

UCH-FC  
DOC-BMCM  
C117  
C. 9

**CONTROL ALOSTÉRICO DE LA OLIGOMERIZACIÓN Y LA  
INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA EN LA  
FOSFOFRUCTOQUINASA-2 de *E. coli*. CONSECUENCIAS  
ESTRUCTURALES DE LA UNIÓN DE LIGANDOS**

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

por

**RICARDO MAURICIO CABRERA PAUCAR**

Marzo, 2004

Directora de Tesis: Dra. Victoria Guixé

Co-director de Tesis: Dr. Jorge Babul

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

RICARDO MAURICIO CABRERA PAUCAR

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 16 de Abril del 2004.

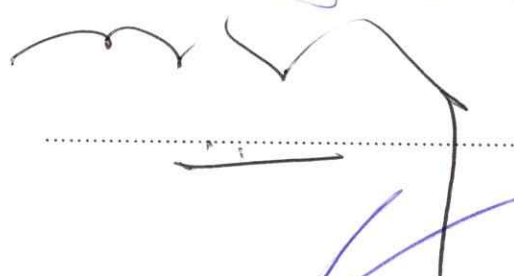
Directora de Tesis:

Dra. Victoria Guixé



Co-director de Tesis

Dr. Jorge Babul



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Osvaldo Alvarez (Presidente)



Dra. Verónica Cambiazo



Dr. Jaime Eyzaguirre



Dr. Mauricio González



*A MI MADRE,  
MARIA SOLEDAD  
SIN CUYO ESFUERZO Y AMOR  
NADA NUNCA HUBIERA SIDO POSIBLE*

## Agradecimientos

A mis tutores Dra. Victoria Guixé y Dr. Jorge Babul, quienes han sido como mis padres, excelentes guías y maestros. Gracias por su confianza.

A Mauricio Báez, por el aporte de sus incansables discusiones, su creatividad para diseñar experimentos e interpretar los resultados y por su amistad.

A los miembros del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, especialmente a Marcela Mancilla, Jenny Alfaro, Andrés Caniuguir y Rafael Parducci, junto a quienes viví jornadas de intenso trabajo y crecimiento intelectual.

Al personal del grupo de cristalografía del Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, especialmente al Dr. Richard C. Garratt, cuya confianza me permitió expandir los alcances de mi trabajo. Gracias también al Dr. Stefano Trapani, Hannes Fischer, Andre Ambrosio y al Dr. Aldo Craievich de la Universidade de São Paulo.

A los miembros del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, especialmente a los Doctores Claudio Vásquez y Claudia Saavedra por su generoso apoyo y amistad.

A los profesores Tito Ureta y Ana Preller, gracias a quienes conocí la bioquímica por primera vez.

Al profesor Carlos Medina por el tiempo invertido en explorar los interesantes caminos y explicaciones de la Biología.

A Helbert Medina y al apoyo de las dos mujeres más importantes de mi vida, María Soledad Paucar y Giselle Saavedra.

## Índice de Materias

Dedicatoria .....	ii
Agradecimientos .....	iii
Índice de materias .....	iv
Lista de Tablas .....	vii
Lista de Figuras .....	viii
Lista de Abreviaturas .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Regulación de la actividad enzimática por cambios en el estado de agregación .....	1
2. Fosfofructoquinasa de <i>E. coli</i> .....	3
3. La regulación alostérica de la actividad enzimática y la oligomerización en Pfk-2 de <i>E. coli</i> . Consecuencias estructurales de la unión de ligandos .....	7
<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
<b>MATERIALES</b> .....	15
1. Cepas bacterianas .....	15
2. Vectores .....	16
3. Partidores mutagénicos. ....	16
4. Reactivos .....	17
<b>MÉTODOS</b> .....	18
1. Medios de Cultivo. ....	18
2. Preparación del DNA plasmidial en escala pequeña.....	18
3. Transformación de <i>E. coli</i> .....	18
3.1 <i>Preparación de células competentes</i> .....	18
3.2 <i>Transformación por pulso de calor</i> .....	19
4. Mutagénesis sitio específica.....	19
5. Secuenciación de las mutantes .....	20
6. Sobreexpresión de Pfk-2 y las proteínas mutantes.....	21
7. Purificación de la Pfk-2 y las proteínas mutantes .....	21
8. Determinación de la actividad enzimática de la Pfk-2 .....	23
9. Mediciones de fluorescencia intrínseca.....	24
10. Mediciones de dicroísmo circular .....	25
11. Cromatografía de exclusión molecular .....	25
12. Proteólisis limitada.....	26
12.1 <i>Reacción de digestión</i> .....	26
12.2 <i>Purificación del intermediario de digestión de 28 kDa</i> .....	27
13. Experimentos de unión de MgATP .....	27
14. Dispersión de rayos-X en ángulos pequeños.....	28
14.1 <i>Colección de datos</i> .....	28
14.2 <i>Cálculo de la probabilidad de distribución de distancias</i> .....	29

14.3	<i>Cálculo ab initio de la estructura de Pfk-2 en baja resolución</i>	29
15.	Modelado de los cambios conformacionales inducidos por ligandos usando los datos de SAXS	30
15.1	<i>Movimiento de dominios</i>	30
15.2	<i>Empacamiento de los dímeros en el tetrámero</i>	30
15.3	<i>Simulación de curvas de SAXS a partir de los modelos atómicos generados y cálculo de la discrepancia con los datos experimentales</i>	31
16.	Cristalografía de rayos-X	32
16.1	<i>Crecimiento de cristales de Pfk-2</i>	32
16.2	<i>Colección de datos</i>	33
16.3	<i>Procesamiento de datos</i>	33
17.	Dispersión dinámica de luz	34
17.1	<i>Colección de datos</i>	34
17.2	<i>Procesamiento de datos</i>	35
18.	Modelado por homología de la estructura de Pfk-2	35
	<b>RESULTADOS</b>	37
I.	ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE Pfk-2	37
1.	Modelado molecular de Pfk-2	37
1.1	<i>Selección de moldes para el modelado de Pfk-2</i>	37
1.2	<i>Alineamiento con baja identidad de secuencia</i>	40
1.3	<i>Modelado y evaluación de los modelos generados</i>	42
2.	Importancia funcional de aminoácidos conservados en la familia PfkB en la catálisis enzimática de Pfk-2	46
3.	Cristalización y análisis cristalográfico preliminar de Pfk-2 acomplejada con MgATP	51
II.	EFFECTO DE LA UNIÓN DE LIGANDOS SOBRE LA ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA DE Pfk-2	58
1.	Dispersión de rayos-X en ángulos pequeños (SAXS)	58
1.1	<i>Curvas SAXS de Pfk-2 en presencia y ausencia de ligandos</i>	59
1.2	<i>Modelado de cambios conformacionales inducidos por ligandos usando los datos de SAXS</i>	61
a.	<i>Estructura de Pfk-2 en ausencia de ligandos y en presencia de fructosa-6-P</i>	61
b.	<i>Estructura de Pfk-2 unida a MgATP. Empacamiento tetramérico de las subunidades</i>	63
1.3	<i>Estructura en baja resolución de la Pfk-2</i>	67
2.	Estudios de proteólisis limitada	70
2.1	<i>Efecto de ligandos sobre la susceptibilidad a proteólisis de Pfk-2 en presencia y ausencia de ligandos</i>	70
2.2	<i>Caracterización del intermediario proteolítico de 28 kDa</i>	72
III.	REGULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y LA OLIGOMERIZACIÓN DE Pfk-2	76
1.	Mecanismo de tetramerización de Pfk-2 inducida por la unión de MgATP al sitio alostérico	76

1.1	<i>Análisis de unión de MgATP al sitio alostérico de Pfk-2</i> .....	76
1.2	<i>Estado de agregación de Pfk-2 determinado por dispersión dinámica de luz</i> .....	80
a.	<i>Efecto de la concentración de proteína sobre el estado de agregación de Pfk-2</i> .....	82
b.	<i>Tetramerización inducida por MgATP a distintas concentraciones de proteína</i> .....	84
2.	Mecanismo de inhibición de la actividad enzimática de Pfk-2 por unión de MgATP al sitio alostérico.....	87
2.1	<i>Efecto de la unión de MgATP al sitio alostérico sobre el sitio activo</i> .....	88
2.2	<i>Efecto de la unión de fructosa-6-P al sitio activo sobre el sitio alostérico</i> .....	90
	<b>DISCUSION</b> .....	93
I.	<b>ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE Pfk-2</b> .....	94
1.	Modelado molecular de Pfk-2.....	96
2.	Participación de aminoácidos conservados en la familia PFKB en la catálisis enzimática de Pfk-2.....	96
3.	Cristalización y análisis cristalográfico preliminar del complejo Pfk-2- MgATP .....	99
II.	<b>EFFECTO DE LA UNIÓN DE LIGANDOS SOBRE LA ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA DE Pfk-2</b> .....	102
1.	Modelado de cambios conformacionales inducidos por ligandos usando los datos de SAXS.....	102
1.1	<i>Estructura de Pfk-2 en ausencia de ligandos y en presencia de fructosa-6-P</i> .....	102
1.2	<i>Estructura de Pfk-2 unida a MgATP. Empacamiento tetramérico de las subunidades</i> .....	103
2.	Estudios de proteólisis limitada.....	105
III.	<b>REGULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y LA OLIGOMERIZACIÓN DE Pfk-2</b> .....	108
1.	Mecanismo de tetramerización de Pfk-2 inducida por la unión de MgATP al sitio alostérico .....	108
2.	Mecanismo de inhibición de la actividad enzimática de Pfk-2 por unión de MgATP al sitio alostérico.....	110
	<b>Proyecciones de la Tesis</b> .....	113
	<b>Publicaciones generadas por la Tesis hasta la fecha de su presentación</b> .....	114
	<b>REFERENCIAS</b> .....	115

Lista de Tablas

Tabla 1	Parámetros cinéticos de Pfk-2 y de las mutantes D256N y E190Q. ....	50
Tabla 2	Parámetros y valores finales del procesamiento de los datos obtenidos para el cristal del complejo Pfk-2+MgATP.....	56



## Lista de Figuras

Figura 1	Plegamiento de la familia PFKB .....	9
Figura 2	Proteínas de la familia PFKB con estructura conocida. ....	39
Figura 3	Estructura dimérica de la quinasa putativa, riboquinasa y desoxigluconato quinasa. ....	39
Figura 4	Árbol no enraizado de miembros de la familia PFKB. ....	41
Figura 5	Motivos conservados en el alineamiento múltiple de las quinasa de azúcares-fosfato. ....	43
Figura 6	Motivos conservados en el alineamiento múltiple de las quinasa de ribosa, fructosa y fructosa-6-P.....	44
Figura 7	Modelado por homología y evaluación de la estructura de Pfk-2. ....	45
Figura 8	Conservación de glutámico 190 en la familia PFKB y su participación en la catálisis. ....	47
Figura 9	Conservación de aspártico 256 en la familia PFKB y su participación en la catálisis. ....	47
Figura 10	Espectros de dicroísmo circular de la Pfk-2 nativa y de las mutantes E190Q y D256N. ....	49
Figura 11	Inhibición por MgATP en las mutantes E190Q y D256N. ....	49
Figura 12	Esquema del método de cristalización por difusión de vapor en gota colgante. ....	52
Figura 13	Fotografía de los cristales del complejo Pfk-2+MgATP.....	52
Figura 14	Patrón de difracción característico del complejo Pfk-2+MgATP. ....	53
Figura 15	Proyección estereográfica perpendicular al eje z (sección $\kappa =$ $180^\circ$ ) de la función de auto-rotación del complejo Pfk-2- MgATP.....	57
Figura 16	Curvas de dispersión de rayos-X de Pfk-2 libre y unida a ligandos. ....	60
Figura 17	Función de distribución de distancias de Pfk-2 libre y unida a ligandos. ....	62
Figura 18	Modelado de los cambios conformacionales inducidos por fructosa-6-P.....	64
Figura 19	Generación de modelos tetraméricos.....	66
Figura 20	Optimización de los modelos tetraméricos.....	66
Figura 21	Estructura de los tetrámeros optimizados.....	68
Figura 22	Imagen estereográfica de la superposición estructural de los modelos optimizados con la superficie molecular determinada por SAXS. ....	69
Figura 23	Proteólisis limitada de Pfk-2 con tripsina en presencia y ausencia de ligandos. ....	71
Figura 24	Proteólisis limitada de Pfk-2 con subtilisina. ....	71
Figura 25	Purificación del intermediario 28 kDa producido por digestión con subtilisina en presencia de fructosa-6-P 1mM. ....	73
Figura 26	Estado de agregación del intermediario de 28 kDa. ....	73
Figura 27	Unión de ligandos al intermediario de 28 kDa. ....	74

Figura 28	Mediciones de unión de MgATP a Pfk-2 por el método cromatográfico de Hummel-Dreyer. ....	77
Figura 29	Gráfico de Scatchard para la unión de MgATP a Pfk-2. ....	77
Figura 30	Dispersión dinámica de luz de Pfk-2. ....	81
Figura 31	Función de autocorrelación para diferentes concentraciones de Pfk-2. ....	83
Figura 32	Efecto de la concentración de proteína sobre el estado de agregación de Pfk-2. ....	83
Figura 33	Efecto de la tetramerización de Pfk-2 inducida por MgATP sobre las medidas de dispersión dinámica de luz. ....	85
Figura 34	Tetramerización inducida por MgATP de Pfk-2. ....	85
Figura 35	Efecto de la concentración de proteína sobre la tetramerización inducida por MgATP. ....	86
Figura 36	Efecto de la concentración de MgATP sobre la Km para fructosa-6-P. ....	89
Figura 37	Cinética del cambio en el estado de agregación de Pfk-2. ....	92
Figura 38	Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la $K_{0.5}$ de tetramerización para MgATP. ....	92

## Lista de Abreviaturas

ADP	adenosina 5'-difosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
fructosa-6-P	D-fructosa-6-fosfato
GDP	guanosina 5'-difosfato
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	isopropiltiogalactósido
MgATP	adenosina 5'-trifosfato acomplejada con magnesio
PFK	fosfofructoquinasa
rpm	revoluciones por minuto
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
s	segundos
min	minutos
h	horas
Å	Angstrom
g	gramo
x g	aceleración de gravedad
grad	grados
l	litro
$K_m$	constante de Michaelis-Menten
$K_d$	constante de disociación
$k_{cat}$	constante catalítica
$K_{0.5}$	concentración de ligando que produce la mitad del efecto observado
U	unidad internacional de enzima, $\mu$ moles de sustrato procesado por minuto
u.a.	unidades arbitrarias
CdM	centro de masa
$\nu$	moles de ligando unido por mol de proteína
SAXS	small angle X-ray scattering
DLS	dynamic light scattering

## RESUMEN

La fosforilación de fructosa-6-P dependiente de ATP es una etapa importante de la vía glicolítica y está sujeta a múltiples mecanismos de regulación en una amplia variedad de organismos. La fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *Escherichia coli*, pertenece a la familia de quinasas de azúcares PFKB. Es un homodímero cuya actividad enzimática no es sensible a los efectores alostéricos de Pfk-1, pero presenta inhibición por su sustrato MgATP cuando el ensayo de actividad se realiza a bajas concentraciones de fructosa-6-P. Esta inhibición está asociada a la formación de tetrámeros debido a la unión de MgATP a un sitio alostérico, y es revertida a altas concentraciones de fructosa-6-P. Estudios *in vivo* en cepas de *E. coli* que poseen una forma mutada de Pfk-2 que no presenta inhibición por MgATP, indican que la pérdida de esta propiedad regulatoria afecta la fisiología del metabolismo de los hidratos de carbono. Experimentos de fluorescencia intrínseca, que afectan la señal del único triptofano presente en Pfk-2, aportan pruebas de cambios conformacionales inducidos por la unión de fructosa-6-P al sitio activo y MgATP al sitio alostérico.

El objetivo central de este trabajo es determinar cómo se relacionan los cambios conformacionales inducidos por los ligandos con el mecanismo de la regulación alostérica de la actividad enzimática y estudiar la función, en la catálisis, de aminoácidos conservados en la familia PFKB.

Dado que la estructura de la Pfk-2 no ha sido resuelta experimentalmente, ésta fue modelada usando como moldes las estructuras de la riboquinasa de *E. coli* y la quinasa putativa de *Thermothoga maritima*, de la familia PFKB, que presentan 26 y 21%

de identidad de secuencia con la Pfk-2, respectivamente. Debido al bajo porcentaje de identidad, el alineamiento con los moldes fue optimizado mediante la generación de alineamientos con múltiples secuencias de la familia PFKB y la imposición de restricciones para la introducción de interrupciones, a partir de la información de la estructura tridimensional de los moldes. La estructura modelada presenta dos dominios, uno mayor y uno menor, entre los cuales se ubica el sitio activo. El dominio menor forma parte de la interfase entre las subunidades en el dímero. Dentro de las regiones conservadas que forman parte del sitio activo en el modelo, se encuentran los residuos Glu190 y Asp256, cuya función en la catálisis, deducida a partir de las estructuras resueltas, fue evaluada mediante la caracterización cinética de mutantes sitio-específicas. El reemplazo de Glu190 por Gln produce una disminución de 60 veces en la  $k_{cat}$  y un incremento en la  $K_m$  para MgATP de 4 veces, respecto de la enzima silvestre. El reemplazo de Asp256 por Asn disminuye 10.000 veces la  $k_{cat}$  e incrementa al doble la  $K_m$  para fructosa-6-P, respecto de la enzima silvestre. Estos resultados indican que Asp256 corresponde al residuo catalítico de la enzima y que Glu190 participa en la catálisis y probablemente está relacionado con la unión de MgATP. Además, se realizó un análisis preliminar por cristalografía de rayos-X, de cristales de proteína del complejo Pfk-2-MgATP. El análisis de la función de auto-rotación del mapa de Patterson es consecuente con la presencia de un tetrámero en la unidad asimétrica, constituido como un dímero de dímeros. Los parámetros de evaluación obtenidos después del escalonamiento y promediación de los datos, indican que sería posible usarlos para resolver la fase mediante Sustitución Molecular.

Para determinar los efectos de la unión de fructosa-6-P al sitio activo y de MgATP al sitio alostérico sobre la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima, se usó la dispersión de rayos-X en ángulos pequeños (SAXS), una técnica sensible a cambios en la forma y en el estado oligomérico de las proteínas. En presencia de fructosa-6-P el dímero sufre una disminución en su radio de giro. El cambio conformacional asociado a esta compactación fue modelado mediante movimientos de cuerpo rígido de los dominios mayores en el modelo dimérico, evaluando la discrepancia entre los datos calculados a partir de estos modelos y los datos experimentales. Los resultados sugieren que en ausencia de ligandos el dímero se encuentra en una conformación abierta, en la que los sitios activos están expuestos al solvente, y que la unión de fructosa-6-P aproxima los dominios sobre el sitio activo (conformación casi cerrada). De la misma manera, se modeló el empacamiento y la conformación de las subunidades en el tetramero, es decir, generando modelos tetraméricos con modificaciones sistemáticas de la inclinación relativa y la distancia de los centros de masa entre dímeros con diferentes rotaciones de dominios. El modelo tetramérico que satisface mejor los datos experimentales presenta una disposición casi paralela de los dímeros y una distancia de 36 Å entre sus centros de masa, con una conformación cerrada de los sitios activos. También, los cambios estructurales inducidos por la unión de los ligandos, se evaluaron mediante proteólisis limitada. Se usaron proteasas con diferentes especificidades, observándose en todos los casos que la unión de fructosa-6-P confiere una protección parcial, mientras que la unión de MgATP al sitio alostérico protege completamente de la digestión. Cuando la digestión se realiza con subtilisina y en presencia de fructosa-6-P 1 mM ocurre la estabilización de un intermediario de 28 kDa, que carece del extremo

carboxilo terminal. Este intermediario es inactivo, dimérico y no se tetrameriza en presencia de MgATP; sin embargo, une fructosa-6-P con una constante de disociación similar a la de la enzima nativa, y une MgATP con un comportamiento hiperbólico.

Con el objetivo de plantear un modelo general que integre los procesos implicados en la regulación alostérica de la enzima, se determinó la correlación entre la unión de MgATP al sitio alostérico, el cambio en el estado de agregación y la inhibición de la actividad enzimática. El efecto de la concentración de proteína sobre la curva de unión de MgATP en gráficos de Scatchard sugiere que la tetramerización inducida por MgATP corresponde a un equilibrio *mediado* por el nucleótido. Esto implica que no existe un equilibrio de asociación en ausencia de MgATP y que a mayor concentración de proteína se necesitan menos moles de MgATP por mol de proteína para completar el paso de dímero a tetrámero. Ambas predicciones fueron corroboradas experimentalmente, evaluando los cambios en el radio hidrodinámico de la proteína como prueba de cambios en el estado de agregación, por dispersión dinámica de luz (DLS). Por otra parte, la inhibición por MgATP puede explicarse mediante dos mecanismos alternativos, en un caso, la unión de MgATP al sitio alostérico produce una enzima que presenta una afinidad menor por fructosa-6-P, mientras que en el otro caso, la unión de MgATP al sitio alostérico es mutuamente excluyente con la unión de fructosa-6-P al sitio activo. La dependencia lineal de la  $K_m$  aparente para fructosa-6-P con la concentración de MgATP y de la  $K_{0.5}$  de tetramerización para MgATP con la concentración de fructosa-6-P, sugieren que probablemente la unión es mutuamente excluyente entre el sitio alostérico y el sitio activo.

Considerando en su conjunto estos resultados, se propone un modelo para la regulación alostérica de Pfk-2 por MgATP. En ausencia de ligandos la Pfk-2 se encuentra en una conformación abierta, con el sitio activo expuesto al solvente. Cuando fructosa-6-P se une al sitio activo, ocurre un movimiento de dominios que favorece una conformación casi cerrada del sitio activo, la cual presentaría una mayor afinidad por el nucleótido para la formación del complejo ternario. La unión de MgATP al sitio alostérico promueve una conformación completamente cerrada del sitio activo que bloquea la entrada de fructosa-6-P (y por lo tanto impide la catálisis), haciendo la unión de estos ligandos mutuamente excluyente. La tetramerización del complejo Pfk-2-MgATP desplaza el equilibrio de unión del nucleótido hacia la forma unida al ligando, consolidando el efecto inhibitorio.



## ABSTRACT

The ATP-dependent fructose-6-P phosphorylation is an important highly regulated step of glycolysis in several organisms. The phosphofructokinase-2 (Pfk-2) from *Escherichia coli* belongs to the PFKB family of sugar kinases is inhibited by its substrate MgATP at low fructose-6-P concentrations. This inhibition is related to the binding of MgATP to an allosteric site, which also promotes the tetramerization of the dimeric enzyme, and is reversed at high fructose-6-P concentrations. *In vivo* experiments, using *E. coli* strains harboring a mutant Pfk-2 insensible to MgATP inhibition, highlighted the importance of this regulatory mechanism for the physiology of carbohydrate metabolism. Evidence for the fructose-6-P and MgATP-induced conformational changes came from experiments using the single-tryptophan fluorescence signal.

The central purpose in this work is to determine how the ligand induced conformational changes are related to the mechanism of allosteric regulation of Pfk-2, and to study the catalytic function of conserved amino acid residues in the PFKB family.

The structure of Pfk-2 was built by homology modelling, since it has not been solved experimentally. The templates used were the ribokinase from *E. coli* and a putative quinase from *Thermotoga maritima*, which have 21 and 26% sequence identity with Pfk-2, respectively. Due to these low identities the alignment with the templates was optimized by using multiple sequence alignments with PFKB family members and including restraints derived from the templates for gap introduction in the alignment. The structure generated has two domains, one larger than the other, with the active site

located in the cleft formed between them. The monomer-monomer interface in the dimer is formed by the intertwining of the minor domains in each subunit. The role in catalysis of the conserved residues, Glu190 and Asp256 (located within the active site in the model) was inferred from equivalent residues in solved structures and evaluated by kinetic characterization of site-specific mutants. A decrease of 60 times in  $k_{\text{cat}}$  and an increment of 4 times in  $K_m$  for MgATP was observed with the replacement of Glu190 by Gln. Notably, the replacement of Asp256 by Asn produced a 10,000 fold decrease in  $k_{\text{cat}}$  with only a twofold increment in the  $K_m$  for fructose-6-P. These results indicate that Asp256 corresponds to a catalytic residue of Pfk-2 and Glu190 participates in catalysis, probably related to MgATP binding. A preliminar X-ray diffraction analysis was performed on crystals of the Pfk-2-MgATP complex. Patterson map self-rotation analysis is consistent with the presence of a tetramer in the asymmetric unit, with a dimer of dimers molecular symmetry. According to the evaluation values obtained after data scaling and merging, it would be possible to use the collected data to solve the phase by means of Molecular Substitution.

Small angle X-ray scattering (SAXS), a technique sensitive to changes in protein shape and oligomeric state of proteins, was used to determine the effect of active site binding of fructose-6-P and allosteric site binding of MgATP on tertiary and quaternary structure of Pfk-2. In the presence of fructose-6-P, the radius of gyration of the dimer is decreased. The conformational change that accounts for this compactation was modelled by rigid body movements of the major domains and the discrepancy between the calculated data from the models with the experimental data was evaluated. The results suggest that in the absence of ligands the dimer is in a solvent-exposed open active site

conformation, which changes to an almost closed conformation when fructose-6-P is bound. Using the same approach, the packing and conformation of the subunits in the tetramer was modelled by systematic modifications of the relative shear angle and the center of mass distance between dimers with different domain rotations. A nearly parallel configuration and a 36 Å distance between the center of mass of the dimers with a closed active site conformation, was found to satisfy the experimental data better. The ligand-induced structural changes were also evaluated by limited proteolysis. In the presence of fructose-6-P a partial protection against proteolytic cleavage was observed regardless the specificity of the assayed protease, whereas a complete protection is conferred by the allosteric binding of MgATP, in the same experimental conditions. In the presence of 1mM fructose-6-P, subtilisin digestion produces a stable 28 kDa intermediary, which lacks the native carboxy terminus. This intermediary was found to be inactive, dimeric and unable to tetramerize in the presence of MgATP, although it binds fructose-6-P (with a  $K_d$  similar to the native enzyme) and MgATP in an hyperbolic fashion.

In order to integrate the mechanism involved in the allosteric regulation of the enzyme in a general model, the correlation between MgATP binding to the allosteric site, the tetramerization and the inhibition of enzymatic activity was determined. The effect of protein concentration on the Scatchard plots of the MgATP binding curves, suggests that MgATP-induced tetramerization follows a nucleotide-mediated equilibrium. This means that there is no aggregation equilibrium in the absence of MgATP, and upon increasing protein concentration, a lower number of moles of ligand per mole of protein will be needed to complete the dimer-tetramer transition. Both

predictions were experimentally tested by evaluating the changes in the hydrodynamic radius of the protein as an indication of changes in the aggregation state, by means of dynamic light scattering (DLS) measurements. Two alternative mechanisms can be used to explain MgATP inhibition. In one hand, allosteric binding of MgATP can produce a low fructose-6-P affinity enzyme. On the other hand, allosteric MgATP binding and active-site fructose-6-P binding can be mutually exclusive. The linear dependence of the apparent  $K_m$  for fructose-6-P with MgATP concentration and the  $K_{0.5}$  for the MgATP induced tetramerization with fructose-6-P concentration, suggests that the latter mechanism is valid.

From these results, a model is proposed to account for the MgATP allosteric regulation of Pfk-2. In the absence of ligands, Pfk-2 is found in an open solvent-exposed active site conformation. Upon fructose-6-P binding to the active site, an almost closed conformation of the active site is promoted by domain movement, which increases the nucleotide affinity for ternary complex formation. With MgATP binding to the allosteric site, a fully closed active site conformation is induced, which blocks the entrance of fructose-6-P (thereby impeding catalysis), making mutually exclusive the ligand binding at each site. Tetramerization of the Pfk-2-MgATP complex displaces the nucleotide binding equilibrium to the ligated form, further enhancing the inhibitory effect.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Regulación de la actividad enzimática por cambios en el estado de agregación

La unión de un ligando a un sitio alostérico puede afectar la actividad enzimática por medio de cambios conformacionales que pueden ser acompañados de cambios en el estado de agregación, los que tienen como consecuencia la activación o la inhibición de la actividad enzimática.

Aunque la regulación de la actividad enzimática por efectores alostéricos se ha estudiado ampliamente, los casos en que la regulación involucra cambios en el estado de agregación, son menos entendidos. Un ejemplo del control alostérico de la oligomerización es la enzima glicerol quinasa de *Escherichia coli* (*E. coli*), que es inhibida por la unión de fructosa-1,6-bisP a un sitio alostérico (Zwaig y col., 1970). La inhibición de esta enzima constituye el mecanismo primario de regulación por el cual la concentración de glucosa controla la utilización de glicerol *in vivo* en *E. coli* (Holtman y col., 2001). La glicerol quinasa presenta un equilibrio dímero-tetramero, en el que ambas especies unen fructosa-1,6-bisP y donde la forma tetramérica es favorecida en presencia del ligando (Yu y Pettigrew, 2003). El requerimiento de la formación del tetramero para el control de la actividad por fructosa-1,6-bisP ha sido demostrado en experimentos de mutagénesis sitio-específica, donde la perturbación de la interfaz tetramérica produce dímeros insensibles a la inhibición por fructosa-1,6-bisP (Liu y col., 1994).

Un caso análogo lo constituye la enzima ribonucleótido reductasa de mamíferos. Esta enzima presenta regulación de la actividad enzimática en la subunidad catalítica, R2, debido al efecto de la unión de ligandos en R1, la subunidad regulatoria (Reichard y

col., 2000). La unión alostérica de nucleótidos y desoxi-nucleósidos trifosfato a tres clases de sitios en R1 determina la formación de especies enzimáticas de distinto estado oligomérico, las cuales difieren en actividad y especificidad por el sustrato (Kashlan y col., 2002). Esto destaca la importancia del estado de agregación como mecanismo de regulación de la actividad de esta enzima por la unión de efectores alostéricos (Cooperman y Kashlan, 2003).

Por otra parte, en la enzima carbamoil-P sintetasa de *E. coli*, se ha demostrado que la regulación alostérica por la ornitina, el IMP y el UMP (Anderson y Marvin, 1968), está sujeta cambios en el estado oligomérico de la enzima, la cual es un heterodímero ( $\alpha\beta$ ) en su estado nativo (Anderson, 1986). La ornitina y el IMP actúan como activadores alostéricos y favorecen la formación de un tetrámero tipo  $(\alpha\beta)_4$ , mientras que el UMP inhibe la actividad de la enzima y estabiliza la forma  $(\alpha\beta)_2$  (Kim y Raushel, 2001).

El mecanismo por el cual el cambio en el estado de agregación contribuye al efecto del ligando sobre la actividad de la enzima, puede ser variado. Puede ocurrir que la interfaz oligomérica constituya el sitio de unión del ligando o que la agregación afecte la accesibilidad del sustrato al sitio activo. Sin embargo, cuando la unión del ligando, *per se*, produce cambios conformacionales que afectan la actividad, la agregación puede ser un mecanismo por el cual se desplace el equilibrio de unión hacia la formación del complejo, consolidando el efecto activador o inhibitorio. Determinar dicho mecanismo es importante para entender las bases estructurales que subyacen al importante fenómeno biológico de la regulación de la actividad enzimática.

## 2. Fosfofructoquinasas de *E. coli*

En la glicólisis, la actividad fosfofructoquinasa, la fosforilación dependiente de ATP de fructosa-6-P, es una etapa importante de la vía que está sujeta a múltiples mecanismos de regulación en una amplia variedad de organismos. En *E. coli* esta actividad es llevada a cabo por dos enzimas, Pfk-1 y Pfk-2, las que difieren en sus propiedades cinéticas y estructurales.

Pfk-1 ha sido ampliamente estudiada y se conoce su estructura tridimensional (Shirakihara y Evans, 1988). La enzima es un homotetrámero, que presenta inhibición por la unión alostérica de fosfoenolpiruvato y activación por ADP y GDP. Ambos ligandos compiten por la unión al mismo sitio alostérico, pero no afectan el estado de agregación de la enzima. Los sustratos, MgATP y fructosa-6-P, se unen al sitio activo con un mecanismo cinético al azar y presentan antagonismo, es decir, la unión del primer sustrato disminuye la afinidad de la enzima por el segundo sustrato (Deville-Bonne y col., 1991; Johnson y Reinhart, 1992; Zheng y Kemp, 1992). Además, se ha observado que MgATP inhibe la actividad de Pfk-1 a concentraciones de fructosa-6-P por bajo de la  $K_m$ . Este fenómeno ha sido explicado mediante dos propuestas alternativas. Zheng y Kemp (1992), plantean la existencia de dos vías cinéticas en un mecanismo al azar, en equilibrio lento. En la primera vía, MgATP se une primero al sitio activo y fructosa-6-P después, y es una vía lenta. En la segunda vía, MgATP se une después que fructosa-6-P y es cinéticamente más rápida que la primera. Entonces, a concentraciones bajas de fructosa-6-P, la vía cinética usada cambiará desde la vía rápida hacia la vía lenta a medida que la concentración de MgATP se incrementa, produciendo la inhibición observada. Por otra parte, Johnson y Reinhart (1992) ofrecen una

explicación alternativa basada en la interacción antagonista entre la unión de MgATP a un sitio activo y la unión de fructosa-6-P a un sitio activo diferente en el tetrámero. Según este modelo, la inhibición por MgATP ocurre porque al saturarse los sitios activos con MgATP, la afinidad por fructosa-6-P decae dramáticamente, pasando del rango micromolar al milimolar. En experimentos con tetrámeros híbridos, que poseen solamente un sitio activo funcional, se ha observado que estos no presentan inhibición, lo cual señala que es necesaria la interacción entre sitios activos en diferentes subunidades para dar cuenta de la inhibición por MgATP (Fenton y Reinhart, 2003).

Pfk-2 es un homodímero cuya estructura tridimensional no ha sido resuelta. La actividad de Pfk-2 no es sensible a los efectores alostéricos de Pfk-1, pero también presenta inhibición por MgATP cuando el ensayo de actividad se realiza a bajas concentraciones de fructosa-6-P, la cual es revertida a mayores concentraciones de este sustrato (Guixé y Babul, 1985). Pfk-2 presenta un orden estricto en la adición de sustratos al sitio activo, en el cual fructosa-6-P es el primer sustrato que se une a la enzima, de manera que MgATP no se une si fructosa-6-P no se ha unido primero (Campos y col., 1984). No obstante, experimentos de fluorescencia, usando como sonda intrínseca el único triptofano que posee la enzima (Trp 88), demuestran que en ausencia de fructosa-6-P, MgATP se une a la proteína causando un apagamiento de la emisión de fluorescencia (Guixé y col., 1998). Esto, junto con pruebas experimentales de cinética enzimática, apoyan la existencia de un sitio alostérico para la unión de MgATP. Además, en presencia de MgATP la enzima pasa de dímero a tetrámero, como ha sido observado en experimentos de centrifugación en gradiente de densidad y filtración molecular (Guixé y Babul, 1988; Guixé, 2000). Así, la unión de MgATP al sitio



alostérico está relacionada con la inhibición de la actividad enzimática, observada a bajas concentraciones de fructosa-6-P, y con cambios en el estado de agregación de la enzima.

Por lo tanto, Pfk-2 representa un sistema apropiado para estudiar los fenómenos asociados de unión alostérica y cambios en el estado de agregación, como parte del mecanismo regulatorio de la actividad de una enzima que cataliza una reacción importante de la vía glicolítica. El hecho que MgATP actúe como sustrato y como inhibidor alostérico, añade un grado más de dificultad, que hace que el problema de la regulación en esta enzima, sea aún más interesante.

En *E. coli* se ha estudiado el efecto fisiológico de la pérdida de la inhibición alostérica por MgATP en Pfk-2 sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y la velocidad de crecimiento (Torres y col., 1997). Cepas con niveles similares de Pfk-1 o Pfk-2 crecen a velocidades comparables sobre fuentes de carbono glicolíticas y gluconeogénicas (Daldal y col., 1982). Una cepa que posee una mutante de Pfk-2 (Tyr 23 → Asp), que no presenta inhibición alostérica por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P, no presenta problemas de crecimiento en fuentes de carbono glicolíticas (tiempo de duplicación de 90 - 95 min) pero crecen significativamente más lento sobre sustratos gluconeogénicos (tiempo de duplicación de 350 - 450 min). Experimentos *in vivo*, de flujo por marcación reversa en condiciones de metabolismo gluconeogénico usando la cepa mutante, muestran un alto nivel de marcación radioactiva de fructosa-1,6-bisP, a partir de glucosa uniformemente marcada con [ $^{14}\text{C}$ ], lo que indica una alta actividad fosfofructoquinásica. En condiciones gluconeogénicas, donde la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa está activa, lo anterior implica la hidrólisis de fructosa-1,6-bisP

a fructosa-6-P, lo cual genera un ciclo fútil, con un consumo continuo de ATP. De este modo, la falta de sensibilidad a la inhibición por MgATP en la Pfk-2 mutante, tiene como consecuencia una falta de regulación entre las vías glicolítica y gluconeogénica, lo cual afecta negativamente el crecimiento de la cepa mutante. Estos estudios constituyen un ejemplo importante de la ausencia de una propiedad regulatoria, estudiada *in vitro*, y su impacto en el metabolismo *in vivo* de la bacteria.

Hay que destacar que Pfk-2 no presenta patrones de secuencia conservados que permitan asociarla con Pfk-1, y por lo tanto, ninguna propiedad puede ser inferida de la estructura tridimensional de esta última. Pfk-1 pertenece a la familia de enzimas PFKA, que incluye a la mayoría de fosfofructoquinasas dependientes de ATP y pirofosfato que se encuentran en los dominios *bacteria* y *eucarya* (Ronimus y Morgan, 2001). Por su parte, Pfk-2 esta relacionada a una familia de quinasas de azúcares, denominada familia PFKB, que incluye a quinasas de ribosa, fructosa, fructosa-1-P, adenosina y tagatosa-6-P (Bork y col., 1993). Las estructuras resueltas por cristalografía de rayos-X, de proteínas representativas de cada familia (Evans y col., 1981; Shirakihara y Evans, 1988; Sigrell y col., 1998; Mathews y col., 1998; Schumacher y col., 2000), muestran diferencias notables en sus estructuras terciarias. Esto resalta la convergencia funcional, a nivel de actividad enzimática y de inhibición por el sustrato MgATP, entre dos proteínas que presentan discrepancias fundamentales a nivel del plegamiento y la geometría del sitio activo.

Respecto del mecanismo catalítico de Pfk-1, las pruebas estructurales, cinéticas y estereoquímicas sugieren que la transferencia del grupo fosfato involucra un ataque nucleofílico “en línea” por el grupo hidroxilo de fructosa-6-P sobre el fosfato- $\gamma$  del ATP

(Shirakihara y Evans, 1988; Blangy y col., 1968; Jarvest y col., 1981). La función en la catálisis de aminoácidos presentes en el sitio activo de Pfk-1 ha sido determinada en estudios de mutagénesis sitio-específica (Berger y Evans, 1992). Debido a que Pfk-1 y Pfk-2 catalizan la misma reacción, es importante examinar el nivel de convergencia en la función de los residuos de aminoácidos, en sus respectivos sitios activos. Sin embargo, un análisis comparativo entre las funciones de aminoácidos en el sitio activo de ambas enzimas requiere del conocimiento de la estructura tridimensional de la Pfk-2.

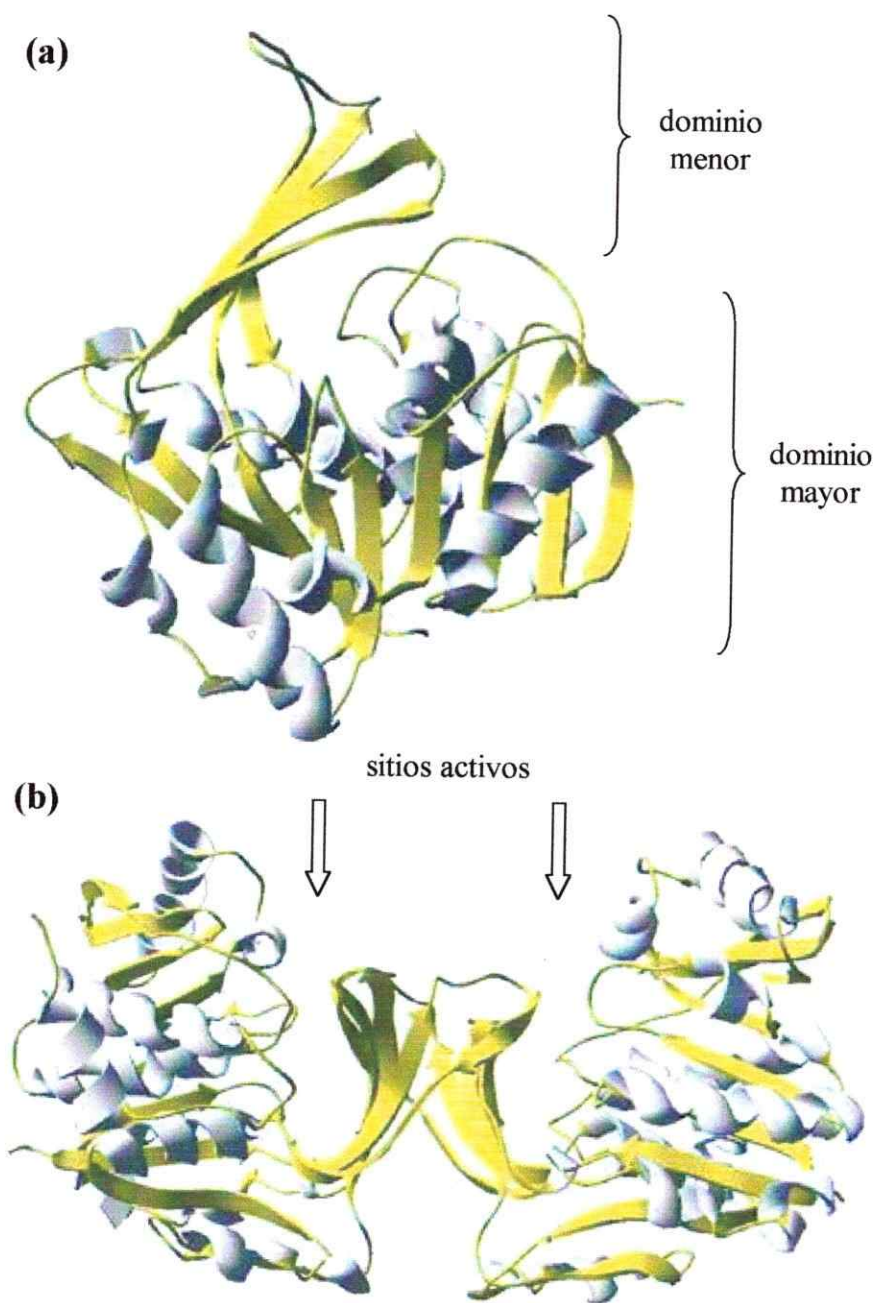
### **3. La regulación alostérica de la actividad enzimática y la oligomerización en Pfk-2 de *E. coli*. Consecuencias estructurales de la unión de ligandos**

En los estudios de la relación entre estructura y función de proteínas, es indispensable contar con un modelo de la estructura tridimensional, con resolución atómica, de la proteína estudiada. En ausencia de una estructura cristalográfica, es posible modelar la estructura *in silico* a partir de las estructuras resueltas de proteínas homólogas, en un proceso denominado modelado por homología (o modelado comparativo). La efectividad del modelado por homología depende del porcentaje de identidad entre la proteína homóloga con estructura resuelta (molde) y la proteína estudiada (objetivo). Un bajo porcentaje de identidad de secuencia dificulta el correcto alineamiento entre las secuencias del molde y la secuencia objetivo. El alineamiento determina cuales residuos de aminoácidos en la secuencia objetivo son asignados como estructuralmente equivalentes a sus contrapartes en la estructura molde. En los casos de modelado con baja identidad de secuencia, es importante contar con estrategias de refinamiento para mejorar la calidad del alineamiento. De acuerdo con lo anterior, es

posible construir un modelo por homología para la Pfk-2 basándose en las estructuras resueltas de proteínas de la familia PFKB, presentes en la base de datos del Protein Data Bank (PDB, Berman y col., 2000).

Las enzimas de la familia PFKB, cuya estructura ha sido resuelta, presentan una identidad de secuencia por debajo de 25%. Sin embargo, sus estructuras muestran una gran conservación a nivel del plegamiento y la estructura del sitio activo (Sigrell y col., 1998; Mathews y col., 1998; Schumacher y col., 2000). Por ejemplo, la desviación RMS (raíz cuadrada del promedio de la distancia al cuadrado) para los carbonos- $\alpha$  superpuestos entre la riboquinasa de *E. coli* y la adenosina quinasa de humano es de 2,4 Å, aunque la identidad de secuencia es de sólo un 22%. El plegamiento en esta familia de proteínas consta de dos dominios (figura 1a): un dominio mayor, que contiene una sábana- $\beta$  central rodeada por  $\alpha$ -hélices, y un dominio menor. El sitio activo se encuentra en la hendidura formada entre ambos dominios. En la riboquinasa, el dominio menor corresponde a una sábana  $\beta$  que se empaqueta ortogonalmente con el dominio menor de la otra subunidad, constituyendo la interfaz de dimerización (figura 1b). En el dominio pequeño de las adenosina quinasas hay inserciones de  $\alpha$ -hélice que impiden la formación de dímeros y, por lo tanto, estas enzimas son monoméricas.

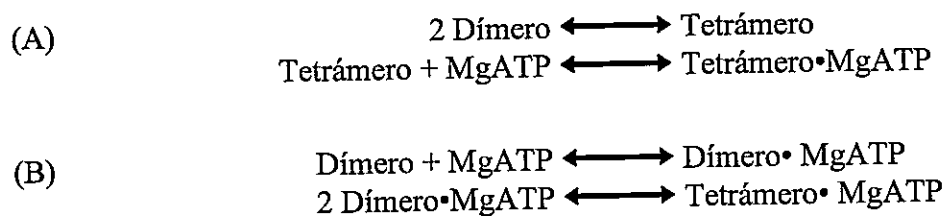
La comparación de la forma libre y la forma unida al azúcar en las estructuras de riboquinasa de *E. coli* y adenosina quinasa de *Toxoplasma gondii*, revela un cambio conformacional importante, que puede ser descrito como la rotación del dominio mayor sobre el dominio menor (Sigrell y col., 1999; Schumacher y col., 2000). Este movimiento ayuda a la unión del segundo sustrato (MgATP) y por lo tanto, a la catálisis. Los experimentos de fluorescencia intrínseca en Pfk-2, indican que la unión del sustrato



**Figura 1. Plegamiento de la familia PFKB.** (a) Estructura del monómero de la riboquinasa de *E. coli*. Los elementos de estructura secundaria aparecen como cintas. Las hélices- $\alpha$  se muestran en gris, las hebras- $\beta$  y los lazos, se muestran en amarillo. Se señalan las regiones correspondientes al dominio menor y al mayor. El sitio activo se encuentra en la hendidura formada entre ambos dominios. (b) Estructura del dímero de la riboquinasa de *E. coli*. Se señala la ubicación de los sitios activos.

azúcar en Pfk-2 afecta las propiedades del ambiente químico alrededor de W88, sin afectar el estado dimérico de la enzima. Sin embargo, dado que no se dispone de una estructura para la Pfk-2, no es posible determinar si el efecto de la unión de fructosa-6-P al sitio activo es similar al descrito para las enzimas homólogas mencionadas. Lo mismo es cierto para los efectos de la unión de MgATP al sitio alostérico. Existe una correlación entre el cambio de estado de agregación y los efectos de la unión sobre la fluorescencia intrínseca de la enzima, pero no se conoce la naturaleza estructural del cambio conformacional, ni de que manera se asocian los dímeros para formar el tetramero. Esto permitiría saber si la inhibición es una consecuencia directa de un cambio conformacional inducido por MgATP o si, por lo contrario, la tetramerización es necesaria para la inhibición.

El estudio de la regulación alostérica de la actividad enzimática y el cambio en el estado de agregación de Pfk-2, implica determinar los mecanismos de inhibición y tetramerización inducidos por MgATP. Respecto de la asociación inducida por la unión de un ligando, existen dos modelos para explicar el cambio en el estado de agregación (Cann, 1978). En un caso, denominado agregación *facilitada*, existe un equilibrio de agregación, el que es desplazado hacia la forma agregada, debido a que esta presenta mayor afinidad por la unión del ligando. En el segundo caso, denominado agregación *mediada* por ligando, existe un equilibrio de unión y solamente la forma unida es capaz de agregar. En este caso no existe asociación en ausencia del ligando. El siguiente esquema ilustra los equilibrios de asociación facilitada (A) y mediada (B) por MgATP para Pfk-2:



Estos mecanismos predicen comportamientos diferentes en la unión del ligando y el estado de agregación, con respecto a la concentración de proteína y, por lo tanto, es posible diferenciarlos experimentalmente. Sin embargo, no se han realizado experimentos que permitan discernir cual de estos mecanismos opera en la asociación inducida por MgATP en Pfk-2.

En este trabajo, que estudia la relación estructura-función de la Pfk-2 de *E. coli*, se abordó la obtención de la estructura de la Pfk-2 por modelado por homología y preliminarmente por determinación experimental por cristalografía de rayos-X. Mediante el uso del modelo propuesto, se caracterizó la función de ciertos aminoácidos considerados importantes en la catálisis, y el efecto de la unión de los ligandos sobre la estructura terciaria y cuaternaria de la Pfk-2. También se estudió el mecanismo de agregación y la interacción entre los sitios de unión de los ligandos (sitio activo y sitio alostérico), para proponer un modelo de la regulación alostérica de la actividad enzimática y la oligomerización en Pfk-2. La problemática abordada en este trabajo no ha sido resuelta previamente y constituye una parte fundamental respecto de la comprensión de una propiedad regulatoria cuya importancia fisiológica ha sido demostrada experimentalmente (Torres y col., 1997).

Se estudió la función de los residuos de aminoácidos, presentes en el sitio activo del modelo de Pfk-2, que presentan una conservación absoluta en el alineamiento generado para la familia PFKB. La función de estos residuos fue asignada, a partir de las estructuras homólogas cristalizadas en presencia de sustratos, considerando sus interacciones con estas moléculas.

El efecto de la unión de los ligandos, fructosa-6-P y MgATP, al sitio activo y al sitio alostérico, respectivamente, sobre la estructura de la Pfk-2, se estudió mediante dos enfoques. El primero es la caracterización de los cambios en tamaño y forma de la Pfk-2, inducidos por la unión de los ligandos, por la técnica de dispersión de rayos-X en ángulos pequeños (Small Angle X-ray Scattering, SAXS). En un experimento de SAXS, una muestra de proteína en solución, es irradiada con rayos-X y la intensidad de dispersión es registrada como función del ángulo de dispersión. Los perfiles de SAXS obtenidos contienen información respecto de la estructura cuaternaria y terciaria (en baja resolución) de las proteínas. La dispersión de rayos-X ha sido usada en diversos estudios, en conjunto con modelos estructurales, para determinar cambios conformacionales de proteínas en solución (Fetler y Vachette, 2001; Shilton y col., 2002, Matsushima y col., 2000). La segunda aproximación, es la caracterización del patrón de corte proteolítico de la Pfk-2 en presencia y ausencia de los ligandos. Mediante esta técnica es posible obtener, en conjunto con información de la estructura del modelo, indicios acerca de cambios conformacionales y de regiones en la proteína involucradas en funciones como unión de ligandos, catálisis o asociación entre subunidades.



Se caracterizó el estado de agregación de la Pfk-2 en distintas condiciones experimentales, por medidas de dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS). En esta técnica se analiza el curso temporal de la adquisición de fotones dispersados por una muestra de proteína en solución. Las fluctuaciones aleatorias en dicho curso temporal contienen información acerca del movimiento browniano de las proteínas en la muestra. A partir de estos datos es posible obtener, mediante un análisis estadístico, el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico de la proteína. Utilizando DLS es posible estudiar las propiedades hidrodinámicas de las proteínas en condiciones "reales" de solución, sin recurrir a procesos forzados de separación, como en los experimentos de filtración molecular y sedimentación.

En resumen, como resultado de este trabajo, se obtuvo un modelo para la estructura tridimensional del dímero y del tetrámero de Pfk-2; se caracterizó la función de aminoácidos putativamente presentes en el sitio activo y se modelaron los cambios en la estructura terciaria producidos por la unión de los ligandos, fructosa-6-P y MgATP. Además, se determinó el mecanismo por el cual MgATP induce la tetramerización y la inhibición de la actividad enzimática de Pfk-2. En su conjunto, los resultados presentados describen las bases estructurales de las propiedades regulatorias de la fosfofructoquinasa-2 de *E. coli*.

## OBJETIVOS

Los objetivos generales de esta tesis son: i) *proponer un modelo para la estructura tridimensional de Pfk-2 y a partir de este modelo estudiar la función en el sitio activo de aminoácidos conservados en la familia PFKB*; ii) *estudiar el efecto de la unión de ligandos sobre la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima*; y iii) *determinar un mecanismo para la regulación alostérica de la actividad y la oligomerización de la enzima.*

De acuerdo con los objetivos generales, se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Modelado por homología de Pfk-2.
- Evaluación de la participación de aminoácidos conservados en la familia PFKB en la catálisis enzimática de Pfk-2, mediante mutagénesis sitio-específica.
- Estudio de los cambios conformacionales inducidos por ligandos, mediante la técnica de dispersión de rayos-X en ángulos pequeños y mediante proteólisis limitada.
- Determinación del mecanismo de tetramerización de Pfk-2, mediante el análisis de la unión de MgATP al sitio alostérico y del efecto de la concentración de proteína sobre el estado de agregación, por dispersión dinámica de luz.
- Determinación del mecanismo de la inhibición de la actividad enzimática por la unión de MgATP al sitio alostérico de Pfk-2.
- Análisis cristalográfico preliminar de Pfk-2.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

#### 1. Cepas bacterianas

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

La cepa de *E. coli* DF1020 (*pro82, Δpfb201, recA56, Δ-(rha-pfkA), endA1, hsdR17, supE44*) que carece de fragmentos en los genes de ambas fosfofructoquinazas, *pfk-1* y *pfk-2* (Daldal, 1983), fue co-transformada con los plásmidos pET 21-d (que contiene el gen mutante de Pfk-2) y pGP1-2 (que contiene el gen de la RNA polimerasa del fago T7), para la expresión de las mutantes de Pfk-2.

Las cepas de *E. coli* JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiD(lac-proAB)*) y DH5α (*supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) fueron usadas para ensayos de transformación y extracción de plásmidos.

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

## 2. Vectores

El vector pET 21-d de Novagen (Madison, WI, USA) se utilizó para la sobreexpresión de la Pfk-2 silvestre y sus mutantes (927 pares de bases). Este vector posee un tamaño aproximado de 5.400 pares de bases y contiene un gen cuyo producto confiere resistencia a ampicilina. El gen de la Pfk-2 fue clonado entre los sitios de corte de las endonucleasas NcoI (que conserva el codón de inicio) y BamHI, conservándose el codón de término original del gen, de manera que el producto génico no contiene ninguna fusión. El gen clonado se encuentra bajo el control del promotor T7, y para su transcripción es necesario proveer de una fuente de la RNA polimerasa del fago T7 en la bacteria hospedera.

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

## 3. Partidores mutagénicos

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

Aspártico 256 por Asparagina:

5'-ACCGTTGGCGCTGGTAACAGCATGGTCGGCGCG-3'

3'-TGGCAACCGCGACCATTGTCGTACCAGCCGCGC-5'

Glutámico 190 por Glutamina:

5'-GGTTAAGCCTAACCAAAAACAACTCAGTGCGCTGGTGAATCG-3'

3'-CCAATTCGGATTGGTTTTGTTGAGTCACGCGACCACTTAGC-5'

El triplete de bases subrayado corresponde al codón del aminoácido reemplazado, y en negrita aparece la base sustituida.

Los partidores para Asp256 fueron sintetizados por Keystone Labs (Camarillo, CA, USA) a través de Biosonda (Chile) y los partidores para Glu190 fueron sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) a través de Bios Chile (Chile).

#### 4. Reactivos

Las enzimas aldolasa, triosa fosfato isomerasa y  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, tripsina, subtilisina y proteinasa K, el NADH, los estándares de calibración de peso molecular, los sustratos fructosa-6-P y ATP, fueron adquiridos de SIGMA Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

## **MÉTODOS**

### **1. Medios de Cultivo**

#### **1.1 *Luria Broth (LB)***

Se puso 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura sobre 900 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7,0 antes de aforar a 1 l y esterilizar en autoclave.

#### **1.2 *NZY<sup>+</sup>***

Se puso 10 g de casaminoácidos, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl sobre 900 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7,5 antes de aforar a 1 l y esterilizar en autoclave. Previo al uso, se agregaron 12,5 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M, 12,5 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M y 10 ml de glucosa 2 M.

### **2. Preparación del DNA plasmidial en escala pequeña**

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

### **3. Transformación de *E. coli***

#### **3.1 *Preparación de células competentes***

Para obtener células en fase exponencial se inoculó 1 ml de LB con una colonia de la cepa receptora y se incubó durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente se inoculó 50 ml de medio LB con 250 µl del cultivo anterior y se incubó a 37° C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,3 a 550 nm. Seguidamente se

dejó en hielo por 10 min y después se centrifugó a 5.000 rpm a 4° C por 10 min en una centrifuga Sorvall usando el rotor SS34. El sedimento de bacterias fue resuspendido en 25 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, estéril y fría (en hielo). Esta solución se dejó en hielo por 30 min y después se centrifugó a 5.000 rpm como más arriba. El sedimento se resuspendió en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, estéril y fría y se dejó incubando por 4 h antes de la transformación.

### ***3.2 Transformación por pulso de calor***

Se puso 100 µl de células competentes en tubos Eppendorf de 500 µl, fríos (en hielo) a los que se agregó 1 µl de una solución de DNA plasmidial y se dejó incubando en hielo por 30 min, para permitir que el DNA se adhiriera a las bacterias. Seguidamente, la mezcla fue sometida a un pulso de temperatura a 42° C por 40 s y después se dejó en hielo por 1 min. Después se agregó 400 µl de medio LB tibio (37° C) y se dejó agitando a 37° C por una hora para la recuperación de las bacterias. Finalmente se sembró 100 µl de células en placas que contenían el antibiótico apropiado, dependiendo del plásmido utilizado para la transformación. Las placas fueron dejadas por toda la noche a 37° C o hasta la aparición de las colonias recombinantes.

## **4. Mutagénesis sitio específica**

Para las mutaciones sitio-específicas se utilizó el sistema QuickChange<sup>®</sup> de Stratagene (La Jolla, CA, USA). El procedimiento básico utiliza como molde el plásmido que contiene el gen silvestre de Pfk-2 y como partidores dos oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación deseada. Para la

reacción de amplificación se usó un volumen de 50  $\mu$ l, 10 ng de plásmido molde, 125 ng de ambos oligonucleótidos mutagénicos y 2,5 U de la enzima *PfuTurbo*<sup>®</sup> DNA polimerasa de Stratagene (La Jolla, CA, USA). Para las reacciones de amplificación se usó un termociclador TGradient de Biometra<sup>®</sup> (Goettingen, Germany). Para la amplificación del plásmido mutante se usó un protocolo de 30 ciclos de 95° C por 1 min (desnaturación), 56° C por 1 min (templado) y 68° C por 14 min (extensión). Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

La DNA polimerasa *PfuTurbo* extiende e incorpora los oligonucleótidos mutagénicos generando un plásmido mutado que contiene un corte en cada hebra. El producto de amplificación fue tratado directamente con 10 U de la endonucleasa *Dpn* I para degradar el plásmido parental metilado.

Se utilizó 1  $\mu$ l del DNA tratado con *Dpn* I para transformar 50  $\mu$ l de bacterias XL1-Blue *supercompetent cells* (suministradas en el kit) que reparan los cortes. La transformación se realizó por el método del pulso de calor, usando 0,5 ml de medio NZY+ precalentado a 42° C para la recuperación de las células. Finalmente, se sembró 100  $\mu$ l de la solución de células transformadas sobre placas de agar que contenían el antibiótico apropiado y fueron incubadas por toda la noche a 37° C.

## **5. Secuenciación de las mutantes**

La secuencia de bases nitrogenadas del DNA de las mutantes se encargó al laboratorio del Dr. Víctor Cifuentes de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.



## **6. Sobreexpresión de Pfk-2 y las proteínas mutantes**

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

En el caso de las cepas transformadas que contenían el plásmido pGP1-2 y el vector pET 21-d con el gen mutante clonado, el cultivo de noche y el cultivo de 2 l, mencionados arriba, fueron incubados a 30° C. Después de que el cultivo de 2 l llegó a una absorbancia de 0,4 a 580 nm, se realizó la inducción de la polimerasa T7 para la sobreexpresión de la proteína mutante, por incubación a 42° C por 20 min. Seguidamente el cultivo fue transferido a 37° C por 4 h. Las bacterias inducidas se colectaron como se indicó anteriormente.

## **7. Purificación de la Pfk-2 y las proteínas mutantes**

El sedimento de las bacterias inducidas, colectado por centrifugación, se resuspendió en 100 ml de la solución A: amortiguador fosfato de potasio 20 mM, pH 7,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 28,6 mM y glicerol 5%. La suspensión de bacterias fue lisada en un sonicador Sonifier modelo W185 (Heat

Systems-Ultrasonics, INC - Plainview, NY, USA) usando la sonda grande, mediante la aplicación de pulsos de 30 s de sonicado (potencia 10) y 30 s de enfriamiento en hielo. El lisado se centrifugó en una centrífuga Beckman modelo L5-50B, durante 30 min a 35.000 rpm usando un rotor Ti50.2 a 4° C. El líquido sobrenadante se aplicó sobre una columna de hidroxilapatita equilibrada en la solución A y después la columna se lavó con 300 ml de la misma solución A. La Pfk-2 se eluyó con 600 ml de un gradiente lineal de 20 a 150 mM de fosfato de potasio en la solución A.

Las fracciones con actividad fosfofructoquinasa se concentraron por ultrafiltración hasta un volumen final de 30 ml mediante el uso de una membrana Amicon PM10 (Beverly, MA USA). La enzima concentrada se dializó contra la solución B: amortiguador Tris-HCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 28,6 mM y glicerol 5%. El dializado se aplicó sobre una columna de Azul de Cibacron-Sefarosa equilibrada en la solución B. Después de lavar la columna con 50 ml de solución B y luego con 100 ml de la solución B + KCl 100 mM, la enzima se eluyó con 100 ml de la solución B, KCl 100 mM y ATP 1mM. El conjunto de las fracciones con actividad fosfofructoquinasa fue dializado contra la solución B y re-cromatografiado en una columna de Azul de Cibacron-Sefarosa y eluído de la manera descrita. La actividad específica de la enzima pura fue de 100 U/mg. La preparación enzimática se dividió en varias porciones y se guardó en glicerol 50% a -20° C, condiciones en las cuales la actividad enzimática era estable por varios meses. El rendimiento era aproximadamente de 20 a 30 mg de enzima por 2 l de cultivo original.

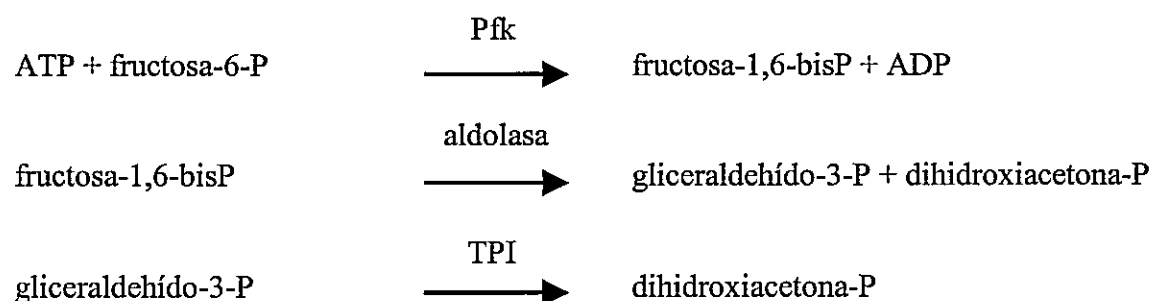
Previamente a cada experimento, se tomaba un pequeño volumen de la preparación enzimática purificada y concentrada para quitar el glicerol y los otros componentes del amortiguador por filtración en el sistema HiTrap™ Desalting Column de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) equilibrado en el amortiguador apropiado para el experimento.

Para la purificación de las enzimas mutantes, se usó el protocolo descrito para la enzima nativa, excepto que el proceso de la purificación fue controlado detectando la presencia de la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida usando el método de Laemmli (1970), ya que su actividad enzimática era muy baja o despreciable.

El grado de pureza obtenido para la enzima silvestre y las mutantes, determinado mediante electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalantes, fue superior a un 95%.

### 8. Determinación de la actividad enzimática de la Pfk-2

La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente, acoplando la producción de fructosa-1,6-bisP a la oxidación de NADH, mediante el uso de las enzimas auxiliares aldolasa, triosafosfato isomerasa (TPI) y  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa (GDH), según el esquema que se indica a continuación:





La cuantificación de fructosa-1,6-bisP se hacía midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH y calculando el número de  $\mu\text{moles}$  de este compuesto, usando un coeficiente de extinción molar de  $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Kornberg y Pricer, 1953). La mezcla de reacción contenía amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 8,2,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, NADH 0,2 mM, fructosa-6-P 1 mM, ATP 1 mM y una mezcla de 40  $\mu\text{g}$  de aldolasa, 3  $\mu\text{g}$  de triosafosfato isomerasa y 30  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, en un volumen final de 0,5 ml (ensayo estándar). En los experimentos cinéticos, las concentraciones de fructosa-6-P y ATP se variaron según se indica. La reacción se iniciaba mediante la adición de la Pfk-2.

### 9. Mediciones de fluorescencia intrínseca

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro Perkin-Elmer LS 50 a temperatura ambiente (aprox.  $25^\circ \text{C}$ ). La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y se colectaron espectros de emisión entre 300 y 500 nm, usando aperturas de excitación y emisión de 5 nm. A cada espectro se le substrajo el registro del amortiguador en ausencia de proteína. Para los experimentos de titulación se usó pequeños volúmenes de soluciones concentradas de ATP o fructosa-6-P sobre la solución que contenía la enzima, corrigiendo después por el factor de dilución de la proteína. Los experimentos fueron realizados en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, DTT 1 mM y la concentración de proteína fue de 80  $\mu\text{g/ml}$ . El análisis de

los datos fue realizado usando el programa Grams/386<sup>®</sup> de Galactic Industries Corp (Main Street Salem, NH, USA).

La saturación fraccional de la unión de cada ligando fue determinada a partir de la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de ligando adicionada mediante el uso de la siguiente fórmula:

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

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

#### **10. Mediciones de dicroísmo circular**

Los espectros de dicroísmo circular fueron determinados en un espectropolarímetro JASCO J-715 (Essex, UK). Se midió en el rango UV-lejano usando una celda con 1 mm de paso óptico. Las muestras contenían amortiguador Tris-HCl 25 mM, pH 8,2, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM y una concentración de proteína de 250 µg/ml. Para eliminar el ruido se promedió 16 determinaciones del espectro. Los datos son representados en términos de la elipticidad observada, en unidades de miligrados.

#### **11. Cromatografía de exclusión molecular**

Se usó una columna de filtración en gel Bio-Sil<sup>®</sup> SEC 250 de BioRad (Hercules, CA, USA) con dimensiones de 300 mm x 7.8 mm, usando un sistema de HPLC Waters

1525 con bombas binarias. El amortiguador de elución contenía amortiguador Tris-HCl 25 mM, pH 8,2, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT, 2 mM y KCl 0,2 M. La columna se cargó con 20 µl de muestra de con un flujo de 1 ml/min. La absorbancia del líquido eluído fue medida continuamente a 280 y 260 nm con un detector dual Waters 2487. Se usó las siguientes proteínas como estándares de calibración de peso molecular: tiroglobulina (670.000), IgG (158.000), ovoalbumina (44.000), mioglobina (17.000), vitamina B<sub>12</sub> (1.350). Los datos fueron analizados con el programa GRAMS/386®.

## **12. Proteólisis limitada**

### **12.1 *Reacción de digestión***

Para estudiar la cinética de digestión se incubó a 37° C soluciones de Pfk-2 que contenían 1 mg/ml de proteína, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, en ausencia de ligandos y en presencia de ATP o fructosa-6-P 1 mM. El cuociente de masa entre la proteasa y la Pfk-2 fue de 1:100 para tripsina, 1:150 para proteinasa K y 1:300 para subtilisina. La reacción fue iniciada mediante la adición de un volumen pequeño de la proteasa. Se tomaron muestras de la mezcla de reacción a distintos tiempos para realizar mediciones de actividad enzimática (la reacción de proteólisis se detuvo por dilución de la muestra en el medio de ensayo) y análisis electroforético por el método de Laemmli (1970) en geles de poliacrilamida al 11,5%. Después de teñir los geles con azul de Coomasie, se cuantificaron las bandas por análisis densitométrico, mediante el uso del programa Sigma Scan (Jandel Scientific Corp. – San Rafael, CA, USA).

### **12.2 Purificación del intermediario de digestión de 28 kDa**

La Pfk-2 fue digerida en presencia de fructosa-6-P 1 mM por 60 min en un volumen de reacción de 4 ml, de acuerdo a lo descrito en "Reacción de digestión". Después de la digestión, la muestra fue separada por HPLC en una columna MonoQ HR 5/5 equilibrada en amortiguador Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y DTT 2 mM a un flujo de 1 ml/min. La muestra fue eluída usando un gradiente lineal de 257 mM a 550 mM de NaCl. Bajo estas condiciones, el volumen de elución del intermediario de 28 kDa fue de 8,9 mL. La pureza de la muestra fue evaluada por electroforesis en condiciones denaturantes, usando el método de Laemmli (1970).

### **13. Experimentos de unión de MgATP**

Para cuantificar la unión de este ligando se utilizó el procedimiento cromatográfico de Hummel y Dreyer (Cann y Hinman, 1976). La filtración en gel fue realizada según se describe en "Cromatografía de exclusión molecular". Después de equilibrar la columna con amortiguador de corrida más una determinada concentración de ATP, una muestra de proteína equilibrada en el mismo solvente, a la misma concentración de ATP es cargada en la columna y se registra la absorbancia del eluído a 260 nm (máximo de absorción del nucleótido). En esas condiciones una cantidad de ligando, determinada por la constante de disociación del complejo y la concentración de ligando libre, se une a la proteína y migra con ella. Por lo tanto, el ligando unido aparece como un pico en el volumen de elución de la proteína y dado que el ligando libre se encuentra a una concentración menor que la concentración de ligando total (usada para equilibrar la columna), se produce un valle en el volumen de elución del ligando. Los

moles de ligando unido se calculan a partir del área del valle y del coeficiente de extinción molar del ATP a 260 nm ( $15.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Las curvas de unión son analizadas por medio de gráficos de Scatchard, en los que se grafica  $v$  (los moles de ligando unido por mol de Pfk-2) dividido por la concentración del ligando libre, versus  $v$ . La intersección en el eje de la abscisa corresponde al número de sitios para MgATP por monómero de Pfk-2.

#### **14. Dispersión de rayos-X en ángulos pequeños**

##### **14.1 Colección de datos**

Los datos de dispersión de rayos-X fueron colectados en la línea de SAXS del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) usando un detector unidimensional (Kellermann y col., 1997) y una longitud de onda de  $\lambda = 1.488 \text{ \AA}$ . Se midieron muestras de Pfk-2 en amortiguador Tris-HCl 25 mM, pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y DTT 5 mM a dos concentraciones de proteína, en ausencia y presencia de ligandos. La concentración menor de proteína se usó para adquirir los datos de baja resolución, mientras que la concentración mayor fue usada para los datos de alta resolución, empleando distancias de detector de 631,2 y 1260 mm que combinados cubrieron el intervalo de  $q$  entre  $0,01 \text{ \AA}^{-1}$  y  $0,55 \text{ \AA}^{-1}$  ( $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ , donde  $\theta$  es la mitad del ángulo de dispersión). En ausencia de ligandos y en presencia de concentraciones saturantes de MgATP, las concentraciones altas y bajas de proteína fueron 4,2 y 30 mg/ml. En presencia de concentraciones saturantes de fructosa-6-P, las concentraciones altas y bajas de proteína fueron 5 y 25 mg/ml. Se tomó registros durante varios intervalos (8-10)



de 15 s y se restaron las curvas del amortiguador en ausencia de proteína de las curvas de soluciones de proteína.

#### **14.2 *Cálculo de la probabilidad de distribución de distancias***

La función de distribución de distancias intramoleculares  $p(r)$  y el radio de giro de la proteína en distintas condiciones fueron calculados por transformada de Fourier indirecta usando el programa GNOM (Svergun, 1992).

#### **14.3 *Cálculo ab initio de la estructura de Pfk-2 en baja resolución***

La estructura en baja resolución de la proteína fue calculada usando el procedimiento descrito por Svergun (Svergun y col., 2001) e implementado en el programa GASBOR. En este método, el empaquetamiento de un conjunto de pseudo-residuos (esferas) es modificado de modo de minimizar la discrepancia entre la curva de SAXS experimental y la calculada a partir del empaquetamiento. La posición espacial relativa de estos pseudo-residuos intenta ser similar a la posición relativa promedio de los carbonos alfa en una estructura de proteína. Para la estructura final de la proteína libre y en presencia de fructosa-6-P se usó 618 pseudo-residuos (el número de aminoácidos en el dímero) y una simetría molecular P2. Para la estructura final del tetramero, se usó 1236 pseudo-residuos, suponiendo una simetría P222.

## **15. Modelado de los cambios conformacionales inducidos por ligandos usando los datos de SAXS**

### **15.1 *Movimiento de dominios***

Para modelar la apertura y cierre de los dominios se eligió como modelo la riboquinasa en su conformación abierta (en ausencia de sustratos) y cerrada (en presencia de ribosa) cuyos códigos PDB son 1RKA y 1RKD, respectivamente. Para definir los dominios quasi-rígidos, los residuos flexibles de interconexión y los ejes de rotación, se usó el programa DynDom (Hayward y Berendsen 1998). De acuerdo con lo descrito para riboquinasa los dominios mayores en el dímero se cierran, rotando sobre los dominios pequeños asociados en la interfaz. El dímero de la Pfk-2 modelado por homología fue sobrepuesto sobre el dímero de riboquinasa y los residuos en el dominio mayor fueron rotados rígidamente tomando como ejes los encontrados para riboquinasa, usando el programa MOLEMAN2 ([http://xray.bmc.uu.se/usf/moleman2\\_man.html](http://xray.bmc.uu.se/usf/moleman2_man.html)). Las curvas de SAXS simuladas para el dímero en cada ángulo de rotación modelado fueron ajustadas con las curvas experimentales usando el programa CRY SOL (Svergun y col., 1995), según se describe más adelante.

### **15.2 *Empacamiento de los dímeros en el tetrámero***

Dos copias de un dímero fueron alineadas poniendo sus centros de masa (CdM) en el origen de un sistema de referencia ortogonal,  $xyz$ , con sus ejes de orden 2 alineados a lo largo de  $x$  y sus momentos de inercia mayores a lo largo de  $y$  (programa MOLEMAN). Después de rotar uno de los dímeros en  $180^\circ$  a lo largo de  $y$ , los dímeros fueron trasladados en direcciones opuestas a lo largo de  $x$ , obteniéndose las

configuraciones tetraméricas I y II, dependiendo de la dirección de traslado. Se obtuvo varios modelos tetraméricos, aplicando rotaciones alrededor de  $x$  (para variar la inclinación) y translaciones a lo largo de  $x$  (para variar la distancia CdM) sobre uno de los dímeros, manteniendo fijo el otro. Para cada una de estas configuraciones se utilizó dímeros con distintos ángulos de rotación de dominios. Las curvas de SAXS simuladas para cada configuración fueron comparadas con la curva experimental de Pfk-2 en presencia de MgATP.

### ***15.3 Simulación de curvas de SAXS a partir de los modelos atómicos generados y cálculo de la discrepancia con los datos experimentales***

Las curvas de SAXS se calcularon a partir de las coordenadas de los modelos modificados por movimientos de cuerpo rígido, usando el programa CRY SOL, el cual rodea la macromolécula con una cubierta de hidratación de 0,3 nm, con una densidad ajustable ( $\rho_b$ ). La curva de dispersión se calcula mediante la fórmula:

$$I(q) = \left\langle \left| A_a(q) - \rho_s A_s + \delta\rho_b A_b(q) \right|^2 \right\rangle_{\Omega} \quad [3]$$

donde  $A_a(q)$  es la amplitud de la dispersión de la proteína en el vacío,  $A_s$  y  $A_b(q)$  son las amplitudes de la dispersión del volumen excluido y de la cubierta de hidratación, respectivamente, y  $\rho_s$  es la densidad del solvente. La notación  $\Omega$ , corresponde al promedio en todas las direcciones.

CRYSOL calcula la discrepancia,  $\chi$ , de acuerdo con la fórmula:

$$\chi = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[ \frac{I(q_j) - I_{\text{exp}}(q_j)}{\sigma(q_j)} \right]^2} \quad [4]$$

donde  $I_{\text{exp}}(q_j)$  y  $\sigma(q_j)$  denotan la intensidad experimental del punto  $j$  en el eje  $q$  y su desviación estándar, respectivamente, y  $N$  es el número de puntos experimentales evaluados.

## 16. Cristalografía de rayos-X

### 16.1 Crecimiento de cristales de Pfk-2

El método utilizado fue el de difusión de vapor en gota colgante, con un volumen de 500  $\mu\text{l}$  de solución madre en el reservorio y una mezcla de 2  $\mu\text{l}$  de muestra por 2  $\mu\text{l}$  de solución del reservorio en la gota. Inicialmente, se ensayaron diversas condiciones variando tanto la concentración de proteína (4 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) como la concentración de sales, agentes precipitantes y pH, mediante el uso de la batería de soluciones *factorial screen 1* y *2*, provistas por Hampton Research Corp (Aliso Viejo, CA, USA). Las gotas fueron observadas al microscopio de luz inmediatamente después de la preparación, al día siguiente, a la semana siguiente y al mes siguiente. Posteriormente, se optimizaron las condiciones mediante la inclusión de aditivos en las condiciones de cristalización. Se obtuvieron cristales de diversas geometrías y tamaños en presencia de fructosa-6-P y MgATP y en presencia de cloruro de guanidinio 0,1 - 0,2 M.

## 16.2 *Colección de datos*

Los experimentos de difracción de rayos-X de los complejos Pfk-2-MgATP y Pfk-2-fru-6-P fueron realizados a temperaturas criogénicas (100° K) en flujo de nitrógeno, con adición de agentes crioprotectores a diferentes concentraciones, en la solución madre. Se utilizó etilen glicol como agente crioprotector en concentraciones entre 10 y 20%. La colección de datos de difracción de rayos-X fue realizada en el Laboratorio de Cristalografía de Proteínas del Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, utilizando un generador de rayos-X de tipo ánodo rotatorio RIGAKU ultraX 18 con sistema de adquisición MAR345 dtb (placa de imagen), a una longitud de onda de 1,5418 Å (Cu-K $\alpha$ ).

Se obtuvo un conjunto de datos mediante el método de rotación a partir de un cristal de dimensiones aproximadas de 0,4 mm  $\times$  0,2 mm  $\times$  0,05 mm. Un total de 240 imágenes ( $\Delta\phi/\text{foto} = 0,5^\circ$ ) fueron registradas durante un tiempo de exposición de 10 min por foto. Los datos fueron colectados a una resolución máxima (en el borde de la placa) de 3,7 Å.

## 16.3 *Procesamiento de datos*

La integración de los datos y la indexación de la celda unitaria fueron realizadas con MOSFLM (Powell, 1999). Además se usaron los programas SCALA (Evans, 1997), TRUNCATE (French y Wilson, 1978), MATTHEWS COEFF (Matthews, 1968) y POLARRFN del paquete de programas cristalográficos CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994).

## 17. Dispersión dinámica de luz

### 17.1 Colección de datos

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

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

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

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta en K y  $\eta$  es la viscosidad del solvente.

Las soluciones de Pfk-2 fueron preparadas en soluciones filtradas de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, MgCl<sub>2</sub> 5mM y DTT 2mM a diferentes concentraciones de proteína según se especifica en cada caso. Se centrifugó un volumen de entre 50 y 100  $\mu$ l de muestra por 30 min a 13.600 x g previo a cada medición. Todas las mediciones fueron realizadas a 25° C. El equipo es controlado mediante el programa DYNAMICS™ v. 5.26.39 (Protein Solutions Inc.)

### **17.2 *Procesamiento de datos***

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

### **18. Modelado por homología de la estructura de Pfk-2**

Para encontrar homólogos remotos con estructura conocida, la secuencia de Pfk-2 fue utilizada como sujeto de búsqueda en los programas de reconocimiento de

plegamiento 3D-pssm ([www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/3dpssm/](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/3dpssm/)), GenTHREADER ([bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/](http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)) y FUGUE ([www-cryst.bioc.cam.ac.uk/fugue/](http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/fugue/)), obteniéndose resultados similares. Las estructuras de proteína fueron analizadas y preparadas para su presentación mediante el programa Swiss-PDB viewer (Guex y Peitsch, 1997).

Los alineamientos múltiples fueron generados con el programa ClustalX (Thompson y col., 1997), en su modalidad *profile alignment*, usando las estructuras secundarias de los moldes para modificar los parámetros de penalidad de apertura de interrupciones en la secuencia. Los alineamientos resultantes fueron analizados mediante el uso del programa GenDoc (Nicholas y col., 1997).

El programa Modeller (Sali y Blundell, 1993) fue usado para generar la estructura del modelo de Pfk-2, usando el alineamiento entre Pfk-2 y los moldes seleccionados. Se generaron 10 modelos usando la rutina estándar, en la cual las coordenadas cartesianas iniciales de los átomos fueron localizadas aleatoriamente, antes de la optimización de la función de objetivo variable (*variable target function*).

La probabilidad  $p(G)$  de cada modelo (Sánchez y Sali, 1998), asociada al cociente entre el Z-score y el logaritmo natural de la longitud de la secuencia, se calculó usando el servidor [atlas.physbio.mssm.edu:8084/servers/pg/](http://atlas.physbio.mssm.edu:8084/servers/pg/). El programa Verify3D ([www.doe-mbi.ucla.edu/Services/Verify\\_3D/](http://www.doe-mbi.ucla.edu/Services/Verify_3D/)), se usó para evaluar la pseudo-energía en función de la posición en la secuencia (Luthy y col., 1992) para cada modelo, usando una ventana de deslizamiento de 21 aminoácidos.



## RESULTADOS

### I. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE Pfk-2

La estructura de la enzima fue construida mediante modelado por homología, usando como moldes estructuras de enzimas de la familia PFKB, disponibles en la base de datos del PDB. A partir de la estructura generada se evaluó la función de residuos putativamente presentes en el sitio activo de Pfk-2 por mutagénesis sitio-específica. Además, se realizó un análisis preliminar por cristalografía de rayos-X, de cristales de proteína del complejo Pfk-2-MgATP.

#### 1. Modelado molecular de Pfk-2

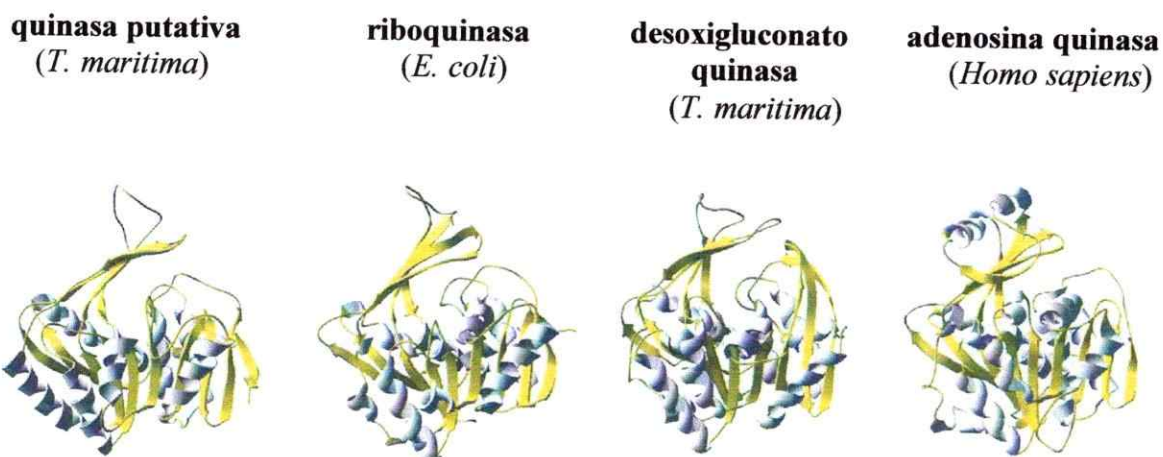
La construcción de un modelo por homología (o modelo comparativo) implica tres etapas. Primero, se requiere una proteína homóloga (o un conjunto de ellas) con estructura tridimensional resuelta, para utilizarla como molde. Segundo, se debe realizar un alineamiento entre la secuencia problema y la secuencia de la proteína molde para asignar los aminoácidos que serán estructuralmente equivalentes entre ambas. Finalmente, se genera un modelo tridimensional para la secuencia problema sobre la base en la estructura de la(s) proteína(s) molde.

##### 1.1 Selección de moldes para el modelado de Pfk-2

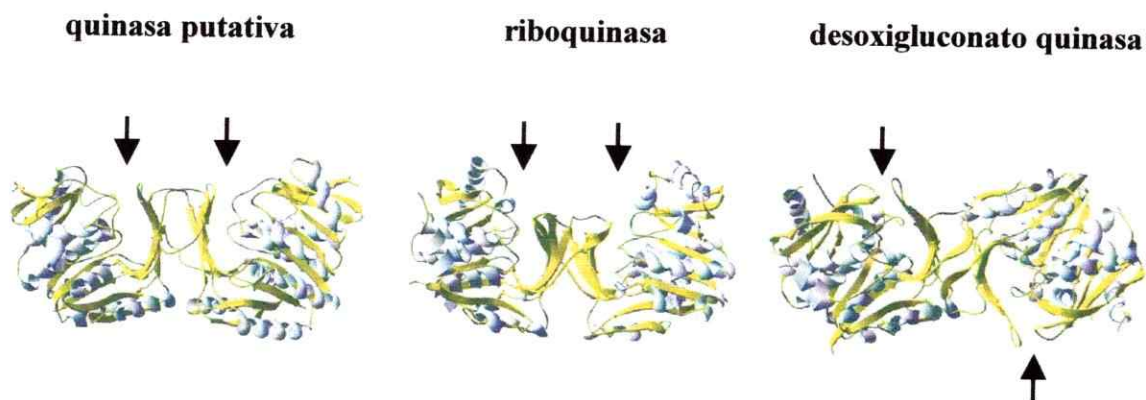
La familia PFKB incluye quinasas de ribosa, adenosina, fructosa, fructosa-1-P, tagatosa-6-P y desoxigluconato, además de la Pfk-2 de *E. coli*. Se han publicado las

estructuras cristalográficas de la riboquinasa de *E. coli* (Sigrell y col., 1998) y las adenosina quinasa de humano y *T. gondii* (Mathews y col., 1998; Schumacher y col., 2000). Sin embargo, una búsqueda de homólogos remotos con los programas de predicción de plegamiento 3D-pssm (Kelley y col., 2000), GenTHREADER (Jones, 1999) y FUGUE (Shi y col., 2001), arroja como resultado, además de los homólogos mencionados, dos proteínas cuyas estructuras se encuentran depositadas en la base de datos del PDB. (figura 2). Estas proteínas corresponden a la 2-ceto-3-desoxigluconato quinasa (TM0067, PDBid: 1j5v) y a una putativa quinasa de azúcares (TM0828, PDBid: 1o14), ambas de *Thermotoga maritima*.

La superposición estructural de los monómeros muestra mayor semejanza entre la riboquinasa, la 2-ceto-3-desoxigluconato quinasa y la quinasa putativa. La riboquinasa, al igual que Pfk-2 es un dímero en su estado nativo, mientras que las adenosina quinasa son monoméricas y presentan inserciones de  $\alpha$ -hélice en el dominio menor. El estado de agregación nativo de las enzimas de *T. maritima* no se encuentra especificado los archivos de la base de datos, sin embargo, es posible generar dímeros a partir de sus estructuras, mediante operaciones de simetría no cristalográfica. Como se muestra en la figura 3, los dímeros de riboquinasa y la quinasa putativa presentan la misma orientación relativa entre sus subunidades, a diferencia del dímero de la desoxigluconato quinasa, el cual presenta una configuración opuesta. El porcentaje de identidad de secuencia de la Pfk-2 con la quinasa putativa, la riboquinasa, la desoxigluconato quinasa y las adenosina quinasa fue de 26, 21, 15 y 12%, respectivamente. Un alineamiento preliminar usando representantes de todas las familias indicó que las adenosina quinasa y la desoxigluconato quinasa constituyen los grupos



**Figura 2. Proteínas de la familia PFKB con estructura conocida.** Los elementos de estructura secundaria aparecen como cintas. Las hélices- $\alpha$  se muestran en gris, las hebras- $\beta$  y los *loops*, se muestran en amarillo. Las estructuras se muestran con la misma orientación espacial, a partir de una superposición estructural. Los códigos de acceso PDB de las estructuras, de izquierda a derecha, son 1o14, 1rkd, 1j5v y 1bx4. La estructura de la adenosina quinasa de *T. gondii* no se muestra en la figura.

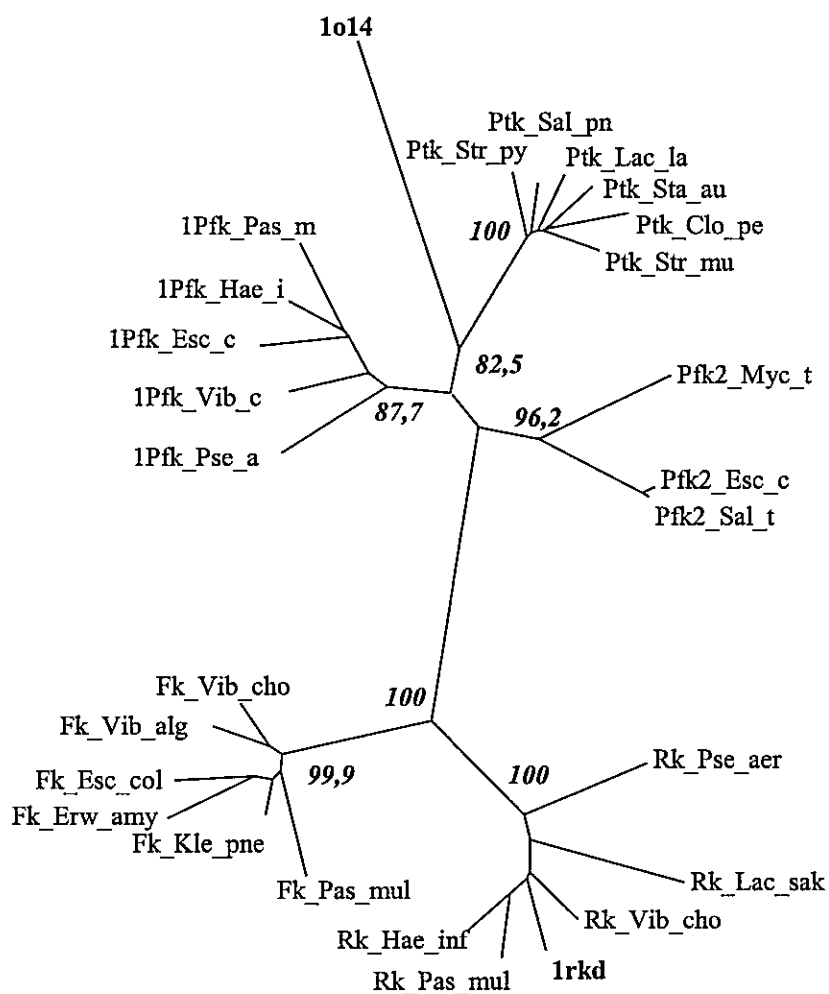


**Figura 3. Estructura dimérica de la quinasa putativa, riboquinasa y desoxigluconato quinasa.** Los dímeros fueron generados mediante operaciones de simetría no cristalográfica, mediante el programa Swiss-PDB viewer. La posición de los sitios activos está indicada por las flechas.

más divergentes dentro de la familia (ya que introducen el mayor número de interrupciones en el alineamiento múltiple). Por lo tanto, las estructuras de la quinasa putativa de *T. maritima* y la riboquinasa de *E. coli*, fueron escogidas como los moldes más apropiados para el modelado por homología de Pfk-2.

### 1.2 Alineamiento con baja identidad de secuencia

Debido al bajo porcentaje de identidad de secuencia, el alineamiento de la Pfk-2 con sus moldes debe ser optimizado incluyendo un mayor contenido de información de secuencia, bajo la forma de alineamientos múltiples de la familia y, además, usando información estructural de los moldes para guiar dicho alineamiento, penalizando la apertura de interrupciones en regiones de estructura secundaria. En la figura 4 se muestra un árbol filogenético generado a partir de un alineamiento múltiple entre secuencias de la familia PFKB (excepto adenosina quinasa y desoxiguconato quinasa), usando el método de *Neighbour Joining* (implementado en clustal), excluyendo las interrupciones y corrigiendo por sustituciones múltiples. El valor de confianza para las agrupaciones (*bootstrap*) fue de 100% para las riboquinasa, 99,9% para las fructoquinasa, 87,7% para las 1-fosfofructoquinasa, 100% para las fosfotagosaquinasa (82,5% agrupandolas junto con la quinasa putativa) y 96,2% para las 6-fosfofructoquinasa. Las quinasa de azúcares no fosforilados (ribosa y fructosa) pueden ser agrupadas con un valor de *bootstrap* de 100%, pero el valor de *bootstrap* para agrupar las 6-fosfofructoquinasa con otro grupo no es significativo. Por lo tanto, se construyó un alineamiento múltiple de las 6-fosfofructoquinasa con las quinasa de azúcares no fosforilados y otro alineamiento múltiple de las 6-fosfofructoquinasa con



**Figura 4. Árbol no enraizado de miembros de la familia PFKB.** No se incluye las adenosina quinasa ni las desoxigluconato quinasa. Las quinasa de tagatosa-6-P se encuentran abreviada con el sufijo Ptk junto a la especie de la que provienen, abreviada como: Str\_py, *Streptococcus pyogenes*, Sal\_pn, *Salmonella pneumoniae*, Lac\_la, *Lactococcus lactis*, Sta\_au, *Staphylococcus aureus*, Clo\_pe, *Clostridium perfringens*, Str\_mu, *Streptococcus mutans*; las quinasa de fructosa-6-P se abrevian con el sufijo Pfk2 junto a la especie de la que provienen, abreviada como: Myc\_t, *Mycobacterium tuberculosis*, Esc\_c, *Escherichia coli*, Sal\_t, *Salmonella typhimurium*; las quinasa de fructosa-1-P se abrevian con el sufijo 1Pfk junto a la especie de la que provienen, abreviada como: Pas\_m, *Pasteurella multocida*, Hae\_i, *Haemophyllus influenzae*, Vib\_c, *Vibrio cholerae*, Pse\_a, *Pseudomonas aeruginosa*; las quinasa de ribosa se abrevian con el sufijo Rk junto a la especie de la que provienen, abreviada como: Pse\_aer, *Pseudomonas aeruginosa*, Lac\_sak, *Lactococcus sakei*, Vib\_cho, *Vibrio cholerae*, Pas\_mul, *Pasteurella multocida*, Hae\_inf, *Haemophyllus influenzae*; las quinasa de fructosa se abrevian con el sufijo Fk junto a la especie de la cual provienen, abreviada como: Kle\_pne, *Klebsiella pneumoniae*, Erw\_amy, *Erwinia amylovora*, Esc\_col, *Escherichia coli*, Vib\_alg, *Vibrio alginolyticus*. Las secuencia de la quinasa putativa y la riboquinasa de *E. coli* se muestran mediante su código PDB, 1o14 y 1rkd, respectivamente. Se indican los valores de *bootstrap* obtenidos para los grupos principales.

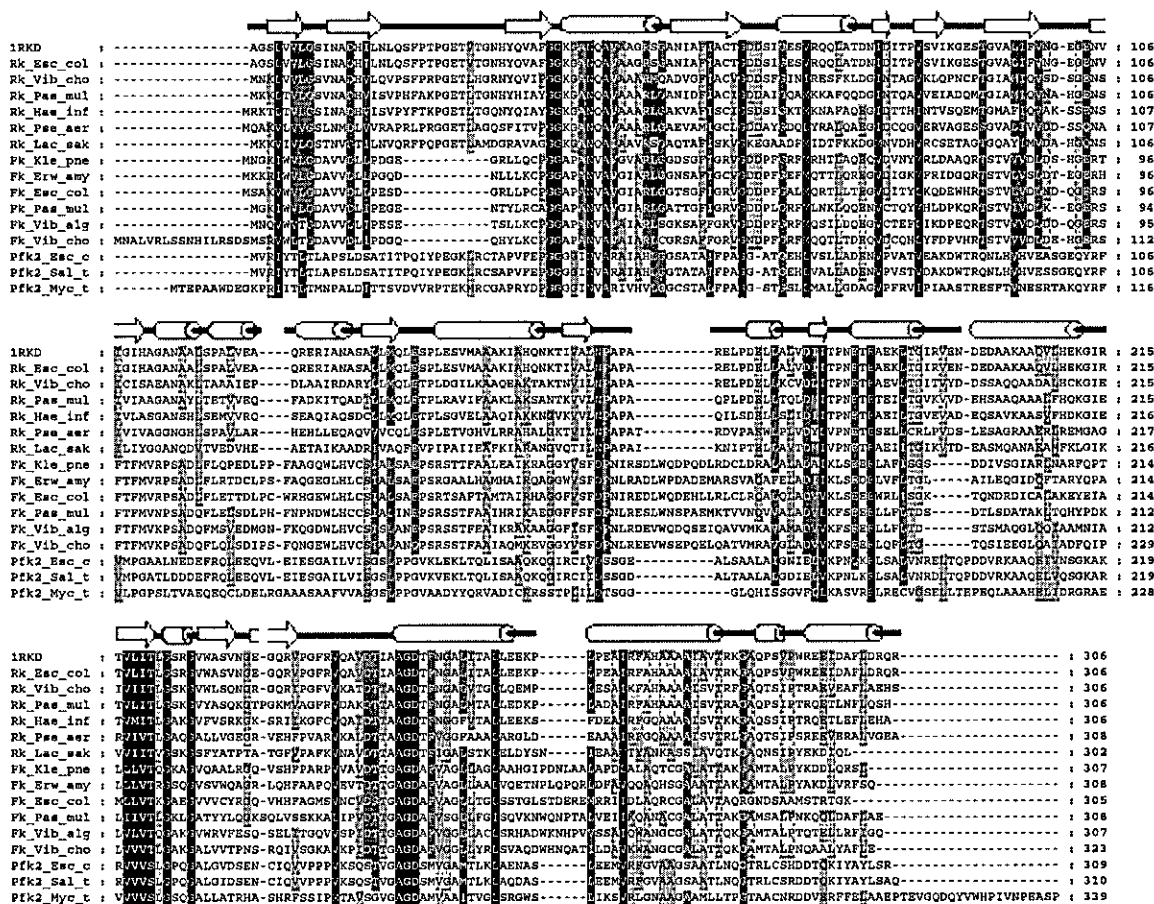
los grupos restantes (quinasas de azúcares fosfato) incluyendo una penalización para la apertura de interrupciones dentro de regiones de estructura secundaria de los moldes riboquinasa de *E. coli* y la quinasa putativa de *T. maritima*. En los alineamientos mostrados en las figuras 5 y 6, se puede observar que varias de las regiones conservadas detectadas son las mismas en ambos casos, sin embargo, estas comprenden un mayor número de aminoácidos en el alineamiento de las quinasas de azúcares-fosfato. En el modelado, la asignación de las restricciones de estructura desde un determinado molde sobre la estructura modelada de la Pfk-2, se realizó sobre la base de la conservación de secuencia en dicha región

### **1.3 Modelado y evaluación de los modelos generados**

A partir del alineamiento de la Pfk-2 con sus moldes, la estructura de la enzima fue modelada mediante el uso del programa Modeller-6. Se construyó 10 modelos partiendo desde diferentes posiciones atómicas aleatorias, los cuales fueron evaluados por parámetros de pseudo-energía. La superposición de las estructuras de los 10 modelos, observada en la figura 7a, muestra la variabilidad posicional de la cadena polipeptídica, debida a un menor peso de las restricciones impuestas por el programa, ya que en estas regiones la similitud entre las secuencias de la Pfk-2 y los moldes es muy baja. El índice  $p(G)$ , o probabilidad de un plegamiento correcto (Sánchez y Sali, 1998), fue de 0,999 para todos los modelos y el puntaje promedio del perfil 3D-1D, generado por el programa Verify 3D (Luthy y col., 1998), fue mayor que 0,1 para más del 94% de las posiciones en la secuencia (figura 7b). De esta manera, el modelo propuesto presenta valores óptimos en los parámetros de evaluación utilizados.

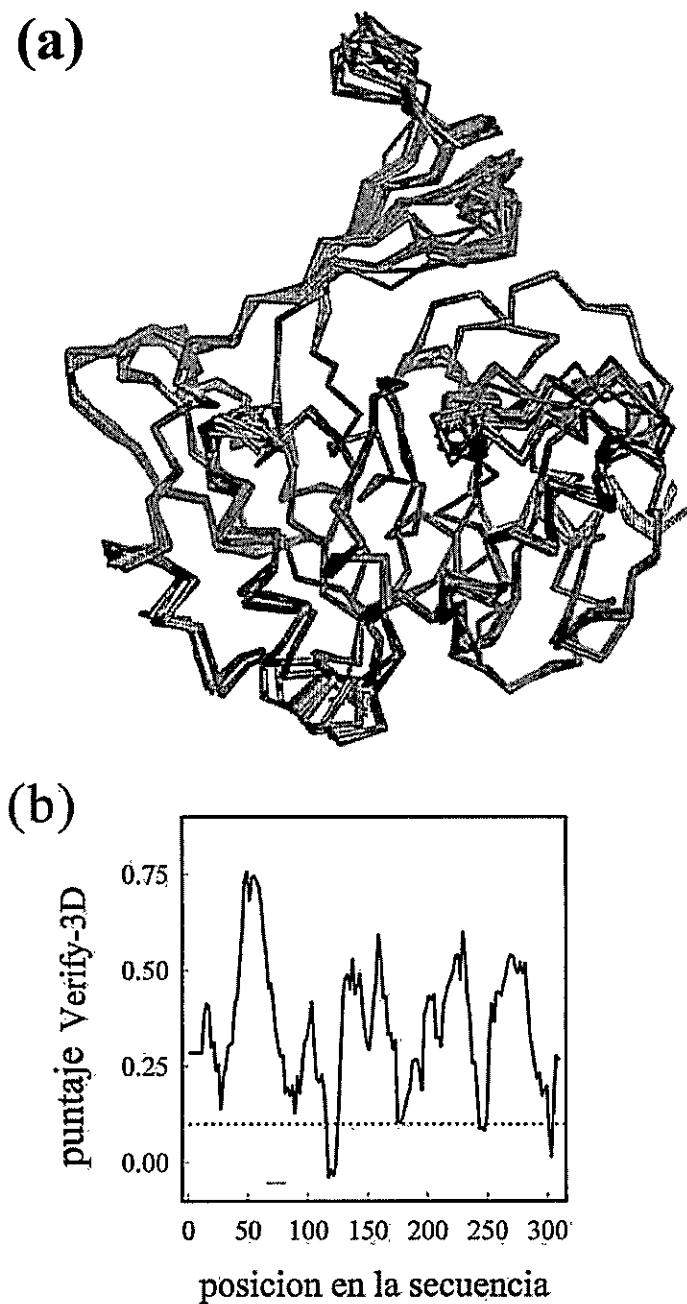


**Figura 5. Motivos conservados en la alineación múltiple de las quinases de azúcares-fosfato.** El alineamiento fue guiado incluyendo información de la estructura secundaria de la quinasa putativa, la cual es presentada al principio del alineamiento, sobre su secuencia. Los cilindros corresponden a las hélices alfa, las flechas corresponden a las hebras beta y los lazos se indican como líneas negras. Las columnas negras indican bloques de secuencias conservadas en todas las proteínas, las columnas en gris oscuro indican bloques de secuencias conservadas en más de 80% de los residuos conservados y las columnas grises indican entre 60 y 80% de residuos conservados por columna.



**Figura 6. Motivos conservados en el alineamiento múltiple de las quinasas de ribosa, fructosa y fructosa-6-P.** El alineamiento fue guiado incluyendo información de la estructura secundaria de la riboquinasa de *E. coli*, que está indicada al principio del alineamiento sobre su secuencia, los cilindros corresponden a las hélices alfa, las flechas corresponden a las hebras beta y los lazos se indican como líneas negras. Las columnas negras indican bloques de secuencias conservadas en todas las proteínas, las columnas en gris oscuro indican más de 80% residuos conservados y las columnas grises indican entre 60 y 80% de residuos conservados por columna.





**Figura 7. Modelado por homología y evaluación de la estructura de Pfk-2. (a)** Superposición de la cadena de carbonos- $\alpha$  de 10 modelos generados por MODELLER. **(b)** Perfil de la evaluación del plegamiento mediante el programa Verify 3D. La línea de puntos indica un puntaje crítico de 0,1 bajo el cual se considera malo.

## **2. Importancia funcional de aminoácidos conservados en la familia PfkB en la catálisis enzimática de Pfk-2**

Dentro de los motivos de secuencia conservada que caracterizan a la familia PFKB, se encuentra dos aminoácidos que estarían relacionados directamente con el mecanismo catalítico de la reacción de fosforilación de azúcares, común a todas las enzimas de la familia.

Un residuo de glutámico estrictamente conservado en la familia, se encuentra formando una interacción específica con un ión Mg en la adenosina quinasa de humano (figura 8). Esto sugiere que este residuo forma parte de la esfera de coordinación del  $Mg^{+2}$ , el cual es un requerimiento absoluto para la reacción catalizada por las enzimas de esta familia. Por otra parte, estudios estructurales y de mutagénesis sitio-específica (Sigrell y col., 1998; Maj y col., 2000) indican que un residuo de aspártico, también estrictamente conservado en la familia PFKB, es responsable de la desprotonación del hidroxilo en el sustrato azúcar, iniciando la transferencia del fosfato- $\gamma$  del ATP (figura 9).

Los aminoácidos correspondientes en Pfk-2 son el aspártico 256 (D256) y el glutámico 190 (E190). Por lo tanto, se estudió la función de estos aminoácidos en la catálisis enzimática de Pfk-2. Se realizó el reemplazo de D256 por asparragina (D256N) y E190 por glutamina (E190Q), con el propósito de eliminar la carga sin afectar las dimensiones de la cadena lateral. Las respectivas mutantes fueron purificadas a homogeneidad de acuerdo con el protocolo usado para Pfk-2, excepto que su presencia fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida, ya que su actividad enzimática era muy baja o despreciable.

```

1RKD      : DITPNETAEKLTGIRVE : 197
Rk_Vibr_ch : DITPNETAEVLTGITVY : 197
Rk_Haem_in : DITPNETAEILTGVVEA : 198
Rk_Past_mu : DITPNETTEILTGVKVV : 197
Rk_Lact_sa : DITVPNETAEILTGIKVT : 198
Rk_Pseu_ae : DITVPNETSELTCRLPVD : 199
Fk_Kleb_pn : DAKLSEELAFVLSG---- : 196
Fk_Esch_co : DAKLSEELWRLVLSG---- : 196
Fk_E_amyl  : DAKLSEELVFLVSG---- : 196
Fk_Vibr_al : DAKKFSEELLFVLTG---- : 195
Fk_Vibr_ch : DAKKFSEELQFLVSG---- : 212
Fk_Past_mu : DAKKFSEELLFVLTG---- : 194
1Pfk_Vibr_ : WDKPNDELSQLQWCGRELT : 200
1Pfk_Esch_ : WDKPNRRLEIWAQRKLP : 200
1Pfk_Haem_ : WDKPNHRELAWVGHPLN : 199
1Pfk_Past_ : WDKPNRDLASWYGSPLA : 199
1Pfk_Pseud : WDKPNVEELADLCSAPMD : 199
Ptk_Stap_a : TDKPNISLYQLNQPLD : 198
Ptk_S_muta : TDKPNTEELSQLMEREIT : 198
Ptk_Salm_p : TDKPNNEELSQLGREVS : 197
Ptk_Lact_l : TDKPNNEELSQLGKEVT : 198
Ptk_Stre_p : TDKPNLEELSQLGKEMT : 197
Ptk_Clos_p : FADKPNIDELSDLGVKVK : 198
Pfk2_Esch_ : EFDKPNQKLSAVNRELT : 200
Pfk2_Salm_ : EFDKPNLKLSAVNRDLT : 200
Pfk2_Myco_ : FDKASVRELRRCVGSSELL : 209

```

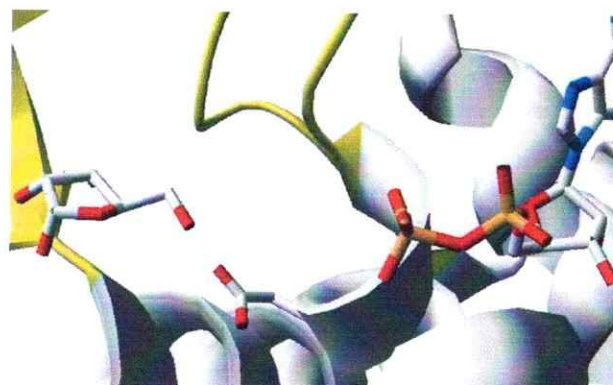


**Figura 8. Conservación de glutámico 190 en la familia PFKB y su participación en la catálisis.** (a) Alineamiento múltiple de la familia PFKB alrededor del glutámico conservado. (b) Sitio activo de la adenosina quinasa de *T. gondii*, con las posiciones relativas de la cadena lateral del glutámico conservado y el ión Mg en el sitio activo.

```

1RKD      : RQAVDTIAAETFNGAITALL : 263
Rk_Vibr_ch : VKATDITTAETFNGAIVTGLL : 263
Rk_Haem_in : CQALDITTAETFNNGEVTALL : 264
Rk_Past_mu : RDAKDTTAAETFNGAIMTALL : 264
Rk_Lact_sa : KQNAVDTTAAETFTGALSTKLE : 264
Rk_Pseu_ae : RKALDITTAETFTGGFAAALA : 265
Fk_Kleb_pn : PVVAVDTTGAETAFVAGLAGLA : 262
Fk_Esch_co : SINCVDSTGAETAFVAGLITGLS : 262
Fk_E_amyl  : QAEVDTTGAETAFVAGLAAIV : 262
Fk_Vibr_al : VVSPIDTTGAETAFVAGLACLS : 260
Fk_Vibr_ch : AVKPIDTTGAETAFVAGLYRSL : 277
Fk_Past_mu : AIPVDTTGAETAFVAGLFGSL : 261
1Pfk_Vibr_ : KQVVSTVGAETLVAGLCWGHM : 266
1Pfk_Esch_ : SDVVSTVGAETSMVGGIYGLL : 266
1Pfk_Haem_ : CENVVSTVGAETSMVAGIYGF : 266
1Pfk_Past_ : DTPIVSTVGAETMVAGIYGLL : 266
1Pfk_Pseud : AVEVSTVGAETSLVAGLHGIA : 265
Ptk_Stap_a : TNVLPVGSSTVAGTSAALL : 265
Ptk_S_muta : KQAVNPVGSSTVAGTSAIA : 265
Ptk_Salm_p : RQVVNPVGSSTVAGISSGLL : 264
Ptk_Lact_l : DPVVNPVGSSTVAGASALN : 265
Ptk_Stre_p : KQKIVSAGVGSSTVAGIASGIA : 264
Ptk_Clos_p : KQVVNPVGSSTVAGTRGIN : 265
Pfk2_Esch_ : PPKSQSTVGAETSMVAGATLKIA : 267
Pfk2_Salm_ : PPKSQSTVGAETSMVAGATLKIA : 267
Pfk2_Myco_ : PPTAVSGVGAETAMAAATVGLS : 276

```



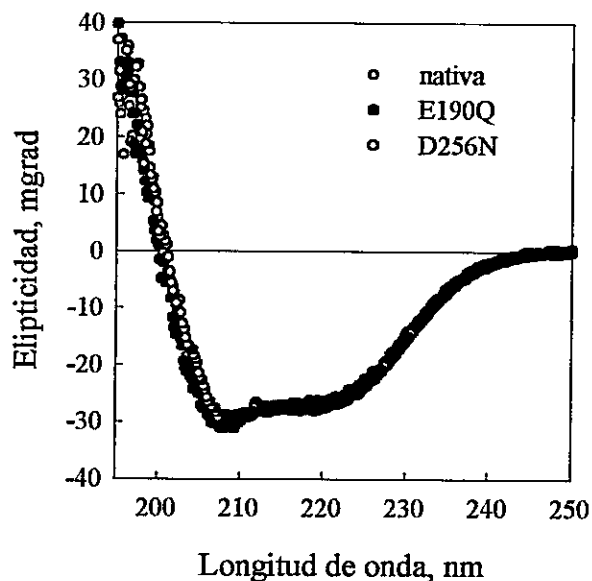
**Figura 9. Conservación de aspártico 256 en la familia PFKB y su participación en la catálisis.** (a) Alineamiento múltiple de la familia PFKB alrededor del aspártico conservado. (b) Sitio activo de la riboquinasa de *E. coli*, con las posiciones relativas de la cadena lateral del aspártico conservado y del hidroxilo-5 del sustrato ribosa.

La comparación del espectro de dicroísmo circular de las enzimas mutantes con la enzima nativa (figura 10), indica que las mutaciones no producen alteraciones en la estructura secundaria de la proteína.

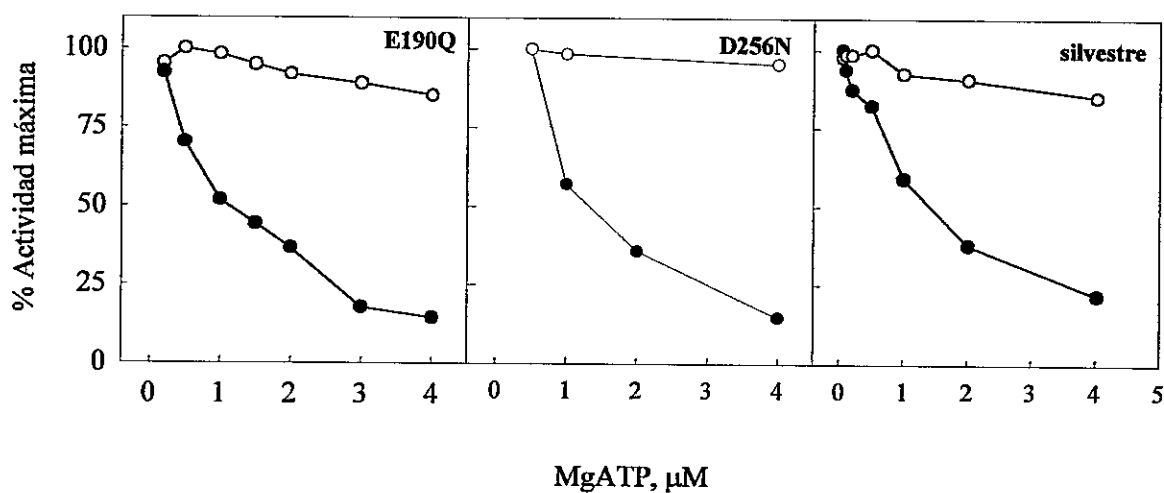
En la tabla 1 se muestran los parámetros cinéticos determinados para las mutantes purificadas y la enzima silvestre. La mutante D256N presenta una  $k_{cat}$  igual a  $10^{-4}$  la  $k_{cat}$  de la nativa, resultado consecuente con la función propuesta para este residuo como aminoácido catalítico. La  $K_m$  para MgATP se incrementa levemente debido a la mutación, mientras que la  $K_m$  para fructosa-6-P sólo aumenta al doble. Esto indica que las propiedades de unión de los sustratos no se afectan significativamente y por ende, la estructura del sitio activo no se distorsiona por la mutación.

En el caso de E190Q, la  $K_m$  para MgATP aumenta casi cuatro veces, en tanto que la  $K_m$  para fructosa-6-P disminuye ligeramente respecto de la enzima silvestre. La disminución en la  $k_{cat}$  es a 1/60 de la silvestre, lo cual sugiere que este aminoácido también participa en la catálisis.

Para determinar si las mutaciones antes mencionadas afectan al sitio alostérico de la enzima, se observó la inhibición por MgATP en ambas mutantes (figura 11). En ambos casos se observa inhibición por MgATP cuando el ensayo se realiza a una concentración de fructosa-6-P de 0,1 mM, la que es revertida a concentraciones mayores del sustrato azúcar, al igual que la enzima nativa. Este resultado, en conjunto con los resultados de dicroísmo circular, sugiere que los efectos de las mutaciones se localizan solo a nivel del sitio activo.



**Figura 10. Espectros de dicroísmo circular de la Pfk-2 nativa y de las mutantes E190Q y D256N.** La concentración de proteína usada fue de 250  $\mu\text{g/mL}$  para la Pfk-2 y las mutantes. Se grafica la elipticidad observada en miligrados en función de la longitud de onda.



**Figura 11. Inhibición por MgATP en las mutantes E190Q y D256N.** La actividad fue medida con diferentes concentraciones de MgATP a dos concentraciones fijas de fructosa-6-P: 0,1 mM (círculos negros) y 1 mM (círculos blancos) según se describe en Materiales y Métodos.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de Pfk-2 y de las mutantes D256N y E190Q.

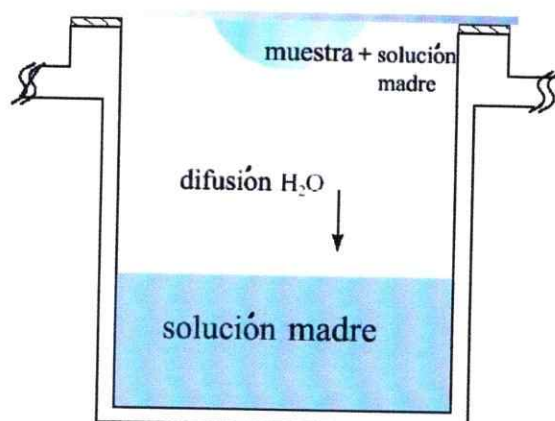
PARÁMETROS CINÉTICOS	ENZIMA SILVESTRE	D256N	E190Q
$K_m$ fructosa-6-P, $\mu\text{M}$	30	69	18
$K_m$ MgATP, $\mu\text{M}$	15	24	52
$k_{\text{cat}}$ , $\text{s}^{-1}$	55	$6,8 \times 10^{-3}$	0,97

### 3. Cristalización y análisis cristalográfico preliminar de la Pfk-2 unida a MgATP

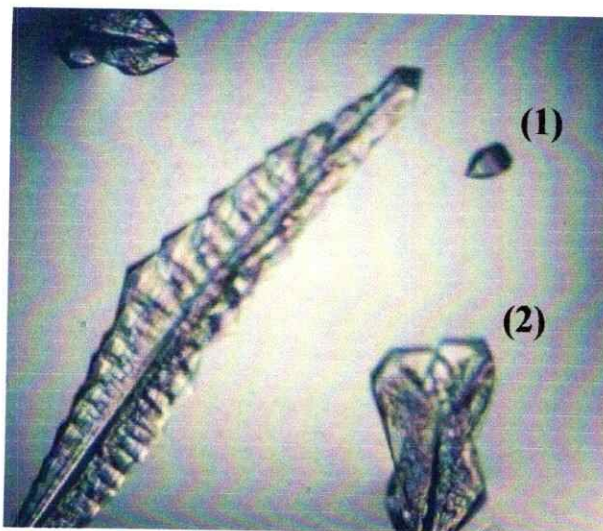
Los cristales de Pfk-2 fueron obtenidos por el método de difusión de vapor en un esquema de gota colgante (figura 12). La solución del reservorio contenía amortiguador cacodilato de sodio 0,1 M, pH 6,5, sulfato de amonio 0,1 M y cloruro de guanidinio 0,2 M. En la gota, la solución de proteína contenía además MgATP 5 mM. En la figura 13 se muestran fotos de cristales obtenidos en presencia de MgATP, tomadas después de una semana de crecimiento. Se colectaron datos preliminares para el monocristal (1), sin embargo, un fragmento del policristal (2) dio los mejores patrones de difracción. Un ejemplo de las imágenes colectadas se muestran en la figura 14, donde los datos fueron colectados a una resolución máxima (en el borde de la placa) de 3,7 Å.

Usando el programa MOSFLM se realizó la auto-indexación de la imagen del primer patrón de difracción, mediante la cual se encontraron los valores aproximados de parámetros de celda ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y la orientación del cristal. A partir de la distribución de vectores de diferencia, generados desde los puntos recíprocos extraídos del patrón de difracción, el programa presenta los parámetros de celda calculados para cada una de las posibles 14 redes de Bravais. Para cada una de estas redes se atribuyen penalidades correspondientes a la distorsión necesaria para que la celda triclinica original se transforme en redes de mayor simetría. El sistema cristalino correcto es seleccionado tomando el sistema de mayor simetría con la más baja penalidad.

De acuerdo con estos criterios, la red de Bravais escogida fue la tetragonal primitiva. Las posibilidades de grupo espacial para una red tetragonal primitiva son: P4, P4<sub>1</sub>, P4<sub>2</sub>, P4<sub>3</sub>, P422, P42<sub>1</sub>2, P4<sub>1</sub>22, P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2, P4<sub>2</sub>22, P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2, P4<sub>3</sub>22 y P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2. La definición

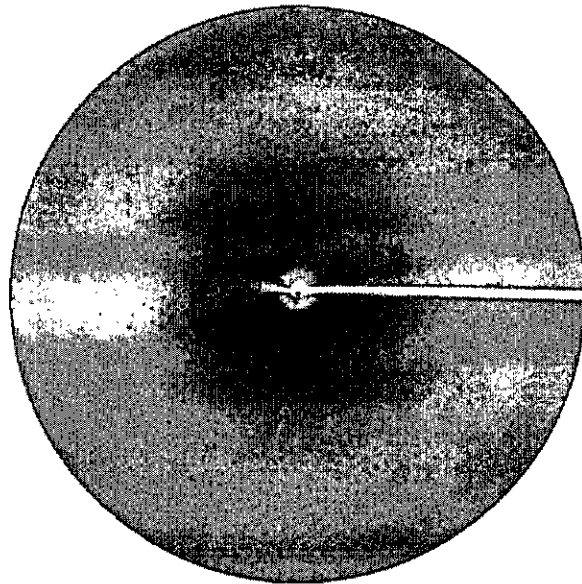


**Figura 12. Esquema del método de cristalización por difusión de vapor en gota colgante.** La solución madre en el reservorio contiene los reactivos que controlan las condiciones de cristalización (amortiguador, sales, agentes precipitantes, etc.). La gota contiene una mezcla 1:1 de la muestra de proteína y la solución madre, de manera que para alcanzar el equilibrio en el sistema, el vapor de agua abandona la gota incrementando lentamente la concentración de proteína y el resto de los reactivos, favoreciendo la cristalización.



**Figura 13. Fotografía de los cristales del complejo Pfk-2+MgATP.** Cristales crecidos por difusión de vapor en amortiguador cacodilato de sodio 0,1 M, pH 6,5, sulfato de amonio 0,1 M y cloruro de guanidinio 0,2 M, DTT 5 mM y MgATP 5 mM. La foto fue tomada una semana después de montar la gota. Los cristales (1) y (2) corresponden a un monocristal y un policristal, respectivamente.





**Figura 14. Patrón de difracción característico del complejo Pfk-2+MgATP.** Foto tomada para un cristal crecido en la condición descrita en la figura 2, crioprottegido en 10% etilén-glicol. La imagen fue colectada con una oscilación de  $0,5^\circ$ , durante un tiempo de exposición de 10 min.

del grupo espacial correcto fue realizada mediante el análisis de las simetrías de Patterson y de las extinciones sistemáticas (reflexiones ausentes sistemáticamente) catalogadas en *International Tables for Crystallography* Vol. A (Kluwer Academic, 1996). Se observó una simetría de Patterson del tipo  $P4/mmm$  en el patrón de difracción y sólo reflexiones en índices  $h = k = 2n$  (para reflexiones del tipo  $h00$  o  $0k0$ ), indicando la presencia de un eje helicoidal  $2_1$  en las direcciones perpendiculares a  $l$  (eje de orden 4). De este modo, serían posibles sólo los grupos  $P4_21_2$ ,  $P4_12_12$ ,  $P4_22_12$  y  $P4_32_12$ . Desafortunadamente, debido a la orientación del cristal, no fue posible medir los datos de tipo  $00l$  a lo largo del eje  $l$ , lo que hubiese eliminado la duda sobre un eje helicoidal de los tipos  $4_1$ ,  $4_2$  o  $4_3$ .

Una vez impuesta la simetría tetragonal primitiva en la predicción de las reflexiones, se estimó el valor de *mosaicidad* del cristal, el cual fue de  $0,46^\circ$ . La integración de las imágenes de difracción y el refinamiento de los parámetros fueron realizados utilizando MOSFLM, hasta una resolución máxima de  $3,8 \text{ \AA}$ .

Después, los datos fueron escalonados y promediados con el programa SCALA, el cual incluye el programa TRUNCATE, los que son parte del paquete de programas cristalográficos CCP4. El archivo final generado contiene los índices de Miller (h,k,l), los módulos de factores de estructura,  $|F(hkl)|$ , y sus respectivas incertezas ( $\sigma(F)$ ).

El número de moléculas en la unidad asimétrica fue estimado utilizando el programa MATTHEWS COEFF (CCP4), que hace uso de la metodología propuesta por Matthews (1968), que considera la masa molecular del monómero (33 kDa) y el tamaño de la celda unitaria. Debido al gran tamaño de la celda y la simetría obtenida, se espera

un tetrámero en la unidad asimétrica, con un contenido de solvente en el cristal de aproximadamente 55 % de su volumen total. En la tabla 2 están resumidos los resultados finales del procesamiento.

En la figura 15 se muestra la función de auto-rotación del mapa de Patterson del complejo Pfk-2-MgATP, calculado mediante el uso del programa POLARRFN (paquete CCP4), utilizando los datos medidos entre 40 y 4,0 Å. En el cálculo de la función, se usó un radio de rotación de 35 Å, que corresponde al Radio de Stokes (radio hidrodinámico) del tetrámero, determinado por medidas de Dispersión Dinámica de Luz (DLS, ver sección III.1.2). Los datos son compatibles con la presencia de un tetrámero en la unidad asimétrica, donde dos ejes de orden 2 no cristalográficos, mutuamente perpendiculares, están sobre el plano  $xy$  desplazados en 15° o 30° en relación a los ejes  $x$  e  $y$  (ejes azules o verdes, respectivamente, en la figura 15). Por lo tanto, el tercer eje de orden 2 (no cristalográfico) sería co-lineal con el eje cristalográfico de orden 4 a lo largo de la dirección  $z$ . De esta manera, se puede concluir que el tetrámero en la unidad asimétrica posee simetría 222, es decir, sería un dímero de dímeros. Este resultado es consistente con lo esperado para la asociación de los dímeros de Pfk-2, y es el soporte experimental para uno de los supuestos empleados en el modelado de la estructura del tetrámero a partir de los datos de dispersión de rayos-X en ángulos pequeños.

**Tabla 2.** Parámetros y valores finales del procesamiento de los datos obtenidos para el cristal del complejo Pfk-2+MgATP.

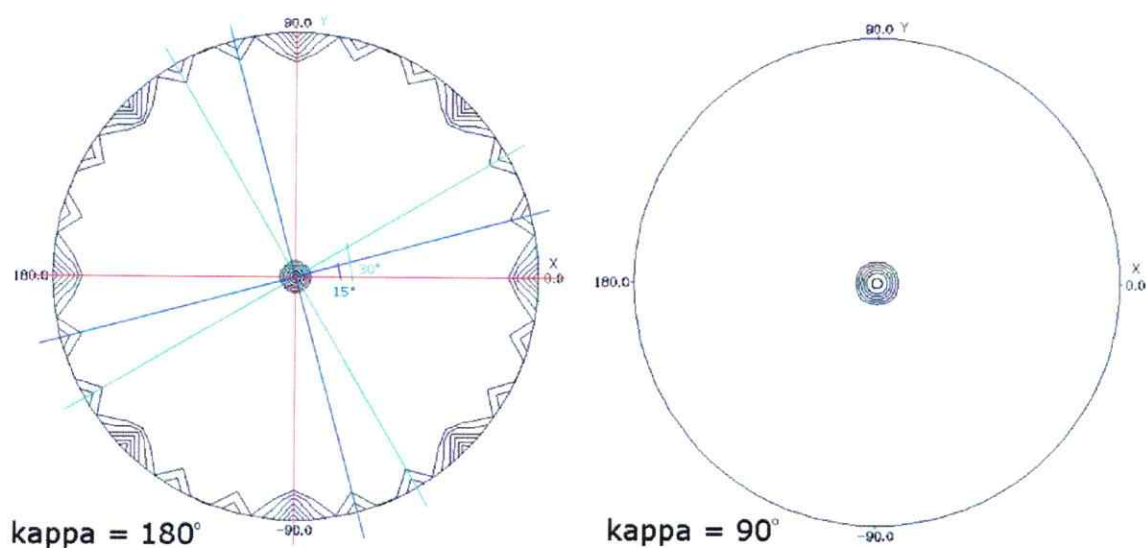
PARÁMETROS	RESULTADOS
Grupos espaciales posibles	P4 <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> , P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2, P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 y P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Parámetros de la celda unitaria	a = b = 99,19 Å, c = 319,43 Å, α = β = γ = 90°
Unidad asimétrica	4 moléculas
Mosaicidad	0,46°
Rango de resolución (capa externa)	50,0 – 3,8 Å (4,0 – 3,8)
Solución crioprotectora	Solución madre + 10% etilén glicol
Total de imágenes <sup>a</sup>	240
Reflexiones totales	315048
Reflexiones únicas	16623
Redundancia (capa externa)	7,3 (5,0)
R <sub>sym</sub> <sup>b</sup> total (capa externa)	8,7 % (36,1 %)
R <sub>meas</sub> <sup>c</sup> total (capa externa)	9,4 % (40,2 %)
Completamiento (capa externa)	93,9 % (93,9 %)
⟨I/σ(I)⟩ <sup>d</sup> total (capa externa)	3,4 (2,1)

<sup>a</sup> (Δφ = 1°)

<sup>b</sup>  $R_{sym}(F) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i F_i(hkl)}$ : discrepancia entre los factores de estructura relacionados simétricamente.

<sup>c</sup>  $R_{meas}(F) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i \sqrt{\frac{N}{N-1}} |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i F_i(hkl)}$ : discrepancia corregida por la multiplicidad del conjunto.

<sup>d</sup> ⟨I/σ(I)⟩: intensidad media dividida por el error promedio asociado a cada medida.



**Figura 15. Proyección estereográfica perpendicular al eje z (sección  $\kappa = 180^\circ$ ) de la función de auto-rotación del complejo Pfk-2+MgATP.** Los ejes en rojo indican la presencia del eje cristalográfico de orden 4 y los ejes en azul y verde indican dos posibilidades para ejes de simetría no cristalográfica de orden 2. A la derecha, la proyección perpendicular a z, en la sección  $\kappa = 90^\circ$ .

## II. EFECTO DE LA UNIÓN DE LIGANDOS SOBRE LA ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA DE Pfk-2

Para determinar los efectos de la unión de fructosa-6-P al sitio activo y de MgATP al sitio alostérico sobre la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima, se usó la dispersión de rayos-X en ángulos pequeños (*small angle X-ray scattering*, SAXS). El efecto de los ligandos sobre la estructura de la enzima también fue evaluado mediante estudios de proteólisis limitada. En este caso, los cambios estructurales inducidos por la unión de los ligandos, son evaluados mediante la susceptibilidad al corte proteolítico usando proteasas con diferentes especificidades.

### 1. Dispersión de rayos-X en ángulos pequeños

En un experimento de SAXS, una solución de proteína es expuesta a un haz de rayos-X (caracterizados por una longitud de onda,  $\lambda = 1,5 \text{ \AA}$ ) y la intensidad dispersada,  $I$ , es registrada como función del vector de dispersión  $q$ . El módulo del vector de dispersión está dado por  $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$ , donde  $2\theta$  es el ángulo de dispersión (ángulo entre el haz incidente y el haz dispersado).

Para soluciones monodispersas de partículas no interactuantes, la intensidad resultante es isotrópica y está dada por  $I(q) = N I_1(q)$ , donde  $N$  es el número de partículas por unidad de volumen e  $I_1(q)$  es la función de dispersión de una única partícula. A su vez,  $I_1(q)$  depende de la distribución de densidad electrónica de la partícula,  $\rho(r)$ , promediada en todas las orientaciones. Por lo tanto, las curvas de SAXS,  $I(q)$ , contienen información sobre rasgos estructurales de la partícula, pero en baja

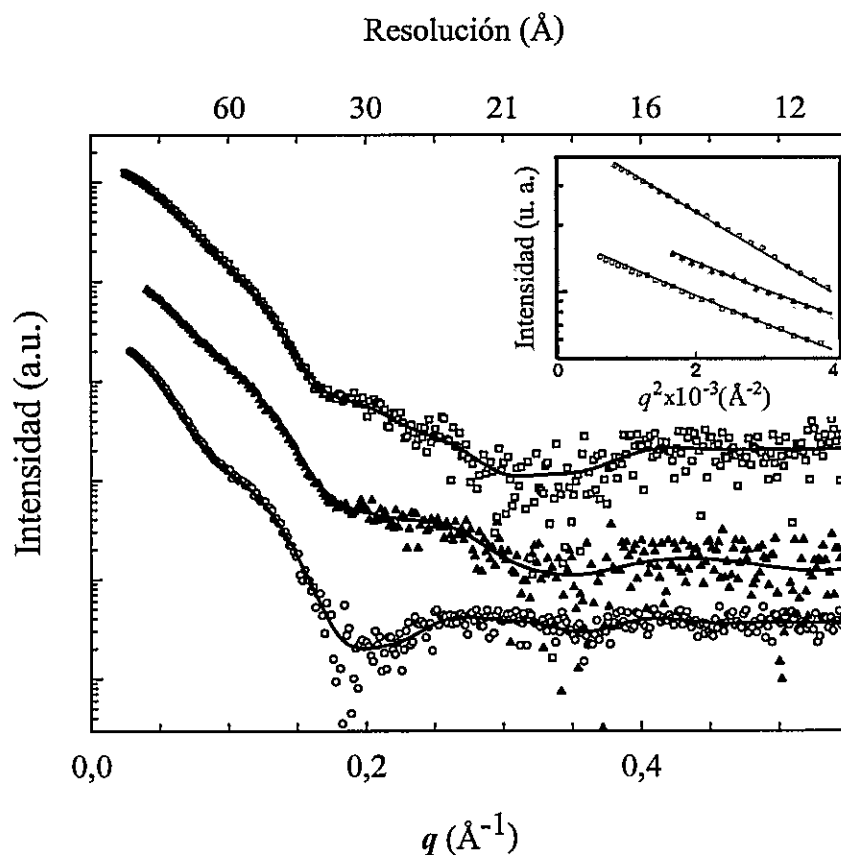
resolución, debido a las posiciones aleatorias de las partículas en la solución. Es decir, las curvas de dispersión, son sensibles a diferencias en tamaño y forma de las proteínas, a ángulos cercanos a cero (30 a 5 Å de resolución).

### 1.1 *Curvas SAXS de Pfk-2 en presencia y ausencia de ligandos*

Se realizaron mediciones de SAXS con Pfk-2 en tres condiciones: en ausencia de ligandos y en presencia de concentraciones saturantes de MgATP o de fructosa-6-P. Las curvas de dispersión se muestran en la figura 16. La existencia de cambios conformacionales inducidos por la unión de ligandos en la estructura de la Pfk-2 se manifiesta por las diferencias en intensidades a lo largo de todo el rango de  $q$  observado. En el caso de fructosa-6-P las diferencias son menores, pero no despreciables.

Las diferencias en intensidad a  $q < 0,08 \text{ \AA}^{-1}$  entre las curvas en ausencia de ligandos y en presencia de MgATP indican un cambio en el estado oligomérico de Pfk-2, con un incremento al doble en la intensidad de dispersión a  $q = 0$ ,  $I(0)$ , donde la intensidad es proporcional a la masa molecular de la partícula.

El radio de giro,  $R_g$ , de Pfk-2 en presencia y ausencia de ligandos fue calculado a partir de las pendientes obtenidas en el gráfico de Guinier ( $\ln I(q)$  vs.  $q^2$ ). En ausencia de ligandos el  $R_g$  de Pfk-2 es  $29,1 \pm 0,2 \text{ \AA}$ . Cuando el MgATP se une al sitio alostérico, el  $R_g$  se incrementa a  $35,4 \pm 0,1 \text{ \AA}$  como consecuencia de la formación del tetrámero. Por otra parte, cuando fructosa-6-P se une al sitio activo, el  $R_g$  es  $28,7 \pm 0,2 \text{ \AA}$ .



**Figura 16. Curvas de dispersión de rayos-X de Pfk-2 libre y unida a ligandos.** Las curvas de intensidad en función de  $q$  fueron obtenidas por combinación de datos colectados a dos distancias entre el detector y la muestra. La intensidad está expresada en unidades arbitrarias y en escala logarítmica. ( ) Pfk2, ( ) Pfk-2+fructosa-6-P ( ) Pfk-2+MgATP. Las curvas de dispersión se encuentran desplazadas entre sí por una década en el eje de la ordenada para mayor claridad. En la parte superior del gráfico se expresa el eje de la abscisa en términos de la resolución en Å. Las líneas continuas corresponden al mejor ajuste de los cálculos *ab initio* obtenidos usando GASBOR. Los valores  $\chi$  de los ajustes son 1,22, 0,86 y 1,05 para la Pfk-2 libre, el complejo Pfk-2+fructosa-6-P y el complejo Pfk-2+MgATP, respectivamente. El valor de la intensidad extrapolada a  $q = 0$  fue de 1,907 para la curva obtenida en ausencia de ligandos, 2,158 para la curva en presencia de fructosa-6-P y 4,252 para la curva en presencia de MgATP. En la parte superior del gráfico se expresa el eje de la abscisa en términos de la resolución en Å. El gráfico inserto muestra las curvas de Guinier, a partir de las que se obtuvo el radio de giro ( $R_g$ ), donde el eje de la ordenada está en escala de logaritmo natural y en unidades arbitrarias.



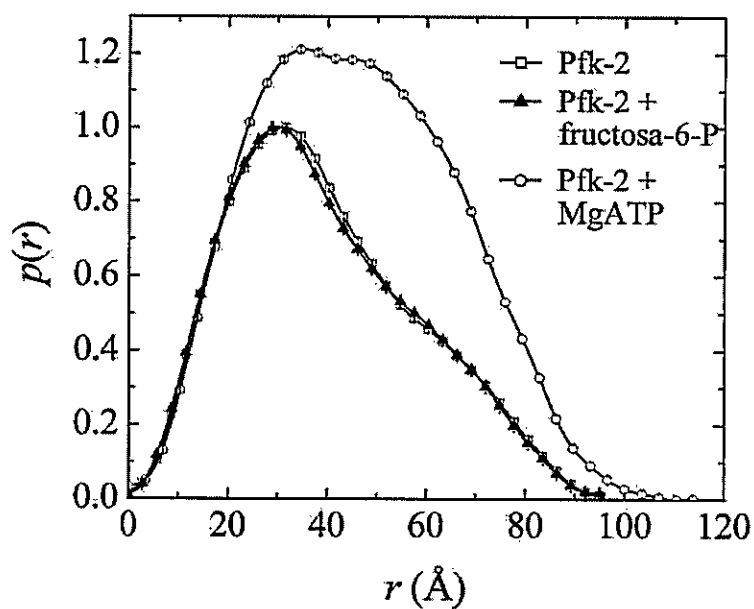
La presencia de un valle situado en  $q = 0,2 \text{ \AA}^{-1}$  en la curva de SAXS en presencia de MgATP sugiere que este ligando afecta la estructura de Pfk-2 también a nivel de la estructura terciaria. Este valle no está presente en las curvas control y en presencia de fructosa-6-P.

Las curvas de SAXS indican que cuando fructosa-6-P se une al sitio activo de Pfk-2 ocurren cambios conformacionales a nivel de la estructura terciaria. Esto también es evidente en la función de distribución de distancias de la proteína,  $p(r)$ , en presencia y en ausencia de ligandos (figura 17). La función  $p(r)$  es una representación de la curva de dispersión en el espacio real, obtenida por transformada de Fourier indirecta, y posee información acerca de la forma de la partícula. Para el complejo Pfk-2-fructosa-6-P, la función  $p(r)$  exhibe menores valores a distancias entre 30 y 50 Å que en ausencia de ligandos, lo cual indica que la forma de la proteína es más compacta cuando fructosa-6-P se ha unido al sitio activo. Para obtener información más detallada acerca de estos cambios, se refinó la orientación de los dominios, como se describe más adelante.

## ***1.2 Modelado de cambios conformacionales inducidos por ligandos usando los datos de SAXS***

### **a. Estructura de Pfk-2 en ausencia de ligandos y en presencia de fructosa-6-P**

Se ha descrito cambios conformacionales inducidos por la unión del sustrato en enzimas relacionadas filogenéticamente a Pfk-2, tales como riboquinasa y adenosina quinasa (Sigrell y col., 1999; Schumacher y col., 2000). Estas enzimas exhiben un movimiento tipo bisagra del dominio mayor sobre el dominio pequeño, que puede ser descrito como una rotación cuasi-rígida alrededor de un eje que pasa a través de los



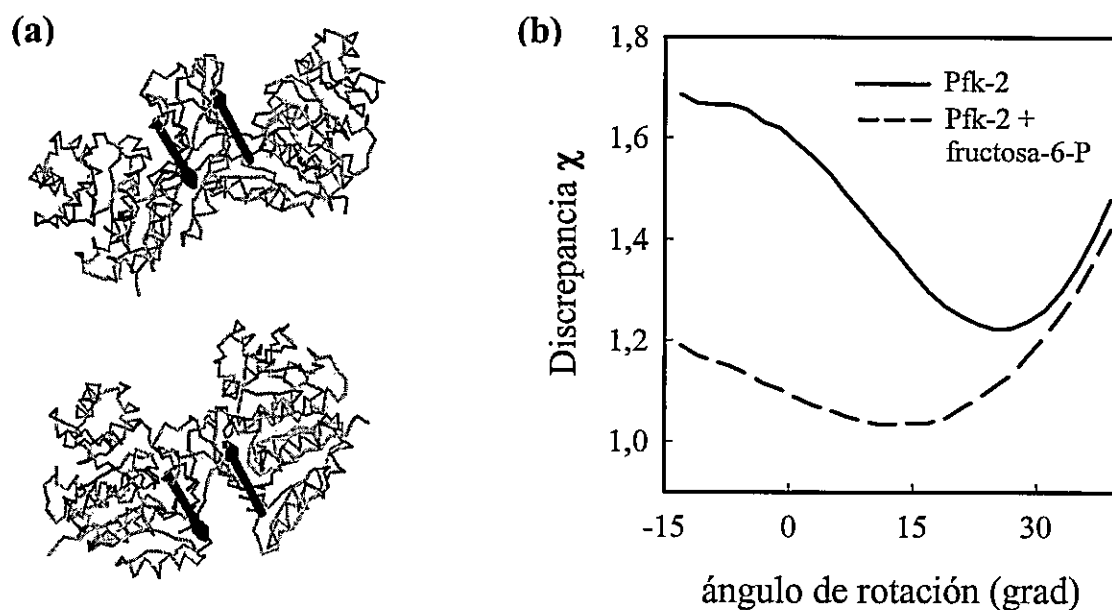
**Figura 17. Función de distribución de distancias intramoleculares de Pfk-2 libre y unida a ligandos.** ( ) Pfk2, ( ) Pfk-2+fructosa-6-P ( ) Pfk-2+MgATP. La ordenada es proporcional a la probabilidad de encontrar la distancia correspondiente a cada valor de la abscisa. Los valores de la función fueron normalizados con respecto al máximo de la curva de Pfk-2 en ausencia de ligandos.

residuos de interconexión entre ambos dominios. Para dar cuenta de las diferencias entre las curvas de SAXS obtenidas para las formas libre y unida a fructosa-6-P de Pfk-2, la estructura del dímero obtenida por modelado se modificó mediante rotaciones de cada dominio mayor (figura 18a). El eje de rotación de los dominios es el equivalente al encontrado en riboquinasa. A partir de las coordenadas atómicas de cada modelo generado, se calculó las curvas de SAXS y se evaluó la función de discrepancia,  $\chi$ , entre éstas y las curvas experimentales. Mientras mayor es el valor de  $\chi$  mayor es el desacuerdo entre los datos experimentales y el modelo generado.

La figura 18b muestra  $\chi$  en función del ángulo de rotación de los dominios mayores en el modelo dimérico de Pfk-2. Los ángulos de rotación de  $0^\circ$  y  $+17^\circ$  corresponden a los ángulos en las conformaciones cerrada y abierta de riboquinasa, respectivamente. Se puede observar que en ausencia de ligandos, la menor discrepancia ocurre con conformaciones abiertas, alrededor de  $25^\circ (\pm 7^\circ)$ . En cambio, el mejor ajuste con los datos de SAXS de Pfk-2 unida a fructosa-6-P se obtiene con una conformación significativamente menos abierta, alrededor de  $13^\circ$ , aunque en este caso el mínimo en la función  $\chi$  es menos definido. Estas observaciones indican la Pfk-2 pasa de una configuración abierta a una cerrada cuando la fructosa-6-P se une al sitio activo.

#### **b. Estructura de Pfk-2 unida a MgATP. Empacamiento tetramérico de las subunidades**

La tetramerización promovida por la unión de MgATP al sitio alostérico ha sido documentada (Guixé y Babul, 1988; Guixé, 2000). Sin embargo, no se ha abordado

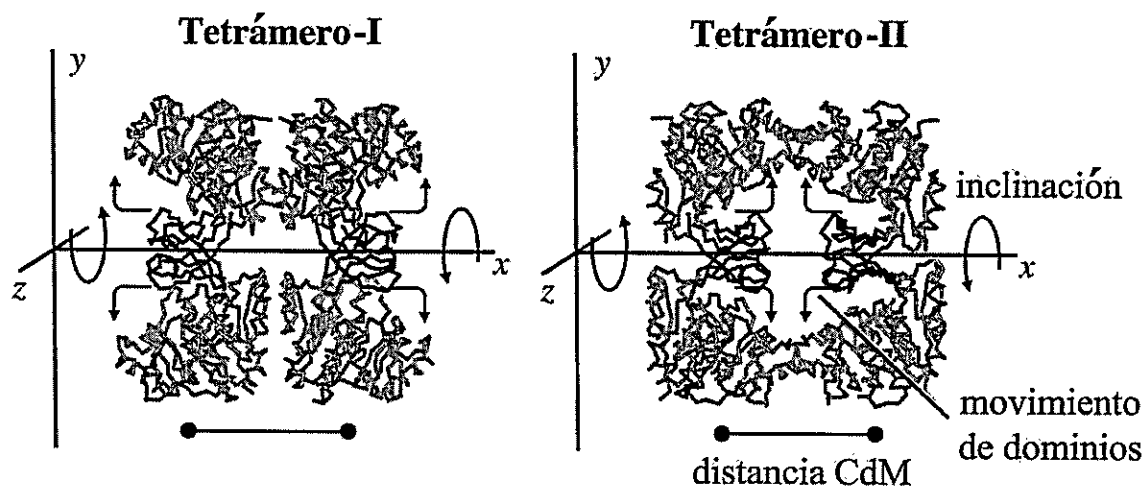


**Figura 18. Modelado de los cambios conformacionales inducidos por fructosa-6-P.** (a) Estructuras de modelos del dímero de la Pfk-2 mostrando dos conformaciones producidas por la rotación de cuerpo rígido de los dominios mayores sobre alrededor de los ejes de rotación extrapolados de la riboquinasa (flechas gruesas). Arriba se muestra la conformación más abierta ( $40^\circ$ ) y abajo la más cerrada ( $-20^\circ$ ). (b) Curva de discrepancia entre los datos experimentales y las curvas simuladas para modelos con distinto ángulo de rotación de los dominios. Pfk-2 (línea continua) y Pfk-2 unida a fructosa-6-P (línea discontinua).

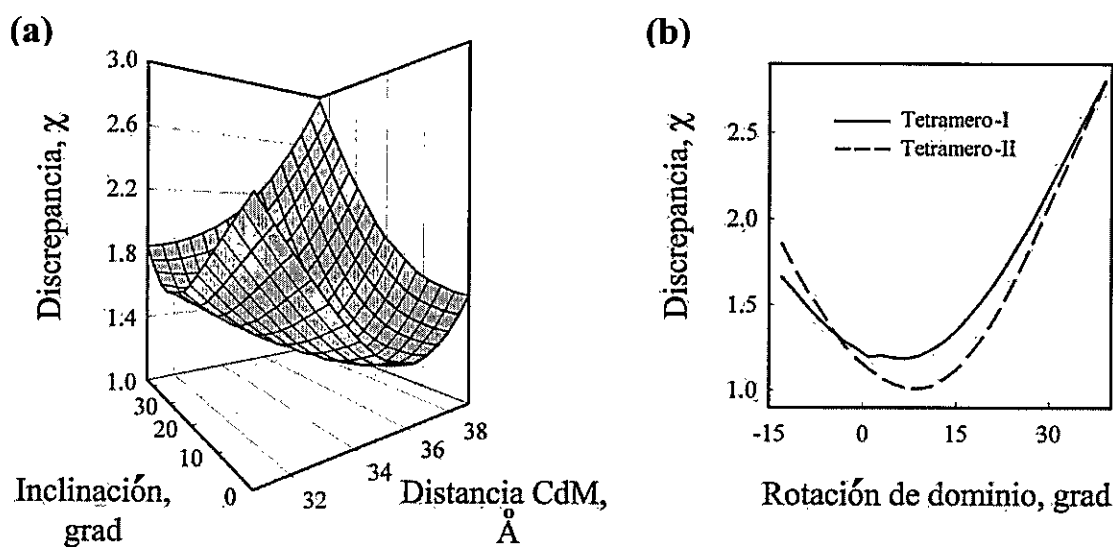
antes un enfoque para determinar la disposición relativa de las subunidades en el tetrámero.

Usando los datos de SAXS se modeló el ordenamiento tetramérico de la enzima como un “dímero de dímeros”. Esto implica una simetría molecular del tipo 222 para el tetrámero, donde uno de los ejes de simetría doble corresponde al eje de simetría de ambos dímeros (el eje  $x$  en la figura 19). Este eje pasa a través de ambos dominios pequeños en la interfaz monómero-monómero. Se modeló dos configuraciones para los dímeros en el tetrámero (figura 19), una con los sitios activos orientados hacia afuera (tetrámero-I) y la otra con los sitios activos orientados hacia adentro (tetrámero-II). Se usó formas diméricas de la enzima con distintos ángulos de rotación del dominio mayor. Se generó modelos tetraméricos aplicando diferentes distancias entre los centros de masa (CdM), a lo largo del eje  $x$ , y diferentes ángulos de inclinación entre los dímeros, girando sobre el eje  $x$ . Estos son los únicos movimientos rígidos permitidos para mantener la simetría 222 del tetrámero. Para cada configuración se evaluó la discrepancia con los datos de SAXS en presencia de MgATP. La figura 20a muestra la discrepancia en función de la distancia entre los CdM y en función del ángulo de inclinación entre los dímeros para la configuración tetramérica I, usando un ángulo de apertura de  $7^\circ$ . El mínimo en esta superficie representa al modelo optimizado, es decir, el que da el mejor ajuste, respecto de estos parámetros.

La función  $\chi$  en la figura 20b se refiere a los modelos optimizados en función de la rotación aplicada sobre el dominio mayor de cada subunidad, en las configuraciones tetraméricas I y II. La discrepancia de los mejores ajustes con los datos experimentales es pequeña para ambas configuraciones y ocurre con rotaciones de dominios aún más



**Figura 19. Generación de modelos tetraméricos.** Los dominios pequeños que forman la interfaz dimérica se muestran en gris oscuro. La simetría 222 de los modelos es representada por los ejes  $x$ ,  $y$  y  $z$ , correspondiendo  $x$  al eje de simetría de orden 2 del dímero. La rotación de dominios, la inclinación entre dímeros (alrededor de  $x$ ) y la distancia entre los centros de masa de los dímeros (CdM) fueron los tres grados de libertad usados para el modelado.



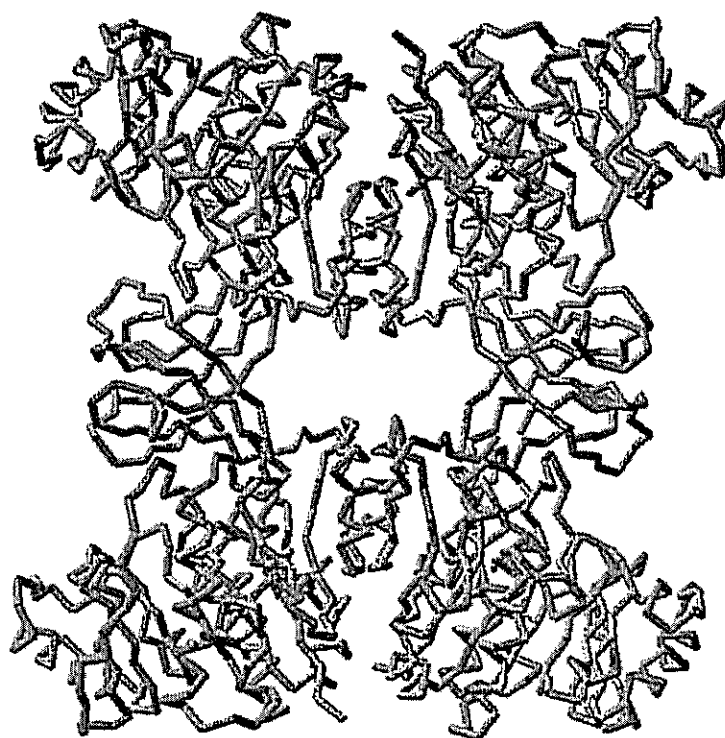
**Figura 20. Optimización de los modelos tetraméricos.** (a) Optimización del ángulo de inclinación y la distancia entre los centros de masa (CdM) para el Tetrámero I, usando dímeros con  $7^\circ$  de rotación de dominio. (b) Discrepancia del óptimo de inclinación y distancia CdM en función del ángulo de rotación de dominios para las configuraciones Tetrámero-I (línea continua) y Tetrámero-II (línea discontinua).

cerradas que aquellas obtenidas con fructosa-6-P. Aunque la curva  $\chi$  para el tetramero-II muestra valores más bajos que para el tetramero-I, una inspección visual del modelo tridimensional correspondiente al mínimo, indica que presenta severos problemas de superposición entre las cadenas polipeptídicas de los dímeros. Además, modelos del tetramero-II con una distancia razonable entre los dímeros, sin impedimentos estéricos, presentan una alta discrepancia con los datos experimentales ( $\chi = 3$ ). Por lo contrario, el mínimo de  $\chi$  para la configuración tetramérica-I refleja una configuración que puede razonablemente representar a la estructura real (dentro de las limitaciones del modelado de cuerpo rígido), como se muestra en la figura 21.

Dentro de los límites del 95% de confianza, de acuerdo con la estadística  $F$  (Bevington, 1969), los dímeros estarían en una conformación casi paralela, con una inclinación relativa entre 4 y 16°, a una distancia de CdM entre 34,7 y 36,3 Å y con un ángulo de rotación de dominios entre 1 y 9°, alrededor del mínimo (variación máxima de  $\chi$  entre 1,19 a 1,23). La zona de contacto entre los dímeros en el modelo tetramérico propuesto involucra regiones del dominio mayor.

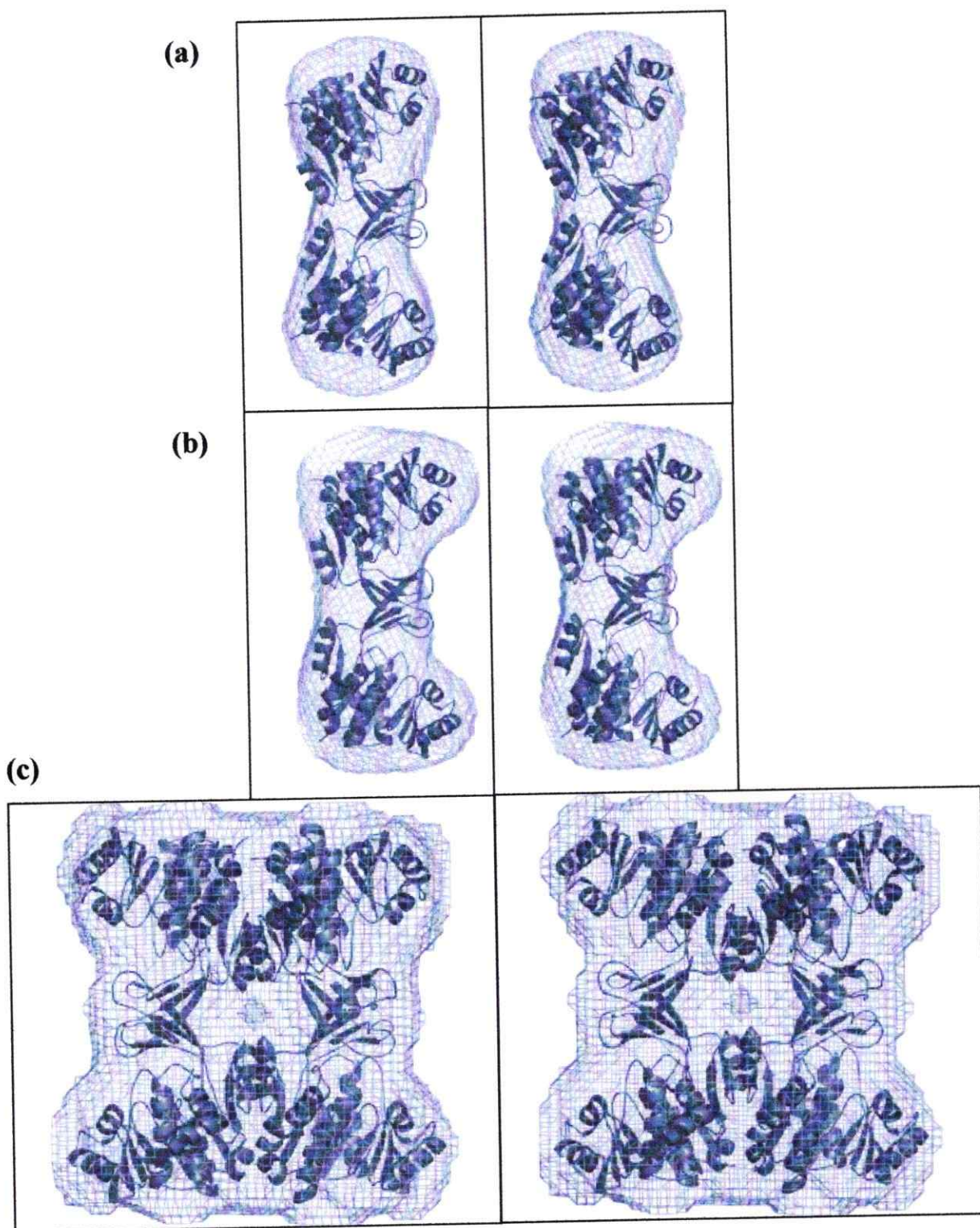
### **1.3 Estructura en baja resolución de la Pfk-2**

Los datos de SAXS de la Pfk-2 libre y en presencia de ligandos fueron usados para generar la estructura en baja resolución, mediante el método implementado por Svergun y col. (2001), según se describe en Materiales y Métodos. La estructura resultante corresponde a la superficie molecular de la proteína a una resolución de 11,4 Å. En la figura 22 se muestra la superposición entre los modelos optimizados y la superficie molecular para los tres estados de la Pfk-2.



**Figura 21. Estructura del tetramero optimizado.** Modelo del tetramero-I que presenta la menor discrepancia con los datos de SAXS del complejo Pfk-2+MgATP evaluada para la inclinación, distancia entre centros de masa (CdM) y ángulo de rotación de dominios. Presenta un ángulo de inclinación relativa de  $12^\circ$ , una distancia CdM de  $35,7 \text{ \AA}$  y un ángulo de rotación de dominios de  $7^\circ$ .





**Figura 22. Imagen estereográfica de la superposición estructural de los modelos optimizados con la superficie molecular determinada por SAXS. La superficie molecular determinada a 11,4Å, a partir de los datos de SAXS de la Pfk-2 libre y unida a fructosa-6-P o MgATP, fue calculada según se describe en Materiales y Métodos. (a) Pfk-2 en ausencia de ligandos. (b) Pfk-2 unida a fructosa-6-P. (c) Pfk-2 unida a MgATP.**

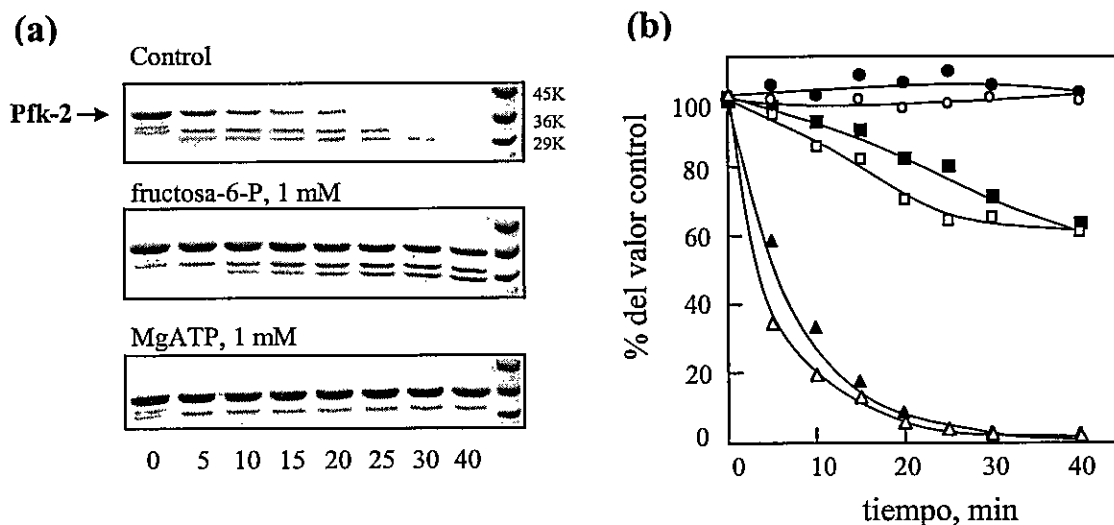
## 2. Estudios de proteólisis limitada

### 2.1 *Efecto de ligandos sobre la susceptibilidad a proteólisis de Pfk-2 en presencia y ausencia de ligandos*

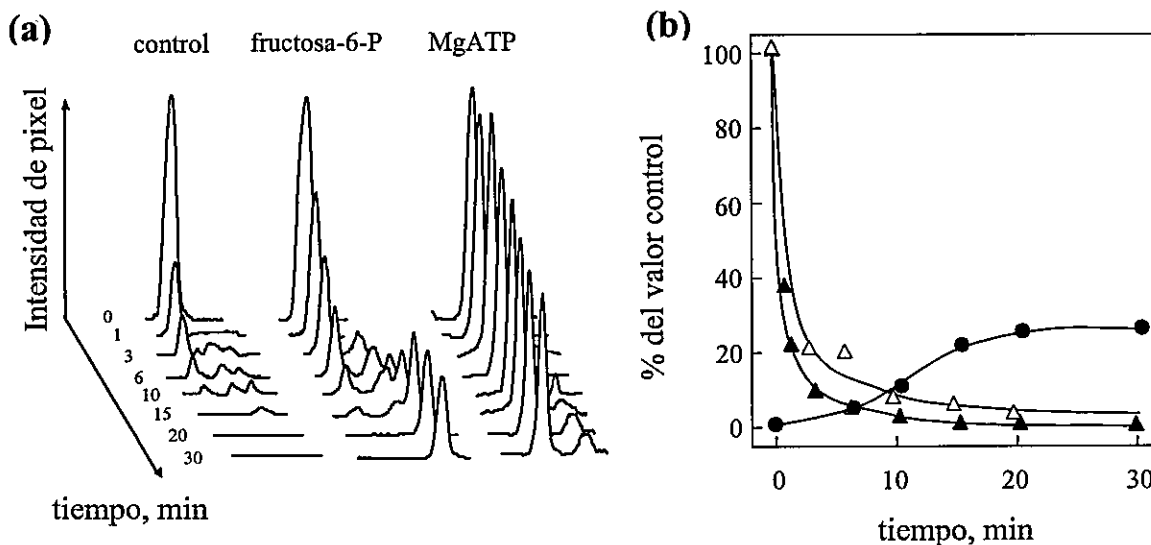
Para evaluar el efecto de los ligandos en la susceptibilidad a corte proteolítico de la Pfk-2, se usó proteasas con diferente especificidad. Esta técnica se basa en que los segmentos de la cadena polipeptídica que son accesibles a la proteasa pueden aparecer o ser protegidos debido a cambios conformacionales inducidos por los ligandos.

Se analizó el patrón electroforético producido por proteólisis de Pfk-2 con tripsina, en ausencia de ligandos y en presencia de MgATP 1 mM o fructosa-6-P 1 mM (figura 23). En ausencia de ligandos se observó una rápida disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la proteína intacta y la aparición de dos fragmentos, de 30 y 28 kDa, que fueron consumidos casi por completo a los 40 min de digestión. La unión de fructosa-6-P al sitio activo proporciona una protección parcial de la proteína intacta y de los fragmentos, sin alterar el patrón de corte proteolítico. La unión de MgATP al sitio alostérico impide la degradación de la cadena polipeptídica durante el tiempo de observación. En todos los casos, la pérdida de la actividad enzimática debido a la proteólisis ocurre en conjunto con la disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la proteína intacta, lo cual sugiere que todas las especies parcialmente digeridas son inactivas.

Además de tripsina, en estos estudios se usó proteinasa K y subtilisina, dos proteasas inespecíficas con diferente preferencia por el tipo de aminoácido localizado en el sitio de corte. El efecto protector de los ligandos sobre la integridad de la cadena polipeptídica, los intermediarios proteolíticos y la actividad enzimática fue similar al



**Figura 23. Proteólisis limitada de Pfk-2 con tripsina en presencia y ausencia de ligandos.** (a) Curso temporal de la reacción de digestión, realizada según se describe en Materiales y Métodos. La flecha indica la posición de la Pfk-2 no digerida. La masa molecular de los estándares se indica a la derecha del primer gel. (b) Intensidad de la banda de la Pfk-2 no digerida (símbolos negros) y la actividad enzimática remanente (símbolos blancos) en función del tiempo de digestión. Los círculos corresponden al ensayo en presencia de MgATP 1mM, los cuadrados, en presencia de fructosa-6-P 1 mM y los triángulos, en ausencia de ligandos.



**Figura 24. Proteólisis limitada de Pfk-2 con subtilisina.** Densitometría de geles obtenidos después de separar los productos de la digestión con subtilisina por electroforesis en condiciones desnaturantes, según se describe en Materiales y Métodos. (b) Intensidad de la banda de la Pfk-2 no digerida (triángulos negros), la banda de 28 kDa (círculos negros) y la actividad enzimática remanente (triángulos blancos) en función del tiempo de digestión, en presencia de fructosa-6-P 1 mM.

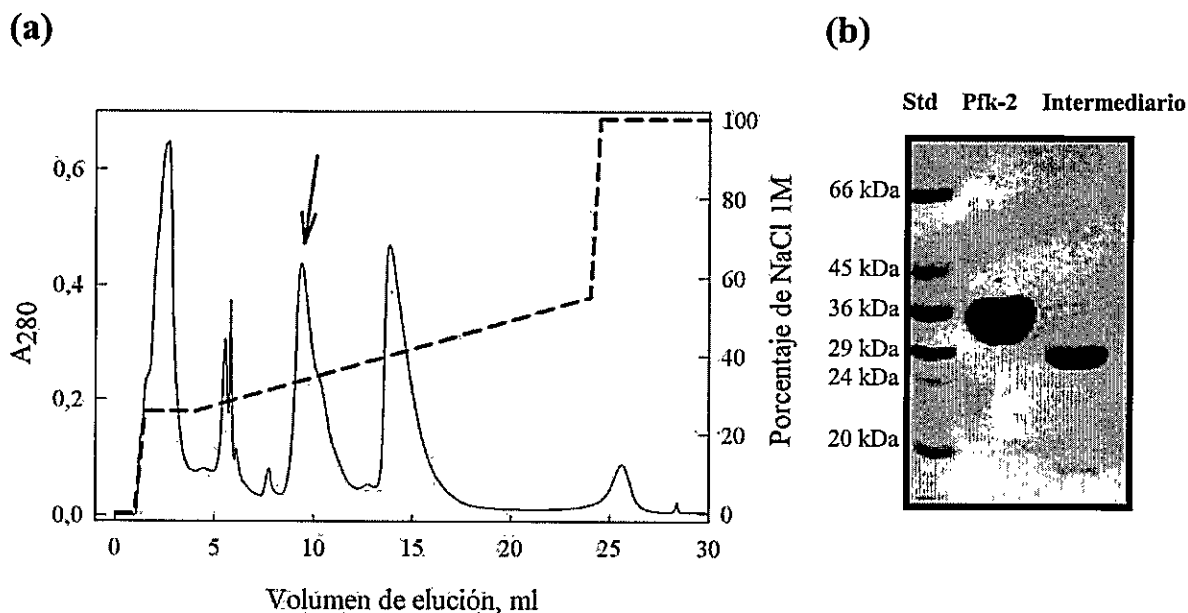
observado con tripsina. Sin embargo, cuando la digestión se realiza con subtilisina y en presencia de fructosa-6-P 1 mM ocurre una estabilización del intermediario de 28 kDa, siendo la única especie presente después de 20 min de digestión (figura 24).

## ***2.2 Caracterización del intermediario proteolítico de 28 kDa***

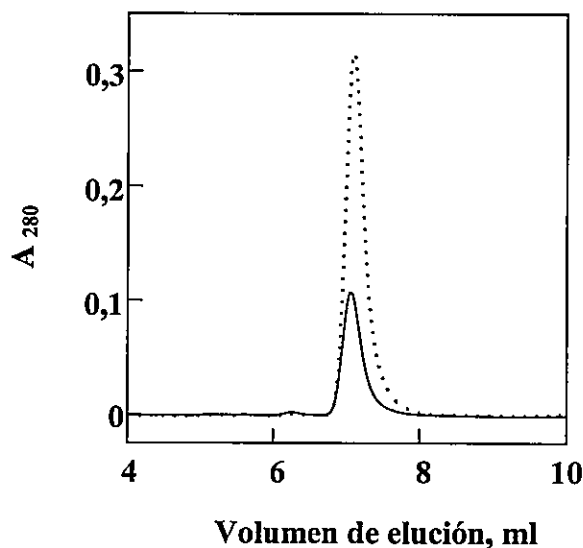
El intermediario proteolítico de Pfk-2, producido por digestión con subtilisina en presencia de fructosa-6-P 1 mM, se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoQ (figura 25a). La pureza del fragmento fue verificada por electroforesis en presencia de SDS (figura 25b).

El intermediario de 28 kDa, en ausencia de ligandos, presenta el mismo volumen de elución que el dímero nativo de la Pfk-2 en experimentos de cromatografía de exclusión molecular (figura 26). Sin embargo, el intermediario no cambia su estado de agregación en presencia de MgATP como la enzima nativa.

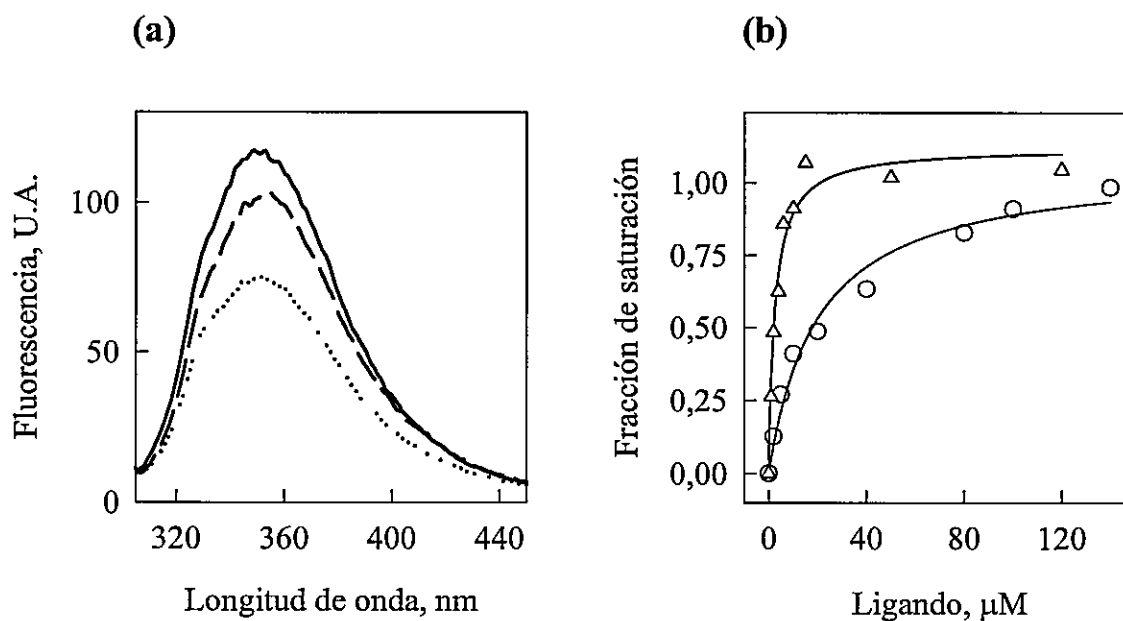
La identificación de los primeros 11 aminoácidos en el extremo N-terminal del intermediario purificado, mostró que éste corresponde exactamente a la secuencia N-terminal de la Pfk-2. Por lo tanto, el fragmento removido por la proteasa se encuentra en el extremo C-terminal de la Pfk-2, de manera que el único triptofano de la enzima, localizado en la posición 88, puede ser usado para caracterizar la unión de ligandos al intermediario de 28 kDa. La figura 27a muestra el espectro de fluorescencia del intermediario purificado en ausencia y en presencia de ligandos. Al igual que la Pfk-2 intacta, el intermediario presenta un máximo de emisión a 352 nm. En presencia de fructosa-6-P 120  $\mu$ M la intensidad de fluorescencia decae en un 14% con respecto a la observada en ausencia de ligandos. La fluorescencia del intermediario también es



**Figura 25. Purificación del intermediario 28 kDa producido por digestión con subtilisina en presencia de fructosa-6-P 1mM.** (a) Cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoQ de la mezcla de digestión después de 60 min de reacción. La flecha señala el pico que corresponde al intermediario de 28 kDa. (b) Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes de la Pfk-2 no digerida y del intermediario de 28 kDa purificado. A la izquierda del gel se indica las masas moleculares de los estándares (Std) usados.



**Figura 26. Estado de agregación del intermediario de 28 kDa.** Cromatografía de exclusión molecular de la Pfk-2 (línea de puntos) y del intermediario purificado en ausencia de ligandos (línea continua).



**Figura 27. Unión de ligandos al intermediario de 28 kDa.** (a) Espectros de fluorescencia del intermediario purificado en ausencia de ligandos (línea continúa) y en presencia de concentraciones saturantes de fructosa-6-P (línea discontinua) y MgATP (línea de puntos). La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias. (b) Cambios en la fluorescencia del intermediario purificado en función de la concentración de fructosa-6-P (triángulos) o MgATP (círculos).

afectada por MgATP, provocando un apagamiento de la fluorescencia de un 39% a 120  $\mu\text{M}$  de MgATP, respecto del valor inicial en ausencia de ligandos, sin cambios en el máximo de emisión. La dependencia de la fluorescencia con la concentración de ligando es hiperbólica para fructosa-6-P y MgATP, con una  $K_d$  de 3  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente (figura 27b).

### III. REGULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y LA OLIGOMERIZACIÓN DE Pfk-2

Con el objetivo de plantear un modelo general que integre los mecanismos implicados en la regulación alostérica de la enzima, se determinó la relación entre la unión de MgATP al sitio alostérico, el cambio en el estado de agregación y la inhibición de la actividad enzimática.

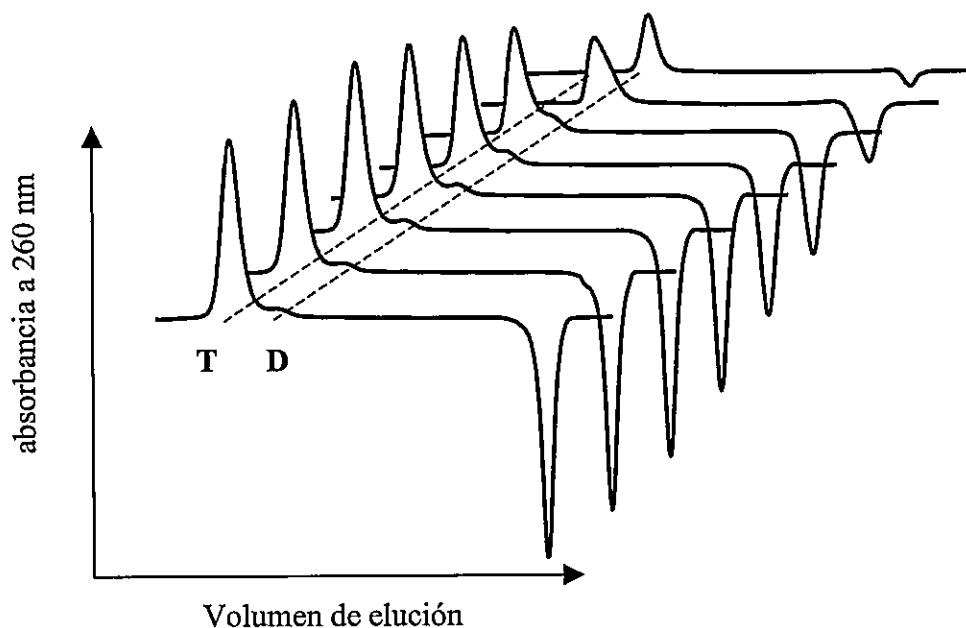
#### 1. Mecanismo de tetramerización de Pfk-2 inducida por la unión de MgATP al sitio alostérico

##### 1.1 *Análisis de unión de MgATP al sitio alostérico de Pfk-2*

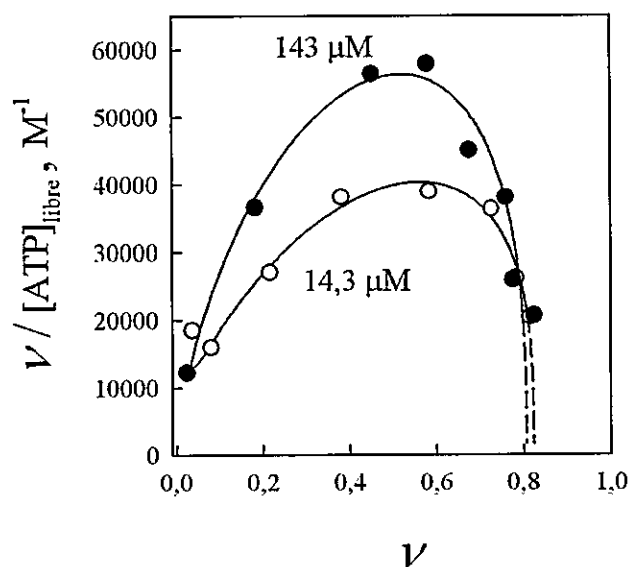
La unión de MgATP fue determinada por el método de Hummel-Dreyer (Cann y Hinman, 1976). En la figura 28 se muestra una serie de cromatogramas de Pfk-2 obtenidos con concentraciones crecientes de MgATP. Se puede observar que el área del valle, que es proporcional a la cantidad de ligando unido, se va incrementando con la concentración de MgATP hasta la saturación. También es posible observar la aparición de tetrámeros como consecuencia de la unión de MgATP. Los moles de ligando unido se calcularon a partir del área del valle en cada cromatograma, según se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados son expresados mediante gráficos de Scatchard, donde se grafica el número de moles de MgATP unido por mol de Pfk-2 ( $v$ ) dividido por la concentración de equilibrio de MgATP libre ( $[MgATP]_{libre}$ ), en función de  $v$ . En la figura 29, se muestran los gráficos de Scatchard para dos concentraciones de proteína, que difieren en





**Figura 28. Mediciones de unión de MgATP a Pfk-2 por el método cromatográfico de Hummel-Dreyer.** Perfiles cromatográficos en presencia de concentraciones crecientes del ligando, de atrás hacia adelante. Las líneas punteadas indican la posición de los picos del dímero (D) y del tetramero (T). Los moles de ligando unido se calcularon a partir del área del valle, según se describe en Materiales y Métodos.

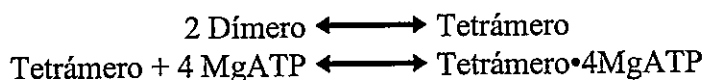


**Figura 29. Gráfico de Scatchard para la unión de MgATP a Pfk-2.** La unión se determinó por el procedimiento de Hummel-Dreyer a dos concentraciones de proteína, 14,3 y 143  $\mu\text{M}$ . Las líneas punteadas corresponden a la extrapolación de las curvas de unión hacia el eje de la abscisa.

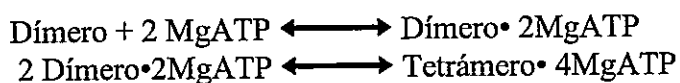
un orden de magnitud. La intersección con el eje de la abscisa es compatible con la presencia de un solo sitio de unión por monómero con una  $K_d$  de 90  $\mu\text{M}$ , calculada de acuerdo con el método de Cann (1978). La forma de las curvas es convexa, lo cual es usualmente interpretado como indicio de la presencia de múltiples sitios de unión con cooperatividad positiva. Sin embargo, en este caso la unión varía con la concentración de proteína.

En el análisis de Cann (1978), para sistemas que presentan agregación asociada a la unión de ligandos, dos equilibrios diferentes producen gráficos de Scatchard convexos, según se ilustra en el siguiente esquema:

Agregación *facilitada* por ligando:



Agregación *mediada* por ligando



En el modelo de agregación facilitada por ligando, la forma convexa de la curva refleja la cooperatividad conferida por la estabilización del tetrámero mediante la unión del ligando. Esto desplaza el equilibrio de agregación favoreciendo la forma tetramérica, que, a su vez, es la especie que une el ligando. El incremento en la cooperatividad con la concentración de proteína proviene del efecto de acción de masas por el equilibrio de

agregación, o sea, del incremento de la especie que es capaz de unir el ligando. La predicción analítica para el mecanismo de agregación facilitada por ligando es que la intersección con la ordenada en el gráfico de Scatchard debe disminuir a concentraciones menores de proteína. Esto es así debido a que la dilución afecta la tetramerización, la cual es dependiente de la unión del ligando.

Por otra parte, en el equilibrio de agregación mediada por ligando, la cooperatividad reflejada por la forma convexa de la curva se debe a que la tetramerización previene la acumulación del dímero unido a MgATP. Esto favorece la unión porque desplaza el equilibrio hacia la forma unida a ligando. El efecto es mayor a concentraciones más altas de proteína, ya que al favorecerse el equilibrio de agregación, el equilibrio de unión se desplaza hacia la derecha. Como consecuencia, se necesita menos moles de MgATP por mol de proteína para completar la tetramerización. De acuerdo con la predicción analítica para este sistema, la intersección con la ordenada corresponde a la constante de unión del ligando al dímero y debe ser independiente de la concentración de proteína.

Las curvas mostradas en la figura 29 sugieren que la tetramerización de Pfk-2 inducida por la unión de MgATP al sitio alostérico corresponde a un mecanismo de asociación *mediada* por ligando porque la intersección con la ordenada no cambia con la concentración de proteína. Este modelo implica que i) *no existe un equilibrio dímero-tetrámero en ausencia de MgATP* y por lo tanto el estado de agregación de la Pfk-2 no debe ser dependiente de la concentración de proteína; y ii) *a mayor concentración de proteína una menor cantidad de moles equivalentes de ligando serán necesarias para completar la transición de dímero a tetrámero.*

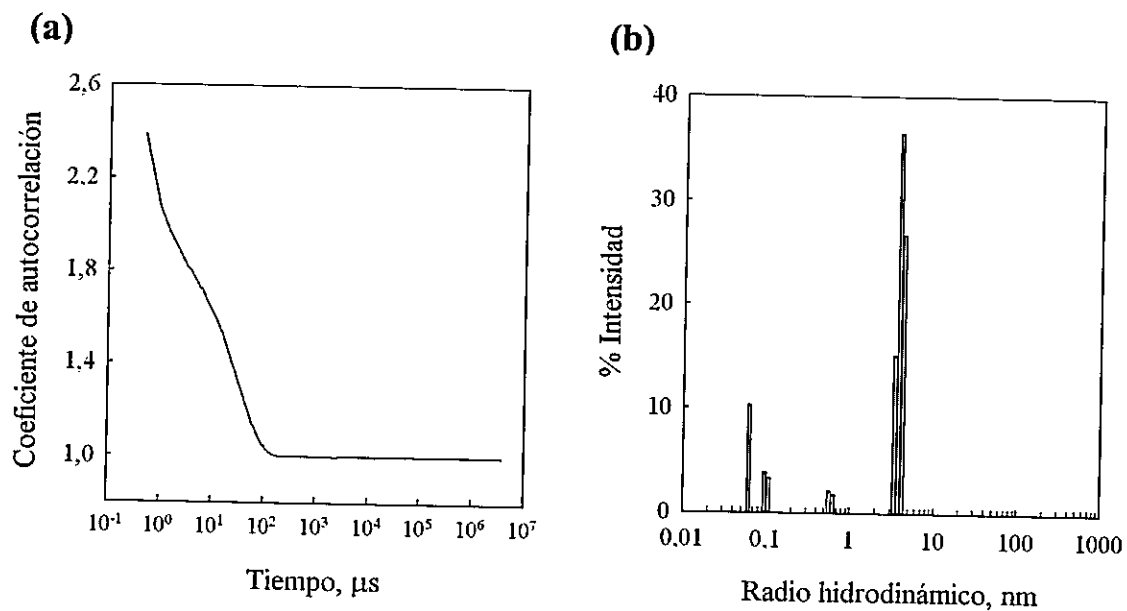
Ambas predicciones fueron evaluadas experimentalmente, como se indica a continuación.

### 1.2 Estado de agregación de Pfk-2 determinado por dispersión dinámica de luz

Para estudiar el efecto de la concentración de proteína sobre la tetramerización inducida por MgATP se usó la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS). Esta técnica, registra las variaciones de intensidad de fotones dispersados por una muestra en solución, mediante el análisis estadístico denominado función de auto-correlación. Esta función corresponde a un decaimiento exponencial (o una suma de decaimientos) cuya constante de tiempo se relaciona con el radio hidrodinámico ( $R_H$ ) y con el coeficiente de difusión de la proteína en solución, según se describe en Materiales y Métodos.

En la figura 30a se muestra la función de auto-correlación (gráfico *log-normal*) para una muestra de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Pfk-2. Intuitivamente, la función muestra cuanto tiempo toma la proteína en difundir una distancia determinada (relacionada a la longitud de onda del láser). La caída a línea base (coeficiente = 1) ocurre cerca de los 100  $\mu\text{s}$ . Dado que partículas muy grandes o agregados mayores a 25 nm decaen alrededor de los milisegundos, la función de auto-correlación indica una buena calidad de la muestra, sin la presencia de agregados.

La curva de auto-correlación posee claramente más de un decaimiento. La distribución de los tamaños de las partículas en la muestra (figura 30b), calculada por transformada de Laplace inversa, indica que la componente principal, que da cuenta de casi el 40% de la intensidad total, se debe a una partícula con un  $R_H$  de 3,62 nm. Los picos con  $R_H < 1$  nm corresponden a la señal del solvente (Tris,  $\text{MgCl}_2$ , DTT). El peso molecular (MW) puede ser estimado del  $R_H$  usando una curva de MW vs.  $R_H$  obtenida a



**Figura 30. Dispersión dinámica de luz de Pfk-2.** (a) Función de auto-correlación de Pfk-2 a  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . (b) Histograma de regularización por transformada de Laplace inversa de la función de auto-correlación mostrada en (a). Este procedimiento se usa para obtener el radio hidrodinámico en las mediciones de dispersión dinámica de luz.

partir de estándares de peso conocido. El programa DYNAMICS™ tiene incorporada la siguiente ecuación obtenida a partir de 10 proteínas globulares:

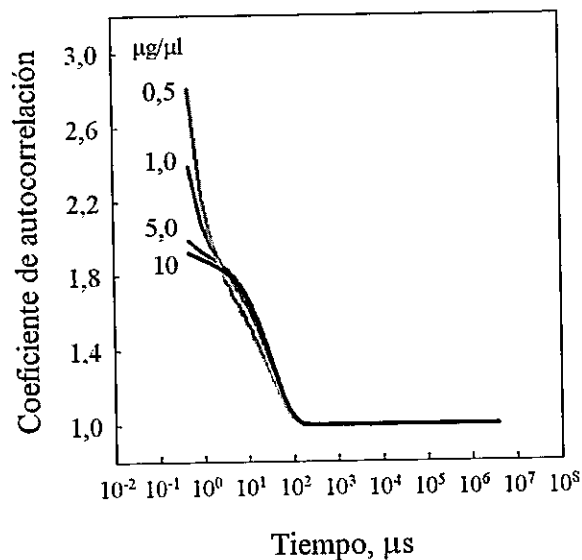
$$MW \text{ (kDa)} = [1,68 \cdot R_H \text{ (nm)}]^{2,3398}$$

El peso molecular estimado de esta manera es 68,3 kDa, que es sólo levemente mayor al peso esperado para el dímero (66 kDa).

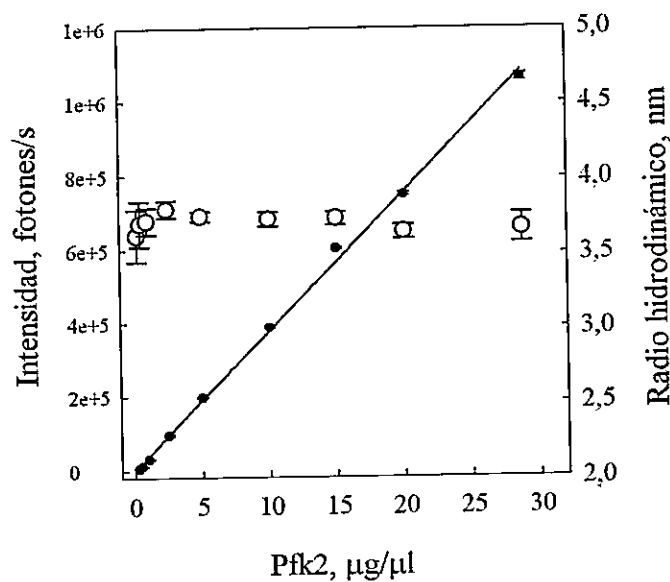
**a. Efecto de la concentración de proteína sobre el estado de agregación de Pfk-2**

Se estudió el efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros determinados por DLS para una serie de soluciones con distintas concentraciones de Pfk-2 (0,25-28,7 µg/µl). En la figura 31 se muestra el efecto sobre la función de autocorrelación. Se observa que la componente de decaimiento rápido (debida al solvente) se hace menos significativa a mayores concentraciones de Pfk-2.

La influencia de la concentración de proteína sobre la intensidad residual dispersada (la intensidad de la muestra menos la intensidad del solvente) y el  $R_H$  se muestra en la figura 32. De acuerdo con la ecuación de Rayleigh (Wyatt, 1993), la intensidad residual será directamente proporcional al producto de la concentración y el peso molecular de la partícula dispersante ( $I \propto C \times MW$ ). De esta manera, la variación lineal de la intensidad residual dispersada con el incremento de la concentración de proteína implica que el estado de agregación no varía en el intervalo de concentración observado (variación de más de dos órdenes de magnitud). Consecuentemente con lo



**Figura 31. Función de autocorrelación para diferentes concentraciones de Pfk-2. La concentración de proteína en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  se indica al lado de cada curva.**



**Figura 32. Efecto de la concentración de proteína sobre el estado de agregación de Pfk-2. Intensidad residual dispersada (puntos negros) y el Radio hidrodinámico (círculos blancos) de Pfk-2. Para cada concentración se muestra el promedio y la desviación estándar de cuatro medidas. El tiempo de adquisición de datos fue de 5 s.**

anterior, se observa que el  $R_H$  no se incrementa con la concentración de proteína. A pesar que para concentraciones bajas de proteína los  $R_H$  muestran una mayor dispersión, ésta no es significativa y ocurre dentro del error. Este efecto se debe principalmente a la mayor contribución del solvente sobre la función de auto-correlación y al ruido de la señal en las concentraciones más bajas de proteína.

Esta observación concuerda con la predicción i) “*no existe un equilibrio dímero-tetrámero en ausencia de MgATP*”.

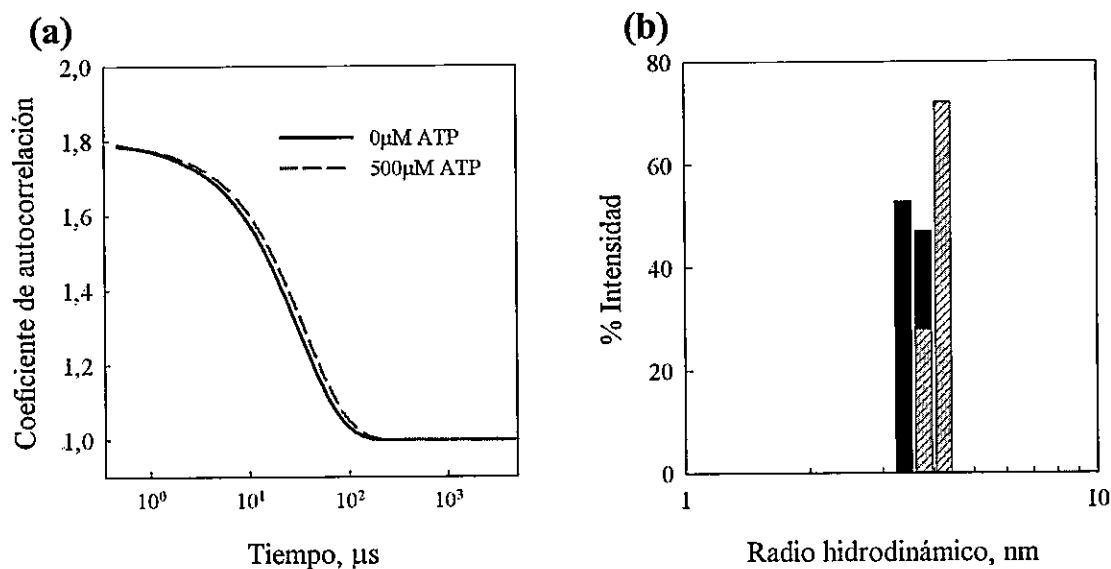
#### **b. Tetramerización inducida por MgATP a distintas concentraciones de proteína**

Inicialmente, se evaluó si la técnica de DLS era sensible al cambio en el estado de agregación de la Pfk-2 debido a la unión de MgATP al sitio alostérico. Las funciones de auto-correlación del dímero y el tetrámero y el incremento en  $R_H$ , producto de la tetramerización, se muestran en la figura 33a y 33b, respectivamente. La función de auto-correlación se desplaza hacia tiempos mayores, indicando que la partícula (proteína) recorre la misma distancia en mayor tiempo, como consecuencia del incremento en tamaño.

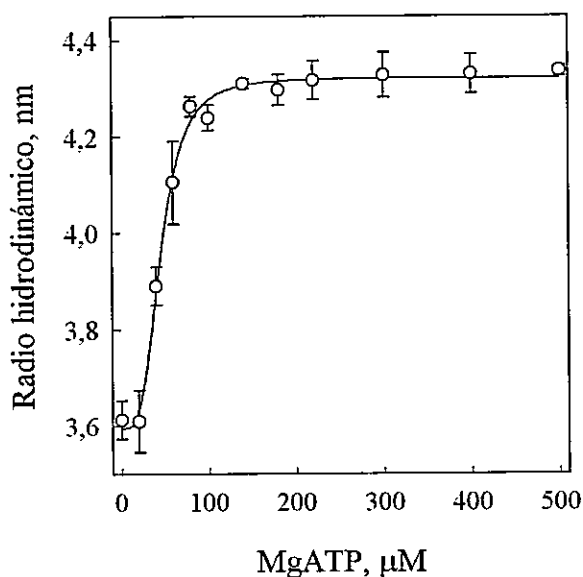
En la figura 34 se muestra la dependencia del  $R_H$  con la concentración de MgATP. Se puede observar que la determinación del  $R_H$  es lo suficientemente sensible para establecer el intervalo de concentración del ligando en el cual ocurre la transición de dímero a tetrámero. A 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Pfk-2, la transición es sigmoídea con una  $K_{0,5}$  de 46  $\mu\text{M}$  MgATP y un coeficiente de Hill de 3,5.

Posteriormente, se determinó el efecto de la concentración de proteína sobre la tetramerización inducida por MgATP. En la figura 35 se grafica la dependencia del  $R_H$

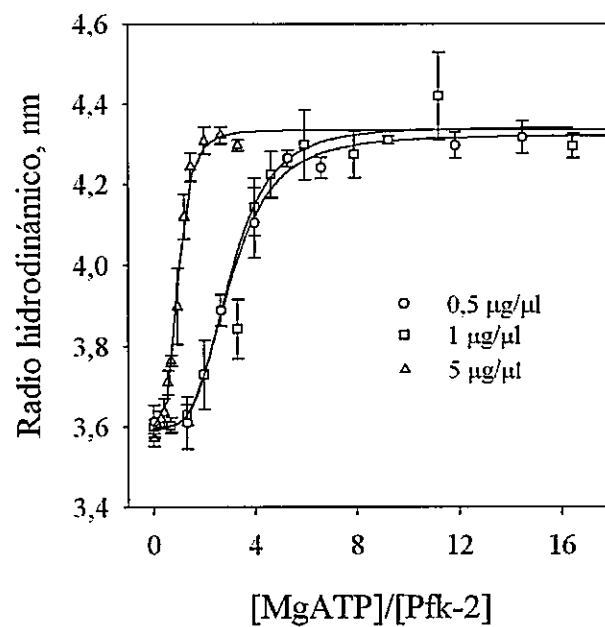




**Figura 33. Efecto de la tetramerización de Pfk-2 inducida por MgATP, sobre las medidas de dispersión dinámica de luz.** (a) Función de autocorrelación de Pfk-2 (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en ausencia (línea continua) y presencia (línea discontinua) de MgATP 500  $\mu\text{M}$ . (b) Histograma de regularización de las curvas mostradas en (a). Barra negra, Pfk-2 en ausencia de ligandos,  $R_H = 3,62$  nm; barra achurada, complejo Pfk-2+MgATP,  $R_H = 4,35$  nm.



**Figura 34. Tetramerización inducida por MgATP de Pfk-2.**  $R_H$  en función de la concentración de MgATP a una concentración de proteína de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La curva representa el ajuste a la ecuación de Hill, para el cual se obtuvo una  $K_{0,5}$  de 46  $\mu\text{M}$  y un  $n_H$  de 3,5.



**Figura 35. Efecto de la concentración de proteína sobre la tetramerización inducida por MgATP.** Las concentraciones de Pfk-2 ensayadas se indican en la leyenda. Los valores de  $R_H$  fueron graficados en función de los moles de MgATP por mol de monómero de Pfk-2.

con los moles de MgATP por mol de Pfk-2, a tres concentraciones de proteína, 0,5, 1 y 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se observa que a 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , la transición a tetrámero ocurre con una menor cantidad de moles de ligando por mol de proteína, que a 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Además, el coeficiente de Hill se incrementa de 3,5 a 3,8, indicando un aumento en la cooperatividad de la transición a mayor concentración de proteína. Entre 0,5 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  las diferencias entre las curvas no son significativas y caen dentro del error estándar de las mediciones.

Las observaciones anteriores son consecuentes con la predicción ii) "*a mayor concentración de proteína una menor cantidad de equivalentes de ligando serán necesarias para completar la transición de dímero a tetrámero*". Por lo tanto, se concluye que la tetramerización de Pfk-2 inducida por la unión de MgATP al sitio alostérico es explicada satisfactoriamente por un mecanismo de agregación mediada por ligando.

## **2. Mecanismo de inhibición de la actividad enzimática de Pfk-2 por unión de MgATP al sitio alostérico**

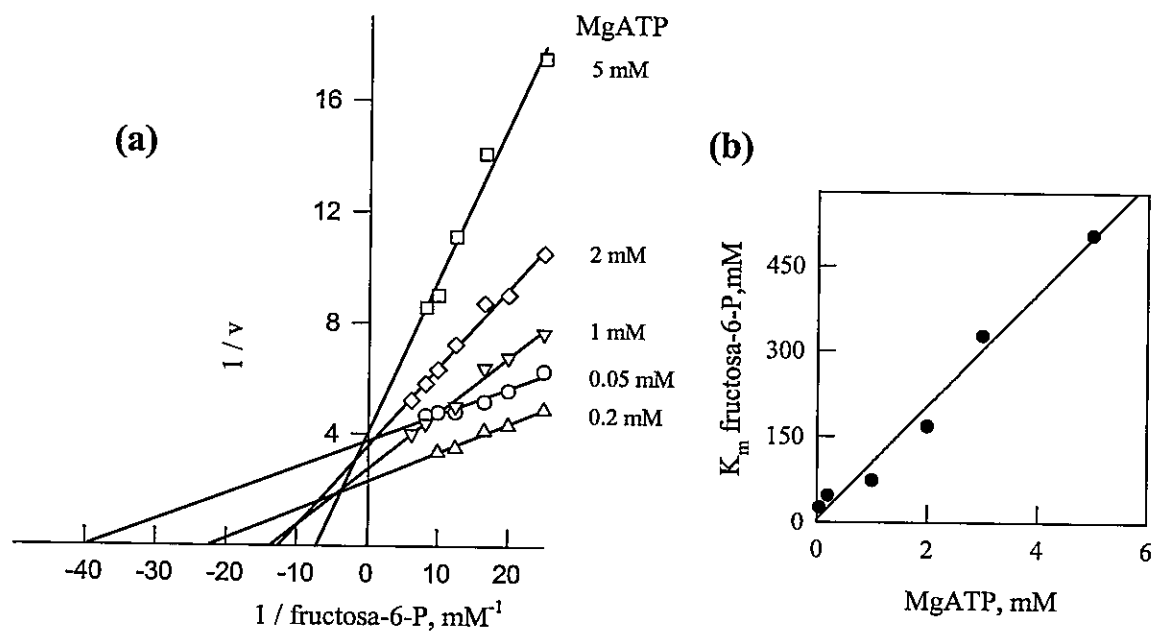
Una posible explicación para la inhibición de la actividad enzimática por MgATP en Pfk-2 podría ser análoga a la descrita por Fenton y Reinhart (2003) para la Pfk-1 de *E. coli*. Los autores proponen que la unión de MgATP en un sitio activo del tetrámero de Pfk-1, reduce la afinidad por fructosa-6-P en un segundo sitio. Esto es similar a lo que ocurre en la inhibición competitiva parcial. En Pfk-2, esto significaría que la unión de MgATP al sitio alostérico produce una enzima cuya afinidad por fructosa-6-P en el sitio activo es menor. Sin embargo, una explicación alternativa es que la unión de MgATP al sitio alostérico y la de fructosa-6-P al sitio activo sean mutuamente excluyentes

(inhibición competitiva clásica). En este caso, la unión de MgATP al sitio alostérico causa un cambio conformacional que distorsiona o enmascara el sitio para fructosa-6-P en el sitio activo (y *vice-versa*). En cinética enzimática, un comportamiento lineal de la  $K_m$  aparente con la concentración del inhibidor es el criterio para distinguir entre inhibición competitiva clásica e inhibición competitiva parcial. La última produce una dependencia hiperbólica para la  $K_m$  aparente con la concentración del inhibidor. Por otra parte, independientemente del mecanismo, los efectos son mutuos entre sustrato e inhibidor, es decir, la  $K_m$  aparente para el sustrato dependerá de la concentración del inhibidor de la misma manera que la  $K_i$  aparente dependerá de la concentración de sustrato.

Por lo tanto, para distinguir entre ambos mecanismos, se evaluó la dependencia de la  $K_m$  aparente para fructosa-6-P con la concentración de MgATP y el efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la  $K_{0.5}$  de tetramerización para MgATP.

### ***2.1 Efecto de la unión de MgATP al sitio alostérico sobre el sitio activo***

Se determinó la velocidad inicial de la reacción enzimática en función de la concentración de fructosa-6-P en presencia de diferentes concentraciones de MgATP. Todas las curvas fueron hiperbólicas y los parámetros cinéticos fueron obtenidos por ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten. En la figura 36a se muestran los datos graficados como dobles recíprocos y en la figura 36b, la dependencia de la  $K_m$  aparente para fructosa-6-P con la concentración de MgATP utilizada. La  $K_m$  sufre un incremento lineal, indicando que MgATP se comportaría como un inhibidor competitivo. Sin embargo, las  $V_{max}$  obtenidas también varían con el incremento de la



**Figura 36. Efecto de la concentración de MgATP sobre la  $K_m$  para fructosa-6-P.** (a) Gráfico de dobles recíprocos de la velocidad de reacción en función de la concentración de fructosa-6-P a diferentes concentraciones de MgATP. (b) Dependencia de la  $K_m$  aparente para fructosa-6-P obtenida a partir de los datos en (a) con la concentración de MgATP.

concentración de MgATP debido a que en el intervalo de concentraciones usadas se ven mezclados los efectos del nucleótido como sustrato y como inhibidor. Por otra parte, a concentraciones altas de MgATP, prima el efecto inhibitorio y por lo tanto las  $V_{\max}$  tienden a ser independientes de la concentración de MgATP, como se espera para una inhibición competitiva.

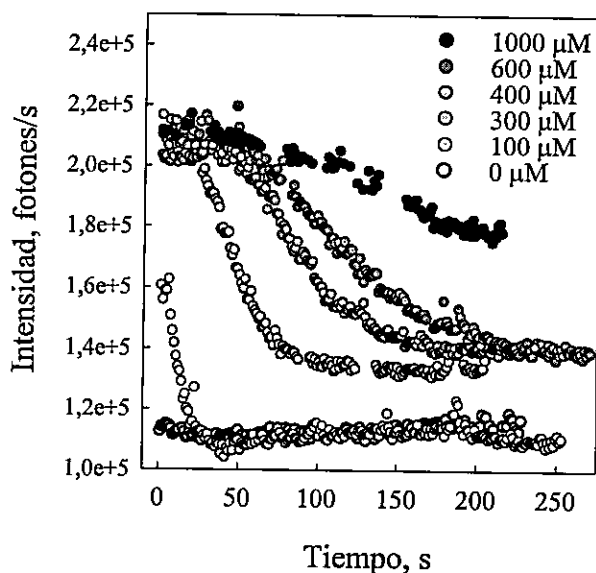
## ***2.2 Efecto de la unión de fructosa-6-P al sitio activo sobre el sitio alostérico***

Para corroborar los experimentos anteriores, se estudió el efecto de fructosa-6-P sobre la tetramerización inducida por MgATP. El principal inconveniente de este sistema es que la enzima consume fructosa-6-P y MgATP como sustratos durante el tiempo de determinación del estado de agregación, y genera los productos de la reacción. Esto se resolvió usando la mutante de Pfk-2 D256N, construida y caracterizada según se describe en Materiales y Métodos y la sección I.3 de Resultados. Dado que la mutación tiene como consecuencia una reducción de 10.000 veces en la  $k_{\text{cat}}$ , se puede considerar que en el curso del experimento fructosa-6-P actúa como un ligando que se une al sitio activo más que como un sustrato. Además, la mutación no perturba significativamente las  $K_m$  para los sustratos ni la inhibición por MgATP, indicando que la unión al sitio activo y al sitio alostérico no han sido afectadas.

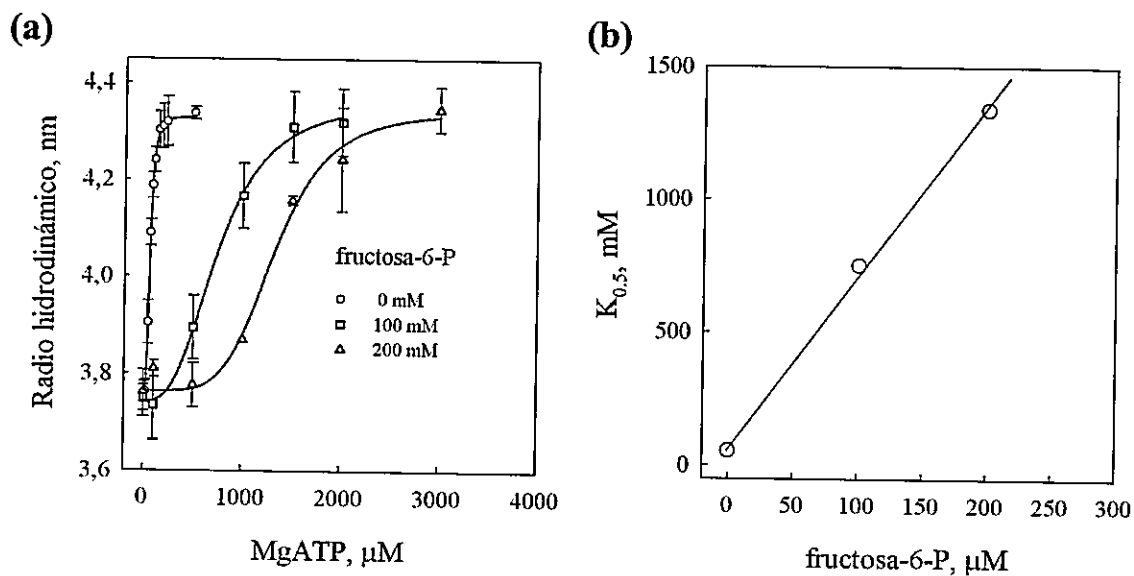
Se determinó la cinética del cambio en el estado de agregación por DLS para determinar el tiempo de incubación requerido antes de obtener una medición del  $R_H$  en condiciones de equilibrio. El cambio en el estado de agregación fue observado como el cambio en intensidad de fotones dispersados, ya que, de acuerdo con la ecuación de Rayleigh, dicha intensidad es proporcional a la masa molecular a concentración de

proteína constante. Por lo tanto, la intensidad dispersada por el dímero debe corresponder a la mitad de la intensidad dispersada por el tetrámero. En la figura 37 se observa el curso temporal de la intensidad después de agregar, a tiempo cero, 100  $\mu\text{M}$  de fructosa-6-P sobre soluciones de Pfk-2 D256N incubadas con concentraciones crecientes de MgATP (0 - 1 mM). El cambio en el estado de agregación se hace más lento con el incremento de la concentración inicial de MgATP. Además las curvas presentan una fase inicial lenta, que se extiende por más tiempo con el incremento de la concentración inicial de MgATP. La fase lenta se puede deber a que existe más de un paso entre el estado tetramérico y el dímero, y que uno de estos pasos depende de la concentración de MgATP. Una vez determinado el tiempo necesario para la estabilización de la intensidad se determinó el  $R_H$  para cada condición. En la figura 38a se muestra el comportamiento de la tetramerización inducida por MgATP a diferentes concentraciones de fructosa-6-P. Se observa que cuando fructosa-6-P está presente, se necesita una mayor cantidad de MgATP para completar la tetramerización. Este comportamiento es similar a lo observado con la inhibición, es decir, concentraciones de MgATP que en presencia de fructosa-6-P 0,1 mM son inhibitorias o producen tetrámeros, no tienen el mismo efecto en presencia de fructosa-6-P 1 mM. En la figura 38b se grafica la constante de tetramerización aparente ( $K_{0.5}$ ) en función de la concentración de fructosa-6-P. De acuerdo con la predicción para la unión mutuamente excluyente entre MgATP y fructosa-6-P, la  $K_{0.5}$  depende linealmente con la concentración de fructosa-6-P.

Estos resultados sugieren que la unión de fructosa-6-P al sitio activo y la unión de MgATP al sitio alostérico en el dímero, son mutuamente excluyentes. La unión de fructosa-6-P favorece la forma activa (dímero) y MgATP la forma inhibida (tetrámero).



**Figura 37. Cinética del cambio en el estado de agregación de Pfk-2.** Se monitoreó la intensidad de dispersión en función del tiempo para muestras pre-incubadas en la concentración de MgATP que se indica en la figura. A tiempo cero se adicionó fructosa-6-P para una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ . El tiempo de adquisición de datos fue de 1 s por punto



**Figura 38. Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la  $K_{0,5}$  de tetramerización para MgATP.** (a)  $R_H$  en función de la concentración de MgATP para la mutante D256N a diferentes concentraciones de fructosa-6-P, según se indica. (b) Dependencia de la  $K_{0,5}$  de tetramerización para MgATP, obtenida a partir de los datos en (a) con la concentración de fructosa-6-P.



## DISCUSION

En este trabajo, se estudió la relación entre estructura y función en la Pfk-2 de *E. coli*, con el propósito de establecer las bases estructurales de las propiedades regulatorias de esta enzima. Los resultados se dividieron en tres partes fundamentales, de acuerdo con los objetivos generales. Primero, se propuso un modelo para la estructura tridimensional de la proteína, mediante modelado por homología y además se obtuvieron resultados preliminares de cristalografía de rayos-X del complejo Pfk-2-MgATP. Mediante este modelo se estudió la participación en la catálisis de los residuos conservados en la familia PFKB, E190 y D256. Segundo, se estudió el efecto de la unión de los ligandos, fructosa-6-P y MgATP, sobre la estructura terciaria y cuaternaria de Pfk-2, mediante las técnicas de dispersión de rayos-X en ángulos pequeños y proteólisis limitada, usando como base el modelo generado para la enzima. Tercero, se determinaron los mecanismos de agregación y de inhibición de la actividad enzimática, inducidos por la unión de MgATP al sitio alostérico.

## **I. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE Pfk-2**

### **1. Modelado molecular de Pfk-2**

Debido a que la información contenida en las secuencias de proteína es limitada, los métodos existentes pueden fallar parcial o completamente en alinear los residuos en los fragmentos estructuralmente equivalentes, donde la similitud de secuencia es muy baja. Es inusual lograr una exactitud en el alineamiento mayor al 80% cuando el porcentaje de identidad entre dos secuencias es inferior al 50% (Marti-Renom y col., 2000; Saqi y col., 1998). Sin embargo, es bien sabido que la similitud estructural entre proteínas homólogas es más conservada que la similitud de la secuencia. Así, debido a que el número de estructuras de proteína depositadas en el PDB crece sostenidamente, se hace más frecuente hallar un número mayor de proteínas que presentan similitud estructural, pero que filogenéticamente son distantes. Por lo tanto, la información estructural a partir de estas proteínas debe ser usada para mejorar la exactitud del alineamiento entre secuencias de proteínas remotamente homólogas. El método utilizado para optimizar el alineamiento entre la Pfk-2 y sus moldes consiste en la generación de alineamientos múltiples de la familia, para incrementar el contenido de la información de secuencia, y la imposición de restricciones para la introducción de interrupciones, a partir de la información de la estructura de los moldes.

A través del análisis de alineamientos múltiples, como los mostrados en la figura 5 y 6, pueden identificarse aquellos residuos de aminoácidos que son probablemente equivalentes estructuralmente entre los moldes y la secuencia objetivo (Ernst y col., 2003). Las columnas mostradas en negro, indican los residuos conservados dentro de la

familia, mientras que en colores se muestran los bloques conservados sólo dentro de un grupo, los cuales reflejan especialización funcional. El análisis de la posición de estos bloques puede indicar una buena probabilidad de similitud estructural entre segmentos moderadamente o pobremente conservados entre los grupos dentro de la familia.

Se obtuvo buenos índices de evaluación del modelo. El plegamiento fue evaluado con el programa ProsaII en conjunto con el  $p(G)$  server. ProsaII otorga un puntaje de pseudo-energía ( $Z$ -score) que es dependiente de la longitud de secuencia del modelo. El valor de  $p(G)$  calculado a partir de este  $Z$ -score confiere una medida independiente de la longitud de secuencia de la probabilidad (entre 0 y 1) que el modelo tenga un plegamiento correcto. Esta probabilidad está basada en estadísticas de los puntajes obtenidos por modelos cuyo plegamiento correcto o incorrecto es conocido. El servidor Verify3D mide la compatibilidad entre la estructura de un modelo (3D) y su secuencia (1D). Cada residuo en el modelo es asignado a una clase estructural de acuerdo con su localización y entorno, luego se evalúa la frecuencia del residuo en esta clase estructural, en una base de datos de estructuras de proteína. Finalmente, se asigna un puntaje al residuo de acuerdo con la frecuencia obtenida. Modelos que poseen un plegamiento correcto presentan puntajes superiores a 0,1 sobre todos sus residuos.

En el modelo, hay 3 zonas que presentan bajos puntajes 3D-1D (0-0,1) y corresponden a las posiciones alrededor de los residuos 120, 174 y 246. Estas posiciones no se encuentran conservadas en el alineamiento y en el modelo corresponden a regiones expuestas al solvente, que no forman parte de elementos de estructura secundaria. Por otra parte, las regiones conservadas se encuentran hacia el interior de la proteína y en el sitio activo, lo cual indica que los rasgos estructurales

extraídos desde las proteínas homólogas, corresponden a determinantes estructurales del plegamiento y la función en la familia PFKB.

Dentro de las regiones conservadas que forman parte del sitio activo en el modelo, se encuentran dos residuos cuya función en la catálisis puede ser asignada a partir de las interacciones que ellos presentan en el sitio activo de las estructuras homólogas resueltas en presencia de sustratos. La participación de estos residuos en la catálisis fue evaluada mediante la caracterización cinética de enzimas mutantes en estos residuos. Por otra parte, el modelo generado fue usado como base para determinar los cambios conformacionales inducidos por los ligandos y para modelar la estructura del tetramero, mediante la técnica de dispersión de rayos-X en ángulos pequeños.

## **2. Participación de aminoácidos conservados en la familia PFKB en la catálisis enzimática de Pfk-2**

Los resultados mostrados en la tabla 2 indican que la mutación de los aminoácidos D256 y E190 afectan las propiedades catalíticas de Pfk-2.

El hidroxilo que se fosforila en el sustrato azúcar se encuentra formando un puente de hidrógeno con el residuo de aspártico del motivo GAGD en las estructuras de la riboquinasa de *E. coli* y las adenosina quininas de humano y *Toxoplasma gondii*, cristalizadas en presencia del sustrato. Esto sugiere la función de este aminoácido como la base catalítica en la reacción catalizada por esta familia de enzimas. Estudios de mutagénesis sitio dirigida en la adenosina quinasa de hamster chino (Maj y col., 2000), mostraron que la sustitución del aspártico correspondiente por asparragina o glutámico conducen a una disminución de cinco órdenes de magnitud en la actividad específica. La

disminución en un factor de  $10^{-4}$  en la  $k_{\text{cat}}$  de la mutante D256N respecto de la enzima nativa es consecuente con estas observaciones. Pruebas estructurales y cinéticas indican que el mecanismo catalítico de la transferencia del fosfato- $\gamma$  del ATP a fructosa-6-P en Pfk-1, también depende de la activación del hidroxilo-1 del azúcar por un residuo de aspártico (Berger y Evans, 1992). Este aspártico catalítico, se encuentra completamente conservado en la familia PFKA, pero forma parte de un motivo muy diferente en secuencia y en estructura (Ronimus y Morgan, 2001), constituyendo un caso de analogía y no de homología.

La  $K_m$  para MgATP no se ve afectada significativamente por la mutación D256N, en tanto que la constante para fructosa-6-P aumenta al doble, lo cual puede interpretarse en términos de la interacción entre la cadena lateral de este aminoácido con el sustrato azúcar.

En la estructura de la adenosina quinasa de humano es posible observar, en el sitio activo, un ion magnesio coordinado a 6 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , que interactúan mediante puentes de hidrógeno con la cadena lateral del glutámico 223 (Mathews y col., 1998). Este aminoácido forma parte del motivo (N/S)XXE, completamente conservado en la familia PFKB (figura 8). Estas observaciones fueron consideradas en el proyecto original de esta tesis, para proponer la función de este residuo de glutámico en la unión del cofactor  $\text{Mg}^{+2}$  en el sitio activo de Pfk-2. Más recientemente, Maj y col. (2002) estudiaron, por mutagénesis sitio-específica, la función del motivo NXXE en adenosina quinasa de hamster chino en relación con el mecanismo de activación por  $\text{PO}_4^-$  y la utilización de  $\text{Mg}^{+2}$  en esa enzima. Dos de las mutaciones generadas por estos autores fueron glutámico por aspártico (E $\rightarrow$ D) y glutámico por leucina (E $\rightarrow$ L).

Interesantemente, la sustitución E→D provoca, en ausencia de  $\text{PO}_4^-$ , una disminución de la  $K_m$  por el sustrato fosforilable y un incremento de la  $K_m$  por ATP respecto de la enzima nativa, reflejando lo observado con la mutante E190Q en Pfk-2. De la misma manera, en la mutante E→D, se incrementa la  $K_m$  para  $\text{Mg}^{+2}$  en 10 veces y se afecta la activación por  $\text{PO}_4^-$ , indicando una posible interacción de estos iones con la cadena lateral. La eliminación de la carga del glutámico en la mutante E→L, tiene como consecuencia una fuerte caída de la  $k_{cat}$ , aunque las  $K_m$  para los sustratos también se ven drásticamente afectadas. Esto sugiere una distorsión en la estructura del sitio activo debido al reemplazo de un aminoácido cargado por uno hidrofóbico. Lamentablemente no se realizó en este estudio el cambio conservado E→Q, lo cual hubiera hecho comparables los efectos de las mutaciones en adenosina quinasa y Pfk-2. Maj y col. (2002) proponen un modelo para el sitio activo, en el cual los aminoácidos asparragina y glutámico, del motivo NXXE, interactúan tanto con  $\text{PO}_4^-$  como con  $\text{Mg}^{+2}$ , sin embargo no ofrecen una explicación satisfactoria para los resultados observados.

En Pfk-2 no ha sido determinado si el anión  $\text{PO}_4^-$  afecta de alguna manera la actividad enzimática ni si existe un segundo sitio para  $\text{Mg}^{+2}$  (diferente al de  $\text{MgATP}$ ) de manera que sea posible observar el efecto de  $\text{Mg}^{+2}$  libre sobre la actividad enzimática. No obstante, una demostración no ambigua de la interacción de  $\text{Mg}^{+2}$  con el glutámico conservado sólo podría provenir de estudios de unión, usando  $\text{Mg}^{+2}$  radiactivo o reemplazando el  $\text{Mg}^{+2}$  por  $\text{Mn}^{+2}$  en mediciones de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Experimentos preliminares demuestran que  $\text{Mn}^{+2}$  puede sustituir a  $\text{Mg}^{+2}$  en la reacción enzimática y que la unión es detectable por EPR.

### 3. Cristalización y análisis cristalográfico preliminar del complejo Pfk-2-MgATP

En una red tetragonal, los parámetros de la celda deben cumplir que,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  y  $a = b \neq c$  (existe un eje de rotación de orden cuatro en la dirección de  $c$ ). La red tetragonal puede ser primitiva, es decir, que contiene solo un punto de la red (y por lo tanto, el mínimo volumen posible), o puede contener un punto adicional centrado en el interior de la celda. Siempre es posible describir el cristal utilizando una celda primitiva, pero frecuentemente se recurre a celdas centradas porque reflejan mejor la simetría intrínseca del cristal. Después de auto-indexación con MOSFLM, los patrones de difracción mostraron que el complejo Pfk-2-MgATP cristaliza en una red tetragonal primitiva, con  $a = b = 99,19 \text{ \AA}$  y  $c = 319,43 \text{ \AA}$ . Aunque se observó la presencia de un eje helicoidal  $2_1$  en las direcciones perpendiculares al eje de orden 4, no se logró coleccionar datos a lo largo de este eje. Debido a esto no es posible resolver el grupo espacial correcto entre los grupos  $P4_21_2$ ,  $P4_12_12$ ,  $P4_22_12$  y  $P4_32_12$ .

Una solución para resolver el grupo correcto es coleccionar los datos que faltan a partir de otro cristal crecido en las mismas condiciones. Pero si la determinación de la estructura es viable por Reemplazo Molecular, el método más seguro consiste en encontrar la función de translación con cada grupo espacial y analizar el coeficiente de correlación en cada caso. Esto corresponde a las etapas iniciales en la resolución de las fases. A pesar de que los datos coleccionados no llegan a una resolución muy alta (hasta  $3,7 \text{ \AA}$  en el borde de la placa), se puede intentar resolver las fases por Reemplazo Molecular ya que en las etapas iniciales de este método se usan datos hasta este nivel de resolución.

En la figura 4 se observa que la intensidad de la difracción disminuye significativamente al alejarse del centro de la placa. Este es un problema frecuente en la

cristalografía de proteínas debido a que los cristales contienen generalmente porciones considerables de solvente acuoso, disminuyendo el orden en el empacamiento de las moléculas de proteína. Esto hace que las posiciones relativas de las moléculas sean un poco diferentes de una celda unitaria a otra, lo cual reduce principalmente la intensidad a alta resolución.

A pesar de la débil señal de difracción, el bajo valor del factor  $R_{\text{sym}}$  (y el más robusto,  $R_{\text{meas}}$ ) obtenido después del escalonamiento y promediación, indica una buena calidad de los datos (Diederichs y Karplus, 1997). Esto se debió principalmente a que fueron colectadas un gran número de imágenes (240) con un ángulo de oscilación pequeño ( $\Delta\phi/\text{foto} = 0,5^\circ$ ). Esto también resultó en más del 90% de completamiento de datos para la capa externa.

Un alto valor de *mosaicidad* también debilita la intensidad de la difracción y puede hacer difícil o imposible la reducción de datos debido al traslape de las reflexiones. Dado que el cristal difractado fue un fragmento de un policristal (figura 3), era esperable que estuviera compuesto de bloques en mosaico. En este caso, se determinó el valor de *mosaicidad* para no dejar ninguna reflexión fuera de las predicciones.

Considerando la masa molecular de la Pfk-2 y el volumen de la celda unitaria, se estimó que existen cuatro moléculas por celda y dado que fue cristalizado el complejo Pfk-2- MgATP, se espera que estas moléculas estén formando un tetrámero. La presencia de un tetrámero fue corroborada por el análisis de la función de auto-rotación del mapa de Patterson, donde se encontraron dos ejes no cristalográficos de orden 2,



mientras que el tercero sería co-lineal con el eje cristalográfico de orden cuatro (figura 5).

Para resolver las fases por el método de Reemplazo Molecular, las estructuras de la riboquinasa de *E. coli* (PDBid: 1rkd) y la quinasa de azúcares putativa de *Thermotoga maritima* (TM0828, PDBid: 1o14) serán utilizadas como modelo de búsqueda usando el programa AMoRe (Navaza, 1994). Alternativamente se usarán modelos truncados de estas estructuras, excluyendo el dominio menor, el cual es el menos conservado. También se usará el modelo por homología de Pfk-2 con la configuración optimizada para el tetramero, determinada por SAXS.

Se han publicado estructuras de proteína a 4 Å de resolución (Lucas y col., 2002; Murakami y col., 2002). En estos casos, en el mapa de densidad electrónica es posible definir el recorrido de la cadena polipeptídica; sin embargo la configuración de las cadenas laterales de los aminoácidos presenta mucha incerteza. Por otro lado, a esta resolución, sería posible localizar el sitio alostérico para MgATP en el tetramero de la Pfk-2, lo que hasta el momento se desconoce.

## II. EFECTO DE LA UNIÓN DE LIGANDOS SOBRE LA ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA DE Pfk-2

### 1. Modelado de los cambios conformacionales inducidos por ligandos usando los datos de SAXS

#### 1.1 Estructura de Pfk-2 en ausencia de ligandos y en presencia de fructosa-6-P

Estudios cristalográficos de las enzimas riboquinasa de *E. coli* y adenosina quinasa de *Toxoplasma gondii* (Sigrell y col., 1999; Schumacher y col., 2000), muestran que ocurre una rotación de los dominios cuando el azúcar se une al sitio activo. Recientemente, el mismo cambio conformacional se ha documentado para la glucoquinasa dependiente de ADP de *Pyrococcus furiosus*, que pertenece a una familia de quinasas relacionada con la familia PFKB y que presenta un plegamiento similar (Ito y col., 2003). Este movimiento de dominios está caracterizado por cambios en los ángulos de torsión de la cadena polipeptídica del grupo de residuos comprendidos en la bisagra que une el dominio mayor y el menor (Schumacher y col., 2000). Estos cambios afectan principalmente a un par de glicinas cuya posición en la secuencia se encuentra conservada en todas las proteínas de la familia, constituyendo el motivo (G/A)GX(G/P)XN. En la conformación unida al azúcar, el desplazamiento de estas glicinas previene un impedimento estérico con el sustrato. Además, como consecuencia de la unión del azúcar, se favorece una conformación con mayor afinidad por el nucleótido en el sitio activo. El cierre del sitio activo, como consecuencia del movimiento de dominios en estas estructuras disminuye la accesibilidad al solvente del sitio activo, lo que previene reacciones laterales, como la hidrólisis de MgATP.

Estas observaciones sugieren que la unión del azúcar a una conformación abierta del sitio activo promueve cambios estructurales que incrementan la afinidad por el nucleótido y el cierre del sitio activo. Este movimiento de dominios sería un mecanismo general de cambios conformacionales asociados a la catálisis en la familia de enzimas PFKB. En Pfk-2, tres líneas independientes de evidencias apoyan este mecanismo. Primero, los estudios de cinética enzimática, muestran que el orden de entrada de los sustratos al sitio activo es secuencial, siendo fructosa-6-P el primer sustrato en unirse a la enzima (Campos y col., 1984). Segundo, los estudios de proteólisis limitada sugieren que la forma dimerica de Pfk-2 en presencia de fructosa-6-P es más compacta que la forma libre, lo cual es consecuente con el paso a una conformación cerrada. Tercero, el cierre del sitio activo, modelado por movimientos de cuerpo rígido, mejora el ajuste del modelo con los datos de SAXS del complejo Pfk-2-fructosa-6-P.

Cabe hacer notar que los ángulos de rotación entre los dominios de Pfk-2, correspondientes a los mínimos en la función  $\chi$  en la figura 10b, no corresponden a aquellos observados en las formas libre y unida a sustrato de riboquinasa. Esto puede reflejar una diferencia real entre ambas enzimas o que existen cambios que son diferentes de aquellos propuestos en este modelo.

### ***1.2 Estructura de Pfk-2 unida a MgATP. Empacamiento tetramérico de las subunidades***

La estructura del tetrámero de Pfk-2 fue modelada como un dímero de dímeros (con simetría molecular 222), ajustando la distancia entre los centros de masa, la inclinación relativa y el grado de cierre de dominios. La suposición acerca de la simetría

molecular del tetrámero fue corroborada mediante el análisis de la función de autorotación del mapa de Paterson, según fue descrito en la sección I.3 de RESULTADOS. En el modelo tetramérico obtenido, los dímeros se encuentran en una disposición casi paralela con los sitios activos orientados externamente y con un ángulo de rotación de dominios entre  $1^\circ$  y  $9^\circ$ . Es interesante notar que el tetrámero posee una configuración cerrada del sitio activo que es incluso más cerrada que la forma unida a fructosa-6-P.

Por lo tanto, se propone que, dado que el cierre del sitio activo ocluye la entrada del solvente, la unión de MgATP al sitio alostérico induce una configuración bloqueada del sitio activo, la cual previene la entrada de fructosa-6-P. Esta es la primera explicación estructural acerca de por qué la Pfk-2 unida a MgATP en el sitio alostérico es una forma enzimática inhibida.

Por otra parte, es importante notar que el cierre del sitio activo es un evento independiente de la tetramerización. Si el cierre de dominios fuera suficiente para exponer los determinantes estructurales necesarios para la tetramerización, se debería esperar tetrámeros como consecuencia de la unión de fructosa-6-P, y ese no es el caso. A menos que MgATP forme parte de la interfaz dímero-dímero, este ligando debe inducir otro cambio conformacional, diferente del cierre de dominios, que sea responsable del cambio en el estado de agregación.

En la riboquinasa, la estructura de la interfaz dimérica es muy similar al dominio de unión a ligandos en proteínas de transporte de lípidos y retinoides (Sigrell y col., 1998; Banaszak y col., 1994), pero el empacamiento ortogonal de sábanas- $\beta$  carece del espacio suficiente para alojar a una molécula pequeña. La posibilidad de que el sitio

alostérico corresponda a la interfaz dimerica en Pfk-2 no puede ser descartada o corroborada por estos estudios.

Experimentos de apagamiento de fluorescencia intrínseca por acrilamida en Pfk-2 (Guixé y col., 1998), demuestran que la accesibilidad al solvente del triptofano se reduce significativamente cuando la proteína tetrameriza, pero esta es similar en la enzima libre o unida a fructosa-6-P. Estas observaciones concuerdan con los modelos propuestos para Pfk-2. El triptofano-88 de Pfk-2 se encuentra localizado en el dominio mayor, muy cerca de la región de la bisagra y en una región próxima a la interfaz dímero-dímero, de manera que se espera un cambio en su accesibilidad a solvente como consecuencia de la tetramerización.

## **2. Estudios de proteólisis limitada**

La digestión controlada de Pfk-2 con subtilisina, en presencia de fructosa-6-P, remueve un fragmento de aproximadamente 5 kDa de la región carboxilo terminal. El estado de agregación determinado por cromatografía de exclusión corresponde a un dímero, lo cual es consecuente con la estructura propuesta por modelado, donde las regiones que forman parte de la interfaz monómero-monómero (de Ser12 a Gly38 y de Arg90 a Pro109) se localizan hacia el amino terminal. El hecho que el intermediario de 28 kDa no presente actividad enzimática también se condice con el modelo, ya que la remoción de los últimos ~46 aminoácidos (lo que equivale a un fragmento de 5 kDa) produciría una desestabilización del aminoácido catalítico, D256. Por otra parte, el modelo predice que la región de corte corresponde al lazo que presenta la mayor longitud y la mayor flexibilidad en la estructura, por lo cual constituye un blanco

apropiado para el ataque proteolítico. Este lazo forma parte del sitio de unión para el nucleótido en el sitio activo de la riboquinasa y la adenosina quinasa. Estos resultados coinciden con experimentos realizados con la adenosina quinasa de hamster chino (Maj y col., 2000), donde cortes sistemáticos de la región carboxilo terminal producen una pérdida progresiva de la actividad. Dichos cortes también conducen a un incremento dramático de la  $K_m$  para MgATP, sin afectar significativamente la  $K_m$  por adenosina.

Con las tres proteasas usadas (tripsina, proteinasa K y subtilisina), las cuales difieren en su especificidad por el sitio de corte, fructosa-6-P proporciona una protección parcial de la cadena polipeptídica sin alterar el patrón de corte proteolítico. Esto sugiere que la estructura dimerica del complejo Pfk-2-fructosa-6-P es más compacta que el dímero libre. Además, considerando los resultados de SAXS, el efecto protector es consecuente con la disminución de la accesibilidad del lazo mencionado anteriormente, cuando los dominios se cierran sobre el sitio activo.

La fluorescencia del intermediario de 28 kDa disminuye en presencia de fructosa-6-P, lo cual es opuesto a lo que ocurre con la enzima nativa, donde la unión del ligando produce un incremento de un 30% en condiciones saturantes. Sin embargo, la titulación del cambio presenta una dependencia hiperbólica y una  $K_d$  de  $3\mu\text{M}$ , muy similar al valor obtenido para la enzima nativa, de  $6\mu\text{M}$  (Guixé y col., 1998). Esto está de acuerdo con las observaciones en adenosina quinasa de hamster chino, donde las deleciones del carboxilo terminal no afectan significativamente la afinidad por adenosina en el sitio activo.

Al igual que en la proteína nativa, la unión de MgATP produce un apagamiento de la fluorescencia del intermediario, y por lo tanto, éste no ha perdido el sitio alostérico.

No obstante, la respuesta de la fluorescencia del intermediario con la concentración de MgATP es hiperbólica con una  $K_d$  de 20  $\mu\text{M}$ . En el caso de la enzima nativa, la respuesta es sigmoídea con una  $K_d$  de 80  $\mu\text{M}$ . Dado que el intermediario no tetrameriza, lo anterior sugiere que la respuesta sigmoídea en la enzima nativa es una consecuencia de la tetramerización y no se debe a la interacción de sitios alostéricos en diferentes subunidades.

### III. REGULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y LA OLIGOMERIZACIÓN DE Pfk-2

#### 1. Mecanismo de tetramerización de Pfk-2 inducida por la unión de MgATP al sitio alostérico

Una de las propuestas más tempranas para explicar la desviación de las isotermas de unión del comportamiento previsto por la ecuación  $P + X \leftrightarrow PX$ , fue la agregación (Hill, 1910). Se sabe que numerosas enzimas sufren cambios en su estructura cuaternaria en presencia de sustratos o efectores. Nichol y col. (1967) y Frieden (1967) señalaron que este proceso es análogo al desplazamiento del equilibrio conceptualizado en el modelo concertado de transición alostérica (Monod y col., 1965) y debe producir cooperatividad en la unión del ligando.

La unión de MgATP al sitio alostérico presenta cooperatividad positiva; sin embargo, ésta es afectada por la concentración de proteína. Esto significa que un equilibrio de agregación está implicado en el proceso de unión. El análisis de la unión de MgATP a dos concentraciones de Pfk-2 indica que existe un sitio por monómero con una  $K_d$  de 90  $\mu\text{M}$ , similar a la obtenida por medidas de fluorescencia, y que la oligomerización está mediada por la unión del nucleótido al sitio alostérico. Este modelo de unión predice que no existe un equilibrio de agregación en ausencia del ligando y que el incremento de la concentración de proteína disminuye la cantidad de moles de ligando por mol de proteína necesarios para completar la tetramerización.

La evaluación experimental de ambas predicciones requiere de un estudio del efecto de la concentración de proteína sobre el estado oligomérico de Pfk-2 en ausencia



y presencia de MgATP. Aunque es posible observar el efecto de MgATP sobre la tetramerización en columnas de filtración molecular de alta resolución, diversos factores dificultan la cuantificación de las fracciones de dímero y tetrámero por este método. El primero es que la columna no resuelve claramente los límites de los picos correspondientes a cada especie y la desconvolución por métodos computacionales no produce resultados satisfactorios (residuales mayores que el 30% del área total). En segundo lugar, el área total va cambiando debido a la unión de MgATP, que también absorbe a 280 nm, y esta unión es diferente para el dímero y el tetrámero. Debido a estos inconvenientes, el estado de agregación fue determinado por dispersión dinámica de luz (DLS). Esta técnica posee la sensibilidad suficiente para mostrar los cambios en el radio hidrodinámico asociados a la transición entre dímero y tetrámero de la Pfk-2.

En el rango de concentración entre 0,25-28,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , el estado de agregación no muestra dependencia con la concentración de proteína. Por otra parte, a mayor concentración de proteína, un menor número de moles de MgATP por mol de proteína es necesario para completar la tetramerización. Estos resultados corroboran las predicciones hechas a partir del análisis de unión de MgATP al sitio alostérico, estableciendo que la formación de tetrámeros es dependiente de la presencia de MgATP en el sitio alostérico.

Este resultado, en conjunto con los obtenidos a partir del modelado de la estructura del tetrámero, sugieren que la unión de MgATP al sitio alostérico induce una conformación inhibida de la enzima y que esta es posteriormente estabilizada por la formación de tetrámeros. De esta manera, el paso de dímero a tetrámero en Pfk-2,

desplazaría el equilibrio de unión hacia el complejo Pfk-2-MgATP, consolidando el efecto inhibitorio.

## **2. Mecanismo de inhibición de la actividad enzimática de Pfk-2 por unión de MgATP al sitio alostérico**

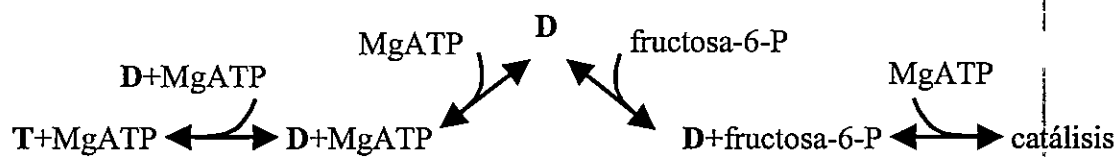
En estudios previos se ha observado que MgATP inhibe la actividad enzimática de Pfk-2 a concentraciones bajas de fructosa-6-P (0,1 mM) y que no presenta inhibición a altas concentraciones de fructosa-6-P (Guixé y Babul, 1985). En estudios de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa se demostró que en condiciones inhibitorias (4 mM MgATP, 0,1 mM fructosa-6-P) la Pfk-2 sedimenta como tetrámero, mientras que en condiciones no inhibitorias (4 mM MgATP, 1 mM fructosa-6-P) sedimenta como dímero (Guixé y Babul, 1988). Sin embargo no se ha realizado un análisis cuantitativo, con el fin de proponer un mecanismo que explique la regulación de la actividad enzimática de Pfk-2 debido a la unión alostérica de MgATP.

Al igual que Pfk-2, la Pfk-1 de *E. coli*, presenta inhibición por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P, aunque en intervalos diferentes de concentraciones (Johnson y Reinhart, 1992). Estudios de cinética enzimática en Pfk-1 indican que ambos sustratos, MgATP y fructosa-6-P, afectan negativamente la unión del otro con un comportamiento que presenta saturación (Deville-Bonne y col., 1991; Zheng y Kemp, 1992). Dado que Pfk-1 presenta un mecanismo al azar para la unión de sustratos al sitio activo, este antagonismo implica que la presencia del primer sustrato disminuye la afinidad de la unión del segundo sustrato para la formación del complejo ternario Pfk-1-fructosa-6-P-MgATP. Fenton y Reinhart (2003) proponen que el antagonismo en Pfk-1

posee un carácter alostérico, ya que la presencia de uno de los sustratos en un sitio activo disminuye la afinidad de unión del otro sustrato en otro sitio activo del tetrámero. De esta manera, la inhibición por MgATP en Pfk-1 se explicaría porque al saturarse los sitios activos con el incremento en concentración del nucleótido, la afinidad por fructosa-6-P pasa del orden micromolar al milimolar. Es decir, la unión de MgATP a un sitio activo produce una enzima cuya afinidad por fructosa-6-P es mucho menor que la afinidad de la enzima libre. Este efecto es similar a lo que ocurre en la inhibición competitiva parcial.

Se realizaron experimentos para determinar si el mecanismo de la inhibición por MgATP en Pfk-2 corresponde a una inhibición competitiva parcial o, alternativamente, a una inhibición competitiva clásica (unión mutuamente excluyente entre MgATP y fructosa-6-P). Se evaluó la dependencia de la  $K_m$  aparente para fructosa-6-P con la concentración de MgATP y el efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la tetramerización inducida por MgATP en una mutante inactiva de Pfk-2 (D256N). La dependencia lineal de la  $K_m$  aparente para fructosa-6-P y la  $K_{0,5}$  aparente para MgATP con la concentración de MgATP o fructosa-6-P, respectivamente, sugiere que la unión de ambos ligandos es mutuamente excluyente.

En su conjunto, la tetramerización mediada por la unión de MgATP al sitio alostérico y la exclusión mutua con la unión de fructosa-6-P al sitio activo pueden ser resumidas en el siguiente equilibrio.



donde "D" y "T" representan al dímero y al tetrámero de Pfk-2, respectivamente. La unión de MgATP a D corresponde al sitio alostérico, mientras que la unión de MgATP al complejo D-fructosa-6-P se refiere al sitio activo.

Así, la inhibición por MgATP puede explicarse de la siguiente manera: la unión de MgATP al sitio alostérico impide la formación del complejo Pfk-2-fructosa-6-P, estableciendo un equilibrio entre las formas dímero y tetrámero, ambas unidas al ligando. A una concentración saturante de MgATP, existirá una pequeña población de dímeros de Pfk-2 no unida a MgATP, la cual estará disponible para la unión de fructosa-6-P. Dicha unión, desplazará el equilibrio de unión de MgATP al sitio alostérico hacia la enzima libre, con lo cual, a altas concentraciones de fructosa-6-P la inhibición será revertida.

Se conoce la  $K_d$  para la formación del complejo D-MgATP a partir de los resultados de esta tesis y la  $K_d$  para la formación del complejo D-fructosa-6-P a partir de estudios de fluorescencia (Guixé y col., 1998). La  $K_d$  para la asociación de los dímeros D+MgATP no se conoce; sin embargo debe ser del orden nanomolar o más baja. Esto porque la concentración de Pfk-2 usada para determinar la actividad enzimática es del orden nanomolar y en esas condiciones se observa inhibición, la cual se correlaciona con la tetramerización.

## Proyecciones de la Tesis

Tomando en cuenta los resultados preliminares de cristalografía, se pueden mejorar las condiciones de cristalización, o usar una fuente de rayos-X de mayor intensidad (síncrotron) para difractar cristales crecidos en las mismas condiciones, con el propósito de obtener mayor intensidad de las reflexiones a alta resolución.

Se puede evaluar la función de otros aminoácidos conservados en el alineamiento generado para la familia PFKB como determinantes estructurales para la afinidad por los sustratos.

Los estudios de la función del aminoácido E190 pueden completarse por mediciones de unión de  $Mg^{+2}$  radiactivo o unión de  $Mn^{+2}$  por EPR. También deberán determinarse los parámetros cinéticos para  $Mg^{+2}$  libre.

El modelo presentado para la estructura del tetrámero permite proponer qué aminoácidos estarían implicados en la interfaz dímero-dímero. Estos aminoácidos pueden ser mutados para prevenir la formación del tetrámero y así estudiar el efecto del sitio alostérico sobre la actividad enzimática en ausencia del cambio en el estado de agregación.

Considerando el equilibrio propuesto para la unión de los ligandos a Pfk-2, es posible derivar ecuaciones para modelar el efecto de los ligandos sobre la actividad y el estado de agregación. El poder predictivo del modelo se podrá evaluar mediante el ajuste con los datos experimentales.

**Publicaciones generadas por la Tesis hasta la fecha de su presentación**

Cabrera, R., Guixé, V., Alfaro, J., Rodriguez, P. H. y Babul, J. 2002. Ligand-dependent structural changes and limited proteolysis of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2. *Arch Biochem Biophys* **406**(2): 289-295.

Cabrera, R., Fischer, H., Trapani, S., Craievich, A. F., Garratt, R. C., Guixé, V. y Babul, J. 2003. Domain motions and quaternary packing of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli* studied by small angle x-ray scattering and homology modeling. *J Biol Chem* **278**(15): 12913-12919.

## REFERENCIAS

- Anderson, P. M. 1986. Carbamoyl-phosphate synthetase: an example of effects on enzyme properties of shifting an equilibrium between active monomer and active oligomer. *Biochemistry* **25**(19): 5576-5582.
- Anderson, P. M. y Marvin, S. V. 1968. Effect of ornithine, IMP, and UMP on carbamoyl phosphate synthetase from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **32**(6): 928-934.
- Banaszak, L., Winter, N., Xu, Z., Bernlohr, D. A., Cowan, S. y Jones, T. A. 1994. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem* **45**: 89-151.
- Berger, S. A. y Evans, P. R. 1992. Site-directed mutagenesis identifies catalytic residues in the active site of *Escherichia coli* phosphofructokinase. *Biochemistry* **31**(38): 9237-9242.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. y Bourne, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**(1): 235-242.
- Bevington P. B. 1969. Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences. McGraw-Hill, New York.
- Blangy, D., Buc, H. y Monod, J. 1968. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **31**(1): 13-35.
- Bork, P., Sander, C. y Valencia, A. 1993. Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci* **2**(1): 31-40.
- Campos, G., Guixé, V. y Babul, J. 1984. Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme with a different mechanism. *J Biol Chem* **259**(10): 6147-6152.
- Cann, J. R. 1978. Ligand-binding by associating systems. *Methods Enzymol* **48**: 299-307.
- Cann, J. R. y Hinman, N. D. 1976. Hummel-Dreyer gel chromatographic procedure as applied to ligand-mediated association. *Biochemistry* **15**(21): 4614-4622.
- Collaborative Computational Project. 1994 The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst D* **50**: 760-763.

- Cooperman, B. S. y Kashlan, O. B. 2003. A comprehensive model for the allosteric regulation of Class Ia ribonucleotide reductases. *Adv Enzyme Regul* **43**: 167-182.
- Daldal, F., Babul, J., Guixé, V. y Fraenkel, D. G. 1982. An alteration in phosphofructokinase-2 of *Escherichia coli* which impairs gluconeogenic growth and improves growth on sugars. *Eur J Biochem* **126**(2): 373-379.
- Deville-Bonne, D., Laine, R. y Garel, J. R. 1991. Substrate antagonism in the kinetic mechanism of *E. coli* phosphofructokinase-1. *FEBS Lett* **290**(1-2): 173-176.
- Diederichs, K. y Karplus, P. A. 1997. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol* **4**(4): 269-275.
- Ernst, M., Brauchart, D., Boresch, S. y Sieghart, W. 2003. Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience* **119**(4): 933-943.
- Evans, P. R. 1997. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter* **33**: 22-24.
- Evans, P. R., Farrants, G. W. y Hudson, P. J. 1981. Phosphofructokinase: structure and control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **293**(1063): 53-62.
- French, G. S. and Wilson, K. S. 1978. On the treatment of negative intensity observations. *Acta Cryst A* **34**: 517-525.
- Fenton, A. W. y Reinhart, G. D. 2003. Mechanism of substrate inhibition in *Escherichia coli* phosphofructokinase. *Biochemistry* **42**(43): 12676-12681.
- Fetler, L. y Vachette, P. 2001. The allosteric activator Mg-ATP modifies the quaternary structure of the R-state of *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase without altering the T R equilibrium. *J Mol Biol* **309**(3): 817-832.
- Frieden, C. 1967. Treatment of enzyme kinetic data. II. The multisite case: comparison of allosteric models and a possible new mechanism. *J Biol Chem* **242**(18): 4045-4052.
- Guex, N. y Peitsch, M. C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**(15): 2714-2723.
- Guixé, V. 2000. Chemical modification of SH groups of *E. coli* phosphofructokinase-2 induces subunit dissociation: monomers are inactive but preserve ligand binding properties. *Arch Biochem Biophys* **376**(2): 313-319.
- Guixé, V. y Babul, J. 1985. Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for MgATP. *J Biol Chem* **260**(20): 11001-11005.



- Guixé, V. y Babul, J. 1988. Influence of ligands on the aggregation of the normal and mutant forms of phosphofructokinase 2 of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **264**(2): 519-524.
- Guixé, V., Rodríguez, P. H. y Babul, J. 1998. Ligand-induced conformational transitions in *Escherichia coli* phosphofructokinase-2: evidence for an allosteric site for MgATP<sup>2-</sup>. *Biochemistry* **37**(38): 13269-13275.
- Hayward, S. y Berendsen, H. J. C. 1998. Systematic analysis of domain motions in protein from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Prot Struct Func Genet* **30**: 144-154.
- Hill, A. V. 1910. *J Physiol (London)* **40**: iv-vii.
- Holtman, C. K., Pawlyk, A. C., Meadow, N. D. y Pettigrew, D. W. 2001. Reverse genetics of *Escherichia coli* glycerol kinase allosteric regulation and glucose control of glycerol utilization *in vivo*. *J Bacteriol* **183**(11): 3336-3344.
- Ito, S., Fushinobu, S., Jeong, J. J., Yoshioka, I., Koga, S., Shoun, H. y Wakagi, T. 2003. Crystal structure of an ADP-dependent glucokinase from *Pyrococcus furiosus*: implications for a sugar-induced conformational change in ADP-dependent kinase. *J Mol Biol* **331**(4): 871-883.
- Jarvest, R. L., Lowe, G. y Potter, B. V. 1981. The stereochemical course of phosphoryl transfer catalysed by *Bacillus stearothermophilus* and rabbit skeletal-muscle phosphofructokinase with a chiral [<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]phosphate ester. *Biochem J* **199**(2): 427-432.
- Johnson, J. L. y Reinhart, G. D. 1992. MgATP and fructose 6-phosphate interactions with phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**(46): 11510-11518.
- Jones, D. T. 1999. GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J Mol Biol* **287**(4): 797-815.
- Kashlan, O. B., Scott, C. P., Lear, J. D. y Cooperman, B. S. 2002. A comprehensive model for the allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase. Functional consequences of ATP- and dATP-induced oligomerization of the large subunit. *Biochemistry* **41**(2): 462-474.
- Kellermann, G., Vicentin, F., Tamura E., Rocha, M., Tolentino, H., Barbosa, A., Craievich, A. y Torriani, I. 1997. The small-angle X-ray scattering beamline at the Brazilian synchrotron light laboratory. *J Appl Crystallog* **30**: 880-883.

- Kelley, L. A., MacCallum, R. M. y Sternberg, M. J. 2000. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol* **299**(2): 499-520.
- Kim, J. y Raushel, F. M. 2001. Allosteric control of the oligomerization of carbamoyl phosphate synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **40**(37): 11030-11036.
- Kornberg, A. y Pricer, W. E., Jr. 1953. Enzymatic esterification of alpha-glycerophosphate by long chain fatty acids. *J Biol Chem* **204**(1): 345-357.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-685.
- Liu, W. Z., Faber, R., Feese, M., Remington, S. J. y Pettigrew, D. W. 1994. *Escherichia coli* glycerol kinase: role of a tetramer interface in regulation by fructose 1,6-bisphosphate and phosphotransferase system regulatory protein IIIglc. *Biochemistry* **33**(33): 10120-10126.
- Lucas, R. W., Larson, S. B., Canady, M. A. y McPherson, A. 2002. The structure of tomato aspermy virus by X-ray crystallography. *J Struct Biol* **139**: 90-102.
- Luthy, R., Bowie, J. U. y Eisenberg, D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**(6364): 83-85.
- Maj, M. C., Singh, B. y Gupta, R. S. 2000. Structure-activity studies on mammalian adenosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **275**(2): 386-393.
- Maj, M. C., Singh, B. y Gupta, R. S. 2002. Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry* **41**(12): 4059-4069.
- Marti-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F. y Sali, A. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**: 291-325.
- Matthews, B. M. 1968. Solvent content of protein crystal. *J Mol Biol* **33**: 491-497
- Mathews, I. I., Erion, M. D. y Ealick, S. E. 1998. Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution. *Biochemistry* **37**(45): 15607-15620.
- Matsushima, N., Hayashi, N., Jinbo, Y. y Izumi, Y. 2000. Ca<sup>2+</sup>-bound calmodulin forms a compact globular structure on binding four trifluoperazine molecules in solution. *Biochem J* **347** (Pt 1): 211-215.

- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J. P. 1965. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Biol* **12**: 88-118.
- Murakami, K. S., Masuda, S. y Darst, S. 2002. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* **296**: 1280-1284.
- Navaza, J. 1994. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst A* **50**: 157-163.
- Nichol, L. W., Jackson, W. J. y Winzor, D. J. 1967. A theoretical study of the binding of small molecules to a polymerizing protein system. A model for allosteric effects. *Biochemistry* **6**(8): 2449-2456.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. J. y Deerfield, D. W. I. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW*. NEWS 4.
- Powell, H. R. 1999. The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. *Acta Crystallogr D* **55**: 1690-1695.
- Reichard, P., Eliasson, R., Ingemarson, R. y Thelander, L. 2000. Cross-talk between the allosteric effector-binding sites in mouse ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* **275**(42): 33021-33026.
- Ronimus, R. S. y Morgan, H. W. 2001. The biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinases from extremophiles. *Extremophiles* **5**(6): 357-373.
- Sali, A. y Blundell, T. L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**(3): 779-815.
- Sánchez, R. y Sali, A. 1998. Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13597-13602.
- Saqi, M. A., Russell, R. B. y Sternberg, M. J. 1998. Misleading local sequence alignments: implications for comparative protein modelling. *Protein Eng* **11**(8): 627-630.
- Schumacher, M. A., Scott, D. M., Mathews, I. I., Ealick, S. E., Roos, D. S., Ullman, B. y Brennan, R. G. 2000. Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. *J Mol Biol* **296**(2): 549-567.
- Shi, J., Blundell, T. L. y Mizuguchi, K. 2001. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J Mol Biol* **310**(1): 243-257.

- Shilton, B. H., McDowell, J. H., Smith, W. C. y Hargrave, P. A. 2002. The solution structure and activation of visual arrestin studied by small-angle X-ray scattering. *Eur J Biochem* **269**(15): 3801-3809.
- Shirakihara, Y. y Evans, P. R. 1988. Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J Mol Biol* **204**(4): 973-994.
- Sigrell, J. A., Cameron, A. D., Jones, T. A. y Mowbray, S. L. 1998. Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure* **6**(2): 183-193.
- Sigrell, J. A., Cameron, A. D. y Mowbray, S. L. 1999. Induced fit on sugar binding activates ribokinase. *J Mol Biol* **290**(5): 1009-1018.
- Svergun, D. I. 1992 Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria *J Appl Crystallog* **25**: 495-503.
- Svergun, D. I., Barberato, C. y Koch, M. H. 1995. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Cryst* **28**: 768-773.
- Svergun, D. I., Petoukhov, M. V. y Koch, M. H. 2001. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* **80**(6): 2946-2953.
- Tabor, S. y Richardson, C. C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(4): 1074-1078.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**(24): 4876-4882.
- Torres, J. C., Guixé, V. y Babul, J. 1997. A mutant phosphofructokinase produces a futile cycle during gluconeogenesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* **327**( Pt 3): 675-684.
- Wyatt, P. J. 1993. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal Chim Acta* **272**(1): 1-40.
- Yu, P. y Pettigrew, D. W. 2003. Linkage between fructose 1,6-bisphosphate binding and the dimer-tetramer equilibrium of *Escherichia coli* glycerol kinase: critical behavior arising from change of ligand stoichiometry. *Biochemistry* **42**(14): 4243-4252.

Zheng, R. L. y Kemp, R. G. 1992. The mechanism of ATP inhibition of wild type and mutant phosphofructo-1-kinase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**(33): 23640-23645.

Zwaig, N., Kistler, W. S. y Lin, E. C. 1970. Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **102**(3): 753-759.