde los 45 a los 110 minutos y 35-80% desde los 110 a los 140 minutos.

El análisis se hizo midiendo la absorción del enlace peptídico a 219 nm, así como la absorción debida a la marca fluorescente (337 nm para el AEDANS, 344 nm para los derivados del pireno). Además, se recolectaron fracciones de 0,5-1,0 mL a las que se les determinó la fluorescencia. (Para AEDANS,  $\lambda_{exc}=337$  nm,  $\lambda_{em}=470$  nm y para los derivados del pireno,  $\lambda_{exc}=344$  nm,  $\lambda_{em}=380$ nm). Los péptidos marcados fueron colectados y concentrados en un evaporador rotatorio para eliminar el acetonitrilo, evitando llevar la muestra a sequedad. Luego fueron purificados en una columna C4 de fase reversa (LC 304 Supelco, 4 mm x 25cm) equilibrada en TFA 0,05%.

La elución de los péptidos desde esta columna se realizó con la misma gradiente de acetonitrilo usada para eluir la columna C18 (Lewis y col., 1989a). El análisis se hizo midiendo la absorción a 219 nm y la fluorescencia en las fracciones recolectadas.

## II.8 DETERMINACION DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LOS PEPTIDOS MODIFICADOS

La secuencia de aminoácidos de los péptidos trópticos modificados con PIA, fue determinada por el método de Edman, en un secuenciador de proteínas en fase gaseosa (Hunkapiller y col., 1982) ABI 470A, empleando los equipos existentes en el Department of Biological Chemistry and Structure, University of Health Sciences, Chicago E.E.U.U. (Alvear y col., 1992).

Se utilizaron los procedimientos de unión covalente cuyo uso se recomienda con el equipo de Sequelon Aryl Amina de Milligen/Biosearch. Se modificaron los ciclos de secuenciación para hacer las reacciones en membranas PVDF (Sequelon-AA, equipo de unión covalente a membranas, Milligen /Biosearch, 1989).

El análisis de las feniltiohidantofnas se realizó con un analizador ABI 120A (Klapper, 1982).



## II.9 DETERMINACIONES DE FLUORESCENCIA.

Todas las determinaciones de fluorescencia en estado estacionario se realizaron a 20°C en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-5. Se usaron pasos de luz de 2,5 nm, tanto para la excitación como para la emisión. Para medir la fluorescencia de los residuos de triptofano de la enzima, se usó una longitud de onda de excitación de 295 nm con el fin de minimizar la interferencia de los residuos de tirosina.

Los tiempos de decaimiento de la fluorescencia fueron determinados mediante la técnica de fluorimetría de fase a frecuencias múltiples (Lakowicz, 1983). Las mediciones se realizaron a 20°C en un fluorímetro GREG-200 de fase y modulación, equipado con celdas Pockels y con sintetizadores de frecuencia. Se obtuvieron los ángulos de fase y los cuocientes de modulación de la luz absorbida y emitida, a distintas frecuencias de modulación. Se usó como referencia glicógeno ( $\tau=0$ ). La longitud de onda de la luz de excitación se seleccionó mediante un monocromador (2,5 nm de paso de luz), y la luz emitida fue detectada a través de filtros de corte apropiado ( $\lambda > 450$  nm para los derivados del AEDANS,  $\lambda > 360$  nm para los derivados del pireno y  $\lambda > 310$  nm para los triptofanos).

Los datos se analizaron mediante un ajuste no lineal de cuadrados mínimos (Gratton y col., 1984) utilizando los programas de rutina que vienen con el instrumento (ISS Inc.). Para algunos experimentos la luz de excitación fue polarizada verticalmente y la emisión fue polarizada a 54,7° con respecto a la vertical para eliminar los posibles efectos de la rotación Browniana sobre la determinación de los tiempos de decaimiento de la fluorescencia.

Los estudios de apagamiento de la fluorescencia por acrilamida, NaI y CsCl se realizaron midiendo la disminución de intensidad de la fluorescencia en el máximo de emisión del fluoróforo, o bien midiendo el decrecimiento en el o los tiempos de decaimiento de la emisión, por el agregado del apagador. Se usaron soluciones concentradas (4-6 M) recién preparadas de los apagadores. La solución de NaI contenía un 1% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  para evitar la formación de  $\text{I}_3^-$  (Lehrer, 1971).

Alícuotas del apagador se agregaron sucesivamente a una celda que contenía la proteína en amortiguador TEA-HCl 20 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM y glicerol 10% v/v. Los datos de apagamiento de la intensidad de la emisión se corrigieron por el efecto de dilución que nunca fue mayor del 5%. En los experimentos de apagamiento por acrilamida, los datos se corrigieron además por el efecto de filtro interno debido a la absorción de luz por esta molécula, según la ecuación :

$$I_{\text{corr}} = I_{\text{obs}} \times 10^{\Delta A/2} \quad (\text{Lehrer y Leavis, 1978a})$$

donde  $\Delta A/2$  corresponde al aumento de absorbancia debido a la adición de acrilamida.

Para los apagadores iónicos se cuantificó el efecto de fuerza iónica, midiendo la intensidad de la fluorescencia en presencia de cantidades equimolares de NaCl. La emisión del PM unido a la PEPCCK disminuyó en un 5% en presencia de NaCl 0,4 M y la fluorescencia de los triptofanos disminuyó en un 6% en las mismas condiciones. Los experimentos de apagamiento de la fluorescencia de los triptofanos por NaI, se llevaron a cabo a fuerza iónica constante, la que se mantuvo con NaCl. Además se determinó el efecto de los apagadores sobre la actividad de la carboxiquinasa, en el rango de concentración usado en los experimentos de apagamiento. La acrilamida, en concentraciones de hasta 0,2 M, no inactiva la enzima en una incubación de 5 minutos a 20°C. Frente a una concentración de acrilamida de 0,4 M la enzima se inactivó en un 16% bajo las mismas condiciones. Concentraciones más altas desnaturalizaron la PEPCCK. Por otra parte, NaI y CsCl 0,4 M, disminuyeron la actividad enzimática en un 24% y un 11%, respectivamente, cuando fueron incubados con la enzima por 5 minutos a 20°C.

Los datos de apagamiento se analizaron según la ecuación de Stern-Volmer :

$$I^0/I = 1 + K_{sv} (Q)$$

o bien según la ecuación de Stern-Volmer modificada (Lehrer y Leavis, 1978b; Eftink y Ghiron, 1981):

$$I^0/I e^{V(Q)} = \tau^0/\tau = 1 + K_{sv} (Q)$$

donde  $I^0, I$  son las intensidades de la fluorescencia en ausencia y presencia del apagador (Q), y  $\tau^0, \tau$  son los tiempos de decaimiento en ausencia y presencia del apagador.  $K_{sv}$  es la constante de apagamiento de Stern-Volmer que se relaciona con la constante

bimolecular de apagamiento,  $k_q$ , según la expresión  $K_{sv} = k_q \tau^0$ ;  $V$  es la constante de apagamiento estático.

Los datos de la disminución de la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos de la enzima a distintas concentraciones de los nucleótidos de guanosina e inosina fueron corregidos por la dilución y por el efecto de filtro interno (Lehrer y Leavis, 1978a) midiendo el aumento de la absorbancia a 295 nm debida al nucleótido agregado. Esta corrección fue en todos los casos menor a un 10%.

Los datos fueron ajustados a la ecuación:

$$\Delta I/I^0 = (L) / K_d + (L)$$

Donde  $\Delta I/I^0$  es el porcentaje del cambio en la intensidad de la fluorescencia por efecto del ligando (L) y  $K_d$ , la constante de disociación del equilibrio  $E-L \rightleftharpoons E+L$ . La ecuación se obtuvo considerando que la concentración de enzima (E) es mucho menor que la concentración de ligando y que  $\Delta I/I^0$  refleja la concentración del complejo E-L.

Las anisotropías de la fluorescencia en estado estacionario ( $r$ ), se midieron en la enzima modificada con AEDANS, usando el espectrofluorímetro GREG-200 e insertando polarizadores (prismas de calcita) en la luz de excitación y emisión. Las determinaciones se realizaron a temperaturas variables entre 4 y 29°C y en una solución de la enzima que contenía glicerol 70% v/v. Las anisotropías se calcularon a partir de las intensidades de la luz polarizada emitida, tanto para el componente paralelo como para el perpendicular. La muestra fue excitada con luz de 380 nm, longitud de onda a la cual la anisotropía del AEDANS alcanza un valor constante (Hudson y Weber, 1973). Los valores de anisotropía se relacionaron con el tiempo de decaimiento de fluorescencia y el tiempo de correlación rotacional, de acuerdo a la ecuación de Perrin (Weber, 1953; Weber, 1966):

$$1/r = 1/r_0 (1 + \tau/\theta)$$

donde  $r$  corresponde a la anisotropía observada,  $r_0$  a la anisotropía límite y  $\theta$  al tiempo de correlación rotacional. La anisotropía límite se determinó por extrapolación a viscosidad infinita, en el gráfico de Perrin.

El tiempo de correlación rotacional para una proteína esférica hidratada, de volumen molar  $V_0$  está dada por:

$$\theta = \eta V_0 / RT = M(\bar{v} + h) \eta / RT$$

donde  $\eta$  es la viscosidad de la solución,  $\bar{v}$  el volumen parcial específico,  $h$  el grado de hidratación,  $M$  la masa molecular de la proteína y  $T$  la temperatura absoluta. A partir de esta ecuación, se calculó un valor de 26 ns para la PEPCK de rata, considerando una masa molecular de 69.289 (Beale y col., 1985), un grado de hidratación de 0,3 mL/g y un volumen parcial específico de 0,736 mL/g (Colombo y col., 1978).

### III. RESULTADOS

#### III.1 MODIFICACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA CON REACTIVOS FLUORESCENTES ESPECIFICOS PARA GRUPOS SULFHIDRILO

##### III.1.1 Cinética de inactivación con 1,5-I-AEDANS y pirenil yodoacetamida.

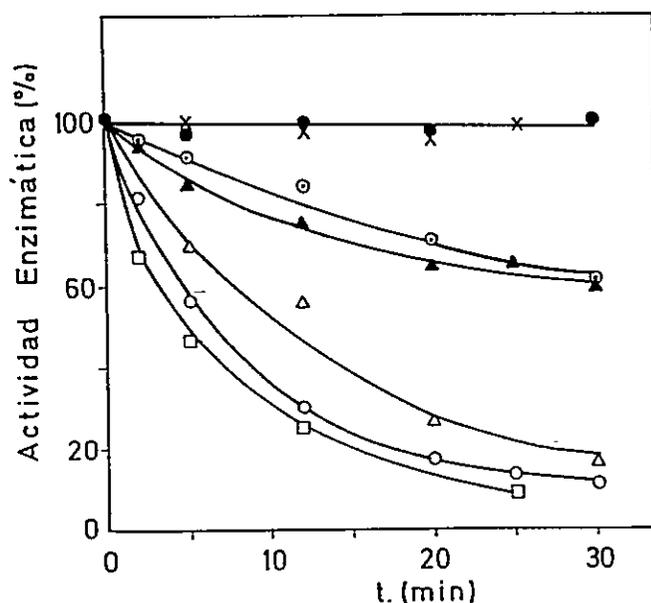
###### Efecto de los sustratos.

La incubación de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de rata a 0° C y pH 7,3 con los reactivos fluorescentes 1,5-I-AEDANS y pirenil yodoacetamida, inactivó completamente la enzima. Las cinéticas de inactivación se muestran en las figuras 2 y 3.

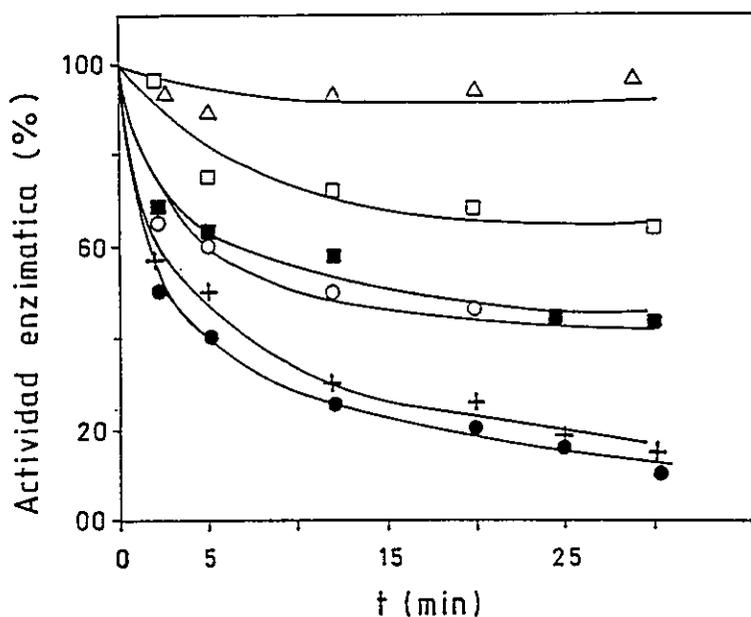
La reacción se llevó a cabo en presencia de un exceso molar de 5 veces de 1,5-I-AEDANS y de 1,5 veces de PIA con respecto a la enzima. En ningún caso fue posible hacer la reacción bajo condiciones de seudoprimer orden, ya que la inactivación es demasiado rápida a concentraciones más altas del modificador. Cuando se aplicó a los datos la ecuación correspondiente a una cinética de segundo orden, no se obtuvo un buen ajuste.

Esta situación es diferente a la descrita para las carboxiquinasas de levadura e hígado de cerdo, cuyas cinéticas de inactivación con 1,5-I-AEDANS y PIA pueden seguirse bajo condiciones de seudoprimer orden (Encinas y col., 1990; Silverstein y col., 1979; Cardemil y col., 1990), puesto que poseen grupos sulfhidrilo de menor reactividad que la enzima de hígado de rata.

La adición de GDPMn al medio de reacción, suprimió completamente el efecto inactivador de 1,5-I-AEDANS o de PIA sobre la PEPCCK de rata. Los otros sustratos de la reacción protegieron parcialmente la enzima o bien no alteraron la cinética de inactivación (figuras 2 y 3).



**Figura 2.** Cinética de inactivación de la PEPCK (5 $\mu$ M) con 1,5-I-AEDANS (25 $\mu$ M) en TEA-HCl 50 mM, pH 7, 3 EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v y 0°C (○). La inactivación también se llevó a cabo en presencia de GDP 90  $\mu$ M más MnCl<sub>2</sub> 2,2 mM (●); GDP 90  $\mu$ M más MnCl<sub>2</sub> 2,2 mM, más PEP 10 mM (x); PEP 10 mM más MnCl<sub>2</sub> 2 mM (◐); MnCl<sub>2</sub> 2 mM (◑); oxaloacetato 1 mM (▲); KHCO<sub>3</sub> 45 mM (◒).



**Figura 3.** Cinética de inactivación de la PEPCK (12 $\mu$ M) con PIA (18 $\mu$ M) en TEA-HCl 50 mM, pH 7, 3 EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v y 0°C (●). La enzima también se incubó en presencia de PIA y GDP 90  $\mu$ M más MnCl<sub>2</sub> 2,2 mM (◒); PEP 10 mM más MnCl<sub>2</sub> 2,2 mM (◐), MnCl<sub>2</sub> 2,2 mM (◑); oxaloacetato 1 mM (■); KHCO<sub>3</sub> 45 mM (+).

La reacción de la PEPCK de rata con pireno maleimida también inactiva la enzima. Las condiciones para esta modificación han sido ya descritas (Lewis y col., 1989a). En concordancia con estos datos, nuestros experimentos confirmaron que la enzima se inactiva muy rápidamente con cantidades equimolares de PM, perdiendo un 95% de la actividad en 0,5 minuto de incubación a 0° C y pH 7,3. También en este caso, GDPMn protege casi completamente de la inactivación.

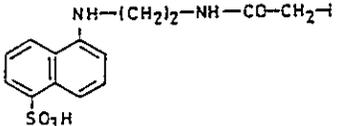
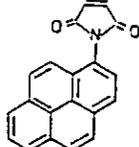
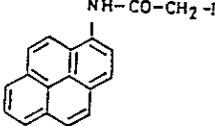
Los resultados obtenidos con los tres modificadores inducen a pensar que los residuos que están reaccionando, se encuentran en o cerca del sitio del nucleótido. Además, estos resultados concuerdan con los datos cinéticos descritos para la inactivación de esta enzima con el análogo de fotoafinidad 8-azido-GTP (Lewis y col., 1989b). Este compuesto se une al sitio del nucleótido de la carboxiquinasa y la inactiva mediante la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre dos cisteínas vecinas ubicadas en ese sitio. La inactivación se suprime casi completamente al agregar GTP al medio de reacción. El fosfoenolpiruvato,  $Mn^{2+}$  o  $HCO_3^-$ , protegen parcialmente o bien no tienen efecto sobre la velocidad de inactivación con 8-azido-GTP (Lewis y col., 1989b).

### **II.1.2 Selectividad de las reacciones de modificación de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.**

Se prepararon los aductos de la PEPCK con 1,5-I-AEDANS, PIA o PM, bajo las condiciones establecidas en la sección anterior, deteniendo la reacción a distintos valores de actividad residual entre 10 y 17%. Después de separar la proteína del exceso de reactivo, se obtuvieron los valores de estequiometría de marcación que se muestran en la Tabla II.

Bajo las condiciones de reacción anteriores, se incorporó alrededor de 1 mol de modificador por mol de enzima inactiva en todos los casos. Este resultado concuerda con la reactividad descrita para los grupos sulfhidrilo de la PEPCK de rata, que contiene una cisteína especialmente reactiva frente a DTNB y cumarinil maleimida (Carlson y col., 1978; Lewis y col., 1989a). La estequiometría de 0,8 que se obtuvo con PM, puede

**TABLA II. ESTEQUIOMETRIA DE MARCACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA CON SONDAS FLUORESCENTES**

Sonda fluorescente		Estequiometría*
1,5-1-AEDANS		1,01 ± 0,095
PM		0,783 ± 0,026
PIA		1,11 ± 0,042

\* moles de sonda unidos por mol de enzima inactiva. Se informa el promedio de 3 o 4 experimentos ± el error estándar.

atribuirse a la incerteza en el valor del coeficiente de extinción descrito para este cromóforo (Sección II.5).

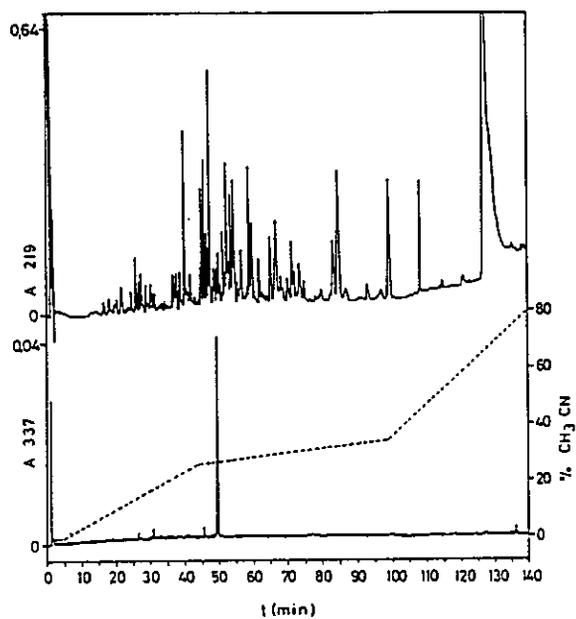
Cuando se incluyó GDPMn en el medio de reacción, se unieron sólo 0,08 moles de AEDANS por mol de enzima, lo que confirmó la especificidad de la reacción. Bajo estas condiciones la enzima no perdió actividad catalítica.

Los criterios anteriores no son suficientes para asegurar la reacción selectiva de los distintos modificadores con un residuo de amino ácido de la PEPCK, puesto que se han descrito numerosos casos en los que una proteína modificada en varios residuos de reactividad similar, presenta una estequiometría de marcación de 1,0 (Saito-Nakatsura y col., 1987; Bishop y col., 1988; Johnson y col., 1991; Kazuta y col. 1991). Por ejemplo, Kazuta y colaboradores, han descrito la modificación mutuamente excluyente de 5 residuos de lisina de la uridina difosfoglucosa pirofosforilasa, bajo condiciones en las que la incorporación total del marcador uridina difosfopiridoxal fue de un mol por mol de enzima.

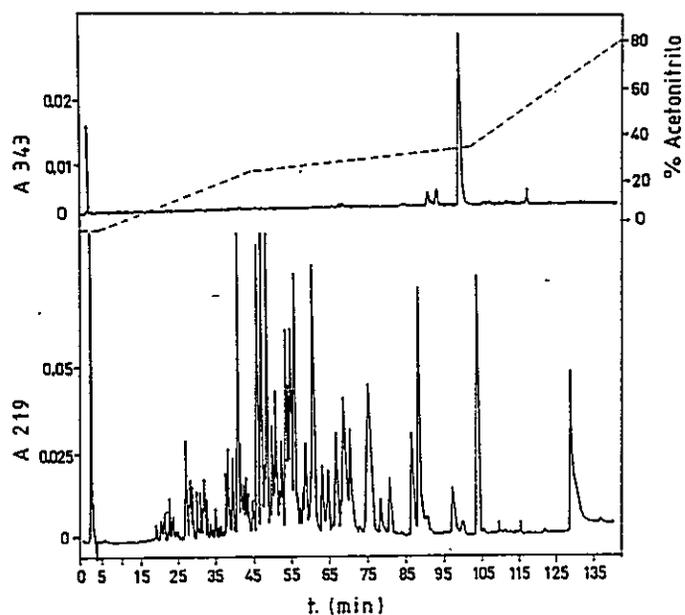
Para establecer con certeza cuántos residuos se encontraban modificados en los tres aductos de la PEPCK que aparecen en la Tabla II, éstos se sometieron a digestión con tripsina y los péptidos resultantes se resolvieron en HPLC.

En las figuras 4,5 y 6 aparecen los perfiles de elución de los péptidos obtenidos a partir de los aductos PEPCK-AEDANS, PEPCK-PM y PEPCK-PA respectivamente. El trazado a 219 nm indica la mezcla de péptidos y el trazado a 337 nm o 344 nm, muestra los péptidos marcados con AEDANS o bien con los derivados del pireno. En todos los casos se midió la fluorescencia en las fracciones recolectadas y se encontró que un solo péptido de la mezcla contiene más de un 95% de la marca fluorescente.

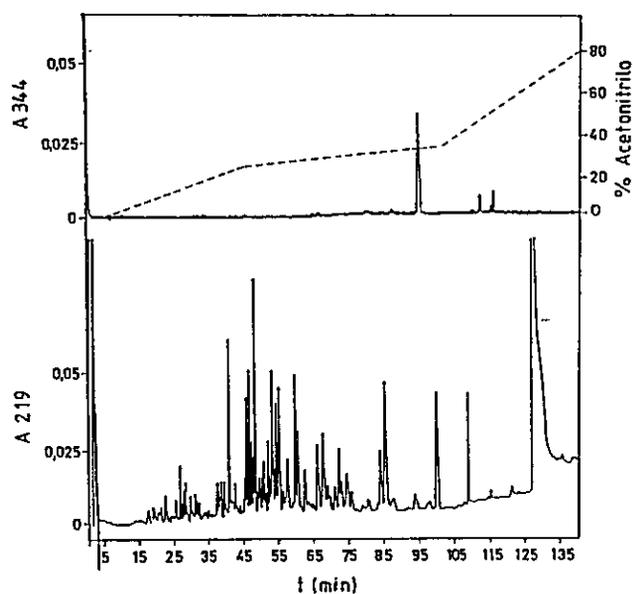
El péptido marcado con AEDANS fue eluido a los 49 minutos y muestra el espectro de emisión del AEDANS en H<sub>2</sub>O. Los péptidos derivatizados con PM y PA fueron eluidos a los 99 y 93 minutos, respectivamente y muestran la emisión característica de los derivados monoméricos del pireno. En el perfil de A<sub>344</sub> de la mezcla de péptidos trópticos del aducto con PA aparece una pequeña proporción de un péptido que se eluye a los 115 minutos. Este péptido es fluorescente y contiene un residuo de cisteína de menor reactividad, que se marca con PIA bajo condiciones de mayor temperatura y concentración del modificador, como se describirá en la sección III.4.



**Figura 4.** Separación de los péptidos trípticos obtenidos a partir de la PEPCK modificada con AEDANS. Columna 100-RP18 de fase reversa. Las condiciones de la cromatografía aparecen descritas en la sección II.7.



**Figura 5.** Separación de los péptidos trípticos obtenidos a partir de la PEPCK modificada con pirenil maleimida. Columna 100-RP18 de fase reversa. Las condiciones de la cromatografía aparecen en la sección II.7.

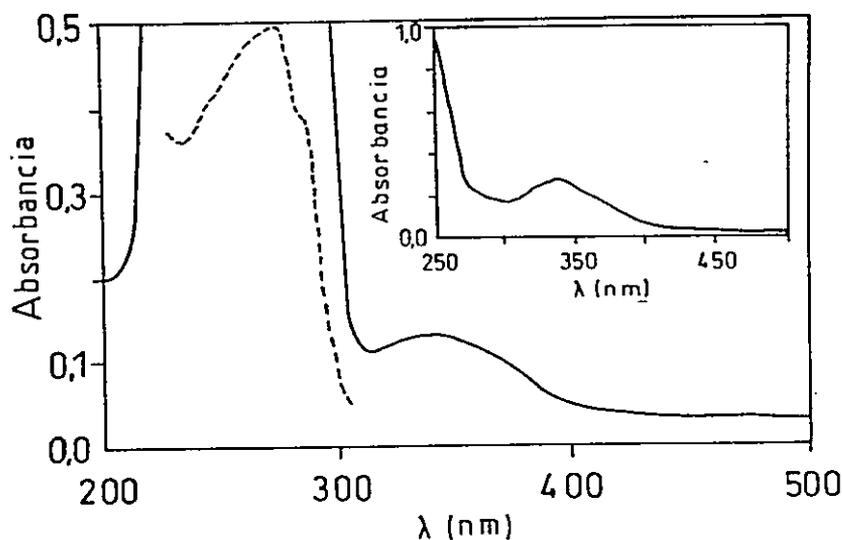


**Figura 6.** Separación de los péptidos trípticos obtenidos del aducto PEPCK:PA=1:1,1. Columna 100-RP18 de fase reversa. Las condiciones de la cromatografía aparecen en la sección II.7.

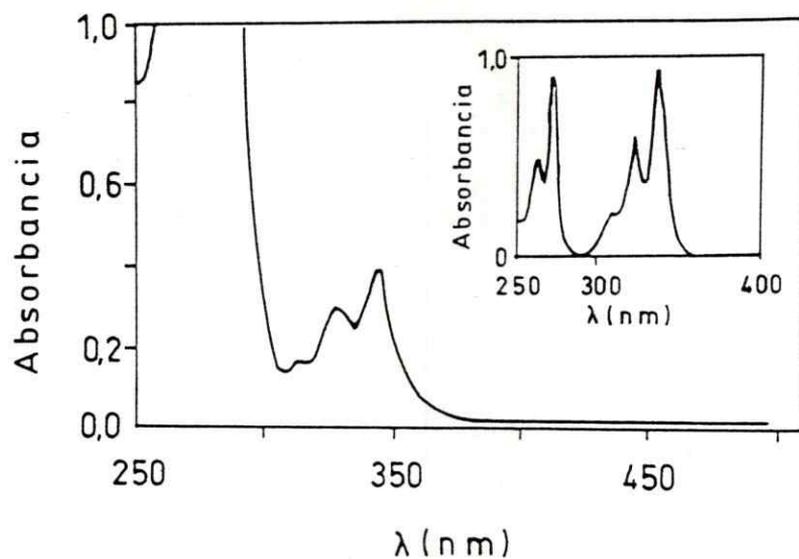
### II.1.3 Espectros de absorción de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica modificada.

Los espectros de absorción de la PEPCK modificada (figuras 7-9) presentaron una banda en la zona de 250 a 300 nm característica de los residuos de aminoácido aromáticos de la proteína, y además una banda a longitudes de onda mayores a 300 nm, que corresponde a la absorción de la sonda fluorescente unida covalentemente a la enzima.

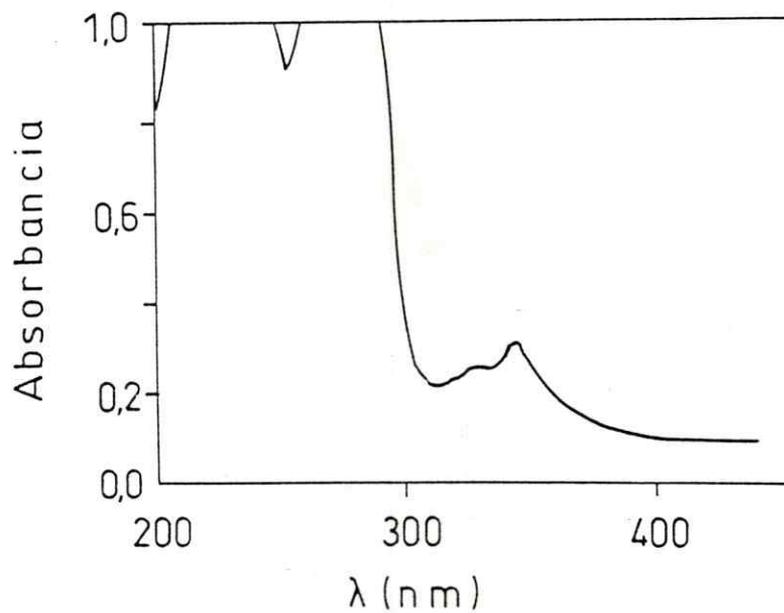
El AEDANS unido a la proteína presenta una banda de absorción centrada a 340 nm, cuya posición no varía con respecto a la banda de absorción del compuesto modelo N-AcCis-AEDANS (recuadro figura 7). En el espectro de los aductos de PM y PA con la PEPCK, aparecen bandas en la región de 310 a 360 nm, que corresponden a la absorción del pireno. La estructura fina vibracional de las bandas en estos aductos se encuentra menos resuelta que en el compuesto modelo N-AcCis-PM, aunque en la misma posición del espectro (ver recuadro figura 8).



**Figura 7.** Espectro de absorción UV-visible de la PEPCK modificada con AEDANS disuelta en TEA-HCl 50 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v. La línea punteada corresponde a la misma muestra diluida 4 veces. En el recuadro aparece el espectro de absorción de la N-AcCis-AEDANS.



**Figura 8.** Espectro de absorción UV-visible de la PEPCK modificada con pirenil maleimida disuelta en TEA-HCl 50 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v. En el recuadro aparece el espectro de absorción de la N-AcCis-PM.



**Figura 9.** Espectro de absorción UV-visible de la PEPCK modificada con PIA disuelta en TEA-HCl 50 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v.

## III.2 PROPIEDADES FLUORESCENTES DE LAS SONDAS UNIDAS A LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA EN LOS ADUCTOS CON AEDANS, PIRENIL ACETAMIDA Y PIRENIL MALEIMIDA

### III.2.1 Espectro de emisión del AEDANS unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.

El AEDANS unido a la enzima, mostró una banda de emisión ancha en la región de 440-540 nm, característica de este cromóforo (figura 10), (Hudson y Weber, 1973). El máximo de emisión del AEDANS unido a la PEPCK (470 nm), está desplazado considerablemente con respecto a la emisión fluorescente de la N-AcCis-AEDANS en H<sub>2</sub>O (500 nm; recuadro figura 10).

Se ha descrito que el máximo de la emisión fluorescente del 1,5-AEDANS y 1,8-AEDANS en mezclas etanol/agua, se desplaza continuamente hacia el azul al disminuir la polaridad del solvente (Hudson y Weber, 1973). Los valores del máximo de la emisión de N-AcCis-AEDANS en una serie de solventes y mezclas etanol/agua, presentan un comportamiento similar y muestran una buena correlación con el parámetro espectroscópico empírico ET 30 (figura 11). Este parámetro ha sido frecuentemente utilizado como escala para caracterizar la micropolaridad del entorno percibido por una sonda (Zacchariasse y col., 1981; Puri y col., 1985; Encinas y col., 1990).

El valor de ET 30 de un solvente determinado se define como la energía de transición (en kcal/mol) de la banda de transferencia de carga del piridinio de N-fenolbetaína en este solvente (Reichart, 1982).

Con el objeto de tener una medida empírica de la polaridad del microentorno del AEDANS en la proteína, se interpoló el valor de su máximo de emisión en la curva de la figura 11. El valor de ET 30 interpolado (52 kcal/mol), indicó una polaridad considerablemente menor que la del H<sub>2</sub>O para el sitio del AEDANS en la PEPCK. Este valor de ET 30 corresponde al obtenido con el modelo cuando se usa etanol como solvente.

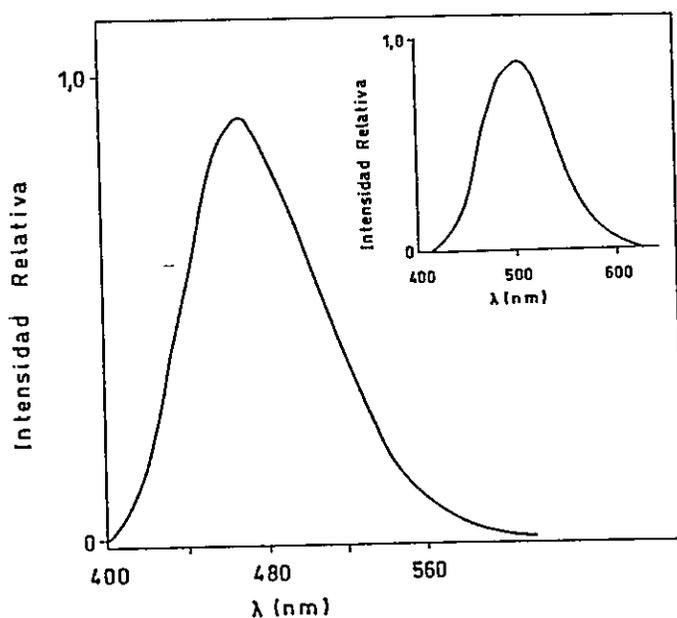


Figura 10. Espectro de emisión de la PEPCK modificada con AEDANS, disuelta en TEA-HCl 50 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v. En el recuadro, el espectro de emisión de la N-AcCis-AEDANS en  $H_2O$ .  $\lambda_{exc} = 337$  nm.

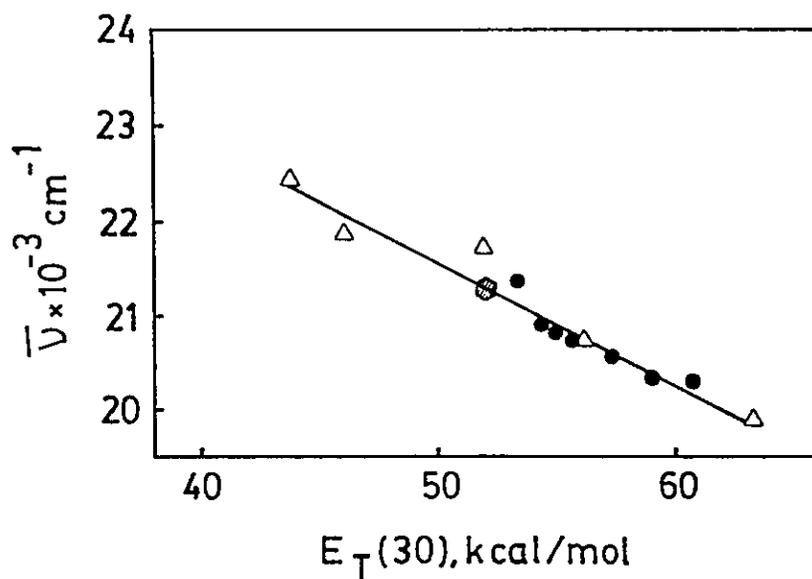


Figura 11. Máximos de la emisión de fluorescencia de la N-AcCis-AEDANS, en función del parámetro  $E_T(30)$  de distintos solventes puros ( $\Delta$ ) y mezclas etanol/ $H_2O$  ( $\bullet$ ). El valor de  $E_T(30)$  para el aducto PEPCK-AEDANS, aparece interpolado ( $\odot$ ).

### **III.2.2 Espectros de emisión del pireno en los aductos de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica con pirenil yodoacetamida y con pirenil maleimida.**

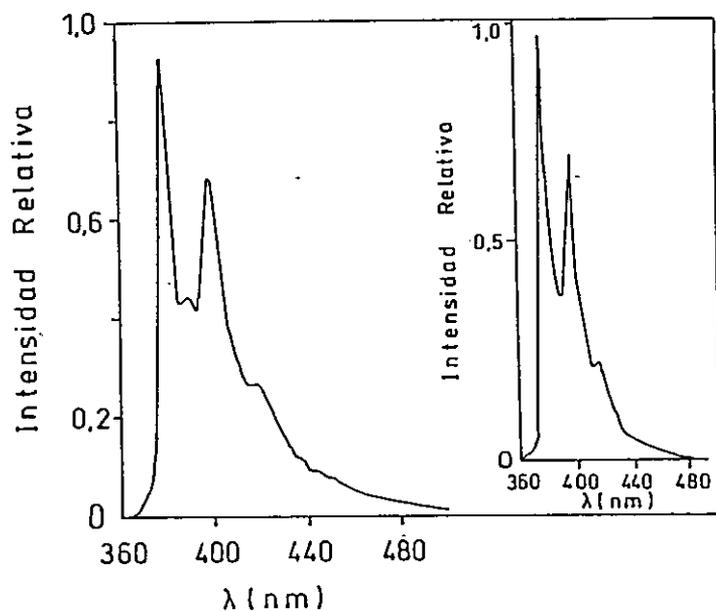
El espectro de emisión de ambos aductos, presenta la banda de emisión típica del monómero de los derivados de pireno, cuya estructura vibracional corresponde a la del compuesto modelo N-AcCis-PM. En la figura 12 se muestra el espectro del aducto del PM con la enzima y se incluye el espectro del modelo N-AcCis-PM. Las bandas vibracionales están bien resueltas en el derivado de la enzima con PM, en tanto que las bandas del aducto de la PEPCK con PA aparecen menos resueltas pero en la misma posición del espectro (figura 13).

La posición de la banda de emisión de la PM y PA unidas a N-AcCis no cambia con la polaridad del solvente (Encinas, M.V. datos no publicados). Sin embargo el decaimiento de la fluorescencia de este tipo de derivados es muy sensible a la composición del microentorno (Encinas y Lissi, 1985b; Encinas y Lissi, 1986; Encinas y col., 1989), permitiendo detectar heterogeneidad en el entorno de estas sondas unidas a proteínas.

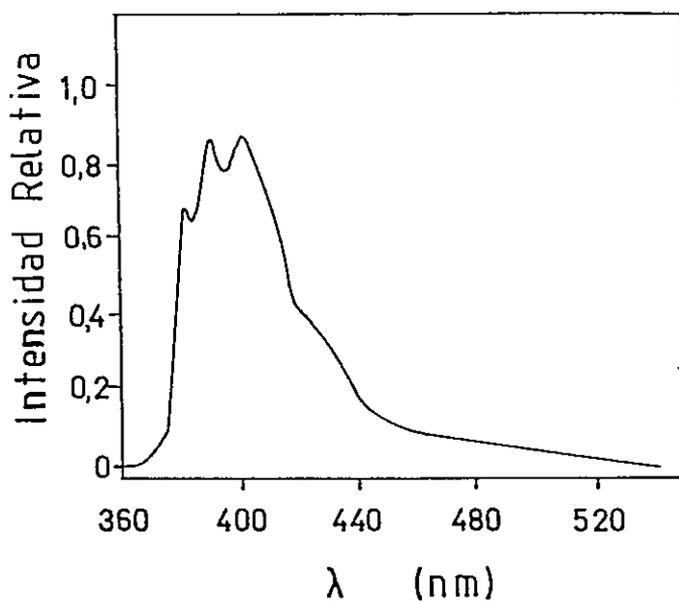
### **III.2.3 Tiempo de decaimiento de la fluorescencia del AEDANS unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.**

Otro parámetro de importancia es el tiempo de decaimiento de la fluorescencia, que puede dar información acerca de la dinámica de la proteína en la escala de tiempo de los nanosegundos. Mediante su determinación, pueden detectarse movimientos del fluoróforo, así como heterogeneidad en su entorno. Además, es necesario conocer el valor del tiempo de decaimiento de la fluorescencia, para calcular las constantes de apagamiento que aparecen en la sección III.2.5.

Usando el método de desplazamiento de fase y desmodulación de la fluorescencia, se determinó el tiempo de decaimiento para el AEDANS unido a la PEPCK. Los datos



**Figura 12.** Espectro de emisión de la PEPCK modificada con pirenil maleimida. La solución contiene TEA-HCl 50 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v.  $\lambda_{exc}=343$  nm. En el recuadro, el espectro de emisión de la N-AcCis-PM.  $\lambda_{exc}=343$  nm.



**Figura 13.** Espectro de emisión de la PEPCK modificada con pirenil yodoacetamida. Estequiometría de marcación, 1,1.  $\lambda_{exc}=344$  nm. La solución contiene TEA-HCl 50 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v.

de fase y modulación a varias frecuencias fueron ajustados a distintos tipos de decaimiento. Se logró un buen ajuste usando un modelo de un componente, que dió un valor de 19 ns para el tiempo de decaimiento de la fluorescencia (figura 14). El valor de  $\chi^2$  no mejoró al introducir dos componentes al modelo.

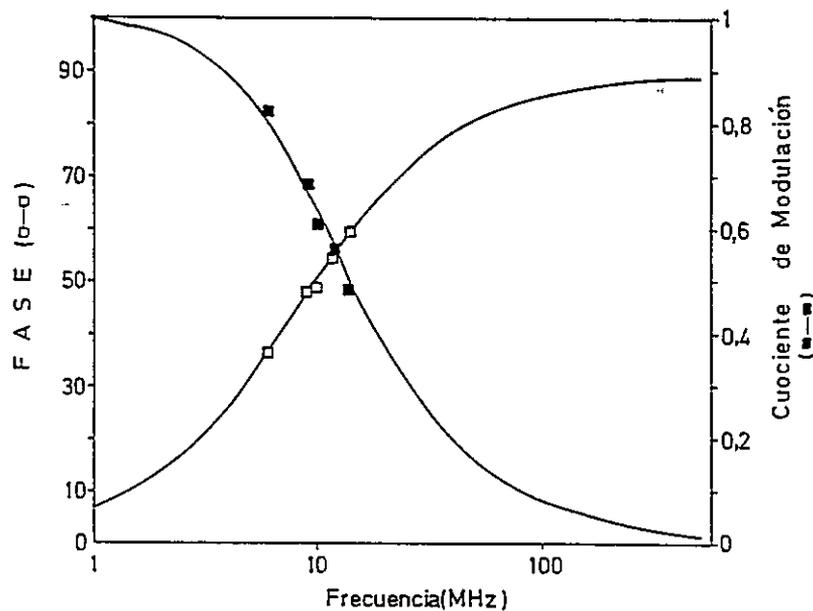
La fluorescencia del AEDANS en el modelo N-AcCis-AEDANS en distintos solventes, también presenta un decaimiento monoexponencial. El tiempo de decaimiento de este compuesto varía moderadamente con la polaridad del solvente y presenta un valor de 10,5 ns en H<sub>2</sub>O y de 18,8 ns en etanol (Encinas y col., 1990). Este último valor es similar al que presenta el AEDANS en la carboxiquinasa de rata.

#### **III.2.4. Tiempos de decaimiento de la fluorescencia de la pirenil maleimida unida a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.**

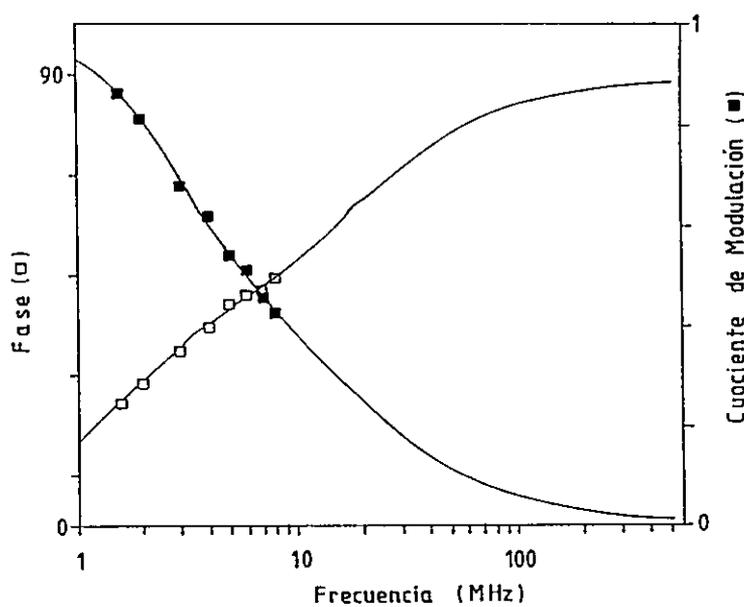
En la figura 15 aparecen los datos de fase y modulación de la fluorescencia de la pirenil maleimida unida a la PEPCK, determinados a distintas frecuencias de modulación entre 2 y 8 MHz.

Los valores de  $\chi^2$  obtenidos al ajustar los datos a cinéticas mono, bi y triexponenciales, indican que el decaimiento está caracterizado por dos componentes. Uno de ellos presenta un  $\tau$  de 65,6 ns y da cuenta de un 70% de la intensidad de la fluorescencia. El segundo componente muestra un  $\tau$  de 11,75 ns y una intensidad fraccional de 0,3. Esta heterogeneidad en el decaimiento de la fluorescencia, pone en evidencia distintos microentornos percibidos por el pireno en la proteína.

La fluorescencia del compuesto modelo N-AcCis-PM en distintos solventes presenta un decaimiento monoexponencial, de modo que la heterogeneidad del decaimiento del pireno en la carboxiquinasa es una propiedad intrínseca de la sonda unida a la proteína. Esta podría ser causada por diferencias en la población de enzima con respecto a la accesibilidad del solvente a la sonda o bien a la cercanía de ésta a residuos apagadores del pireno excitado.



**Figura 14.** Datos de fase y modulación a distintas frecuencias de modulación, para la fluorescencia del AEDANS en la PEPCK. Las líneas representan el mejor ajuste, que dió  $\tau=19$  ns con un valor de  $\chi^2$  de 7,1.



**Figura 15.** Datos de fase y modulación de la fluorescencia de la pirenil maleimida en la PEPCK, a distintas frecuencias de modulación. Las líneas representan el mejor ajuste de los datos, que se obtuvo suponiendo un decaimiento biexponencial.  $\chi^2=5,3$ .

Se determinaron los valores de tiempo de decaimiento de la PM unida a la N-AcCis en mezclas etanol/agua, (Tabla III). En todos los casos el decaimiento fue monoexponencial y fuertemente dependiente de la polaridad del medio. Es así como el tiempo de decaimiento aumentó 14 veces al pasar de agua a etanol.

**TABLA III. TIEMPOS DE DECAIMIENTO DE LA FLUORESCENCIA DE LA PIRENIL MALEIMIDA UNIDA A N-ACETIL CISTEINA EN DISTINTOS SOLVENTES**

Solvente	$\tau$ (ns)
H <sub>2</sub> O	5,5
*EtOH/H <sub>2</sub> O 15%	10
30%	18,2
50%	31,5
75%	54
EtOH	81,5
CH <sub>3</sub> CN	171

\* Porcentaje de etanol (v/v).

### III.2.5 Estudios de apagamiento de la fluorescencia.

La exposición al solvente de las distintas sondas unidas a la carboxiquinasa, fue analizada mediante estudios de apagamiento de la fluorescencia por acrilamida y yoduro.

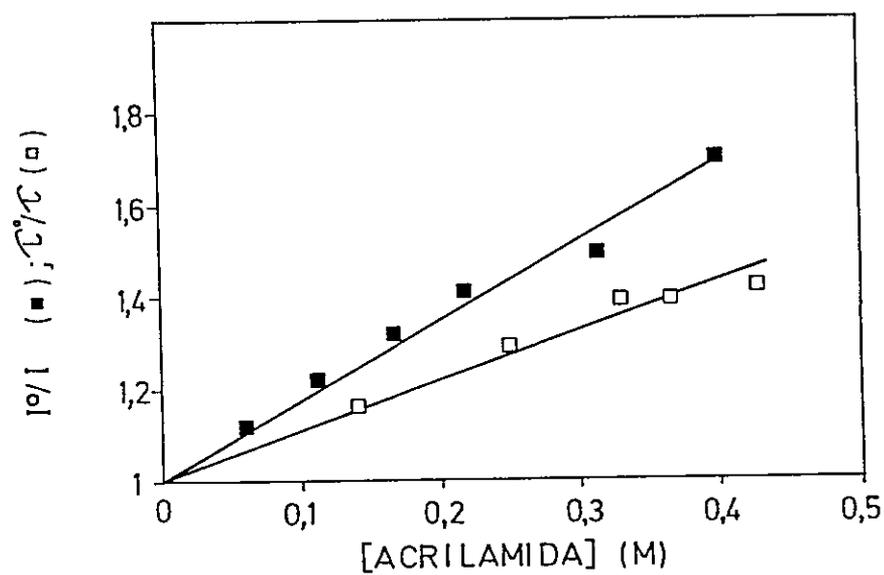
#### Efecto de la acrilamida sobre la fluorescencia del AEDANS unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.

Se determinó el efecto de la acrilamida, molécula apagadora neutra, sobre la intensidad de la fluorescencia del AEDANS y sobre el tiempo de decaimiento de la fluorescencia de esta sonda. Los datos, graficados según la ecuación de Stern-Volmer aparecen en la figura 16. El decaimiento dio un gráfico de Stern-Volmer lineal con una constante,  $K_{sv}$ , de  $1,07 \text{ M}^{-1}$  y una constante de apagamiento dinámico  $kq=5,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Las intensidades de la fluorescencia graficadas según la misma relación, presentan una mayor pendiente, poniendo en evidencia una contribución de apagamiento estático que se podría explicar por adsorción de la acrilamida a la proteína.

El mecanismo de desactivación de la fluorescencia del AEDANS por acrilamida involucra la formación de un complejo de transferencia de carga (Eftink y col., 1987; Encinas y Lissi, 1985a) por lo cual la eficiencia de este proceso dependerá de la polaridad del medio en el que ocurre la desactivación.

El efecto de polaridad fue evaluado analizando los valores de las constantes de apagamiento para el modelo N-AcCis-AEDANS en distintos solventes (Encinas y col., 1990).

En  $\text{H}_2\text{O}$ , la fluorescencia de la N-AcCis-AEDANS es apagada difusionalmente por la acrilamida ( $kq=1,08 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), y este valor disminuye a  $7,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y a  $3,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  cuando el compuesto modelo se encuentra disuelto en etanol y dimetilformamida respectivamente (Encinas y col., 1990).



**Figura 16.** Apagamiento por acrilamida de la fluorescencia del AEDANS unido a la PEPCK. Los gráficos de Stern-Volmer corresponden a la intensidad de la fluorescencia (■) y a los tiempos de decaimiento ( $\tau$ ).  $\lambda_{exc} = 340$  nm;  $\lambda_{em} = 470$  nm,  $T = 20^\circ\text{C}$ .

La adición de los sustratos: fosfoenolpiruvato, oxaloacetato,  $\text{HCO}_3^{-1}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  a la solución de enzima modificada con AEDANS, no alteró el valor de la constante de apagamiento dinámico por acrilamida.

### **Apagamiento por acrilamida de la fluorescencia del pireno unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.**

La adición de acrilamida hasta una concentración de 0,4 M, no afectó la intensidad de la fluorescencia ni los tiempos de decaimiento de la pirenil maleimida unida a la enzima (Tabla IV).

Por otra parte, se determinó la eficiencia de la acrilamida como apagador de la fluorescencia de la pirenil maleimida unida a la N-AcCis. La constante de velocidad de este proceso varía considerablemente con la composición del solvente y disminuye por lo menos en dos órdenes de magnitud al pasar de  $\text{H}_2\text{O}$  a etanol 60% v/v (Tabla V). Esto se debe a que en el mecanismo de la desactivación participa un complejo de transferencia de carga (Encinas y col., 1983), cuya formación se ve favorecida al aumentar la polaridad del medio.

Por otra parte, los datos presentados en la sección III.1 inducen a pensar que PM modifica un residuo del sitio del nucleótido en la PEPCK, sitio que presenta una polaridad considerablemente menor que la del  $\text{H}_2\text{O}$  (sección III.2.1; Lewis y col., 1989a). Ya que el apagamiento por acrilamida de la N-AcCis-PM es muy dependiente de la polaridad, resulta difícil separar el efecto de accesibilidad del efecto de polaridad en el resultado obtenido para la enzima modificada con pirenil maleimida.

**TABLA IV. EFECTO DE LA ACRILAMIDA Y DEL YODURO SOBRE LOS TIEMPOS DE DECAIMIENTO DE LA FLUORESCENCIA DE LA PIRENIL MALEIMIDA UNIDA A LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA**

Aditivo	$\tau_1$ (ns)	$f_1$	$\tau_2$ (ns)	$f_2$	$\chi^2$
1) * -----	65,6	0,7	11,8	0,3	5,3
acrilamida					
0,097 M	68,7	0,7	10,2	0,3	6,1
0,4 M	66,6	0,7	9,5	0,3	5,4
2) * -----	74,5	0,7	12,8	0,3	5,9
NaI					
0,19 M	47,2	0,7	7,5	0,3	10,0
0,35 M	48	0,7	7,0	0,3	2,8
0,8 M	49,5	0,6	7,1	0,4	9,2

f = fracción de la emisión fluorescente.

\* 1) y 2) corresponden a dos experimentos diferentes.

**TABLA V. CONSTANTES DE APAGAMIENTO POR ACRILAMIDA Y YODURO DE LA FLUORESCENCIA DE LA PIRENIL MALEIMIDA UNIDA A N-ACETIL CISTEINA EN DISTINTOS SOLVENTES**

Solvente	Apagador	$kq \times 10^{-5}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
H <sub>2</sub> O	Acrilamida	3,6
	NaI	41
* EtOH/H <sub>2</sub> O	10% Acrilamida	1,2
	20% Acrilamida	0,55
	40% Acrilamida	0,12
	60% Acrilamida	<0,03

\* Porcentaje de etanol (v/v).

### **Apagamiento por NaI de la fluorescencia del pireno unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.**

El NaI disminuyó la intensidad de la fluorescencia de la PM unida a la enzima, dando un gráfico de Stern-Volmer no lineal (figura 17). Este tipo de gráfico es característico de sistemas que presentan dos tiempos de decaimiento, que son desactivados con distinta eficiencia por el apagador (Leavis y col., 1984). Sin embargo, en este caso esta explicación no es válida, puesto que las determinaciones del efecto de yoduro sobre el decaimiento, muestran que los dos  $\tau$  disminuyen en la misma proporción (Tabla IV). En presencia de NaCl, la intensidad de la fluorescencia de la PM unida a la PEPCK prácticamente no cambió (figura 17), demostrando que el efecto de yoduro no es un efecto inespecífico de la fuerza iónica.

Datos adicionales obtenidos con el aducto PEPCK-AEDANS, pusieron en evidencia que la adición de NaI altera la conformación de la enzima. Este aditivo desplaza en 10 nm hacia el rojo el máximo de emisión del AEDANS unido a la carboxiquinasa (figura 18).

### **III.2.6 Estudios de anisotropía de la fluorescencia del AEDANS unido a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica. Determinación del tiempo de correlación rotacional.**

Se determinó la anisotropía de estado estacionario ( $r$ ) del AEDANS unido a la PEPCK, a distintas temperaturas entre 4 y 29°C. Los valores de  $1/r$  en función de  $T/\eta$  se ajustan a una recta que da un valor de anisotropía límite ( $r_0$ ) de 0,34 por extrapolación (figura 19). El valor de  $r_0$  determinado en glicerol 70% v/v y a 15°C, fue de 0,30. Para el AEDANS en propanodiol a -55°C, se ha descrito un valor de  $r_0$  de 0,34 (Hudson y Weber, 1973).

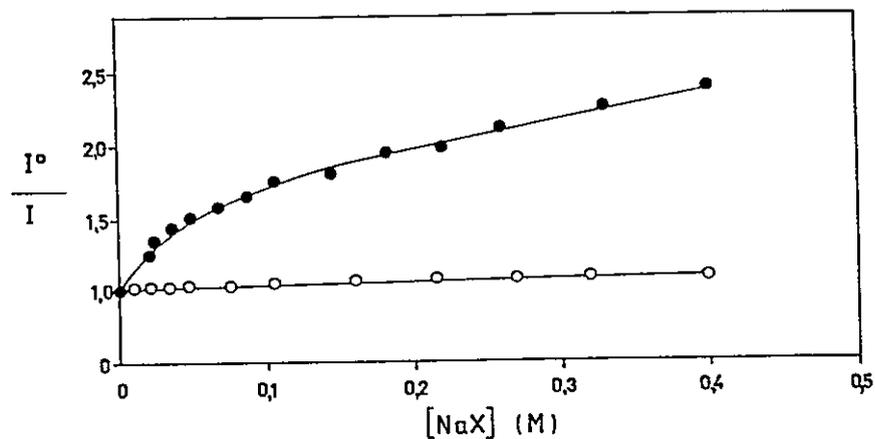


Figura 17. Gráfico de Stern-Volmer para el apagamiento por NaI, de la fluorescencia de la pirenil maleimida unida a la PEPCK (●). En la figura también aparece el efecto de NaCl (○).  $\lambda_{exc} = 343 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$ .

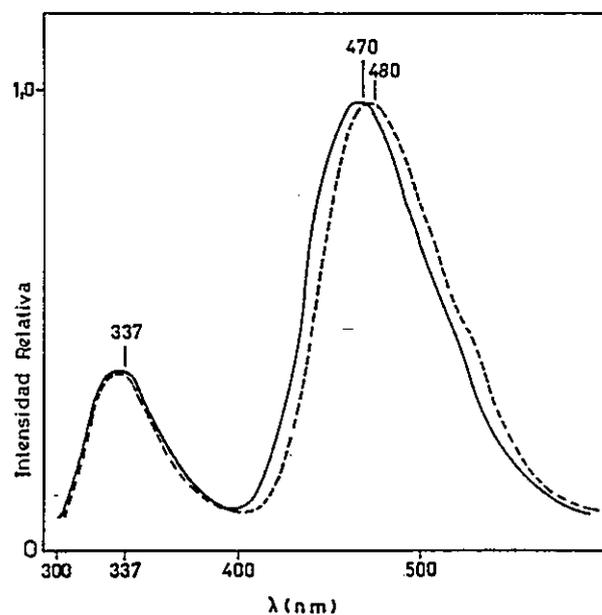
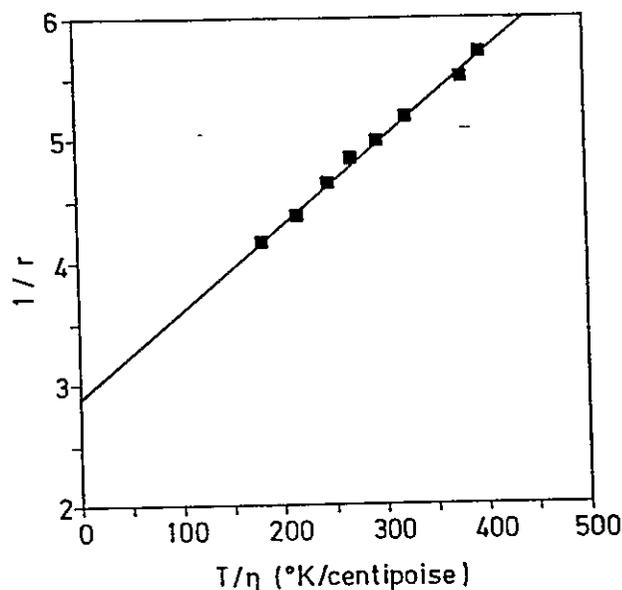


Figura 18. Espectros de emisión fluorescente de la PEPCK modificada con AEDANS.  $\lambda_{exc} = 295 \text{ nm}$ . Los espectros se obtuvieron en ausencia (—) y en presencia (---) de NaI 0,36 M.



**Figura 19.** Gráfico de Perrin de los datos de anisotropía de la fluorescencia del AEDANS unido a la PEPCK. Los datos se obtuvieron variando la temperatura en TEA-HCl 50 mM pH 7,3.  $\lambda_{exc} = 380$  nm. Se detectó la luz emitida a través de un filtro de  $\lambda > 450$  nm.

Se obtuvo un tiempo de correlación rotacional ( $\theta$ ) de 26 ns a 20°C, a partir de la ecuación de Perrin y tomando el valor de  $\tau$  que había sido determinado experimentalmente para la PEPCK-AEDANS (sección III.2.3). El tiempo de correlación rotacional calculado para una proteína esférica hidratada de masa molecular 69.289 (Beale y col., 1985), fue también de 26 ns (sección II.9), lo que demuestra que el movimiento de la proteína es el que determina esencialmente el tiempo de correlación experimental. El movimiento de la sonda en el interior de la carboxiquinasa no contribuye significativamente al tiempo de correlación observado.

### III.3 CARACTERISTICAS DE FLUORESCENCIA DE LOS TRIPTOFANOS DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE RATA

#### III.3.1 Espectro de emisión .

El espectro de emisión fluorescente de la población de triptofanos de la PEPCK de rata ( $\lambda_{exc}=295$  nm), presenta un máximo a 335 nm y un ancho medio de banda de 50 nm (figura 20, curva 0). Estos parámetros son característicos de triptofanos expuestos parcialmente al solvente (Burstein y col., 1973). En la carboxiquinasa desnaturada con urea 4,7 M, los triptofanos presentan un máximo de emisión a 350 nm, valor que corresponde a la emisión del triptofano en agua (Burstein y col., 1973).

Se puede considerar que la fluorescencia observada en estas condiciones ( $\lambda_{exc}=295$  nm) proviene sólo de los residuos de triptofano sin una contribución significativa de las tirosinas, puesto que el espectro de emisión no presenta un hombro en la zona de 308-310 nm, característico de la emisión de estos residuos.

#### III.3.2 Decaimiento de fluorescencia de la población de triptofanos.

La PEPCK de rata contiene 16 residuos de triptofano (Beale y col., 1985), por lo que se espera una considerable heterogeneidad en los tiempos de decaimiento de fluorescencia de estos residuos. Además, la fotoquímica del indol mismo es compleja y se han descrito numerosos casos de proteínas que contienen sólo un residuo de triptofano y que presentan cinéticas de decaimiento multiexponenciales (Grinvald y Steinberg, 1976; Beechem y Brand, 1985).

Los datos de fase y modulación de la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK de rata, fueron ajustados a un decaimiento biexponencial. Uno de los componentes del decaimiento presenta un  $\tau$  de 3,0 ns y da cuenta de un 84% de la intensidad de la fluorescencia en tanto que el segundo componente muestra un  $\tau$  de 0,3 ns y una

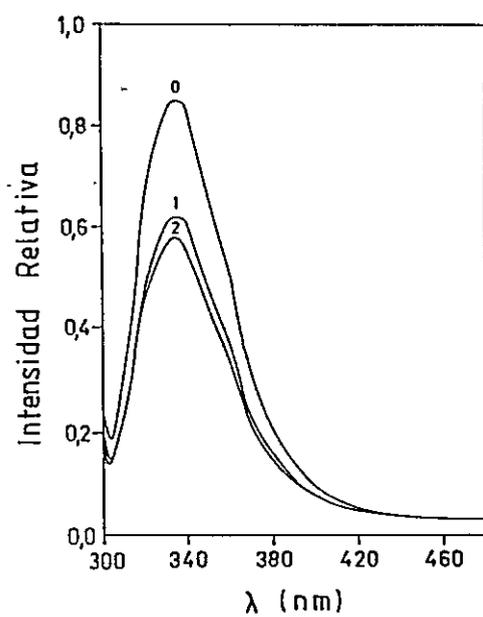
intensidad fraccional de 0,16. No se hicieron ajustes a modelos con mayor número de componentes o a distribuciones continuas de tiempos de decaimiento (Alcála y col., 1987a,b), debido a las limitaciones instrumentales relacionadas con la baja intensidad de la emisión.

### III.3.3 Efecto de los sustratos sobre la intensidad de la emisión de los triptofanos.

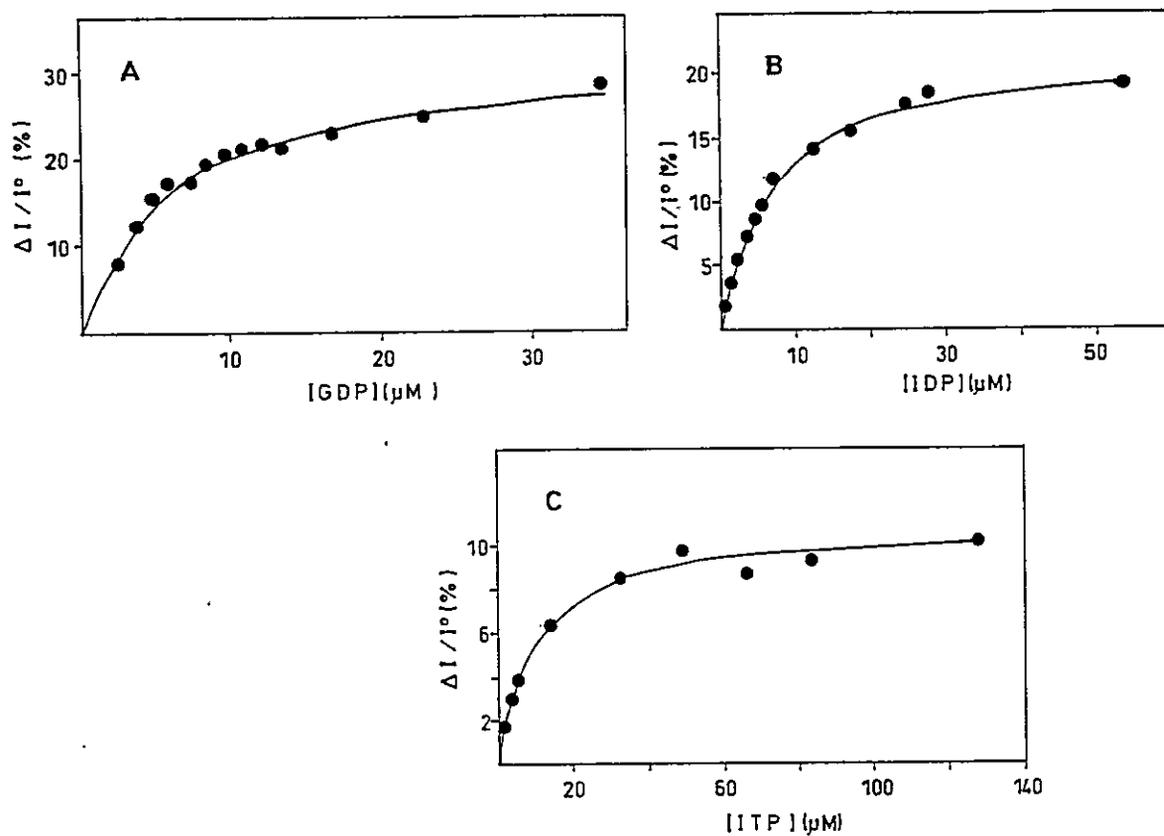
La adición de GDP a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de rata produce una progresiva disminución de la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos, sin alteración significativa en la posición del máximo de emisión de estos residuos (figura 20).

La intensidad de la fluorescencia en función de la concentración de GDP (figura 21) muestra un comportamiento de saturación, que es el esperado si el apagamiento de la fluorescencia refleja indirectamente la unión del nucleótido a la enzima (sección II.9). Los nucleótidos de inosina también apagan la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK de rata. Los datos experimentales que se muestran en la figura 21, fueron corregidos por el efecto de filtro interno (Lehrer y Leavis, 1978a), que en todos los casos fue menor de un 10%. Además, se descartó que este efecto fuera el responsable de la disminución de la intensidad de la fluorescencia por la adición de los nucleótidos, puesto que no se observó cambio en la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK de levadura al agregar GDP. El GDP tampoco afectó la fluorescencia de una solución de triptofano.

Los cambios en la fluorescencia producidos por la unión de ligandos a proteínas, han sido frecuentemente usados para determinar las correspondientes constantes de disociación (Berger y Evans, 1991; Pearce y Hawrot, 1990). Usando este método se obtuvieron las constantes de disociación de los nucleótidos desde la PEPCK de rata (Tabla VI). En la figura 21 aparecen las curvas de saturación de GDP, IDP e ITP expresadas como porcentaje del cambio de la intensidad de la fluorescencia a distintas concentraciones del nucleótido. El máximo efecto apagador fue de 30% con GDP, 12%



**Figura 20.** Espectro de emisión de los triptofanos de la PEPCK ( $2,6 \mu\text{M}$ ), en TEA-HCl  $50 \text{ mM}$ , pH  $7,3$ , EDTA  $0,5 \text{ mM}$ , glicerol  $10\% \text{ v/v}$  (0).  $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ .  $T = 20^\circ\text{C}$ . También se muestra el efecto de la adición de GDP  $6 \mu\text{M}$  (1) y GDP  $12 \mu\text{M}$  (2).



**Figura 21.** Cambio de la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK ( $3 \mu\text{M}$ ), en función de la concentración de GDP (A); IDP (B) e ITP (C). El cambio en la intensidad de la fluorescencia está expresado como porcentaje. Los símbolos corresponden a los puntos experimentales y las líneas al ajuste de la ecuación de una hipérbola.  $\lambda_{\text{exc}}=295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}}=335 \text{ nm}$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ .

**TABLA VI. CONSTANTES DE DISOCIACION DE LOS NUCLEOTIDOS DE GUANINA E INOSINA PARA LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA**

<b>Nucleótido</b>	<b>Kd (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
GDP	$6,0 \pm 0,5$
IDP	$6,7 \pm 0,4$
ITP	$10,1 \pm 1,7$

con ITP y 18% con IDP. Las líneas corresponden al ajuste de los datos experimentales a una función hiperbólica (Perrella, 1988), que permitió obtener los valores de constante de disociación del nucleótido desde la enzima (sección II.9).

La adición de los otros sustratos de la reacción (fosfoenolpiruvato, oxaloacetato,  $\text{HCO}_3^-$  o  $\text{Mn}^{2+}$ ), no afectó significativamente la intensidad ni la posición del máximo de la emisión fluorescente de los triptofanos.

### III.3.4 Efecto de la acrilamida sobre la fluorescencia de los residuos de triptofano de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica libre y saturada con los sustratos.

La acrilamida resultó ser un efectivo apagador de la fluorescencia de los residuos de triptofano de la PEPCK de rata. La figura 22 muestra los datos de intensidad de la fluorescencia a distintas concentraciones de acrilamida, graficados según la ecuación de Stern-Volmer. Los datos obtenidos con la enzima saturada con IDP y GDP también aparecen en la misma figura.

Los gráficos son lineales en todo el rango de concentración utilizado, y presentan una constante de Stern-Volmer de  $2,5 \text{ M}^{-1}$  para la enzima libre y de  $2,1$  y  $1,9 \text{ M}^{-1}$  para la enzima saturada con IDP y GDP, respectivamente.

Para proteínas que contienen múltiples triptofanos se espera heterogeneidad en la accesibilidad de estos residuos a la acrilamida. Esto, junto con el movimiento localizado de los triptofanos durante el tiempo de vida del estado excitado, hace esperar gráficos de Stern-Volmer no lineales. Sin embargo, los gráficos son lineales, lo que significa que la población de residuos de triptofano que emite, presenta una accesibilidad similar frente a este apagador.

Las constantes de Stern-Volmer permitieron apreciar la accesibilidad promedio de la población de triptofanos. Tomando un valor de  $\tau$  promedio, ( $2,6 \text{ ns}$ ), calculado a partir del ajuste biexponencial del decaimiento de la fluorescencia, se obtuvo una constante bimolecular de apagamiento colisional ( $k_q$ ) de  $0,96 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para la enzima libre. Este valor es considerablemente menor que el descrito para el apagamiento del triptofano totalmente expuesto de la adrenocorticotropina (ACTH),  $k_q = 4,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y está en el rango informado para proteínas que presentan una accesibilidad moderada de los residuos de triptofano a la acrilamida (Eftink y Ghiron, 1976a).

Los otros sustratos de la PEPCK ( $\text{HCO}_3^-$ , fosfoenolpiruvato,  $\text{Mn}^{2+}$  y oxaloacetato) no alteraron la constante de apagamiento por acrilamida. En la enzima libre o saturada con los sustratos, el máximo de la emisión fluorescente de los triptofanos no cambió por efecto de la acrilamida.

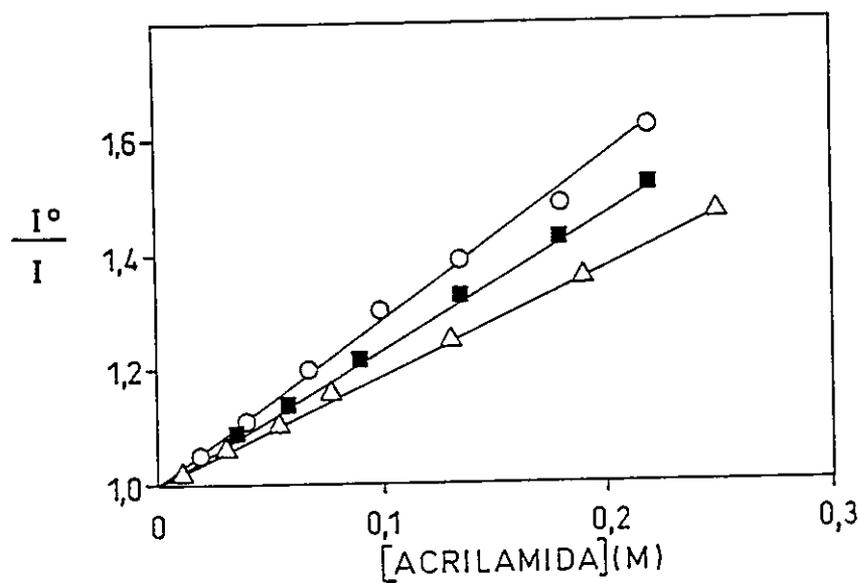


Figura 22. Gráficos de Stern-Volmer para el apagamiento de la fluorescencia de los triptofanos por acrilamida. Las curvas corresponden a la PEPCK libre (O), saturada con IDP (■) y con GDP (Δ). [PEPCK] = 2,3  $\mu$ M; [IDP] = 170  $\mu$ M; [GDP] = 140  $\mu$ M.  $\lambda_{exc}$  = 295 nm;  $\lambda_{em}$  = 335 nm. T = 20°C.

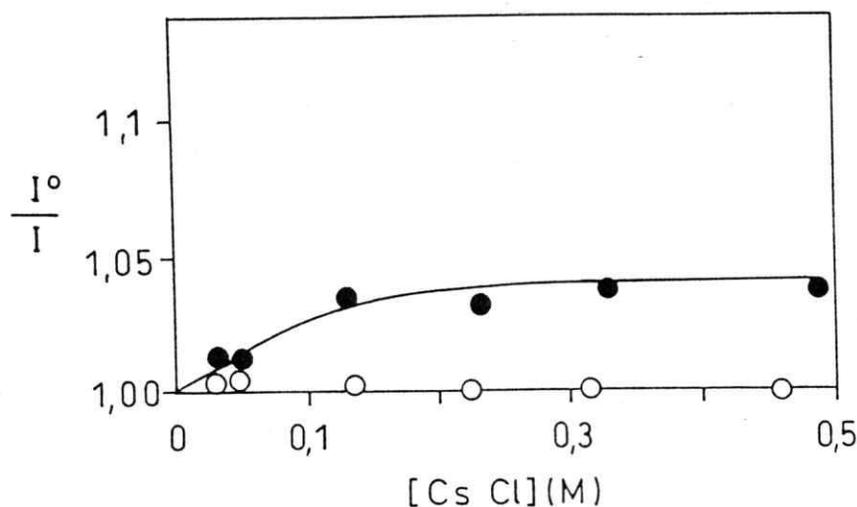
### III.3.5 Efecto de los apagadores iónicos NaI y CsCl sobre la fluorescencia de los residuos de triptofano.

La acrilamida es un apagador poco selectivo que puede penetrar al interior de las proteínas y apagar residuos internos aunque con distinta eficiencia que los exteriores (Eftink y Ghiron, 1976a; Eftink y Ghiron, 1981). En cambio, el NaI y el CsCl, son apagadores colisionales que permiten diferenciar selectivamente los triptofanos expuestos, puesto que son especies altamente hidratadas que no penetran fácilmente al interior de las proteínas (Lehrer, 1971; Burstein y col., 1973).

Estos dos apagadores iónicos disminuyeron parcialmente la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK de rata. Los datos de intensidad de la fluorescencia a distintas concentraciones de NaI desde 0,02 a 0,3 M, aparecen en la figura 23, graficados según la ecuación de Stern-Volmer. En la misma figura se muestra que el NaCl prácticamente no tiene efecto sobre la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos. Además, se observa que los resultados obtenidos manteniendo la fuerza iónica constante para la enzima libre y unida a GDP (figura 23A), son muy parecidos a los datos medidos sin agregar NaCl (figura 23B).

La curva que corresponde a la enzima libre se desvía hacia abajo, comportamiento característico de una población heterogénea de fluoróforos. Sólo una pequeña proporción de la población es accesible al yoduro ya que la intensidad de la fluorescencia disminuye en un 13% en presencia de NaI 0,1 M y sólo disminuye un 3% adicional al aumentar la concentración de yoduro a 0,25 M. El CsCl 0,3 M, apagó sólo en un 3,8% la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK de rata (figura 24).

Los experimentos de apagamiento con NaI y CsCl (figuras 23 y 24), demuestran que estos iones son considerablemente menos efectivos como apagadores en la enzima saturada con los nucleótidos que en la enzima libre. En presencia de GDP, la fluorescencia bajó sólo en un 2,2% por la adición de NaI 0,28 M. La misma concentración de yoduro, en presencia de ITP, bajó la fluorescencia en un 4,8% y prácticamente no la cambió en presencia de IDP.



**Figura 24.** Efecto del CsCl sobre la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK. Los gráficos de Stern-Volmer corresponden a la enzima libre (●) y en presencia de GDP 190  $\mu$ M (○).  $\lambda_{exc}$ =295 nm;  $\lambda_{em}$ =335 nm. T=20°C.

El GDPMn suprimió el efecto desactivador del ion  $Cs^+$  (figura 24). En este caso no se estudió el efecto de los otros nucleótidos dada la baja eficiencia del proceso de desactivación.

Los resultados anteriores, junto con la disminución de la intensidad de la fluorescencia intrínseca de la PEPCK observada al unirse los sustratos nucleotídicos (sección III.3.3), hacen pensar que estos ligandos podrían inducir una alteración conformacional en la enzima. Sin embargo esta no es la única interpretación posible, puesto que los nucleótidos podrían apagar la fluorescencia de los mismos residuos que son desactivados por yoduro, sin mediar un cambio conformacional en la proteína.

La adición de los otros sustratos, fosfoenolpiruvato,  $Mn^{2+}$  o  $HCO_3^-$  no afectó el apagamiento por NaI de la carboxiquinasa.

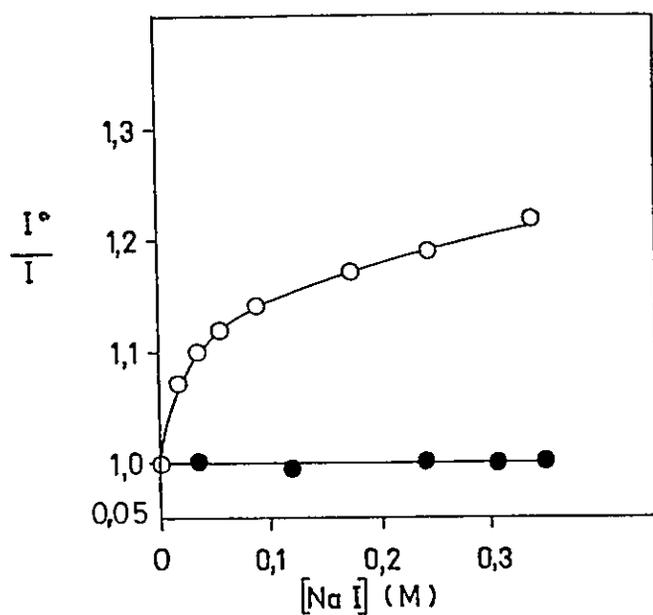
### **III.3.6 Propiedades fluorescentes de los residuos de triptofano en la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica modificada con AEDANS.**

Los triptofanos de la enzima modificada con AEDANS presentan el mismo espectro de fluorescencia que la enzima nativa.

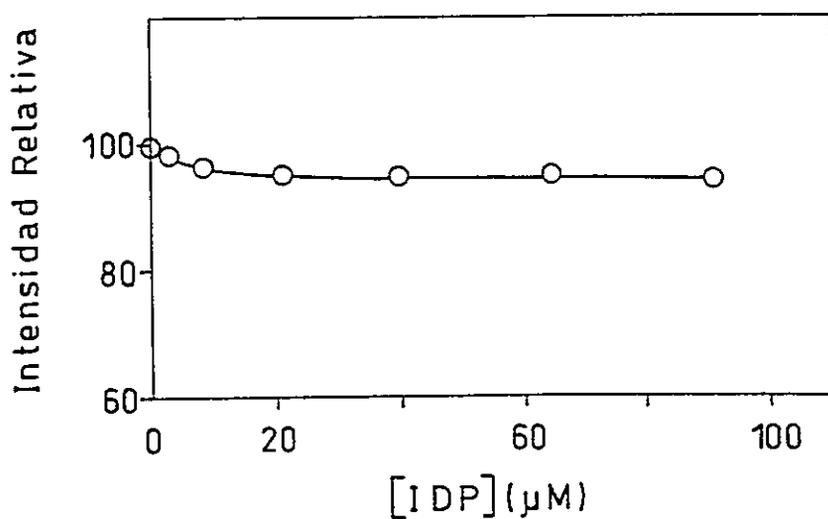
La adición de yoduro hasta una concentración de 0,31 M prácticamente no afectó la intensidad de la emisión de los triptofanos en este aducto (figura 25). Este comportamiento es comparable al que presentan los triptofanos en la carboxiquinasa saturada con los nucleótidos.

En la figura 26 aparece el efecto del IDP sobre la fluorescencia de los triptofanos en la PEPCK-AEDANS. La intensidad de la fluorescencia disminuye en presencia de concentraciones crecientes de IDP, pero en menor grado que en la enzima nativa. Este cambio, aunque pequeño en magnitud, indica que el nucleótido se puede unir a la PEPCK-AEDANS. Es posible que el AEDANS ocupe sólo una porción del sitio del nucleótido y que éste pueda unirse en una posición distorsionada. En la PEPCK mitocondrial de pollo se ha descrito un efecto similar. La enzima modificada con piridoxal fosfato en el sitio de los sustratos fosforilados, puede unirse al PEP, IDP o GTP, aunque en forma alterada con respecto a la enzima nativa (Guidinger y Nowak, 1991).

No fue posible determinar la constante de disociación del IDP a partir de estos datos, dada la pequeña magnitud del cambio observado.



**Figura 25.** Efecto del NaI sobre la fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK modificada con AEDANS (●).  $\lambda_{exc}=295$  nm;  $\lambda_{em}=335$  nm. También se muestra la curva correspondiente a la enzima nativa (○).



**Figura 26.** Efecto de IDP sobre la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos en la PEPCK modificada con AEDANS.  $\lambda_{exc}=295$  nm;  $\lambda_{em}=335$  nm.

### III.4 MODIFICACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA CON UN EXCESO MOLAR DE PIRENIL YODOACETAMIDA

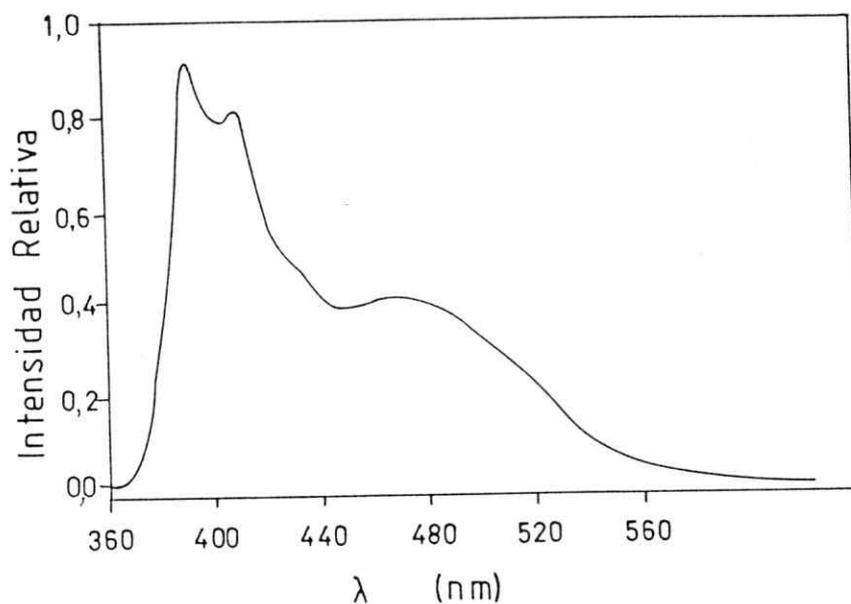
#### III.4.1 Formación del excímero de pireno. Estequiometría de marcación.

Los experimentos de modificación de la PEPCK con PIA demostraron que concentraciones estequiométricas de este marcador fluorescente inactivan la PEPCK, junto con incorporarse 1 mol de pireno por mol de enzima inactiva (sección III.1). El espectro de emisión de la enzima modificada ( $\lambda_{exc} = 344$  nm), corresponde al espectro del monómero de pirenil acetamida con una pequeña contribución de emisión a 470 nm (figura 13).

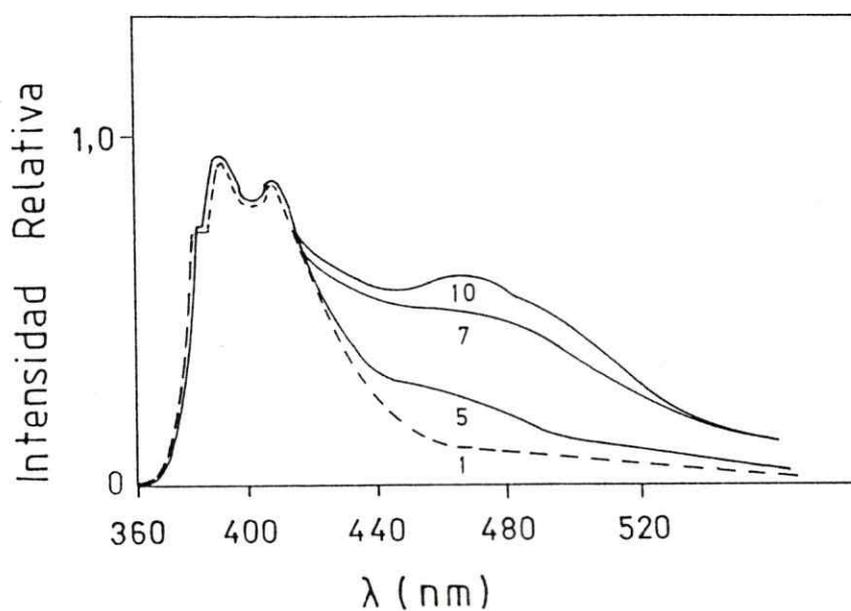
Cuando se hizo reaccionar la carboxiquinasa con un exceso molar de 5 veces de PIA a 20°C, se obtuvo un aducto que contiene  $2,17 \pm 0,12$  moles de pirenil acetamida por mol de enzima y que presenta el espectro de emisión que aparece en la figura 27. Además de las bandas de emisión del monómero de pirenil acetamida, aparece una banda ancha sin estructura vibracional, centrada a 470 nm, que corresponde a un excímero formado por un residuo de pireno en el estado excitado y otro en el estado fundamental (Soutar y col., 1974; Graceffa y Lehrer, 1980; Burtnik y col., 1988). La cinética de formación del excímero puede seguirse en la mezcla de reacción (figura 28). Para que se forme este complejo, los dos anillos de pireno tienen que estar orientados cara a cara, a una distancia de 7-9 Å (Martinho y Winnik, 1987).

Para determinar la selectividad de la reacción de formación del excímero, se hizo reaccionar la enzima en presencia de GDPMn 100 µM, bajo las condiciones descritas en esta sección.

Después de detener la reacción y eliminar el exceso de derivado de pireno libre, se determinó que habían 0,14 moles de PA unidos covalentemente por mol de enzima. Este resultado permite suponer que los dos moles de PA se incorporan en el sitio del GDP.



**Figura 27.** Espectro de emisión del pireno en el aducto PEPCK:PA=1:2,2.  $\lambda_{exc}=344$  nm. La solución contiene TEA-HCl 50 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v.



**Figura 28.** Espectros de emisión del pireno ( $\lambda_{exc}=344$  nm) en la mezcla de reacción que contiene PEPCK (3  $\mu$ M) y PIA (15  $\mu$ M) en TEA-HCl 50 mM, pH 7,3, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v. Los espectros se registraron después de transcurridos 1, 5, 7 y 10 minutos de reacción a 20°C.

### III.4.2. Separación y purificación de los péptidos trípticos generados desde la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica modificada con dos moles de pirenil acetamida.

El perfil de elución en una columna C18 de fase reversa, de los péptidos obtenidos por digestión con tripsina del aducto PEPCK:PA=1:2,2 aparece en la figura 29. Sólo hay 2 péptidos principales que absorben a 344 nm y son fluorescentes, es decir que están modificados con pirenil acetamida. En el cromatograma aparecen denominados como péptidos I y II respectivamente. El tiempo de retención del péptido I corresponde al del péptido tríptico que contiene el pireno en el aducto PEPCK:PA=1:1,1.

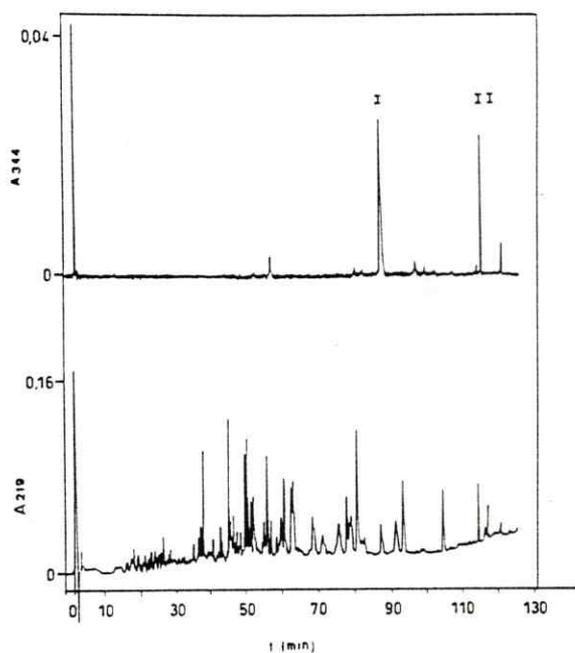
Los péptidos I y II que aparecen en la figura 29, contienen por lo tanto los residuos entre los que se forma el excímero en el aducto PEPCK:PA=1:2,2. La selectividad de la reacción demuestra que prácticamente no hay otros residuos que compitan con el residuo del péptido II en la reacción con PIA.

Este resultado es de gran relevancia puesto que abre la posibilidad de identificar en la secuencia primaria la posición de dos residuos que se encuentran próximos en la estructura tridimensional de la enzima.

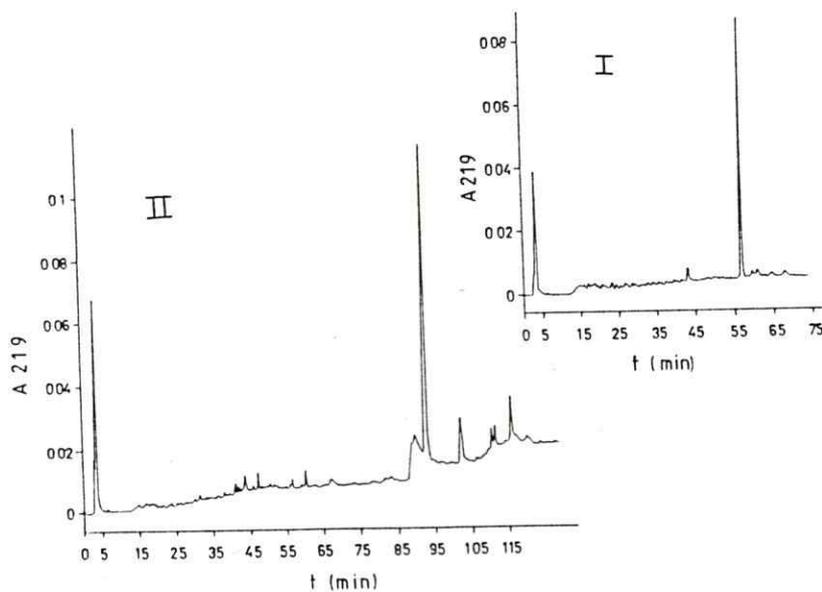
Con el objeto de obtener los péptidos I y II en un grado de pureza apropiado para determinar su secuencia de aminoácidos, se cromatografiaron aproximadamente 20 nmoles de la mezcla de péptidos trípticos del aducto PEPCK:PA=1:2,2 en la columna C18 de fase reversa. La muestra fue aplicada en inyecciones sucesivas y eluída con un gradiente trifásico de acetonitrilo (sección II.7). Los péptidos se recolectaron en forma separada, obteniéndose 11 nmoles del péptido I y 3 nmoles del péptido II.

Después de concentrar las respectivas soluciones para eliminar el acetonitrilo, las muestras fueron inyectadas en una columna C4 de fase reversa y eluidas bajo las mismas condiciones usadas con la columna C18. Los perfiles de elución de los péptidos I y II desde la columna C4 aparecen en la figura 30.

En ambos casos, el pico principal del perfil de absorbancia a 219 nm contiene toda la fluorescencia. Los péptidos I y II, recogidos de la columna C4 y analizados bajo las mismas condiciones, muestran un único pico simétrico a 219 nm (datos no presentados).



**Figura 29.** Separación de los péptidos trípticos obtenidos desde el aducto PEPCK:PA=1:2,2. Columna 100-RP 18 de fase reversa. Las condiciones de la cromatografía son idénticas a las de las figuras 4-6 y aparecen descritas en la sección II.7.



**Figura 30.** Separación de los péptidos I y II del aducto PEPCK:PA=1:2,2. Columna C4 de fase reversa. Se usó la misma gradiente que con la columna C18.

El rendimiento de la cromatografía en la columna C4 fue de un 75% para el péptido I y de un 38% para el péptido II.

### **III.4.3. Determinación de la secuencia de aminoácidos de los péptidos marcados con pirenil acetamida.**

En la Tabla VII aparece el resultado de cada uno de los ciclos de secuenciación de los péptidos I y II, usando el método de secuenciación descrito en la sección II.8. Para cada ciclo, se identificaron los residuos de aminoácido derivatizados con feniltiohidantoina y además se cuantificó su rendimiento.

No fue posible identificar ningún derivado de feniltiohidantoina en el ciclo número 10 del proceso de secuenciación del péptido I. Para el péptido II, ocurrió lo mismo en relación a los ciclos número 2 y 8.

La secuencia de aminoácidos obtenida para el péptido I se comparó con la secuencia primaria descrita para la PEPCK de rata (Beale y col., 1985), y se pudo determinar que este péptido comprende los residuos que van desde la tirosina 279 a la lisina 290 (figura 31). El residuo que no pudo ser identificado en el 10° ciclo de secuenciación corresponde a la cisteína 288 y se infiere que éste es el residuo modificado por PIA.

Este resultado concuerda con los datos descritos por otros autores que indican que la cisteína 288 de la PEPCK de rata se modifica selectivamente con cumaril maleimida (Lewis y col., 1989a). La cisteína 288 también es el residuo de aminoácido más reactivo frente a PIA, puesto que se modifica en forma específica con concentraciones equimolares de este reactivo (sección III.1).

Se determinó la secuencia de los primeros 20 residuos del péptido II (Tabla VII) y ésta se comparó con la secuencia primaria de la enzima. Considerando la especificidad de la tripsina, se infirió que este péptido contiene los residuos que van desde la fenilalanina 406 a la arginina 436, aún cuando no fue posible obtener la secuencia de los 10 últimos residuos (figura 31).

**TABLA VII. DEGRADACION DE EDMAN DE LOS PEPTIDOS MODIFICADOS CON PIRENIL YODOACETAMIDA**

PEPTIDO I		PEPTIDO II	
Aminoácido	pmoles*	Aminoácido	pmoles*
Y	808	F	79
L	95	X	--
A	829	T	22
A	955	P	7
A	888	A	52
F	617	S	2
P	192	Q	27
S	52	X	--
A	472	P	3
X	--	I	24
G	180	I	38
K	156	D	17
		P	6
		A	11
		W	5
		E	4
		S	1
		P	1
		E	1
		G	3

\* Rendimientos para los derivados de feniltiohidantoína de los aminoácidos.



### **III.5 MODIFICACION CON PIRENIL YODOACETAMIDA DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA OXIDADA CON ACIDO BIS-DITIONITROBENZOICO**

La PEPCCK citosólica de hígado de rata contiene 13 tioles, todos en estado reducido (Carlson y col., 1978). Los estudios publicados acerca de la química de sulfhidrilos en esta enzima, demuestran que hay una cisteína esencial, hiperreactiva en o cerca del sitio del nucleótido (Carlson y col., 1978; Lewis y col., 1989 a). La cisteína crítica se encuentra ubicada próxima a una segunda cisteína, ya que la incubación de la enzima con concentraciones equimolares de DTNB lleva a la formación de un enlace disulfuro intramolecular que incluye este residuo (Carlson y col., 1978). Además, la enzima es inactivada por reactivos de ditioles (Carlson y col., 1978) y por el reactivo de fotoafinidad 8-azido-GTP, que también induce la formación de un puente disulfuro entre dos cisteínas ubicadas en el sitio del nucleótido (Lewis y col., 1989 b). Los residuos de cisteína que forman el disulfuro, podrían también ser los que reaccionan con PIA bajo las condiciones en que se forma el excímero de pireno.

Con el objeto de explorar esta posibilidad, los dos sulfhidrilos más reactivos de la carboxiquinasa fueron bloqueados oxidándolos a un disulfuro con ácido bis-ditionitrobenzoico (Carlson y col., 1978). Posteriormente se hizo reaccionar esta enzima oxidada con pirenil yodoacetamida.

#### **III.5.1 Oxidación con ácido bis-ditionitrobenzoico de los dos residuos de cisteína más reactivos de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica.**

Se hizo reaccionar la PEPCCK con concentraciones estequiométricas de DTNB, a 30° C y pH 7,0 (Carlson y col., 1978). En estas condiciones se liberan 2 moles de tionitrobenzoato por mol de enzima (figura 32), lo que permite inferir la formación de un puente disulfuro entre cisteínas vecinas en la estructura tridimensional de la proteína. La cisteína más reactiva reacciona con el DTNB y forma un disulfuro mixto. Luego,

un sulfhidrilo vecino ataca el disulfuro y forma un puente de cistina, liberándose un segundo mol del anión tionitrobenzoato (figura 32).

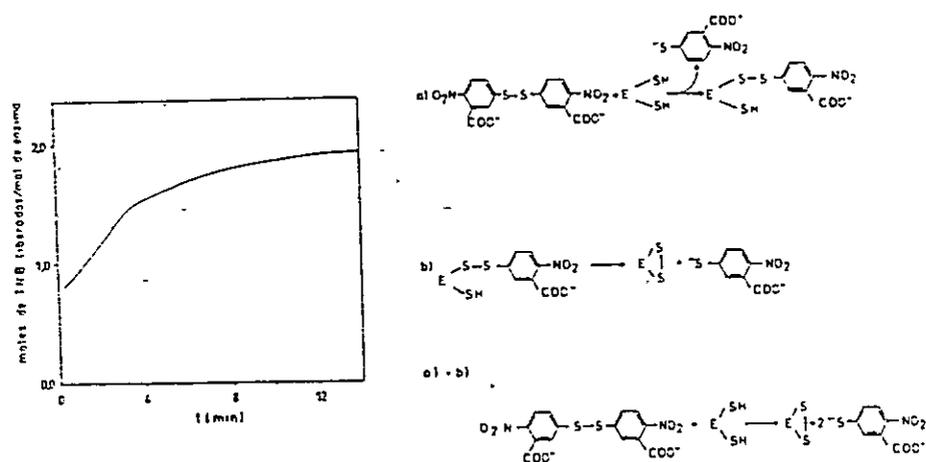
La enzima modificada según el procedimiento anterior fue dializada contra TEA-HCl 50 mM pH 7,3, EDTA 50 mM y glicerol 10% v/v para eliminar el anión tionitrobenzoato.

### **III.5.2 Unión del IDP a la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica oxidada con ácido bis-ditionitrobenzoico.**

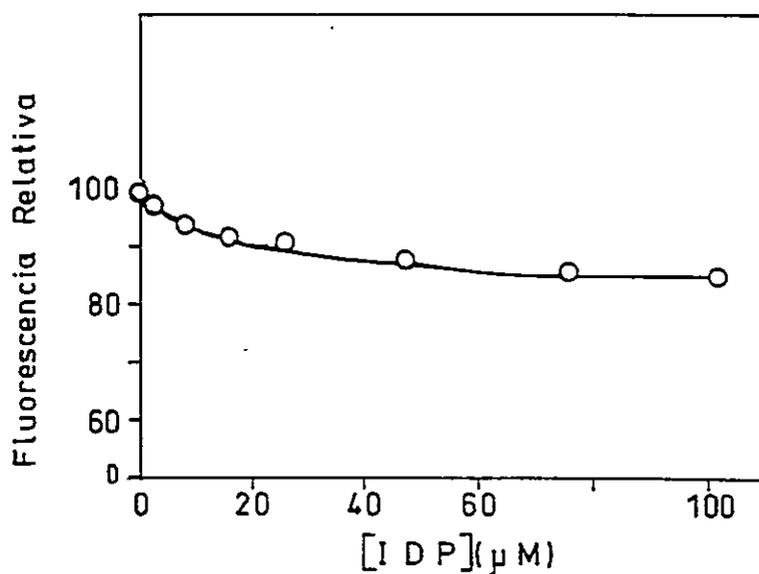
Los experimentos detallados en la sección III.3 demostraron que la unión de los nucleótidos de guanosina e inosina disminuye la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica nativa. Estos datos permitieron determinar las constantes de disociación de los nucleótidos desde la enzima.

La intensidad de la fluorescencia de los triptofanos de la carboxiquinasa oxidada, también disminuyó progresivamente al agregar IDP (figura 33). Concentraciones saturantes de este nucleótido producen una disminución de un 15% en la emisión de estos residuos. De estos datos, se calculó una constante de disociación de 8  $\mu$ M, que es del mismo orden que la constante de disociación del IDP desde la enzima nativa (6,7  $\mu$ M).

Este resultado induce a pensar que la conformación del sitio del nucleótido de la enzima oxidada con DTNB no ha cambiado significativamente con respecto a la de la enzima nativa y que el PIA podría reaccionar con los sulfhidrilos libres presentes en la enzima oxidada, de la manera en que lo hace en la enzima nativa. Los experimentos detallados en las siguientes secciones, permiten deducir si los residuos que forman el excímero son los mismos que se bloquean con DTNB.



**Figura 32.** Cinética de liberación de tionitrobenzoato (TNB), durante la reacción de la PEPCK ( $8\mu\text{M}$ ) con DTNB ( $8\mu\text{M}$ ) a  $30^\circ\text{C}$ . El medio de reacción contiene 25 mM de Hepes pH 7,0, EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v. La concentración de TNB se determinó a 412 nm, ( $\epsilon=13,6 \times 10^3$ ). Las ecuaciones a) y b) del esquema explican la reacción de tioles vecinos en la proteína, con DTNB.



**Figura 33.** Efecto del IDP sobre la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos en la PEPCK oxidada con DTNB.  $\lambda_{\text{exc}}=295\text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}}=335\text{ nm}$ .

### III.5.3 Reacción de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica oxidada, con pirenil yodoacetamida en las condiciones en que se forma excímero.

Se hizo reaccionar la carboxiquinasa oxidada con un exceso molar de 5 veces de PIA, a 20°C por 10 minutos. Después de separar el derivado de pireno libre, se determinó que se habían incorporado 1,75 moles de pirenil acetamida por mol de proteína. El espectro de emisión de este aducto, ( $\lambda_{exc}=344$  nm) presenta la banda del excímero (figura 34), aunque en menor proporción con respecto al monómero que en la PEPCK nativa, modificada con 2,17 moles de PA.

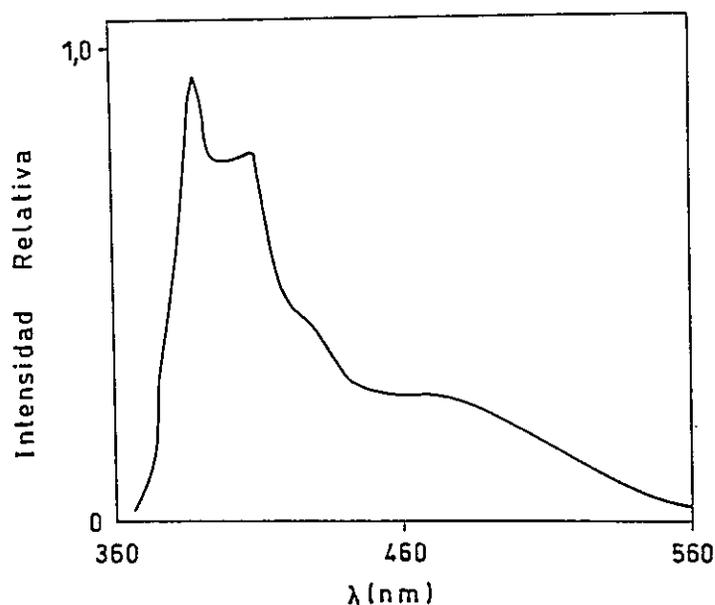


Figura 34. Espectro de emisión del pirenil en la PEPCK oxidada con DTNB y modificada con PIA.  $\lambda_{exc}=344$  nm. La solución contiene TEA-HCl 50 mM, pH 7,3; EDTA 0,5 mM, glicerol 10% v/v.

### III.5.4 Separación de los péptidos trípticos obtenidos a partir de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica oxidada y modificada con pirenil yodoacetamida.

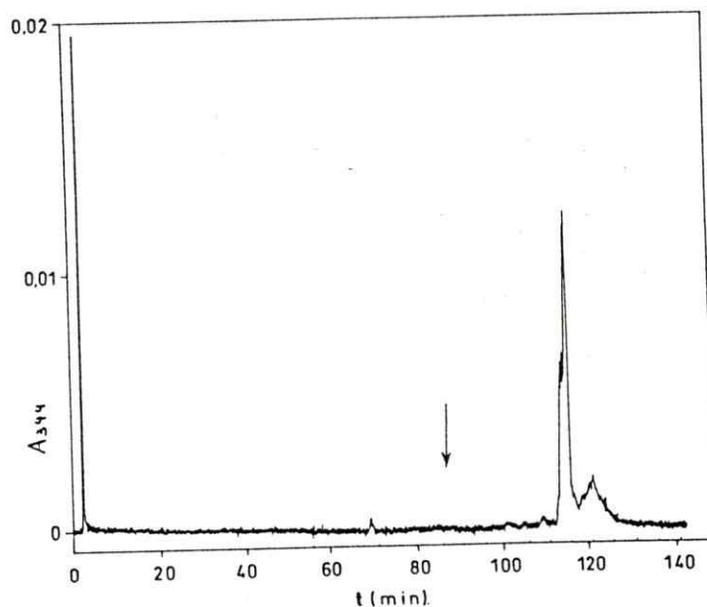
La enzima, oxidada con DTNB y modificada con PIA, fue digerida con tripsina y la mezcla de péptidos fue resuelta en HPLC usando una columna C18 de fase reversa (figura 35).

El cromatograma muestra que no aparecen péptidos que absorban a 344 nm, con tiempos de retención entre 90-100 minutos, zona en la que se eluye el péptido que contiene la cisteína 288. Por lo tanto, la cisteína 288 es uno de los residuos que forma el disulfuro en la enzima oxidada con DTNB.

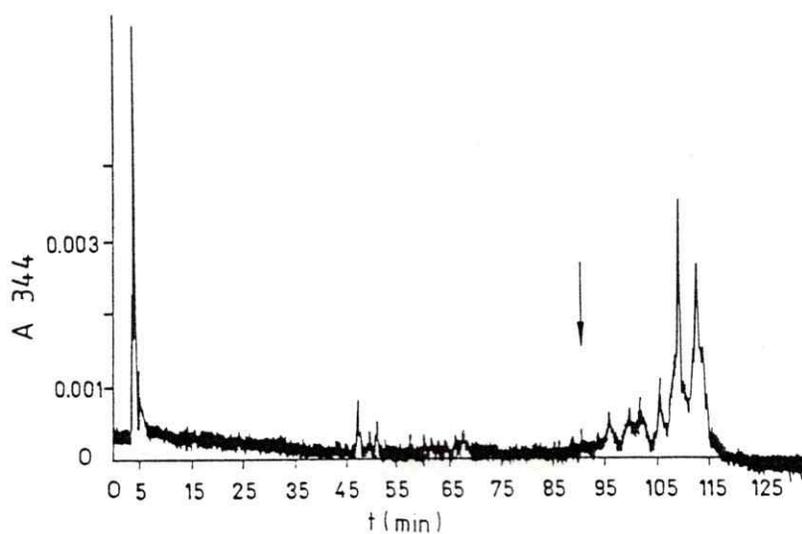
En la zona del cromatograma donde eluye el péptido II del aducto PEPCCK:PA=1:2,2 aparecen varios péptidos que absorben a 344 nm y son fluorescentes. No queda claro de este experimento si alguno de ellos corresponde al péptido II, por lo que esta mezcla de péptidos fue cromatografiada en una columna C4 de fase reversa con el objeto de mejorar su resolución (figura 36). El perfil de absorbancia a 344 nm del eluido de esta columna permite establecer claramente que los péptidos que se modifican con PIA en la PEPCCK oxidada, son distintos al péptido II, cuyo tiempo de retención aparece indicado en la figura 36.

Este resultado indica que las cisteínas que forman el excímero son las mismas que forman el enlace disulfuro frente al DTNB, y por lo tanto permite definir una ubicación espacial relativa para los dos residuos ubicados en el péptido I y II.

La cisteína 288 y la cisteína 403 o la cisteína 407, se encuentran vecinas en la estructura tridimensional de la PEPCCK, en una posición tal que sus grupos sulfhidrilo pueden formar un enlace covalente.



**Figura 35.** Separación de los péptidos trípticos provenientes de la PEPCK oxidada y modificada con PIA. Columna 100-RP18 de fase reversa. Las condiciones de la cromatografía son idénticas a las de la figura 29. La flecha indica el tiempo de retención del péptido que contiene la Cis 288 (figura 29).



**Figura 36.** Separación de los péptidos marcados con pireno, provenientes de la PEPCK oxidada con DTNB y modificada con PIA. Columna C4 de fase reversa. Las condiciones de la cromatografía son las mismas que en el experimento de la figura 30. La flecha indica el tiempo de retención del péptido II (figura 30).

#### IV. DISCUSION

En el presente trabajo se ha efectuado un estudio de la PEPCK del citosol de hígado de rata, basado en el análisis de la emisión de fluoróforos exógenos unidos covalentemente a la enzima, así como en determinaciones de la fluorescencia intrínseca.

Las sondas fluorescentes 1,5-I-AEDANS, pirenil maleimida y pirenil yodoacetamida, modifican selectivamente un residuo de aminoácido de la enzima. En concordancia con la especificidad descrita para estos modificadores (Franzen y col., 1980; Birmachu y col., 1989; Graceffa y Lehrer, 1980; Ishii y Lehrer, 1990; Kouyama y Mihashi, 1981), se demostró que una cisteína es el residuo que reacciona con pirenil yodoacetamida. Este residuo ocupa la posición 288 en la estructura primaria de la PEPCK de rata, como se pudo demostrar secuenciando el péptido tróptico fluorescente respectivo (Tabla VII). La cisteína 288 de esta enzima ya había sido identificada como el tiol más reactivo frente a cumarinil maleimida (Lewis y col., 1989a). Por otra parte, es muy probable que la PM y el 1,5-I-AEDANS reaccionen con este mismo residuo, dada la hiperreactividad de la cisteína 288, así como los patrones de protección por los sustratos obtenidos para la inactivación por 1,5-I-AEDANS y ambos derivados del pireno, que permiten postular que la cisteína modificada estaría ubicada en la misma región de la enzima.

Los sitios de unión de los sustratos en la PEPCK de rata no han sido identificados directamente, pero el conjunto de las pruebas experimentales disponibles, indica que la cisteína más reactiva se encuentra en el sitio activo, en o cerca del sitio del nucleótido.

La enzima modificada con DTNB y cumarinil maleimida es completamente inactiva (Carlson y col., 1978, Lewis y col., 1989a), así como la enzima modificada con 1,5-I-AEDANS, PM o PIA. La inactivación no es consecuencia de un efecto estérico puesto que la enzima modificada con cianuro también es inactiva (Carlson y col., 1978). Por otra parte, el GDP o GDPMn suprimen completamente la inactivación con los

modificadores mencionados anteriormente, a diferencia de los otros sustratos de la enzima que reducen parcialmente o bien no afectan la velocidad de inactivación. Este patrón de protección es análogo al obtenido para la fotoinactivación de la PEPCK con 8-azido GTP, compuesto que se une al sitio del nucleótido y que puede ser utilizado como sustrato por la enzima (Lewis y col., 1989b).

Además, la cisteína 288 se encuentra ubicada en la secuencia primaria de la PEPCK de rata, entre dos secuencias de consenso que han sido postuladas para la unión de los fosforilos del GDP (Cook y col., 1986), y presenta características que son propias de residuos ubicados en el sitio activo de enzimas (reactividad aumentada y  $pK_a$  alterado con respecto a la cisteína libre). La cinética de inactivación de la PEPCK de rata con derivados de la maleimida a pH 7,0 y 0°C es tan rápida que no puede seguirse por métodos convencionales (Lewis y col., 1989a). Esta reactividad aumentada podría ser en parte consecuencia del bajo valor de  $pK_a$  que presenta la cisteína 288 ( $pK_a=7,0$ ). El rango de  $pK_a$  descrito para los residuos de cisteína de diversas proteínas varía entre 8 y 11 (Tanford, 1962). Las características del microentorno del residuo, como la polaridad y la presencia de cargas positivas, pueden dar cuenta del  $pK_a$  alterado. Por ejemplo, en la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico, se demostró que las dos cisteínas más reactivas se encuentran vecinas a varias argininas y que estos residuos presentan un  $pK_a$  considerablemente reducido con respecto a la cisteína libre (Bishop y col., 1988). Es muy probable que existan residuos cargados positivamente en el sitio activo de la PEPCK de rata, dado que varios de sus sustratos son aniones a pH neutro cuyas cargas deben ser estabilizadas por la enzima. De hecho, para las PEPCKs de pollo y de levadura se han descrito argininas y lisinas en el sitio de los sustratos fosforilados (Malebrán y Cardemil, 1987; Saavedra y col., 1988; Guidinguer y Nowak, 1991; Nowak y col., 1992).

Los experimentos con DTNB y 8-azido-GTP habían demostrado la presencia de tioles vecinos en el sitio del nucleótido de la PEPCK de rata (Carlson y col., 1978; Lewis, y col., 1989b). En esta tesis se demostró que la cisteína 288 es uno de los dos residuos que forman un enlace S-S por modificación con cantidades estequiométricas

de DTNB. Además, se demostró que estos dos residuos difieren considerablemente en su reactividad puesto que no compiten por las sondas fluorescentes utilizadas en el presente trabajo. De hecho sólo se logró marcar con PIA una segunda cisteína aumentando notablemente la concentración del modificador, la temperatura y el tiempo de reacción (sección III.4.1). A su vez, esta segunda cisteína presenta una reactividad considerablemente mayor que la de las 11 cisteínas restantes, puesto que se obtuvieron sólo dos péptidos fluorescentes principales a partir del aducto  $PEPCK:PA=1:2,2$ . Esta situación es diferente a la descrita para la PEPCK de levadura, que contiene dos cisteínas de reactividad similar frente a PIA y PM, en el sitio del ATP. Estos dos tioles se marcan simultáneamente con PIA y en forma mutuamente excluyente con PM (Cardemil y col., 1990; Cardemil, E. y Encinas, M.V. datos no publicados).

Las características fluorescentes del AEDANS unido a la PEPCK de rata, demostraron que esta sonda se encuentra en un entorno de polaridad reducida. El máximo de emisión del AEDANS está desplazado hacia el azul con respecto a la emisión de este fluoróforo en agua. La magnitud de este desplazamiento es considerablemente mayor que la descrita para el AEDANS unido a otras proteínas (Franzen y col., 1980; Encinas y col., 1990; First y Taylor, 1989).

El desplazamiento espectral del AEDANS unido a la N-acetilcisteína, en solventes apolares, polares y próticos, muestra una buena correlación con el parámetro ET 30, que mide la capacidad del solvente para estabilizar estructuras dipolares (Reichart, 1982). Interpolando el máximo de emisión del AEDANS unido a la PEPCK de rata en esta serie de valores, se encontró que éste coincide con el de la N-AcCis-AEDANS en etanol. Sin embargo, la interpretación de este resultado no es simple puesto que los grupos de la proteína que interactúan con el AEDANS son heterogéneos y sus movimientos están restringidos, lo que limita su reordenamiento para estabilizar el estado excitado del fluoróforo. Aún así, se puede deducir que la polaridad del sitio del AEDANS en la PEPCK de rata es considerablemente menor que la del  $H_2O$  y menor que la determinada con la misma sonda para el sitio del ATP en la PEPCK de levadura (Encinas y col., 1990).

Estos resultados concuerdan con diversos datos anteriores que hacen pensar en la presencia de un dominio de baja polaridad asociado con la actividad catalítica en la PEPCK de rata. Distintos derivados hidrofóbicos de la maleimida modifican específicamente el sitio del nucleótido de esta enzima (Lewis y col., 1989a). La cisteína 288, residuo que formaría parte de este sitio, se encuentra en un segmento de la proteína enriquecido en aminoácidos apolares (Beale y col., 1985). Además, se ha demostrado que las interacciones hidrofóbicas son importantes en la unión de esta enzima a la matriz de afinidad GTP-agarosa (Colombo y col., 1978).

Por otra parte, la ubicación de la cisteína más reactiva de la carboxiquinasa de rata en un entorno de polaridad reducida, no define su accesibilidad o grado de exposición al solvente, aunque podría esperarse que en general los residuos ubicados en entornos apolares pudieran ser poco accesibles. Los experimentos de apagamiento de la fluorescencia del AEDANS por acrilamida demostraron que esta sonda presenta una accesibilidad limitada a este apagador, con un valor de  $k_q$  ( $5,6 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) que está en el rango inferior descrito para otras proteínas marcadas con AEDANS (Leavis y col., 1984). La eficiencia del proceso de desactivación del AEDANS por la acrilamida disminuye al bajar la polaridad del solvente (Encinas y Lissi, 1985b). Sin embargo, el valor de la constante de apagamiento bimolecular obtenido para la PEPCK de rata es un orden de magnitud menor que el informado para el modelo N-AcCis-AEDANS en etanol y en dimetilformamida (Encinas y col., 1990). Se puede inferir entonces, que el sitio que une al AEDANS se encuentra considerablemente apantallado del solvente en la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de rata.

El decaimiento fluorescente de la pirenil maleimida unida a esta enzima presenta dos componentes, que ponen en evidencia distintos microentornos detectados por la sonda. Esta es una característica propia de la PM unida a la enzima, puesto que el modelo N-AcCis-PM en distintas mezclas de solventes, presenta un decaimiento monoexponencial. En general, la heterogeneidad en el entorno local de una sonda unida a una proteína puede provenir de sitios de unión múltiples (Leavis y col., 1984), de movimientos localizados de la sonda (Bishop y col., 1988) o bien de la existencia de distintas

conformaciones de la proteína (Betteridge y Lehrer, 1983). Como la PEPCCK de rata se modifica con PM en un solo sitio, se descarta la primera posibilidad. Por otra parte, la proteína podría existir en una conformación única y la marca podría equilibrarse en dos entornos que difirieran en el grado de exposición al solvente y/o en la cercanía a distintos residuos apagadores de la fluorescencia del pireno.

El grado de exposición al H<sub>2</sub>O tiene un considerable efecto apagador sobre el cromóforo de la pirenil maleimida, como lo demuestran los valores de tiempos de vida que presenta la N-AcCis-PM en distintas mezclas etanol/agua (Tabla III). Además, se ha demostrado que la fluorescencia del pireno es apagada eficientemente por el triptofano, tanto en H<sub>2</sub>O como en mezclas etanol/H<sub>2</sub>O (Encinas y Lissi, 1986). La N-AcCis-PM también es desactivada por triptofano, así como por histidina y metionina, con una constante de velocidad en el rango de 10<sup>9</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (Encinas, M.V. datos no publicados). Por lo tanto, distintas distribuciones locales de residuos de aminoácido alrededor de la sonda podrían apagar en forma diferencial la fluorescencia del pireno unido a la carboxiquinasa.

Los movimientos rotacionales de la sonda en el interior de la proteína pueden dar origen a un decaimiento heterogéneo solamente si son más lentos que la emisión fluorescente (Alcala y col., 1987b). Sin embargo, para el pireno unido a la enzima esto resulta poco probable, ya que su tiempo de decaimiento fluorescente es bastante largo. Entonces, el decaimiento biexponencial se debería más bien a la participación de fluctuaciones estructurales en la proteína que ocurrirían en una escala de tiempo mucho mayor que la del decaimiento (Alcala y col., 1987b). La carboxiquinasa modificada con pirenil maleimida podría existir en dos estados conformacionales en equilibrio, que diferirían en el tipo y cercanía de los residuos vecinos al fluoróforo o bien en el grado de exposición de éste al solvente.

La adición de acrilamida no afectó la intensidad de la fluorescencia ni los tiempos de decaimiento de la pirenil maleimida unida a la PEPCCK. Si bien este resultado demuestra que el pireno no está expuesto al solvente, no fue posible establecer su grado de inaccesibilidad puesto que la acrilamida es muy ineficiente como apagador del pireno

en solventes de polaridad reducida (Tabla V). Por ejemplo, la constante de apagamiento bimolecular determinada para N-AcCis-PM en etanol 60%, es menor que  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Con este valor se observaría menos de un 6% de apagamiento a una concentración de acrilamida de 0,4 M, tomando un  $\tau$  promedio de 50 ns para el PM unido a la enzima.

Con respecto al efecto apagador del yoduro, se obtuvo para la intensidad de la fluorescencia de la PM en la enzima, un gráfico de Stern-Volmer no lineal. De la pendiente de esta curva a concentraciones bajas de yoduro, se calculó un valor de  $k_q$  de  $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , que corresponde al valor que se esperaría para la pirenil maleimida expuesta al solvente. Sin embargo este no es el caso, puesto que la acrilamida no afectó la intensidad ni los tiempos de decaimiento de la PM unida a la PEPCK. Por otra parte, los dos tiempos de decaimiento fueron apagados con la misma eficiencia por el yoduro. Estas anomalías en el efecto apagador de yoduro sugieren que este anión afecta la fluorescencia del pireno al menos en parte a través de una alteración conformacional de la proteína. Los datos obtenidos con yoduro en la PEPCK modificada con AEDANS apoyan esta hipótesis ya que la adición de este anión desplaza en 10 nm el máximo de emisión de esta sonda sin afectar la intensidad de la fluorescencia del AEDANS. Para otras proteínas se ha descrito que el yoduro induce cambios conformacionales y en algunos casos se ha demostrado que este ion altera la estructura secundaria de estas macromoléculas (Tonomura y col., 1962; Ide y Engelborghs, 1981; Hill y col., 1986).

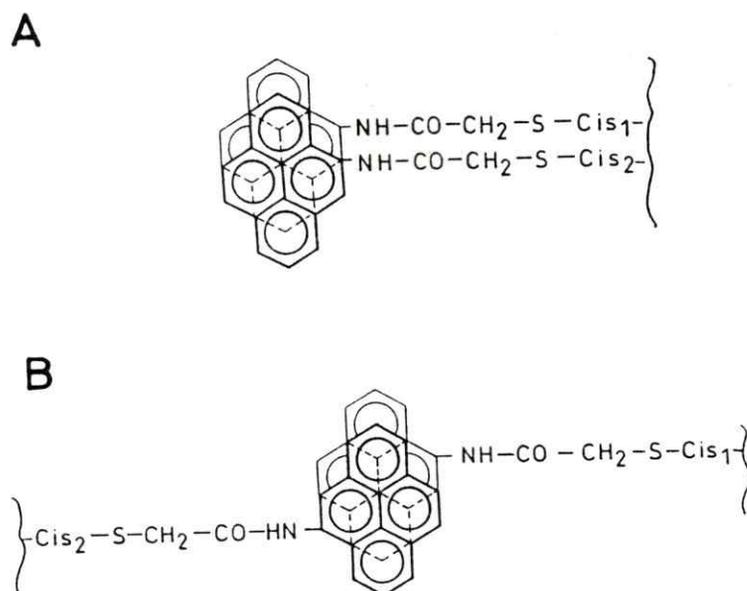
Las determinaciones de anisotropía de la fluorescencia del AEDANS unido a la PEPCK de rata, demostraron que esta sonda presenta una libertad rotacional restringida en el interior de la proteína. En oposición a este resultado, se había detectado considerable movimiento del AEDANS unido al sitio del ATP de la PEPCK de levadura (Encinas y col., 1990). Esto pone en evidencia diferencias estructurales en los sitios del nucleótido de ambas carboxiquinasas, en concordancia con las diferencias que han sido descritas para los sitios del GTP y del ATP en diversas proteínas (Fry y col., 1986; Dever y col., 1987).

Comparando las secuencias primarias de diversas proteínas que unen ATP y GTP, se demostró que hay una secuencia fuertemente conservada, relacionada con la unión

de la guanina (Dever y col., 1987). Si se cambia algún residuo de esta secuencia, disminuye drásticamente la interacción con el GTP (Clanton y col., 1986). Por otra parte, las proteínas que unen ATP muestran una gran variabilidad y no se han detectado en ellas residuos conservados que participen en la interacción con la adenina (Fry y col., 1987). Estos hechos se reflejan en los valores de la constante de disociación ( $K_d$ ) para los nucleótidos de guanina y adenina, que presentan diversas proteínas. Los valores de  $K_d$  para el ATP están entre 50 y 200  $\mu\text{M}$ , mientras que las  $K_d$  para el GTP están entre 1 y 10  $\mu\text{M}$  (Dever y col., 1987). Para la PEPCK de rata, nosotros determinamos que el valor de la constante de disociación para el GDP es de 6,0  $\mu\text{M}$  (Tabla VI), y más adelante volveremos a analizar este punto, al discutir los resultados obtenidos de los estudios de la fluorescencia intrínseca de la enzima.

Por consiguiente, la unión del ATP a la PEPCK de levadura requeriría de menos sitios de contacto que la unión del GTP a la carboxiquinasa de rata, y este hecho podría manifestarse en el tipo de interacción que presentan las dos enzimas con el AEDANS.

Como ya fue comentado anteriormente, se había descrito la existencia de al menos un par de cisteínas vecinas en el sitio de unión del nucleótido de la PEPCK citosólica de rata (Carlson y col., 1978; Lewis y col., 1989b), aunque hasta ahora no existía conocimiento de la ubicación de estos residuos dentro de la estructura primaria de la proteína. En este trabajo se pudieron marcar específicamente con PIA dos residuos de cisteína vecinos ubicados en el sitio del nucleótido de la PEPCK de rata. La enzima así modificada presentó fluorescencia del excímero de pireno además de la banda de emisión del monómero. El excímero puede formarse sólo cuando una molécula de pireno excitado está inmediatamente adyacente a una molécula de pireno en el estado fundamental, con ambos anillos orientados cara a cara (Turro, 1978). Se ha postulado que las dos moléculas de pireno que participan en la formación del excímero se ubicarían a una distancia de 7-9 Å (Martinho y Winnik, 1987). Sin embargo, la formación de excímero no define la orientación espacial de las dos cisteínas modificadas, puesto que los anillos de pireno podrían formar este dímero aún cuando los grupos sulfhidrilo a los



**Figura 37.** Distintas posibilidades de ubicación relativa de las cisteínas que forman el excímero en la PEPCK modificada con 2,17 moles de pireno acetamida.

que se encuentran unidos estén alejados. En la figura 37 aparecen esquematizadas dos posibles ubicaciones para las cisteínas modificadas con PIA.

La secuenciación de los péptidos trípticos obtenidos desde el aducto PEPCK:PA=1:2,2 permitió identificar la cisteína 288 como uno de los residuos que forma el excímero, y que corresponde a la cisteína más reactiva frente a PIA en la enzima (sección III.1). El péptido tríptico que contiene la cisteína de menor reactividad fue identificado en la secuencia primaria de la enzima, pero no fue posible determinar cuál de las dos cisteínas que contiene este péptido (407 o 413), está modificada con PA. No se puede descartar la posibilidad de que ambos residuos se marquen en forma mutuamente excluyente, ya que los péptidos modificados en este caso, probablemente se eluirían juntos de las columnas de fase reversa.

Dada la estequiometría de marcación, se puede descartar la formación de excímero entre las cisteínas 407 y 413, situación para la que se esperaría una incorporación de alrededor de 3,0 moles de pireno por mol de enzima.

La fluorescencia monomérica que se obtiene en el aducto PEPCK:PA=1:2,2 proviene de moléculas de pireno que no pueden formar excímero. Como se observa fluorescencia tanto del monómero como del excímero, se podría inferir que la PEPCK marcada con PA existiría en dos estados en equilibrio. En uno de ellos los anillos de pireno estarían orientados en forma no efectiva para la formación de excímero y el pireno excitado en esta conformación se desactivaría dando la fluorescencia del monómero. En el otro estado, el pireno excitado podría asociarse con un pireno vecino en el estado fundamental y dar la fluorescencia propia del excímero.

Con el objeto de poder discriminar entre las posibilidades que se muestran en la figura 37, nosotros bloqueamos los dos sulfhidrilos más reactivos de la PEPCK de rata con DTNB, y pudimos verificar que las cisteínas que forman el excímero se encuentran vecinas en la estructura tridimensional de la carboxiquinasa nativa. Nuestro argumento para esta afirmación consiste en que los péptidos que contienen estos residuos no aparecen marcados en la carboxiquinasa oxidada con DTNB y tratada con PIA. La formación del enlace disulfuro entre las dos cisteínas más reactivas no alteró la capacidad de unir IDP de la PEPCK, puesto que ese nucleótido disminuyó la intensidad de la fluorescencia de los triptofanos de la enzima oxidada en la misma magnitud que en la carboxiquinasa nativa. Además, la afinidad de la enzima oxidada por el IDP es prácticamente igual a la que presenta la PEPCK nativa. Estos datos sugieren que la oxidación con DTNB no ha alterado significativamente la conformación del sitio de unión del nucleótido. Dada la reactividad con PIA de la enzima oxidada, creemos que la orientación de los 2 tioles que forman el excímero correspondería a la que se esquematiza en la figura 37A. En otras proteínas, como la tropomiosina de músculo de conejo, también se ha demostrado que cisteínas vecinas que se oxidan a un disulfuro frente a DTNB, pueden reaccionar con pirenil maleimida y formar un excímero (Graceffa y Lehrer, 1980).

Los estudios anteriores también permitieron identificar la cisteína más reactiva con DTNB en la PEPCK de rata, residuo que no había sido identificado hasta ahora. Carlson y colaboradores (1978) demostraron que el residuo más reactivo con DTNB, se encuentra en una posición correspondiente al 44% de la longitud total de la proteína, contada desde el grupo amino terminal. Las cisteínas más cercanas a esta posición son la 245 y la 288 (Beale y col., 1985). Posteriormente, Beale propuso la cisteína 245 como el candidato más probable, considerando que la cisteína 288 se encuentra en un segmento hidrofóbico de la proteína que debería estar ubicado hacia el interior y ser inaccesible al DTNB (Beale y col., 1985).

Nuestros experimentos, demuestran claramente que la cisteína 288 es uno de los residuos que reaccionan con DTNB. Considerando la posición descrita para la cisteína más reactiva con este modificador en la secuencia primaria de la carboxiquinasa de rata (Carlson y col., 1978; Beale y col., 1985), se puede inferir que la cisteína 288 es el tiol más reactivo con DTNB. Aunque este residuo se encuentra en un entorno de polaridad reducida, es muy accesible a moléculas como PIA y DTNB que difunden desde la solución.

Los estudios de la fluorescencia extrínseca descritos en este trabajo, fueron complementados con el análisis de las características de fluorescencia de los triptofanos. La fluorescencia intrínseca de la PEPCK de rata resultó ser muy sensible a la presencia de los sustratos y productos nucleotídicos, que apagaron entre un 12 y un 30% de la emisión de estos residuos.

El espectro de emisión de los triptofanos, aportó cierta información con respecto a la naturaleza promedio del entorno de estos fluoróforos. El máximo de emisión a 335 nm induce a pensar que el promedio de la población de triptofanos de la PEPCK de rata está en regiones sólo parcialmente accesibles al solvente (Burstein y col., 1973). Los experimentos con apagadores iónicos comprobaron esta hipótesis, puesto que sólo una pequeña proporción de la población de triptofanos fue apagada por NaI y CsCl.

La constante de apagamiento por acrilamida para el promedio de los triptofanos

de la PEPCK de rata ( $0,96 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), está en el rango descrito para proteínas que contienen residuos medianamente expuestos (Eftink y Ghiron, 1976a). Sin embargo, este desactivador neutro no permitió diferenciar topográficamente los distintos triptofanos de la proteína, puesto que puede penetrar en la matriz y desactivar residuos interiores (Eftink y Ghiron, 1981).

Por otra parte, el yoduro desactiva selectivamente residuos de triptofano expuestos al solvente (Lehrer, 1971). La desviación hacia abajo en el gráfico de Stern-Volmer que se obtuvo con este apagador para la PEPCK de rata, permite postular que sólo una parte de la población de triptofanos está accesible a este anión. Al tratar los datos de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer modificada (Lehrer, 1971), se obtuvo una fracción accesible de 0,18 y una constante de apagamiento efectivo de  $5 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Este último valor es anormalmente alto para la desactivación por yoduro de triptofanos en proteínas (Lehrer, 1971; Calhoun y col., 1983).

Dado que las proteínas son polielectrolitos los efectos electrostáticos pueden influir en la acción desactivadora del yoduro y llevar a sobre o subestimar la exposición de estos fluoróforos. Este efecto ha sido descrito en la seroalbúmina humana así como en compuestos modelo (Lehrer, 1971). Sin embargo, en el experimento con la PEPCK de rata se mantuvo una fuerza iónica constante y alta, por lo cual se esperaba que estos efectos fueran mínimos. Una explicación alternativa es que el yoduro induzca una alteración conformacional en la carboxiquinasa, efecto que ha sido descrito en otras proteínas (Tonomura y col. 1962; Ide y Engelborghs, 1981; Hill y col., 1986). En la PEPCK de rata modificada con AEDANS se demostró que el yoduro altera el entorno de este fluoróforo, de modo que resulta factible que el valor obtenido para la constante de apagamiento de los triptofanos por NaI se deba al menos en parte a que este anión altera la conformación de la enzima.

La fluorescencia intrínseca de la PEPCK de rata disminuyó considerablemente por la unión de GDP, IDP o ITP. Se descartó que este comportamiento se debiera a un efecto de filtro interno, ya que los nucleótidos presentan una absorción baja, menor a 0,02 en todo el rango de concentración usado, que fue considerada en la corrección de

los datos (sección II.9). Además, no se observó disminución de la fluorescencia de los triptofanos al agregar GTP a la carboxiquinasa de levadura.

La disminución de la fluorescencia de los triptofanos de una proteína por la unión de un ligando ha sido interpretada frecuentemente como un cambio estructural local, que altera la interacción de ciertos residuos específicos con grupos vecinos (Omar y Schleich, 1981; Kumar y col., 1988; Pawagi y Deber, 1990; Pearce y Hawroth, 1990). Sin embargo, aunque esta interpretación parece razonable, nuestros resultados podrían también ser consecuencia del efecto apagador de los nucleótidos sobre la fluorescencia de algunos residuos de triptofano ubicados en el sitio de unión de estos ligandos en la enzima. Esta desactivación podría ocurrir a través de un complejo de transferencia de carga entre el triptofano y el GDP. Otros mecanismos de desactivación como la transferencia de energía electrónica a través del mecanismo de Förster (Vasak y col., 1979; Messmer y Kägi, 1985; Divita y col., 1991) y la formación de complejos dador-aceptor en el estado fundamental (Montenay-Garestier y Helene, 1971; Mutai y col., 1975; Atkins y col., 1991) parecen poco probables. El apagamiento por transferencia de energía de resonancia no ocurriría en base a consideraciones energéticas y debido a la falta de sobreposición de los espectros de fluorescencia y de absorción. Además, hay pruebas indirectas que descartan la formación de complejos no-luminiscentes en el estado basal ya que el espectro de absorción de la PEPCK no se alteró en presencia de los nucleótidos.

Por otra parte, se observó una marcada disminución de la eficiencia de la desactivación por yoduro al unirse los nucleótidos a la PEPCK (figura 23). La población accesible al yoduro en esta enzima es baja, y disminuye drásticamente al unirse los nucleótidos. En presencia de IDP la fluorescencia de los triptofanos no se ve afectada por la adición de yoduro (figura 23). Efectos análogos han sido descritos en otras proteínas, como el factor de elongación Tu (Jameson y col., 1987) y la creatina quinasa (Messmer y Kägi, 1985). También se han descrito proteínas con múltiples triptofanos inaccesibles al solvente, como la ubiquinona oxidorreductasa, que contiene 12 triptofanos cuya fluorescencia no es alterada por yoduro ni por ion cesio (Watmough y col., 1991).

Existen varias interpretaciones para nuestros resultados. Una posibilidad es que la unión de los nucleótidos altere la conformación de la enzima, disminuyendo la intensidad de la fluorescencia y reduciendo la exposición de los residuos de triptofano al yoduro. Otra posibilidad es que el yoduro y los nucleótidos desactiven a los mismos residuos, sin alterar la conformación de la enzima. En este caso, los residuos que son apagados por el yoduro en la enzima nativa, no emitirían en presencia de los nucleótidos. Aunque no podemos descartar esta última explicación, nos parece poco probable, puesto que los nucleótidos interactúan con la proteína en un sitio que no está expuesto al solvente y que no se esperaría que fuera accesible al yoduro, molécula que interactuará principalmente con los residuos externos de la proteína. Una tercera alternativa podría considerar la desactivación por yoduro de los triptofanos vecinos al nucleótido, indirectamente, a través de un cambio conformacional. Los experimentos con la enzima modificada con AEDANS y con PM, hacen pensar que el yoduro altera la conformación de la PEPCK, lo que hace factible esta explicación. Sin embargo, resulta poco probable que la totalidad del efecto apagador de yoduro se deba a un cambio conformacional. Probablemente la PEPCK contiene algunos residuos de triptofano expuestos, y en este caso la fluorescencia de estos residuos no debería ser afectada por la unión de GDP, a menos que este ligando induzca una alteración conformacional en la proteína.

En resumen, aunque no podemos diferenciar en forma definitiva entre las situaciones mencionadas anteriormente, creemos que es probable que participen cambios conformacionales en el efecto de yoduro y de los nucleótidos sobre la fluorescencia intrínseca de la PEPCK.

La fluorescencia de los triptofanos de la PEPCK modificada con AEDANS no se vió afectada por la adición de yoduro, en forma análoga a lo que ocurre con la enzima saturada con IDP. Este resultado puede interpretarse como la inducción de una alteración conformacional, por parte de este modificador, que deje a los triptofanos más escondidos. Otra posibilidad es que los triptofanos accesibles al yoduro se encuentren cerca del sitio del AEDANS y por lo tanto se desactiven por transferencia de energía al naftaleno sulfonato. Esto se traduciría en una disminución del efecto apagador de yoduro. No es posible, con nuestros datos, discriminar entre estas dos explicaciones.

No se detectaron modificaciones en la fluorescencia de los triptofanos al agregar  $\text{HCO}_3^-$ , PEP u oxaloacetato a la PEPCK de rata, por lo que se puede concluir que la unión de ligandos en regiones muy cercanas al sitio del nucleótido no afecta la emisión de los triptofanos de la enzima. Las alteraciones observadas son producidas específicamente por los nucleótidos.

En otras PEPCKs se han puesto en evidencia cambios conformacionales inducidos por los sustratos. En la PEPCK de *E.coli*, el ADP, ATP y  $\text{Mn}^{2+}$  inducen cambios conformacionales al unirse a la proteína (Encinas M.V., resultados no publicados), en tanto que en la PEPCK mitocondrial de hígado de pollo la unión de IDP o  $\text{HCO}_3^-$  a la enzima complejada con  $\text{Mn}^{2+}$  altera el entorno del sitio del metal. Este efecto se detectó midiendo la velocidad de relajación de los protones del  $\text{H}_2\text{O}$  unida al  $\text{Mn}^{2+}$  (Hebda y Nowak, 1982b). Recientemente Chen y col. detectaron, mediante experimentos de captura isotópica, un cambio estructural rápido que se produce en la misma enzima en forma concertada con la unión de GTPMg (Chen y col., 1991b).

Los valores de las constantes de disociación para los nucleótidos, determinados a través de los cambios en la fluorescencia intrínseca de la PEPCK de rata (Tabla VI), son del mismo orden de magnitud que los valores de las constantes descritas para la carboxiquinasa de hígado de cerdo (Miller y col., 1968). En cambio, la enzima mitocondrial de pollo muestra una afinidad considerablemente mayor que las PEPCKs de hígado de rata o cerdo para los complejos de  $\text{Mn}^{2+}$  de los nucleótidos trifosforilados (Nowak, 1986). Estos resultados indican que existen diferencias estructurales en los sitios de las distintas carboxiquinasas dependientes de GTP, lo que está de acuerdo con los resultados de modificación química descritos en la sección I (Carlson y col., 1978; Lewis y col., 1989a; Makinen y Nowak, 1989; Silverstein y col., 1979).

Los resultados obtenidos en este trabajo, con sondas fluorescentes unidas covalentemente a cisteínas del sitio del nucleótido de la PEPCK, permitieron conocer algunas propiedades de este sitio, como la polaridad, accesibilidad a moléculas neutras y cargadas, así como el grado de rigidez de este sitio. Los estudios de la fluorescencia intrínseca

informaron acerca de la interacción de la enzima con los nucleótidos. Nuestros resultados también hicieron posible establecer comparaciones con el sitio del ATP de la PEPCK de levadura, cuyas características ya habían sido determinadas mediante estudios de fluorescencia (Encinas y col., 1990; Cardemil y col., 1990).

El sitio del nucleótido de ambas carboxiquinasas presenta diferencias en la polaridad sentida por el cromóforo del AEDANS, así como en la movilidad de esta sonda en la proteína, en concordancia con las diferencias estructurales y de especificidad descritas para estas enzimas. Por otra parte, ambas enzimas presentan similitud en cuanto a la accesibilidad de la acrilamida al sitio del nucleótido y a la existencia de un par de cisteínas en este sitio que se modifican con PA y forman un excímero. Estas dos cisteínas, sin embargo, difieren en su reactividad relativa.

La cisteína más reactiva con PIA y DTNB en la PEPCK de rata (Cis 288), se encuentra próxima a la cisteína que le sigue en reactividad, que se puede ubicar a la distancia de un enlace covalente con respecto a la anterior. En este trabajo no se pudo identificar inequívocamente la cisteína vecina a la 288. Sin embargo, se demostró que ésta corresponde a la cisteína 407 o a la cisteína 413. Aún así, esta información es relevante y deberá ser tomada en cuenta en estudios de predicción de la estructura tridimensional de la PEPCK de rata, ya que permite descartar conformaciones que no contengan los pares cisteína 288/407 o cisteína 288/413 ubicados de manera tal que puedan formar un enlace covalente.

La cisteína marcada con PA en el péptido II (sección III.4.2) podría identificarse inequívocamente, carboximetilando con ácido  $^{14}\text{C}$ -yodoacético las cisteínas libres de la PEPCK modificada con 2 moles de PA. Durante la secuenciación del péptido marcado con PA, podría determinarse la radiactividad en el eluido de cada ciclo y distinguir así entre la carboximetilcisteína proveniente de la PA-cisteína y de la cisteína libre. En esta tesis, la secuenciación del péptido II se planificó como se describe en la sección III.4.3, puesto que no habían antecedentes que hicieran prever la hidrólisis del derivado PA-cisteína durante el procedimiento de secuenciación. De hecho, en la secuenciación de un péptido de la PEPCK de levadura modificada con PIA, se demostró que la

PA-cisteína no genera carboximetil cisteína (Kemp, R.G., datos no publicados). Del mismo modo, se ha descrito que la cisteína modificada con yodoacetamida fluoresceína en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico no se hidroliza en el transcurso de la misma metodología de secuenciación utilizada con la PEPCK de rata (Bishop y col., 1987). La hidrólisis de la porción acetamida de la PA-cisteína en la PEPCK de rata podría verse facilitada por alguno de los residuos que forman parte de este péptido. Este punto será materia de futuros estudios.

El trabajo de modificación con sondas fluorescentes desarrollado en esta tesis abre la posibilidad de obtener información adicional con respecto a la estructura tridimensional de la PEPCK de rata. Introduciendo marcas fluorescentes en sitios de interés de la proteína podrían obtenerse otras distancias entre pares de residuos de cisteína.

Experimentos preliminares obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, demostraron que se puede marcar con PA una tercera cisteína en forma preferencial a las otras 10 cisteínas que contiene la enzima. Además, los resultados mostrados en la sección III.5 demuestran que la enzima oxidada con DTNB incorpora 1,75 moles de PA por mol de enzima y que este aducto presenta fluorescencia del excímero de pirenilo. Es posible que la tercera cisteína más reactiva con PIA forme también parte de un ditiol, puesto que se ha demostrado que las 6 cisteínas más reactivas con DTNB en la PEPCK de rata, forman disulfuros frente a este modificador (Carlson y col., 1978). Este punto podría demostrarse bloqueando los dos pares de tioles más reactivos por oxidación con DTNB y haciendo reaccionar la enzima oxidada con PIA, en forma análoga al experimento que se describe en esta tesis para el par de cisteínas más reactivo (sección III.5). Si se demuestra que el segundo par de cisteínas más reactivas con PIA son las que forman el excímero en la enzima oxidada y que forman parte de un ditiol, se podría determinar la posición de estos residuos en la secuencia primaria de la PEPCK de rata y definir una segunda distancia entre dos cisteínas de la proteína.

Otro tipo de experimento que podría dar información en el mismo sentido, consiste en marcar la proteína fuera del sitio del nucleótido con una sonda fluorescente que

permita hacer estudios de transferencia de energía con algún fluoróforo que modifique específicamente el sitio del nucleótido, por ejemplo, el AEDANS. Una posibilidad sería hacer reaccionar la carboxiquinasa con fluoresceína yodoacetamida, en presencia de GDP. Después de determinar la estequiometría de marcación y eliminar el GDP unido, la proteína se modificaría con 1,5-I-AEDANS, que se sabe reacciona con la cisteína más reactiva ubicada en el sitio del GDP (probablemente la 288). En el aducto resultante, podría determinarse la transferencia de energía entre el AEDANS y la fluoresceína y por consiguiente, la distancia entre estos dos fluoróforos. Por otra parte, podría secuenciarse el péptido que contiene la fluoresceína yodoacetamida, identificar el residuo marcado y obtener la distancia entre éste y la cisteína 288.

En resumen, la introducción de marcas fluorescentes con distintas propiedades, en el sitio del nucleótido de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de rata, permitió caracterizar este sitio, así como identificar algunos de los residuos que lo conforman. Se pudo marcar selectivamente una cisteína de este sitio y, cambiando las condiciones de reacción, fue posible marcar además un segundo tiol.

Las propiedades de fluorescencia del naftaleno sulfonato unido al sitio del GTP demostraron que esta región de la proteína presenta una polaridad reducida con respecto al agua y que se encuentra considerablemente apantallada del solvente. Además, pudimos demostrar que este fluoróforo presenta una movilidad restringida en el interior de la proteína. Por otra parte, las características de la emisión de los derivados del pireno unidos a la carboxiquinasa permitieron detectar fluctuaciones estructurales de la enzima durante el tiempo del decaimiento de la fluorescencia.

Nuestros resultados indican que la cisteína 288 y la cisteína 407 o 413, forman parte del sitio del GTP. Además, demostraron que estos residuos se encuentran vecinos en la estructura tridimensional de la enzima. La cisteína 288 resultó ser el residuo más reactivo frente a pirenil yodoacetamida y DTNB, dentro del conjunto de 13 cisteínas que contiene la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de hígado de rata. El tiol que le sigue en reactividad es el de la cisteína 407 o la cisteína 413. Este último residuo es a su vez mucho más reactivo que las restantes cisteínas de la enzima.

Finalmente, las determinaciones de la fluorescencia intrínseca indicaron que la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de hígado de rata presenta una alta afinidad por los nucleótidos de guanina e inosina y que la unión de estos ligandos reduce la fracción de la emisión fluorescente que es desactivada por yoduro.

La diferencia en reactividad que presentan las cisteínas de la PEPCCK de rata hizo posible la modificación selectiva de los residuos de interés. El enfoque experimental se podría aplicar a otros sitios en la proteína para obtener información estructural adicional. La propiedad de los derivados del pireno de formar un excímero cuando dos fluoróforos se encuentran próximos, junto con la disposición de las cisteínas más reactivas de la PEPCCK de rata en forma de ditioles, abre la posibilidad de identificar otros residuos vecinos en la estructura tridimensional de la proteína.

## V. BIBLIOGRAFIA

- Alcalá, J.R.; Gratton, E. y Prendergast, F.G. (1987a) *Biophys.J.* 51, 587-596.  
Resolvability of fluorescence lifetime distributions using phase fluorometry.
- Alcalá, J.R.; Gratton, E. y Prendergast, F.G. (1987b) *Biophys. J.* 51, 597-604.  
Fluorescence lifetime distributions in proteins.
- Alvear, M.; Encinas, M.V.; Kemp, R.G.; Latshaw, S.P. y Cardemil, E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1119, 35-38.  
ATP-dependent *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase: isolation and sequence of a peptide containing a highly reactive cysteine.
- Ash, D.E.; Emig, F.A.; Chowdhury, S.A.; Satoh, Y. y Schramm, V.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7377-7384.  
Mammalian and liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. Alternate substrates and inhibition by analogues of oxaloacetate.
- Atkins, W.M.; Staylon, P.S. y Villafranca, J.J. (1991) *Biochemistry* 30, 3406-3416.  
Time-resolved fluorescence studies of genetically engineered *Escherichia coli* glutamine synthetase. Effects of ATP on the tryptophan-57 loop.
- Azzi, A. (1975) *Quarterly Reviews Biophys.* 8, 240-264.  
The application of fluorescent probes in membrane studies.
- Ballard, F.J. y Hanson, R.W. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5625-5630.  
Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the cytosol fraction of rat liver and the immunochemical demonstration of differences between this enzyme and the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Barns, R.J. y Keech, D.B. (1972a) *Biochim. Biophys. Acta* 276, 284-296.  
Sheep kidney phosphoenolpyruvate carboxylase. Purification and properties.
- Barns, R.J. y Keech, D.B. (1972b) *Biochim. Biophys. Acta* 289, 410-419.  
Sheep kidney phosphoenolpyruvate carboxylase. Further studies on the sulphhydryl groups using dinitrofluorobenzene and N-ethylmaleimide.

- Beale, E.G.; Chrapkiewicz, N.B.; Scoble, H.A.; Metz, R.J.; Quick, D.P.; Noble, R.L.; Donelson, J.E.; Bieman, K. y Granner, D.K. (1985) *J.Biol.Chem.* 260, 10748-10760.  
Rat hepatic cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Structures of the protein, messenger RNA and gene.
- Beechem, J.M. y Brand, L. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 43-71.  
Time-resolved fluorescence of proteins.
- Berger, S.A. y Evans, P.R. (1991) *Biochemistry* 30, 8477-8480.  
Steady-state fluorescence of *Escherichia coli* phosphofructokinase reveals a regulatory role for ATP.
- Betteridge, D.R. y Lehrer, S.S. (1983) *J.Mol.Biol.* 167, 481-496.  
Two conformational states of didansylcystine-labeled rabbit cardiac tropomyosin.
- Birmachu, W.; Nisswandt, F.L. y Thomas, D.D. (1989) *Biochemistry* 28, 3940-3947.  
Conformational transitions in the calcium adenosinetriphosphatase studied by time-resolved fluorescence resonance energy transfer.
- Bishop, J.E.; Squier, T.C.; Bigelow, D.J. e Inesi G. (1988) *Biochemistry* 27, 5233-5240.  
(Iodoacetamido)fluorescein labels a pair of proximal cysteines on the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum.
- Brech, W.; Shrago, E. y Wilken, D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 201, 145-154.  
Studies on pyruvate carboxylase in rat and human liver.
- Brinkworth, R.I.; Hanson, R.W.; Fullin, F.A. y Schramm, V.L., (1981) *J.Biol.Chem.* 256, 10795-10802.  
Mn<sup>2+</sup>-sensitive and insensitive forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP).
- Burnell, J.N. (1986) *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 577-587.  
Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase from C4 plants.
- Burstein, E.A.; Vedenkina, N.S. y Ivkova, M.N. (1973) *Photochem. Photobiol.* 18, 263-279.  
Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules.
- Burtnick, L.D., Sanders, C. y Smillie, L.B (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 266, 622-627.  
Fluorescence from pyrene-labeled native and reconstituted chicken gizzard tropomyosins.
- Calhoun, D.B.; Vanderkooi, J.M. y Englander, S.W. (1983) *Biochemistry* 22, 1533-1539.  
Penetration of small molecules into proteins studied by quenching of phosphorescence and fluorescence.

- Cardemil, E.; Encinas, M.V. y Jabalquinto, A.M.(1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1040, 71-76.  
Reactive sulfhydryl groups in *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Carlson, G.M.; Colombo,G. y Lardy, H.(1978) *Biochemistry* 17, 5329-5338.  
A vicinal dithiol containing an essential cysteine in phosphoenolpyruvate carboxykinase (Guanosine Triphosphate) from cytosol of rat liver.
- Clanton, D.J.; Hattori, S. y Shih, T.Y. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5076-5080.  
Mutations of the ras gene product p21 that abolish guanine nucleotide binding.
- Colombo, G.; Carlson,G.M. y Lardy,H.A. (1978) *Biochemistry* 17,5321-5329.  
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine triphosphate) from rat liver cytosol. Separation of homogeneous forms of the enzyme with high and low activity by chromatography on agarose-hexane-guanosine triphosphate.
- Colombo, G.; Carlson, G.M. y Lardy, H.A. (1981) *Biochemistry* 20, 2749-2757.  
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine-5'- triphosphate) from rat liver cytosol. Dual-cation requirement for the carboxylation reaction.
- Colombo, G. y Lardy, H.A. (1981) *Biochemistry* 20, 2758- 2767.  
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine 5'-triphosphate) from rat liver cytosol. Divalent cation involvement in the decarboxylation reactions.
- Cook, J.S.; Weldon, S.L.; García-Ruiz, J.P.; Hod, Y y Hanson, R.W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7583-7587.  
Nucleotide sequence of the mRNA encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken.
- Chang, H.C. y Lane, M.D. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2413-2420.  
The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate II. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Chen, C.Y.; Emig, F.A.; Schramm, V.L. y Ash, D.E. (1991a) *J. Biol. Chem.* 266, 16645-16652.  
Inactivation of chicken mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase by o-phthalaldehyde.
- Chen, C.Y.; Sato, Y. y Schramm, V.L. (1991b) *Biochemistry* 30, 4143-4151.  
Isotope trapping and positional isotope exchange with rat and chicken liver phosphoenolpyruvate carboxykinases.
- Cheng, K.C. y Nowak, T. (1989a) *J. Biol. Chem.* 264, 3317-3324.  
Arginine residues at the active site of avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase.

- Cheng, K.C. y Nowak, T. (1989b) J. Biol. Chem. 264, 19666-19676.  
A histidine residue at the active site of avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Choi, J.D. y Mc.Cormick, D.B. (1981) Biochemistry 20, 5722- 5728.  
Roles of arginyl residues in pyridoxamine-5'-phosphate oxidase from rabbit liver.
- Dever, T.E.; Glynnias, M.J. y Merrick, W.C. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1814-1818.  
GTP-binding domain: Three consensus sequence elements with distinct spacing.
- Divita, G.; Di Pietro, A.; Deléage, G.; Roux, B. y Gautheron, D.C. (1991) Biochemistry 30, 3256-3262.  
Intrinsic tryptophan fluorescence of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondrial F1-ATPase. A powerful probe for phosphate and nucleotide interactions.
- Dodiuk, H. y Kosower, E.M. (1977) J. Phys. Chem. 81, 50- 54.  
Intramolecular donor-acceptor systems. 2. Substituent effects on the fluorescence probes: 6-(N-arylamino)-2-naphtalenesulfonamides.
- Duffy, T.H.; Saz, H.J. y Nowak, T. (1982) Biochemistry 21, 132- 139.  
Stereospecificity of (E) and (Z)-phosphoenol  $\alpha$ -ketobutyrate with chicken liver phosphoenolpyruvate carboxykinase and related phosphoenolpyruvate-utilizing enzymes.
- Duffy, T.H. y Nowak, T. (1984) Biochemistry 23, 661-670.  
Stereoselectivity of interaction of phosphoenolpyruvate analogues with various phosphoenolpyruvate-utilizing enzymes.
- Duffy, T.H. y Nowak, T. (1985) Biochemistry 24, 1152-1160.  
 $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  relaxation rate studies of the interaction of phosphoenolpyruvate and its analogues with avian phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Eftink, M.R. y Ghiron, C.A. (1976a) Biochemistry 15, 672-680.  
Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies.
- Eftink, M.R. y Ghiron, C.A. (1976b) J. Phys. Chem. 80, 486-493.  
Fluorescence quenching of indole and model micelle systems.
- Eftink, M.R. y Ghiron, C.A. (1977) Biochemistry 16, 5546-5551.  
Exposure of tryptophanyl residues and protein dynamics.
- Eftink, M.R. y Ghiron, C.A. (1981) Anal. Biochem. 114, 199-227.  
Fluorescence quenching studies with proteins.

- First, E.A. y Taylor, S.S. (1989) *Biochemistry* 28, 3598-3605.  
Selective modification of the catalytic subunit of cAMP- dependent protein kinase with sulfhydryl-specific fluorescent probes.
- Franzen, J.S.; Marchetti, P.S. y Feingold, D.S. (1980) *Biochemistry* 19, 6080-6089.  
Resonance energy transfer between catalytic sites of bovine liver uridine diphosphoglucose dehydrogenase.
- Fry, D.C.; Stephen, A.K. y Mildvan, A.S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 907-911.  
ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins.
- Gancedo, C. y Schwerzmann, K. (1976) *Arch. Microbiol.* 109, 221-225.  
Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*.
- Gratton, E.; Limkeman, M.; Lakowicz, J.R.; Maliwal, B.P.; Cherek, H. y Laczko, G. (1984) *Biophys. J.* 46, 479-486.  
Resolution of mixtures of fluorophores using variable-frequency phase and modulation data.
- Graceffa, P. y Lehrer, S.S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11296-11300.  
The excimer fluorescence of pyrene-labeled tropomyosin. A probe of conformational dynamics.
- Grinvald, A. y Steinberg, I.Z. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 427, 663-678.  
The fluorescence decay of tryptophan residues in native and denatured proteins.
- Guidinger, P.F. y Nowak, T. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 278, 131-141.  
Analogues of oxalacetate as potential substrates for phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Guidinger, P. F. y Nowak, T. (1991) *Biochemistry*, 30, 8851-8861.  
An active site lysine in avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Gundelfinger, E.D.; Hermans-Brogmeyer, I.; Grenningloh, G. y Zopf, D. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 6745.  
Nucleotide and deduced aminoacid sequence of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from *Drosophila melanogaster*.
- Harris, D.L. y Hudson, B.S. (1990) *Biochemistry* 29, 5276-5285.  
Photophysics of tryptophan in bacteriophage T4 lysozymes.
- Hebda, C.A. y Nowak, T. (1982a) *J. Biol. Chem.* 257, 5503-5514.  
The purification, characterization and activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase from chicken liver mitochondria.

- Hebda, C.A. y Nowak, T. (1982b) *J. Biol. Chem.* 257, 5515-5522.  
Phosphoenolpyruvate carboxykinase.  $Mn^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  substrate complexes.
- Hill, B.C.; Horowitz, P.M. y Robinson, N.C. (1986) *Biochemistry* 25, 2287-2292.  
Detection, characterization and quenching of the intrinsic fluorescence of bovine heart cytochrome c oxidase.
- Holten, D.D. y Nordlie, R.C. (1965) *Biochemistry* 4, 723-731.  
Comparative studies of catalytic properties of guinea pig liver intra- and extramitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Hod, Y.; Utter, M.F. y Hanson, R.W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13787-13794.  
The mitochondrial and cytosolic forms of avian phosphoenolpyruvate carboxykinases (GTP) are encoded by different messenger RNAs.
- Hudson, E.N. y Weber, G. (1973) *Biochemistry* 12, 4154-4161.  
Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents.
- Hung, B.T. y Silverstein, R. (1978) *Fed. Proc.* 37, 1427.  
Purification of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase by affinity and hydrophobic chromatography.
- Hunkapiller, M.W.; Hewick, R.M.; Dreyer, W.J. y Hood, L.E. (1982) en *Methods in Protein Sequence Analysis*, pp. 77-90, M. Elzinga (Ed.), Humana Press, New Jersey.  
A new protein microsequenator using gas phase Edman reagents.
- Hwang, S.H. y Nowak, T. (1986) *Biochemistry* 25, 5590-5595.  
Stereochemistry of phosphoenolpyruvate carboxylation catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Hwang, S.E. y Nowak, T. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 269, 646-663.  
Stereoselective ligand interactions of chicken liver phosphoenolpyruvate carboxykinase with fluorophosphoenolpyruvate.
- Ide, G. y Engelborghs, Y. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11684- 11687.  
Fluorescence quenching and induced dissociation of the tubulin-colchicine complex by iodide.
- Ishii, Y. y Lehrer, S.S. (1990) *Biochemistry* 29, 1160-1166.  
Excimer fluorescence of pyrenyliodoacetamide-labeled tropomyosin: a probe of the state of tropomyosin in reconstituted muscle thin filaments.

- Jabalquinto, A.M. y Cardemil, E. (1992).  
Biochim. Biophys. Acta, en prensa.  
The kinetic mechanism of yeast phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Jadus, M.; Hanson, R.W. and Colman, R.F. (1981) Biochem. Biophys. Res. Comm. 101, 884-892.  
Inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase by the guanosine nucleotide analogue, 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl guanosine.
- Jameson, D.M.; Gratton, E. y Eccleston, J.F. (1987) 26, 3894-3901.  
Intrinsic fluorescence of elongation factor Tu in its complexes with GDP and elongation factor Ts.
- Johnson, R.S.; Bowers, M. y Eaton, Q. (1991) Biochemistry 30, 189-198.  
Preparation and characterization of N-(1-pyrenyl) iodoacetamide-labeled *Escherichia coli* RNA polymerase.
- Jurnak, F. (1985) Science 230,32-36.  
Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins.
- Kazuta, Y.; Omura, Y.; Tagaya, M.; Nakano, K. y Fukui, T. (1991) Biochemistry 30, 8541-8545.  
Identification of lysyl residues located at the substrate binding site in UDP-Glucose pyrophosphorylase from potato tuber: Affinity labelling with uridine di and triphosphopyridoxals.
- Klapper, D.G. (1982) en Methods in Protein Sequence Analysis, pp. 509-15, M. Elzinga (Ed.), Humana Press, New Jersey.  
A new low cost, fully automated aminoacid analyzer.
- Konopka, J.M.; Lardy, H.A. y Frey, P.A. (1986) Biochemistry 25, 5571-5575.  
Stereochemical course of thiophosphoryl transfer catalyzed by cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Kosower, E.M.; Kanety, H.; Dodiuk, H.; Striker, G.; Jovin, T.; Boni, H. y Huppert, D. (1983) J. Phys. Chem. 87, 2479-2484.  
Intramolecular donor-acceptor systems. 7. Solvent dielectric relaxation effects on the photophysics of 6-(phenylamino)-N,N-dimethyl-2-naphthalenesulphonamides.
- Kouyama, T. y Mihashi, K. (1981) Eur.J.Biochem. 114, 33-38.  
Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin.

- Kumar, G.K.; Haase, F.C.; Phillips, N.F.B. y Wood, H.G. (1988) *Biochemistry* 27, 5978-5983. Involvement and identification of a tryptophanyl residue at the pyruvate binding site of transcarboxylase.
- Kurtenbach, E. y Verjovski-Almeida, S. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 9636-9641. Labeling of a thiol residue in sarcoplasmic reticulum ATPase by pyrene maleimide. Solvent accessibility studied by fluorescence quenching.
- Laemmli, V.K. (1970) *Nature* 227, 680-685. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
- Lakowicz, J.R. y Weber, G. (1973) *Biochemistry* 12, 4171-4179. Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond scale.
- Lakowicz, J.R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York.
- Lakowicz, J.R. (1986) *Methods in Enzymology* 131, 518-567. Fluorescence studies of structural fluctuations in macromolecules as observed by fluorescence spectroscopy in the time, lifetime and frequency domains.
- Lane, E. (1957) *Methods in Enzymology*, 3, 451-454. Spectrophotometric and Turbidimetric methods for measuring proteins.
- Leavis, P.C.; Gowell, E. y Tao, T. (1984) *Biochemistry* 23, 4156-4161. Fluorescence lifetime and acrylamide quenching studies of the interactions between troponin subunits.
- Lee, M.H.; Hebda, C.A. y Nowak, T. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12793-12801. The role of cations in avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis.
- Lee, M.H. y Nowak, T. (1984) *Biochemistry* 23, 6506-6513. Phosphorus-31 nuclear relaxation rate studies of the nucleotides on phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Lehrer, S.S. (1971) *Biochemistry* 10, 3254-3263. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion.
- Lehrer, S.S. y Leavis, P.C. (1978a) *Methods in Enzymology*, 49, 4406-4412.
- Lehrer, S.S. y Leavis, P.C. (1978b) *Methods in Enzymology*, 49, 222-236. Solute quenching of protein fluorescence.

- Lewis, C.T.; Seyer, J.M. y Carlson, G.M. (1989a) *J. Biol. Chem.* 264, 27-33.  
Cysteine 288: an essential hyperreactive thiol of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Lewis, C.T.; Haley, B.E. y Carlson, G.M. (1989b) *Biochemistry* 28, 9248-9255.  
Formation of an intramolecular cystine disulfide during the reaction of 8-azidoguanosine 5'-triphosphate with cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) causes inactivation without photolabeling.
- Makinen, A.L. y Nowak, T. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 12148- 12157.  
A reactive cysteine in avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Malebrán, P. y Cardemil, E. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 915, 385-392.  
The presence of functional arginine residues in phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*.
- Martinho, J.M.G. y Winnik, M.A. (1987) *J. Phys. Chem.* 91, 3640-3644.  
Transient effects in pyrene monomer-excimer kinetics.
- Mayes, E.L.V. (1984) en *Molecular Biology Vol.II*, pp.33- 39, Walker, J.M.Ed, Humana Press, New Jersey.
- Means, G.E. y Feeney, R.E. (1971) en *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, San Francisco.
- Medina, V.; Pontarollo, R.; Glaeske, D.; Tabel, H. y Goldie, H. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 7151-7156.  
Sequences of the *pckA* gene of *Escherichia coli* K-12: relevance to genetic and allosteric regulation and homology of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase with the enzyme from *Trypanosoma brucei* and *Saccharomyces cerevisiae*.
- Messmer, C.H. y Kägi, J.H.R. (1985) *Biochemistry* 24, 7172-7178.  
Tryptophan residues of creatine kinase: a fluorescence study.
- Miller, R.S.; Mildvan, A.S.; Chang, H-Ch.; Easterday, R.L.; Maruyama, H. y Lane, M.D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 6030-6040.  
The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. IV. The binding of manganese and substrates by phosphoenolpyruvate carboxykinase and phosphoenolpyruvate carboxylase.
- Montenay-Garestier, T. y Hélène, C. (1971) *Biochemistry* 10, 300-306.  
Reflectance and luminiscence studies of molecular complex formation between tryptophan and nucleic acid components in frozen aqueous solutions.
- Müller, M.; Müller, H. y Holzer, H. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 723-727.  
Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenol pyruvate carboxykinase in *Saccharomyces cerevisiae*.

- Mutai, K.; Gruber, B.A. y Leonard, N.J. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4095-4101.  
Synthetic spectroscopic models. Intramolecular stacking interactions between indole and connected nucleic acid bases. Hypochromism and fluorescence.
- Nordlie, R.C. y Lardy, H.A. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 2259-2263.  
Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities.
- Nowak, T. (1986) en *Manganese in Metabolism and Enzyme Function*, pp 165-191.  
Academic Press, Inc. New York.
- Nowak, T.; Cheng, K-C.; Bazaes, S. y Guidinger, P. (1992) *FASEB J.*, 6, resumen 2715.  
The location of active site residues in mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK).
- Omar, S.B. y Schleich, T. (1981) *Biochemistry* 20, 6371-6378.  
Assessment of the exposure and environments of tryptophanyl residues in ribosomal protein S1 by fluorescence quenching.
- Osteras, M.; Finan, T.M. y Stanley, J. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 230, 257-269.  
Site-directed mutagenesis and DNA sequence of *pckA* of *Rhizobium* NGR234, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase: gluconeogenesis and host-dependent symbiotic phenotype.
- Pawagi, A.B. y Deber, C.M. (1990) *Biochemistry* 29, 950- 955.  
Ligand-dependent quenching of tryptophan fluorescence in human erythrocyte hexose transport protein.
- Pearce, S.F. y Hawrot, E. (1990) *Biochemistry* 29, 10649- 10659.  
Intrinsic fluorescence of binding-site fragments of the nicotinic acetylcholine receptor: perturbations produced upon binding alpha-bungarotoxin.
- Perrella, F.W. (1988) *Anal.Biochem.* 174, 437-447.  
EZ-FIT: A practical curve-fitting microcomputer program for the analysis of enzyme kinetic data on IBM-PC compatible computers.
- Puri, R.N.; Bhatnagar, D. y Roskoski, R. (1985) *Biochemistry* 24, 6499-6508.  
Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: Fluorescent affinity labeling of the catalytic subunit from bovine skeletal muscle with o-phthalaldehyde.
- Reichart, C. (1982) *Pure App. Chem.* 54, 1867-1884.  
Solvent effects on chemical reactivity.
- Ricchelli, F., Beltramini, M., Flamigni, L. y Salvato, B. (1987) *Biochemistry* 26, 6933-6939.  
Emission quenching mechanisms in *Octopus vulgaris* hemocyanin: Steady-state and time-resolved fluorescence studies.

- Ricchelli, F. (1990) J.Photochem. Photobiol. 7, 93-100.  
An investigation of the electronic environment of tryptophan in proteins: reliability of fluorescence quenching experiments.
- Saavedra, C.; Araneda, S. y Cardemil, E. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 267, 38-45.  
Affinity labeling of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase with the 2',3'-dialdehyde derivative of ATP.
- Saito-Nakatsuka, K.; Yamashita, T.; Kubota, I. y Kawakita, M. (1987) J. Biochem. 101, 365-376.  
Reactive sulfhydryl groups of sarcoplasmic reticulum ATPase. I. Location of a group which is most reactive with N-ethylmaleimide.
- Sheu, K-F.; Ho, H-T.; Nolan, L.D.; Markovitz, P.; Richard, J.P. y Utter, M. F. (1984) Biochemistry 23, 1779-1783.  
Stereochemical course of thiophosphoryl group transfer catalyzed by mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Silverstein, R.; Rawitch, A.B. y Grainger, D.A.(1979) Biochem.Biophys. Res.Comm. 87, 911-918.  
Affinity labeling of phosphoenolpyruvate carboxykinase with 1,5-I-AEDANS.
- Somogyi, B.; Papp, S.; Rosenberg, A.; Seres, I.; Matko, J.; Welch, R. y Nagy, P. (1985) Biochemistry 24, 6674-6679.  
A double-quenching method for studying protein dynamics: Separation of the fluorescence quenching parameters characteristic of solvent-exposed and solvent-masked fluorophors.
- Soutar, A.K.; Pownall,H.J.; Hu, A.S. y Smith, L.C. (1974) Biochemistry 13, 2828-2836.  
Phase transitions in bilamellar vesicles. Measurement by pyrene excimer formation and the effect on transacylation by lecithin: cholesterol acyltransferase.
- Stucka, R.; Valdés-Hevia, M.D.; Gancedo, C.; Schwarzlose, C. y Feldman, H. (1988) Nucleic Acids Research 16, 10926.  
Nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Saccharomyces cerevisiae*.
- Tanford, C.(1962) Adv. Protein. Chem. 17, 69-165.  
The interpretation of hydrogen ion titration curves of proteins.
- Tomich, J.M.; Marti, C. y Colman, R.F. (1981) Biochemistry 20, 6711-6720.  
Modification of two essential cysteines in rabbit muscle pyruvate kinase by the guanine nucleotide analogue 5'-p- fluorosulfonylbenzoylguanosine.

- Tonomura, Y.; Sekiya, K. e Imamura, K. (1962) J. Biol. Chem. 237, 3110-3115.  
The optical rotatory dispersion of myosin A. I. Effect of inorganic salt.
- Tortora, P., Hanozet, G.M. y Guerritore, A. (1985) Anal. Biochem. 144, 179-185.  
Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae* and its use for bicarbonate assay.
- Turro, N.J. (1978) Modern Molecular Photochemistry, pp. 141-143,  
Eds. The Benjamin, California.
- Urbina, J.A. y Azavache, V. (1984) Mol. Biochem. Parasitol. 11, 241-255.  
Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes, II, NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase.
- Urbina, J.A. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 258, 186-195.  
The phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes: molecular, kinetic and regulatory properties.
- Utter, M.F. y Kolenbrander, H.M. (1972) The Enzymes, 6, 117-168.  
Formation of oxaloacetate by CO<sub>2</sub> fixation on phosphoenolpyruvate.
- Vasak, M.; Nagayama, K.; Wüthrich, K.; Mertens, M.L. y Kägi, J.H.R. (1979) Biochemistry 18, 5050-5055.  
Creatine kinase. Nuclear magnetic resonance and fluorescence evidence for interaction of adenosine 5'-diphosphate with aromatic residue(s).
- Watford, M.; Hod, Y.; Chiao, Y.B.; Utter, M.F. y Hanson, R.W. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10023-10027.  
The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. The significance of a cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase.
- Watmough, N.J.; Loehr, J.P.; Drake, S.K. y Frerman, F.E. (1991) Biochemistry 30, 1317-1323.  
Tryptophan fluorescence in electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase: fluorescence quenching by a brominated pseudosubstrate.
- Weber, G. (1953) Adv. Prot. Chem. 8, 415-459.  
Rotational brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions.
- Weber, G. (1966), en Fluorescence and Phosphorescence Analysis, pp. 217-240,  
D.M. Hercules (Ed), John Wiley and Sons, New York.  
Polarization of the fluorescence of solutions.

- Weldon, S.L.; Rando, A.; Matathias, A.S.; Hod, Y.; Kalonick, P.A.; Savon, S.; Cook, J. y Hanson, R.W. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7308-7317.  
Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase from the chicken. Comparison of the cDNA and protein sequences with the cytosolic isozyme.
- Wieland, O.; Evertz-Prusse, E. y Strukowsky, B. (1968) *FEBS Lett.* 2, 26-28.  
Distribution of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in human liver.
- Wittinghofer, A. y Pai, E. (1991) *TIBS* 16, 382-387.  
The structure of Ras protein : a model for a universal molecular switch.
- Wu, C.; Yarbrough, L.R. y Wu, F.Y. (1976) *Biochemistry* 15, 2863-2868.  
N-(1-pyrene)maleimide: a fluorescent cross-linking reagent.
- Zachariasse, K.A.; Van Phuc, N. y Kosankiewicz, B. (1981) *J. Phys. Chem.* 85, 2676-2683.  
Investigation of micelles, microemulsions and phospholipid bilayers with the pyridinium N-phenolbetaine ET(30), a polarity probe for aqueous interphases.

## AGRADECIMIENTOS

A María Victoria y Emilio, por su ejemplo y amistad.

A todos mis amigos del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Santiago de Chile.

A los profesores del Instituto de Química de la Universidad Católica de Valparaíso, que nos asesoraron en el uso del fluorímetro GREG-200. El uso de este instrumento fue posible gracias a un proyecto FONDECYT interuniversitario.

Al Dr. R.G. Kemp (Departament of Biological Chemistry and Structure, University of Health Sciences, Chicago, EE.UU.), por la secuenciación de los péptidos marcados con pirenil yodoacetamida.

Al Sr. Pedro Alonso por el suministro de los hígados de rata desde los cuales se purificó la enzima.

Este trabajo fue financiado por los proyectos 90-004 y 91-0446 de FONDECYT, Q-3068-9013 del Departamento Técnico de Investigación de la Universidad de Chile, y 048932 CU de la Dirección de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Santiago de Chile.