

UCH-FC
Biotecnología

V.148

C.A

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Contribución del residuo conservado Arginina-50 sobre la preferencia por NADP y NAD de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli*”

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

DIEGO VALDÉS BALBONTÍN

Director de Seminario de Título:
Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Julio, 2011
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr:

DIEGO VALDÉS BALBONTÍN

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en **Biotecnología Molecular**

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Director Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Mauricio Báez Larach
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Corrector

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, julio de 2011.

BIOGRAFIA



Mi nombre es Diego Valdés y nací en Santiago de Chile hace poco más de 28 años, el 21 de marzo de 1983. Hijo de los señores, Rafael Valdés D. y Carmen Balbontín S, soy el menor de 5 hermanos, hecho que influyó de manera muy importante en mi personalidad y carácter, dado mi esfuerzo constante para adaptarme a un mundo de adultos, en el que el mayor de mis hermanos me superaba por más de veinte años.

Desde muy temprano comenzó mi interés por las diferentes ciencias de la naturaleza; a los 4 años, dedicaba gran parte de mi tiempo a construir máquinas que volaran o a medir el tiempo que demoraba un barquito rojo de juguete, en cruzar la acequia que recorría mi casa, preocupando a mi madre por mi poca socialización y mi rechazo a asistir al jardín infantil.

Toda mi etapa escolar la realicé en el Colegio del Verbo Divino. Fue ahí donde descubrí una de las grandes pasiones de mi vida: el atletismo. Herencia de mi padre, un destacado atleta durante los años 60. En el colegio, tuve la suerte de aprender con los mejores entrenadores del país: Alberto Labra y Pedro Soto, de quienes recuerdo especialmente haberme inculcado la autodisciplina y resiliencia, conceptos que fueron claves para alcanzar muchos de los logros conseguidos en mi vida, tanto en el atletismo como en otros aspectos.

Además de las largas horas dedicadas al entrenamiento mismo, parte importante del tiempo lo destinaba a la lectura de libros de Fisiología de William Ganong, con el objetivo de entender mejor cómo funcionaba el metabolismo celular y poder mejorar mi desempeño atlético. Fue tal el interés y entusiasmo por el tema, que recurrí a mis profesores de Biología y Química: José Aravena y Jorge Sanhueza, quienes, finalmente, se convirtieron en grandes amigos.

En esas conversaciones, surgió la posibilidad de utilizar bicarbonato de sodio en mis entrenamientos como mecanismo para neutralizar la producción de ácido láctico endógeno (en otras palabras, la quemazón muscular luego del ejercicio físico). Pese a las advertencias, decidí embarcarme en este proyecto, siendo yo mi propio conejillo de indias. Los resultados fueron excelentes. Con 16 años, batí el record nacional de 100 mts planos de la categoría menores y fui semifinalista del Mundial de Atletismo Sub 17, estando dentro de los veinte mejores velocistas del mundo en dicha categoría. Un año después, ocurrió uno de los hechos más importantes de mi vida: la participación en los Juegos Olímpicos de Sydney 2000, representando a mi país en la posta 4 x 100 mts, con el valor añadido de convertirme en el atleta chileno más joven en participar en unos juegos olímpicos. Si bien el rendimiento no superó nuestras expectativas, el hecho de estar entre la elite del deporte mundial, compartir con los mejores velocistas y deportistas del planeta, y participar de la ceremonia inaugural con la delegación de mi país, se transformó en una experiencia inolvidable.

La dedicación y concentración en el deporte, tuvo sus costos. Aunque en el colegio conseguí mantener un buen rendimiento académico, pese a la alta exigencia de los entrenamientos, me fue difícil preparar la Prueba de Aptitud Académica (PAA), requisito fundamental para el ingreso a las universidades en Chile. Afortunadamente y gracias a mis logros deportivos, obtuve una beca para ingresar a la Universidad de Chile, la casa de estudios con mayor tradición en el país, para estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. Esta carrera encajaba con mis intereses y pude optar a un horario flexible, que me permitía

continuar con mi carrera deportiva y concentrarme en mi objetivo de clasificar a los Juegos Olímpicos de Atenas 2004 y Beijing 2008, metas que lamentablemente no pude alcanzar.

Una lesión que afectaba una de mis rodillas, la falta de recursos y las deficientes políticas deportivas del país, no me permitieron alcanzar el rendimiento requerido para participar en una nueva cita olímpica ni para convertirme en uno de los grandes atletas de la historia del país, como indicaban mis proyecciones. Así y todo, fui dos veces campeón nacional y estuve dentro de los ocho mejores velocistas de Sudamérica, animado por mi incondicional grupo de amigos: Rafael Mayorga, Carlos Cottin, Sebastián Martínez, Rodrigo Debesa, Diego Errazuriz, José Miguel del Solar y Andrés Alemparte, y bajo la tutela del excepcional atleta y amigo, Sebastián Keitel. El año 2006 fue el año en que finalmente decidí dejar la actividad y despedirme del alto rendimiento y de las pistas.

Pese a que mi carrera deportiva se truncó a temprana edad, tengo la tranquilidad que hice todo lo que estuvo a mi alcance para extenderla y haber obtenido triunfos para Chile. La decisión me produjo mucho dolor, pero a la vez traería consigo la etapa más fructífera en mi vida.

El atletismo había ocupado un porcentaje altísimo en mi vida. Durante años postergué todo lo demás; por lo tanto, el abandono trajo un vacío importante, por lo que fue necesario darle un giro a mi vida y generar un verdadero cambio. En ese proceso fue fundamental haber conocido a una mujer que se convirtió en mi gran apoyo, partner y polola: Consuelo Mackenna, gestora del impulso que tuvo mi vida durante los últimos cuatro años.

A pesar de nunca haber dejado la universidad de lado, tomar muy pocos ramos durante 5 años incidió en el hecho de haber perdido a mis compañeros de generación. Ya a esas alturas casi todos se encontraban titulados. Gracias a la ayuda de nuevos compañeros realmente jugados, como Juan Camilo Moreno, Camila Mardones y Luis Zapata, quienes se encargaron de ponerme al día en todo, logré adaptarme a mis últimos años de carrera.

En 2009 entré al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, para comenzar a desarrollar mi tesis. Aquí fui acogido por el recién establecido grupo "ingeniería de enzimas y metabolismo redox", liderado por el Dr. Ricardo Cabrera. Gracias a Dios, nuevamente tuve la suerte de rodearme por los mejores. Recuerdo con especial cariño los consejos de mí ahora tutor Ricardo y la ayuda inestimable de sus alumnos de doctorado y magíster, Karel Olavarria, Luis Matsuda y Rodrigo Muñoz.

Mis estudios de tesis decían relación con la ingeniería de enzimas, comprendiendo cómo éstas reconocen sus sustratos. Fueron casi dos años y medio de incesante trabajo, repleto de aciertos y desaciertos, frustraciones y satisfacciones y muchísimas noches frías que parecían no terminar, todo coronado con el terremoto de Febrero de 2010, que casi nos hace perderlo todo. Fue en esos años donde pude poner en práctica una de las grandes lecciones del atletismo: el factor resiliencia fue determinante.

Y así llegamos a junio de 2011. Momento que parecía inalcanzable hace casi una década. El ciclo termina y el balance, sin duda, es positivo. La nostalgia me embarga, miro hacia atrás y me despido: es hora de un nuevo capítulo. Sin prisa, pero sin pausa, enfrentaré los desafíos que vienen de aquí en adelante, y a la hora de proyectarme al futuro, recuerdo el consejo de mi director de tesis y amigo Ricardo, en un momento de debilidad: "A medida que pasan los años, el vértigo aumenta. Mira primero, respira profundo y aguanta la ola".





*Dedicado a todos los que creyeron en mí:
A mis papas, hermanos, amigos
y a la Consuelo, pero en especial
a Dios que todo lo hace posible.*



AGRADECIMIENTOS

"Más vale pecar por ejecutivo que por ineficaz, porque es en el balance de los aciertos y errores donde se juzga el valor de las personas, y no en la falta de errores de quien no ha sido capaz de tener aciertos"

Quiero agradecer la inestimable colaboración de mi director de tesis Ricardo Cabrera, por su inagotable paciencia y espíritu docente, quien me perfeccionó hasta alcanzar, según sus propias palabras, la energía de activación (nota 7.0). A Karel Olavarría quien me apadrinó cuando llegué al laboratorio y me enseñó parte importante de mis actuales conocimientos sobre cinética enzimática, purificación de proteínas y diseño de experimentos. A Luís Matsuda, por sus consejos y colaboración clave en la purificación de Atlas-50. A Rodrigo Muñoz (Daddy, Willy o Alf) por su infinita e incondicional ayuda en mis experimentos, los cuales más de alguno nos tuvo parados un día entero hasta casi las 5 de la mañana. Sin tu ánimo y múltiples personajes, todavía estaríamos purificando proteínas. Sinceramente, sin la colaboración de este equipo que ensució sus manos por una noble causa, esto jamás habría sido posible.

A Matías Fuentealba (Yellowstone) por sus aportes fundamentales de dinámicas moleculares junto con sus figuras de VMD, las cuales sirvieron para plantear la hipótesis de mi tesis. A la enciclopedia Andrés Rivas (Von Rivas Vader) por sus *tips* oportunos que me ahorraron más de una tarde de trabajo. A Dieguiño (Diego Quiroga) el rockman del laboratorio, quién, además de sus consejos, me animaba subiendo el volumen de la radio cuando tocaban las canciones de Iron Maiden. A Magaly León, quién me prestó su puesto de trabajo innumerables veces para poder purificar mis proteínas. A Andrés Caniuguir (Rapa), quién me instruyó en el uso de varios de los equipos del laboratorio. A Felipe Merino (Filipo) por haberme enseñado a utilizar el fluorímetro y algunos que otros recordatorios de fluorescencia para terminar mis últimos experimentos de tesis. A César Ramírez, que aunque no lo veía nunca, me entretuvo con sus historias en más de una noche fome de trabajo. Y al resto de mis compañeros de laboratorio: Pablo Villalobos, Gabo, Víctor, Payala, Benjamín, Ivana, Swanstaiger; sus presencias fueron determinantes para una estadía más que grata por este laboratorio.

A los profesores, Dr. Tito Ureta, Dra. Victoria Guixé, Dra. Ana Preller y Dr. Jorge Babul, por haberme dado la oportunidad y el honor de trabajar en este tremendo laboratorio.

Al personal de laboratorio: Anita Lizama, quien a pesar de haberme hecho pasar más de alguna rabia, su ayuda fue más que importante; a Jazmín y Tamy por su esencial rol en el funcionamiento extraordinario del laboratorio.

A los integrantes de mi comisión: Dr. Mauricio Báez, por su buena disposición para analizar mis resultados y valiosísimas discusiones; Al Dr. Francisco Chávez, quién en estos dos años de tesis, cada vez que requerí de su ayuda, su colaboración fue excepcional.

Al Dr. Claudio Navarro, del laboratorio de Microbiología y Biotecnología, por haberme instruido en la técnica del *western blot*, esencial en mis experimentos.

A mis compañeros de carrera: Juan Camilo Moreno (bubuja), Camila Mardones, Luís Zapata y Cristian Varela, por su valiosa amistad, entendimiento y entrega durante todos estos años de carrera. El haber llegado a esta instancia también fue posible gracias a ustedes.

Al team mono (Tito Parada, Luís Concha y Jaime Espina) que sin la invención de nuestro antídoto contra la picada de araña de rincón para el proyecto de genética, probablemente estaríamos muertos.

A Verena Ramírez de la secretaría de estudios, por haberme ayudado en todo los trámites que necesité a lo largo de la carrera para poder combinar los estudios con el deporte.

A mi grupo de amigos: Rafael Mayorga, Rodrigo Debesa, Diego Errazuriz, José Miguel del Solar (por su aporte con la biografía) y Andrés Alemparte, pero en especial a Sebastián Martínez por su TI-89, aclaraciones de conceptos matemáticos complejos, almuerzos en San Joaquín y charlas vocacionales; A Carlos Cottin por haberme ayudado a darle un sentido espiritual distinto a esta etapa. El apoyo incondicional de ustedes fue muy importante para mí.

A mis sensei: Hernán y Javier Martínez, quienes me enseñaron el espíritu marcial de un guerrero frente al combate. Éste me sirvió para enfrentar un sinnúmero de problemas a lo largo de estos años de tesis.

A la familia de la Consuelo: mis suegros Lucho y Rebeca, mis cuñadas Con y Cata; a la Pascale, Chicho, Nata, Lucas, todos. Aunque les costó creer que este día llegaría, su apoyo fue trascendental.

Al monasterio Benedictinos, especialmente a los monjes P. José Luís, P. Fernando Y Rafael por sus plegarias constantes las cuales me ayudaron muchísimo para que me fuera bien.

A mi familia: a mi santa madre, quien nunca dejó de alentarme cuando estuve bajoneado y triste. Siempre entregándome una luz de esperanza; a mi papá, por habérselas arreglado a pesar de todos los problemas económicos, para que yo terminara de estudiar. A mis hermanos Rafael, Cañi, Fran y en especial a Paulo, mi padrino, quien se ha encargado de que no me falte nada. Pero muy especialmente a mi gran amor: la Consuelo, quien estuvo conmigo este último tiempo dándome fuerzas para que terminara lo que alguna vez me propuse, como motor para alcanzar sueños que parecían imposibles.

Y por último a Dios, a quien le debo toda mi existencia y propósito de vida. Este documento es mi forma de agradecerle lo que me ha dado en vida, una forma de alabanza y de amor hacia él.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE CONTENIDO	V
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN	1
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasas y preferencia por el cofactor	2
Estudios cinético-estructurales de la G6PDH dual de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ..	6
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	11
Hipótesis.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos	11
MATERIALES Y METODOS	12
Materiales	12
Reactivos	12
Cepas bacterianas	12
Medios de cultivos líquidos	13
Medios de cultivo sólidos	13
Vector de expresión pET28b-eczwf.....	14
Partidores	16
Métodos.....	17
Aislamiento de DNA plasmidial (miniprep)	17
Análisis de restricción del plásmido pET28b-eczwf	17
Mutagénesis sitio específica	18
Electroforesis de DNA plasmidial en geles de agarosa	20
Preparación de células de <i>E. coli</i> electrocompetentes	20
Electrotransformación de <i>E. coli</i>	21
Purificación de la G6PDH silvestre y mutantes	21
Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE)	24
Western blot de la cola de histidina por sondas HRP Ni-NTA	25
Cromatografía de exclusión molecular (HPLC)	26
Titulación de sustratos	28
Determinación de la actividad enzimática de G6PDH	29

Determinación de las constantes cinéticas aparentes	30
Proceso de datos y análisis estadístico.....	31
Mediciones de fluorescencia intrínseca.....	32
Efecto del filtro interno	34
RESULTADOS	36
Generación de mutantes de arginina-50 de G6PDH de E. coli.....	36
Plásmido pET28b-eczwf.....	36
Mutagénesis sitio dirigida.....	37
Condiciones de expresión de las G6PDH silvestre y mutantes	41
Expresión y purificación de la G6PDH silvestre y mutantes	42
Análisis de la estructura cuaternaria por cromatografía de exclusión molecular.....	48
Caracterización cinética de G6PDH silvestre	49
Caracterización cinética de mutantes de arginina-50 de G6PH de E. coli	55
Análisis de la fluorescencia intrínseca de la G6PDH silvestre y mutantes.....	61
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Reactivos utilizadas durante el seminario de titulo.....	12
Tabla 2	Cepas bacterianas utilizadas durante el seminario de titulo.....	12
Tabla 3	Partidores utilizados para introducir las mutaciones en el gen de <i>zwf</i>	16
Tabla 4	Etapas de la purificación G6PDH silvestre.....	45
Tabla 5	Etapas de la purificación de G6PDH mutantes: R50E, R50A, R50Q y R50V.....	46
Tabla 6	Parámetros de los ajustes utilizados: M-M y Hill, reacción con NADP.	53
Tabla 7	Parámetros de los ajustes utilizados: M-M y Hill, reacción con NAD.....	53
Tabla 8	Variables de los ensayos cinéticos y parámetros de los ajustes de las mediciones de las mutantes realizadas con NADP.....	56
Tabla 9	Variables de los ensayos cinéticos y parámetros de los ajustes de las mediciones de las mutantes realizadas con NAD.....	56
Tabla 10	Variables de los ensayos cinéticos y parámetros de los ajustes de las mediciones de las mutantes realizadas con G6P (NADP).....	57
Tabla 11	Variables de los ensayos cinéticos y parámetros de los ajustes de las mediciones de las mutantes realizadas con G6P (NAD).....	57
Tabla 12	Constantes cinéticas aparentes de las mutantes de Arginina-50 en G6PDH de <i>E. coli</i>	60
Tabla 13	Razón de k_{cat} y K_M para las reacciones de NAD y NADP de las diferentes enzimas silvestres y mutantes.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de los cofactores de nicotinamida dinucleótidos.....	2
Figura 2	Esquema de las principales vías del metabolismo central de <i>E. coli</i>	3
Figura 3	Alineamiento múltiple de secuencias de la G6PDH de distintos organismos.....	6
Figura 4	Parámetros cinéticos de la enzima de <i>L. mesenteroides</i>	7
Figura 5	Resultados de las dinámicas moleculares con las enzimas de <i>L. mesenteroides</i> y <i>E. coli</i>	8
Figura 6	Estructura tridimensional de la G6PDH de <i>E. coli</i>	10
Figura 7	Mapa del plásmido de expresión pET28b-eczwf.....	15
Figura 8	Diseño de los partidores según kit Genetailor™	18
Figura 9	Esquema de purificación de las G6PDH silvestre y mutantes.....	23
Figura 10	Curva de calibración HPLC.....	27
Figura 11	Protocolo software Gen5.....	30
Figura 12	Dimensiones de la cubeta utilizada en los experimentos de fluorescencia.....	35
Figura 13	Electroforesis en gel del plásmido pET28b-eczwf purificado.....	36
Figura 14	Electroforesis de los productos de PCR provenientes de la reacción de mutagénesis.....	37
Figura 15	Resultados de secuenciación de las mutantes R50E y R50A.....	39
Figura 16	Resultados de secuenciación de las mutantes R50Q y R50V.....	40
Figura 17	Electroforesis en condiciones desnaturantes para la prueba de expresión de la G6PDH en <i>E. coli</i> BL21-DE3.....	41
Figura 18	Cromatogramas de las columnas Hi-Q y His-trap.....	42
Figura 19	Optimización de la digestión del <i>tag</i> de histidina por trombina.....	43

Figura 20	Separación efectiva de la trombina de la G6PDH.....	44
Figura 21	SDS-PAGE con las muestras de las diferentes etapas de la purificación de la enzima silvestre de <i>E. coli</i>	45
Figura 22	SDS-PAGE con las muestras de las diferentes etapas de la purificación de las mutantes de G6PDH.....	47
Figura 23	Cromatografía de exclusión molecular (HPLC).....	48
Figura 24	Curvas de progreso medidas a diferentes concentraciones de NADP obtenidas a baja y alta concentración de co-sustrato G6P.....	50
Figura 25	Porcentajes de sustrato consumido.....	51
Figura 26	Curvas de saturación para la enzima silvestre en función de la concentración de NADP y NAD medidas a diferentes concentraciones crecientes de co-sustrato (G6P).....	53
Figura 27	Gráficos secundarios obtenidos de los valores aparentes de K_M y V_{MAX}	54
Figura 28	Curvas de saturación para las enzimas mutante y silvestre en función de la concentración de NADP y NAD.....	56
Figura 29	Curvas de saturación para las enzimas mutantes y silvestre en función de la concentración de G6P con NADP y NAD.....	57
Figura 30	Eficiencias catalíticas y preferencia por el cofactor de las enzimas mutante y silvestre de <i>E. coli</i>	59
Figura 31	Espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca de las enzimas mutante y silvestre de <i>E. coli</i>	61
Figura 32	Experimentos de fluorescencia de las enzimas mutantes y silvestre de <i>E. coli</i>	63
Figura 33	Eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_M) de la G6PDH de <i>L. mesenteroides</i> y <i>E. coli</i> con NADP y NAD.....	66
Figura 34	Diagrama de los niveles de energía de una reacción catalizada por una enzima y la correspondiente reacción química no catalizada.....	67
Figura 35	Niveles de energía, según figura 34, de una reacción catalizada por la G6PDH silvestre de <i>L. mesenteroides</i> y <i>E. coli</i> , respectivamente.....	72

Figura 36 Eficiencias catalíticas y preferencias por el cofactor de las enzimas mutante y silvestre de *L. mesenteroides* y *E. coli*..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS

ES	Complejo enzima-sustrato
ES [‡]	Complejo de transición enzima-sustrato
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactósido
k_{cat}/K_M	Eficiencia catalítica
k_{cat}	Constante catalítica
K_d	Constante de disociación
K_M	Constante de Michaelis-Menten
M-M	Modelo de Michaelis-Menten
NAD(H)	Nicotinamida adenosina dinucleótido (reducido)
NADP(H)	Nicotinamida adenosina dinucleótido fosfato (reducido)
Ni-HRP	Ni ²⁺ -NTA conjugado con <i>horseradish peroxidase</i>
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pET28b-eczwf	Plásmido compuesto por el vector pET28b y el inserto del gen <i>zwf</i>
R50A	Sustitución de Arginina-50 por Alanina
R50E	Sustitución de Arginina-50 por Glutamina
R50Q	Sustitución de Arginina-50 por Glutámico
R50V	Sustitución de Arginina-50 por Valina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
V_0	Velocidad inicial
V_{MAX}	Velocidad máxima
<i>Zwf</i>	Gen de la G6PDH

RESUMEN

Los cofactores de nicotinamida adenina dinucleotidos: NADP y NAD, son moléculas esenciales dentro del metabolismo de la célula. Ellos conectan la oxidación de intermediarios en las vías centrales con el consumo de equivalentes de reducción en importantes procesos celulares como biosíntesis y respiración. La única diferencia estructural entre ambas moléculas (un grupo fosfato en la región adenosina) tiene repercusión sobre la especificidad de las deshidrogenasas, pudiéndose observar aquellas que son preferentes por uno u otro cofactor y otras que no poseen una determinada preferencia (duales).

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es la primera enzima de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, que en *Escherichia coli*, provee un tercio del NADPH requerido para la biosíntesis. La G6PDH se ha considerado como una enzima preferente por NADP, sin embargo hasta la fecha, no se había logrado determinar la magnitud de esta preferencia. Estudios estructurales con la G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*, sugieren la participación crucial de un residuo de arginina conservado que se encontraría interactuando con el fosfato y la adenosina del cofactor. Para esta enzima, dicho residuo sería una pieza clave en la interacción con NADP más que con NAD.

En esta tesis, logramos obtener por primera vez parámetros cinéticos de la G6PDH de *E. coli*, purificada a homogeneidad y a concentraciones saturantes de los co-sustratos, que nos permite registrar la magnitud de la preferencia por NADP sobre NAD. Por otra parte, se pudo evaluar la importancia de la arginina conservada (arginina-50) sobre las constantes de especificidad para NADP y NAD, sustituyéndola por 4 aminoácidos: ácido glutámico (R50E), alanina (R50A), valina (R50V) y glutamina (R50Q), mediante mutagénesis sitio-dirigida.

Al comparar las constantes de especificidad para estos cofactores de las G6PDH de *E. coli* y *L. mesenteroides* (silvestre y mutantes) y basados en la teoría del estado de transición, pudimos evaluar la contribución tanto del grupo fosfato del NADP, como de la arginina-50 a la energía de unión del complejo enzima-sustrato (ES), así como a la estabilización del estado de

transición (ES^\ddagger). Este análisis permitió determinar, que para la forma silvestre de ambas enzimas, la ausencia del grupo fosfato en el cofactor provoca cambios en la energía de unión que desestabilizan a los complejos ES en mayor medida que a los ES^\ddagger , pero el efecto es notoriamente mayor en la enzima de *E. coli*. La contribución del grupo fosfato del NADP a la energía de unión en el estado de transición es de 3,5 kcal/mol. Este mismo cálculo para la G6PDH de *L. mesenteroides* resulta en una contribución de 1,38 kcal/mol

En cuanto al aporte de la arginina-50, los resultados mostraron que las cuatro sustituciones generaron desestabilización en los complejos ES y ES^\ddagger con ambos cofactores, pero que los cambios fueron de menor magnitud que los reportados para la enzima de *L. mesenteroides*. En *E. coli*, la preferencia por NADP se mantiene en todas las mutantes, mientras que en la enzima de *L. mesenteroides*, las sustituciones revierten la preferencia por el cofactor. Estos resultados permiten concluir que el residuo de arginina-50 parece tener un rol menos importante que su homólogo en *L. mesenteroides* en cuanto a la unión con NADP. Si bien esta arginina es determinante para la eficiencia catalítica de la enzima con NADP más que con NAD, no es clave para la discriminación molecular.

ABSTRACT

Nicotinamide adenine dinucleotide cofactors NADP and NAD are essential molecules involved in cell metabolism. They connect the oxidation of the intermediates in the central pathways with the consumption of the reducing equivalents during important cellular processes such as biosynthesis and respiration. The only difference between these two molecules (a phosphate group in the adenosine region) has an impact on the cofactor specificity of the dehydrogenases. It is possible to observe those that have preference for one or the other nicotinamide adenine dinucleotide cofactor, and others that do not have a specific cofactor preference (dual dehydrogenases).

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) is the first enzyme in the oxidative branch of the pentose phosphate pathway, which provides a third of the whole NADPH required for biosynthesis in *Escherichia coli*. G6PDH has been considered a NADP preference enzyme. However, to date, the magnitude of this preference has not been determined yet. Structural studies with *Leuconostoc mesenteroides* G6PDH suggest the participation of an important conserved residue that plays a key role in the interaction with NADP but not with NAD.

In this thesis, we obtain for the first time the kinetic parameters for G6PDH from *E. coli* purified to homogeneity and with saturating concentrations of the co-substrates. This allow us to determine the magnitude of the preference for NADP over NAD. Moreover, the importance of this conserved arginine (arginine-50) was evaluated considering the specificity constants for NADP and NAD. To approach this we replaced, by site-directed mutagenesis, the arginine-50 with four different aminoacids: glutamic acid (R50E), alanin (R50A), valin (R50V) and glutamine (R50Q).

Comparing the cofactor specificity constants for *E. coli* and *L. mesenteroides* G6PD (wild type and mutants), and based on the transition state theory, we evaluated the contribution of both the phosphate group of NADP and the arginine-50, to the binding energy of enzyme-substrate complex (ES) as well as the stabilization of the transition state (ES^\ddagger). This analysis let

us to determine that for the wild type forms of both enzymes, the absence of the phosphate group, causes changes in the binding energy, destabilizing the complex ES in a greater extent than the corresponding ES[‡]. Nevertheless, the destabilizing effect is significantly greater in the *E. coli* enzyme. The contribution of the 2' phosphate group of NADP to the binding energy in the transition state is 3,5 kcal/mol. The same calculation for G6PD from *L. mesenteroides* results in a contribution of 1,38 kcal/mol.

Regarding the contribution of arginine-50, our results show that the four substitutions generated destabilization in the ES and ES[‡] complex with both cofactors, but the changes in the enzymes from *E. coli* were smaller in magnitude than those reported for the enzyme from *L. mesenteroides*. In the mutant enzymes from *E. coli*, the preference for NADP remains, while in the mutant enzymes from *L. mesenteroides*, the substitutions generated a reversion in the cofactor preference. This results suggest that arginine-50 in the G6PDH from *E. coli* appears to have a less important role than its counterpart from *L. mesenteroides* in terms of binding with NADP. Although this arginine is critical for the catalytic efficiency of the enzyme with NADP rather than NAD, this residue is not a key determinant in molecular discrimination.

INTRODUCCIÓN

A pesar de la semejanza estructural que poseen los cofactores de nicotinamida adenina dinucleótido, NAD y NADP (Figura 1), los destinos metabólicos que poseen sus formas reducidas, NADH y NADPH, son distintos. El NADH, se encuentra implicado en la transferencia de iones hidruro hacia la cadena transportadora de electrones, participando en la generación del gradiente de protones que permite la síntesis de ATP. Mientras que el NADPH, participa de las reacciones reductoras de la biosíntesis o para atenuar el estrés oxidativo en diversos organismos (Levy & Daouk 1979; Rosemeyer, 1987).

En el metabolismo heterotrófico, la fuente principal de producción de NADH y NADPH proviene a partir de las deshidrogenasas de las vías centrales del metabolismo. En estas vías, las deshidrogenasas pueden presentar diferencias en su preferencia por el cofactor, observándose tres tendencias principales: NADP preferentes, NAD preferentes y aquellas que usan NADP o NAD con similares eficiencias, conocidas como deshidrogenasas duales.

Por supuesto, la capacidad de poder utilizar con diferentes eficiencias catalíticas uno de estos cofactores por sobre el otro, resulta de las interacciones específicas entre residuos del sitio activo de la enzima y los grupos químicos de la molécula.

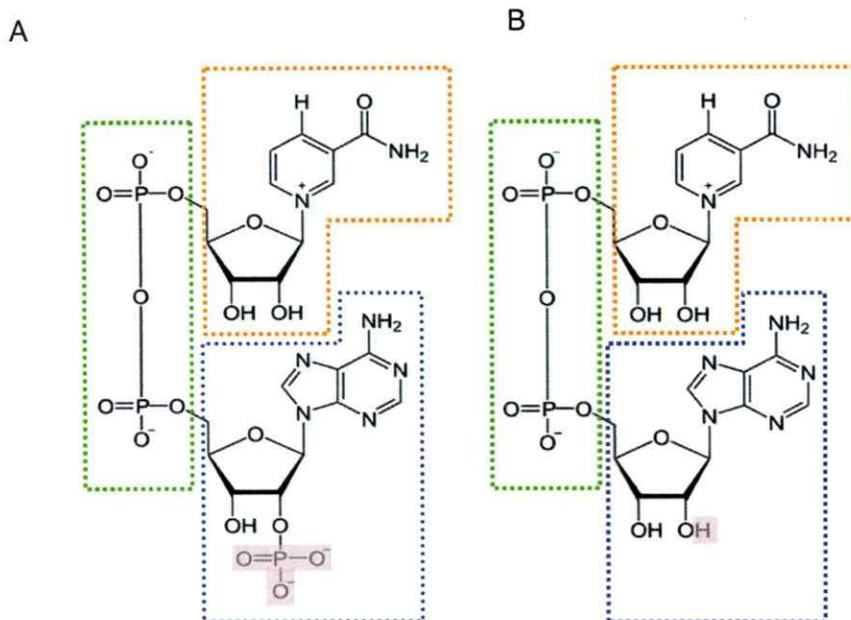


Figura 1.- Estructura de los cofactores de nicotinamida dinucleotidos. En A, molécula de NADP y en B, molécula de NAD. En recuadros de color se señalan: región difosfato (verde), región nicotinamida (naranja), región adenosina (azul). En color rozado se muestra el grupo fosfato esterificado con el hidroxilo del carbono 2' de la ribosa de la adenosina en el NADP.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasas y preferencia por el cofactor

Ahora bien, en dependencia del microorganismo, las deshidrogenasas de una vía en particular pueden corresponder a alguno de los tres tipos anteriormente mencionados.

En el caso de *Escherichia coli*, la producción de NADPH es llevada a cabo por cuatro de las ocho deshidrogenasas de sus vías centrales (figura 2A). Aproximadamente un tercio de la demanda total por NADPH para la biosíntesis, es abastecida por las deshidrogenasas de la vía de las Pentosas fosfato (PP): la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Fuhrer & Sauer, 2009) (figura 2B).

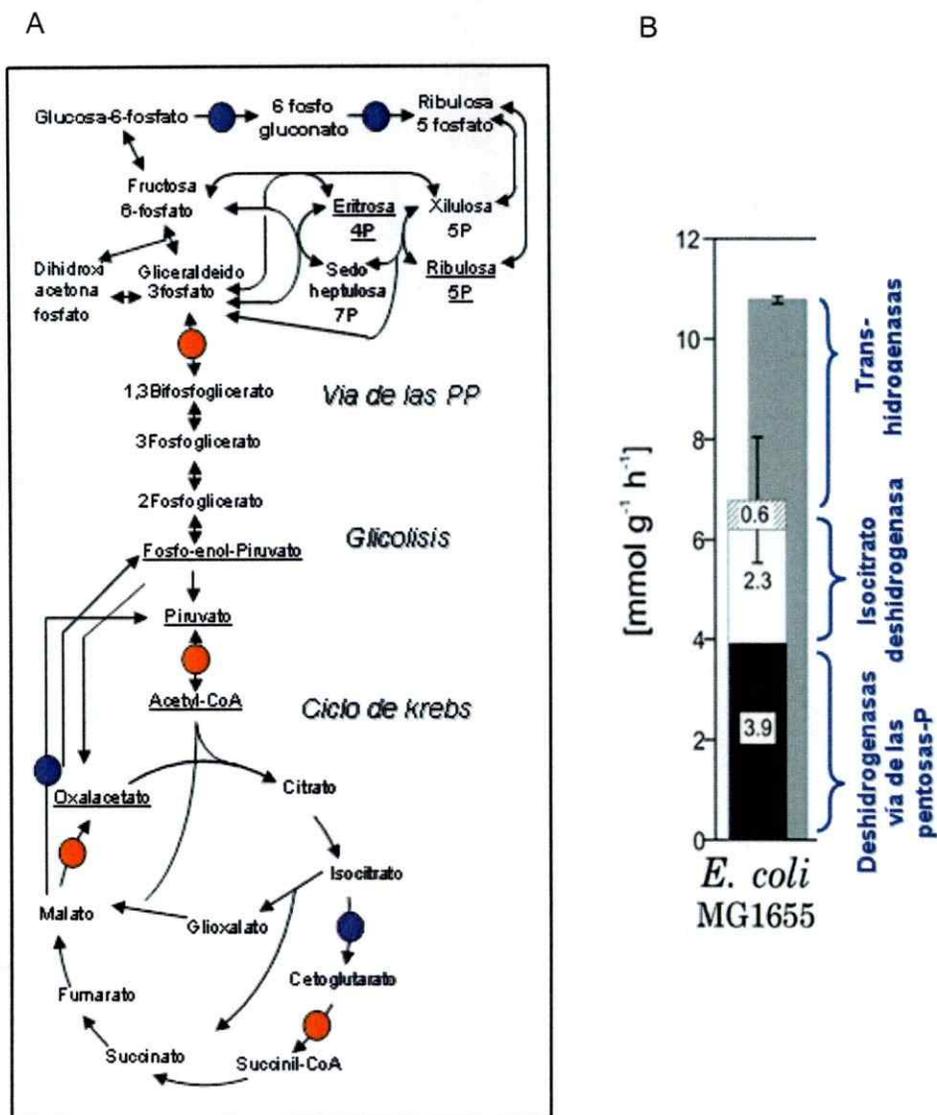
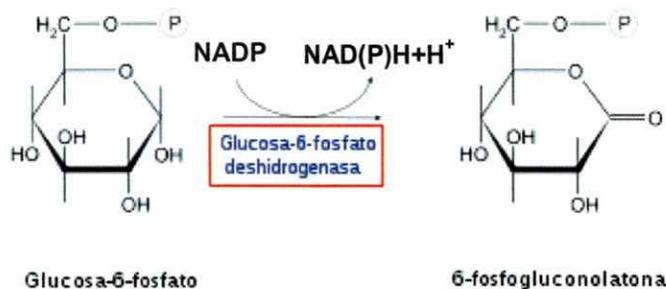


Figura 2.- Esquema de las principales vías del metabolismo central de *E. coli*. En A, los círculos naranjas muestran las diferentes deshidrogenasas a cargo de la producción de cofactores reducidos (NADPH y NADH). En azul, las deshidrogenasas productoras exclusivas de NADPH. En B, tasa estimada de consumo por formación de biomasa crecida en glucosa en un cultivo *bach* (barra gris de atrás) y producción molar de NADPH a partir de las diferentes vías metabólicas (barras de adelante). En letras azules se describen las diferentes enzimas a cargo de esta producción. Según el gráfico, el segundo tercio es aportado por la Isocitrato deshidrogenasa del ciclo de Krebs y la enzima málica. El resto es aportado por las transhidrogenasas, enzimas que de manera acoplada al flujo de carbono, interconvierten cofactores reducidos. (Modificado de Fuhrer & Sauer, 2009).

La G6PDH (E.C.1.1.1.49) es la primera enzima de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. La reacción catalizada por la G6PDH consiste en la reducción del NAD(P)^+ (dependiendo del microorganismo) a expensas de la deshidrogenación de la glucosa 6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona (6PG):



Se han reportado estudios cinéticos de G6PDHs, para una variedad de microorganismos a los cuales se les ha podido evaluar su preferencia por el cofactor, mediante caracterización cinética de las eficiencias catalíticas con ambos cofactores (k_{cat}/K_M). De acuerdo con Cornish-Bowden (1975), la preferencia de una enzima entre dos sustratos se obtiene a partir del cociente de las eficiencias catalíticas. Este es un parámetro que determina la razón de velocidades de dos sustratos que compiten por el mismo sitio activo de una enzima cuando éstos se encuentran en una mezcla a concentraciones equimolares. De esta forma, el cociente que resulta entre la k_{cat}/K_M de uno de los cofactores sobre la k_{cat}/K_M del otro, permite expresar la preferencia de la enzima por un cofactor.

Según esto, la G6PDH de *Thermotoga maritima*, presenta una preferencia de 988 veces por NADP (Hansen y col, 2002), mientras que las G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* y *Gluconacetobacter hansenii*, presentan una preferencia de 9 veces por NADP (Levy y col, 1996) y de 5 veces por NAD (Ragunathan & Levy, 1994), respectivamente. A estas dos últimas se les considera como enzimas duales.

En relación a la G6PDH de *E. coli*, si bien se le conoce como una enzima preferente por NADP, los estudios cinéticos reportados no son lo suficientemente claros para determinar la magnitud de esa preferencia.

En el año 1969, Sanwal informó parámetros cinéticos con una enzima parcialmente purificada. La K_M real para NADP que obtuvo fue de 15 μM . En cuanto al NAD, sólo se menciona que la velocidad de la reacción es 50 veces más lenta que la obtenida con el otro cofactor en presencia de una concentración de NAD 30 veces superior a la de NADP. Para ningún cofactor se mencionan sus k_{cat} .

Por otra parte Banerjee & Fraenkel en el año 1971, reportaron una K_M para NADP y NAD de 16 y 1670 μM , respectivamente. Si bien los parámetros cinéticos fueron obtenidos con enzima purificada a homogeneidad, no se aclara si estos últimos son obtenidos en concentraciones saturantes de co-sustrato. Tampoco se informa la k_{cat} para ambos cofactores.

Es por esto que esta tesis tiene por objeto estudiar a la G6PDH del microorganismo *E. coli*, el cual es ampliamente utilizado como modelo de estudios en ingeniería metabólica. El propósito es poder cuantificar la preferencia de esta enzima por estos cofactores en términos de las k_{cat}/K_M , y con esto, aproximarnos a una explicación de cómo realiza la discriminación molecular en la catálisis. Para llevar acabo tal objetivo, se requiere: 1) Obtener a la enzima pura y caracterizar sus parámetros cinéticos. Con esto, podemos calcular sus eficiencias catalíticas con ambos cofactores, permitiendo determinar claramente la magnitud de la preferencia por los cofactores; y 2) Identificar cual(es) podría(n) ser el(los) residuo(s) estructural(es) involucrado(s) en dicha discriminación y evaluar su contribución(es).

Estudios cinético-estructurales de la G6PDH dual de *Leuconostoc mesenteroides*

Se ha determinado la estructura tridimensional de la deshidrogenasa de *L. mesenteroides* en complejo con NADP y NAD, permitiendo observar las interacciones de los residuos del sitio activo con estos cofactores (Naylor y col, 2001). La importancia de algunos de estos residuos ha sido estudiada por mutagénesis sitio-dirigida, como es el caso de la única cadena lateral que establece interacciones electrostáticas.

Este residuo correspondiente a la arginina-46, ubicado en el loop β_2 - α_B del dominio de unión a nucleótido, sería potencialmente importante en la unión con NADP mediante la contribución de una carga positiva que interactúa principalmente con el fosfato 2' de la adenosina. Esta interacción involucraría dos puentes de hidrógeno entre los dos átomos de nitrógeno del grupo guanidinio del residuo de la arginina y dos átomos de oxígeno del fosfato (Naylor y col, 2001).

Esta arginina se encuentra altamente conservada en todas las G6PDH para las cuales su secuencia se encuentra disponible (figura 3).

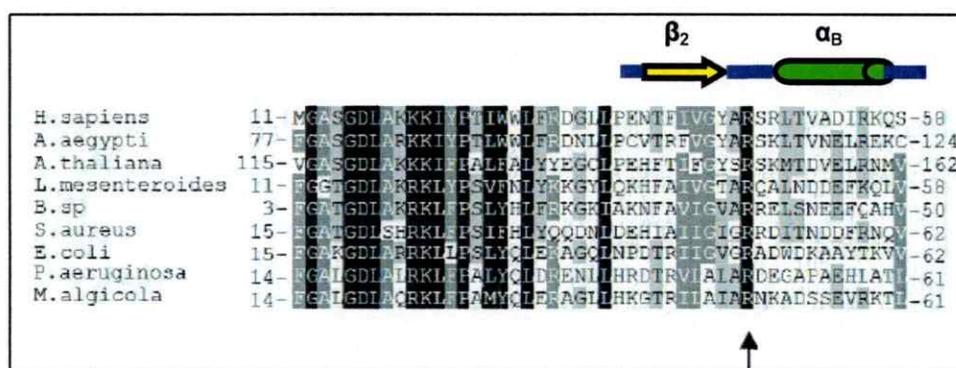


Figura 3.- Alineamiento múltiple de secuencias de la G6PDH de distintos organismos. Se observa una conservación del residuo arginina (flecha negra) que participa de la interacción con el fosfato que diferencia al NADP del NAD. Arriba del alineamiento, se muestra una representación de los elementos de la estructura secundaria donde se ubica la arginina-50.

Levy & Vought (1996, 2000), con el fin de evaluar la importancia de esta arginina en la interacción con los cofactores, la sustituyeron por tres residuos: por alanina (R50A) para evaluar la contribución de la cadena lateral, por glutamina (R50Q), con el propósito de eliminar la carga positiva y mantener el largo de la cadena lateral, y por ácido glutámico (R50E), para la generación de un ambiente poco favorable para la carga negativa del fosfato 2' de la adenosina.

Los resultados obtenidos demostraron que todas las sustituciones de arginina-46, disminuyeron las eficiencias catalíticas con ambos cofactores. Estas disminuciones siempre tuvieron un efecto mayor con NADP más que con NAD (figura 4A).

En cuanto a la preferencia por el cofactor, sorprendentemente se observó que en todas las sustituciones se vió revertida hacia NAD (figura 4B). Para la sustitución por glutámico, alcanzó las 208 veces de cambio en relación a la enzima silvestre. Estos trabajos concluyeron que la arginina-46 es un residuo determinante en la catálisis, unión y especificidad por NADP el cual estaría implicado en otorgarle a esta enzima su preferencia (aunque leve) por NADP.

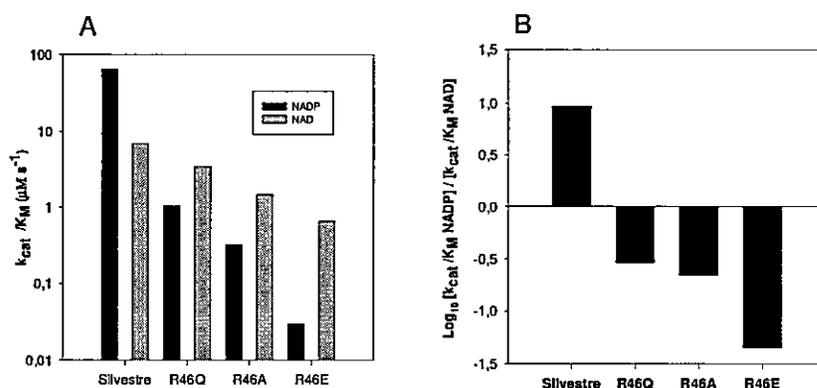


Figura 4.- Parámetros cinéticos de la enzima de *L. mesenteroides*. En A, gráfico de eficiencias catalíticas con ambos cofactores de la enzima silvestre y mutantes de Arginina-46. En B, gráfico de cocientes de selectividad para la enzima silvestre y mutantes. Los valores del eje Y, se obtienen a partir del logaritmo del cociente. Datos tomados de Levy & Vought (1996, 2000)

En nuestro laboratorio, por medio de análisis de dinámica molecular en trayectorias de 10 nanosegundos (ns), utilizando la estructura de G6PDH de *L. mesenteroides* con ligandos NADP y NAD (resultados tesis de pregrado, Matías Fuentealba), se determinó el número de puentes de hidrógeno formados entre los residuos del dominio N-terminal de unión a nucleótido de la enzima con el segmento de la adenosina del cofactor (figura 5).

Estas observaciones indicaron que la arginina-46 establecía un alto número de interacciones con el cofactor NADP, en tanto que en las dinámicas con NAD, esas

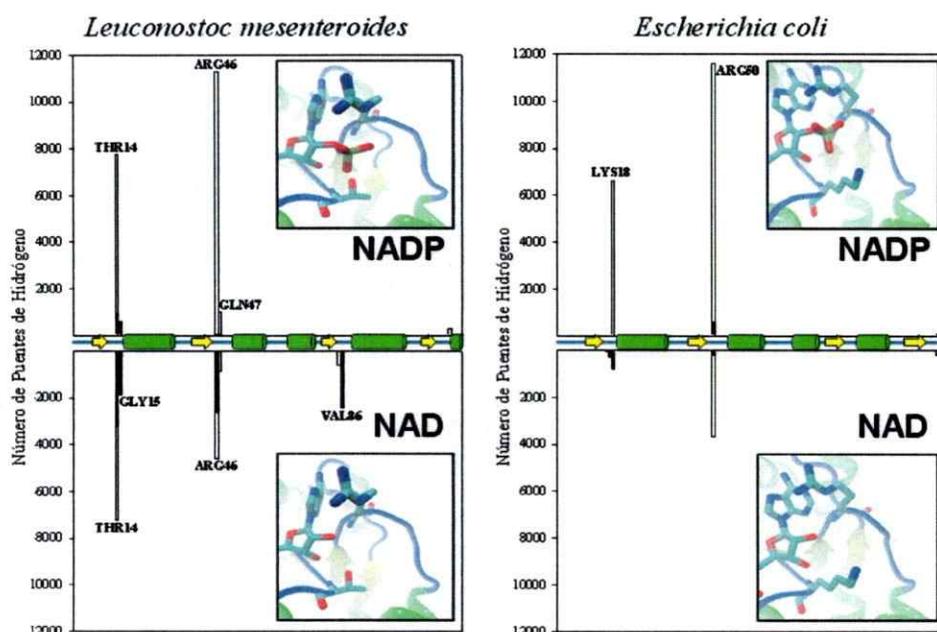


Figura 5.- Resultados de las dinámicas moleculares con las enzimas de *L. mesenteroides* y *E. coli*. En la figura se muestran los residuos involucrados en la interacción con la región adenosina del cofactor. En el eje de las ordenadas se muestran el número de puentes de hidrógeno establecidos entre la región adenosina del cofactor y residuos de la región N-terminal de las G6PDH's durante 10 ns. En el eje de las ordenadas (eje central) se muestran los elementos consecutivos de la estructura secundaria del dominio de unión a nucleótido. Las barras en negro representan los puentes de hidrógeno generados entre el cofactor y la cadena principal, mientras que las barras en blanco corresponden a interacciones con la cadena lateral.

interacciones eran menores. Adicionalmente, otros residuos establecieron una cantidad significativa de interacciones

Por otra parte, se generó un modelo de la G6PDH de *E. coli* utilizando como templado la estructura proteica de *L. mesenteroides*. Realizando el mismo protocolo, se observó que el residuo homólogo, arginina-50 (figura 3 y 5), establecía un alto número de interacciones entre la cadena lateral del aminoácido y el ligando, en tanto que en las dinámicas con NAD, éstas disminuyeron poco más que lo observado en *L. mesenteroides*.

En este caso, la arginina-50, es probablemente el único residuo que exhibe interacciones con la región adenosina de ambos nucleótidos. A diferencia de lo visto con la enzima de *L. mesenteroides*, su remoción afectaría drásticamente los parámetros cinéticos de ambos cofactores, con consecuencias fundamentalmente para el NAD (debido a la ausencia de residuos que aporten en la interacción con este nucleótido).

Es por esto que, a partir de estos resultados, surge la idea de evaluar la importancia de la arginina-50 sobre la preferencia por NADP y determinar las diferencias que se establecen con su homólogo arginina-46 de la G6PDH de *L. mesenteroides*. Permittiendo con esto entender las interacciones que determinan la discriminación molecular entre NADP y NAD.

Por último, para realizar dicho análisis, en este seminario de título evaluamos la importancia de esta arginina sustituyéndola por aquellos tres aminoácidos propuestos por Levy & Vought (1996, 2000), más una cuarta sustitución por valina (la que tiene por objeto determinar la contribución del tamaño de la cadena lateral), mediante mutagénesis sitio-dirigida en el gen *zwf*, y posterior comparación de los parámetros cinéticos con la enzima silvestre pura.

Adicionalmente, se realizaron estudios de unión con el ligando NADP, por medio del apagamiento de la fluorescencia intrínseca del triptófano. Dada la cercanía de un triptófano al sitio de unión a nucleótido de la enzima, éste puede censar cambios conformacionales por efecto de la unión del cofactor de acuerdo con el modelo de la G6PDH de *E. coli*.

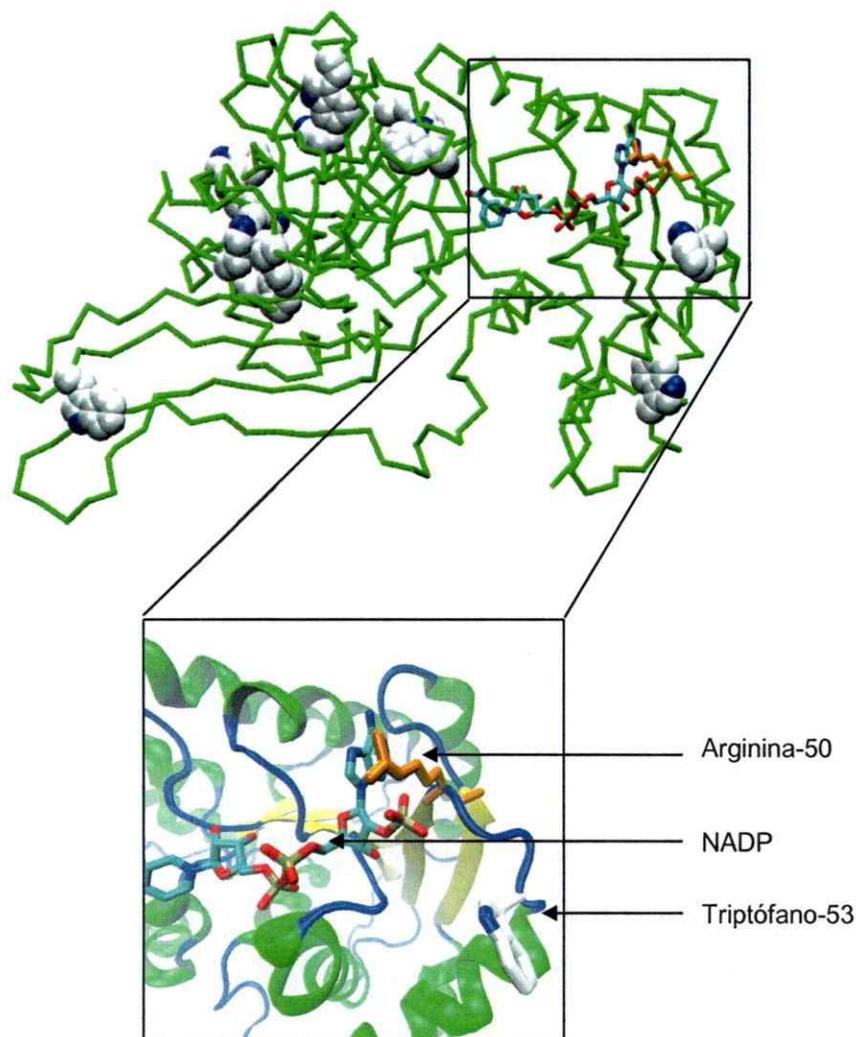


Figura 6.- Estructura tridimensional de la G6PDH de *E. coli*. En verde, se muestra la estructura de un monómero de la proteína con sus 12 triptófanos representados por esferas blancas. En el recuadro de acercamiento se aprecia parte del sitio activo, denotándose la estrecha cercanía entre el triptófano-53, la arginina-50; y el NADP.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

“En la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli* el residuo conservado del sitio activo, Arginina-50, es determinante para la eficiencia catalítica con NADP más que con NAD, pero no para revertir la preferencia por el cofactor”.

Objetivo general

- Evaluar la contribución de la Arginina-50 de G6PDH de *E. coli* a la preferencia por el cofactor.

Objetivos específicos

- Producción de G6PDH de *E. coli* silvestre y mutantes de Arginina-50 puras.
- Caracterización estructural: fluorescencia y estructura cuaternaria de las enzimas purificadas.
- Caracterización de parámetros cinéticos K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M y de unión (K_d) de las enzimas purificadas.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Reactivos

Tabla 1.- Reactivos utilizadas durante el seminario de título

LABORATORIO	REACTIVOS
Sigma (MO-USA)	β -mercapto-etanol, BSA, NAD(P), G6P, Rojo ponceau, standard
Merck (NJ-USA)	Azul de Coomssie R-250, APS, Agar, Tris, $MgCl_2$, $CaCl_2$, NaCl, $NiSO_4$, Imidazol, Metanol, Etanol, H_2O_2
Calbiochem (NJ-USA)	PMSF, Trombina, Glicina, Tween-20, SDS, 4-cloro-1-naftol
Qiagen (CA-USA)	HRP-Ni-NTA
Becton Dickison (NJ-USA)	Peptona
UsBiological (MA-USA)	IPTG, Kanamicina, tetraciclina, ampicilina
Biorad (CA-USA)	Bradford
Winkler (STGO-CHILE)	Glicerol
Invitrogen (CA-USA)	Genetailor, archilamida
Omega Bio-Tek (GA-USA)	E.Z.N.A (miniprep kit)
Biotium (CA-USA)	Gel Red
Fermentas (MA-USA)	Enzimas de restricción: <i>Bam</i> H1 y <i>Hind</i> III
TCL (STGO-CHILE)	TEMED
Lonza (Basel-Switzerland)	LE Agarosa SeaKem®

El agua utilizada en todos los experimentos se ultrapurificó (agua nanopura), hasta una resistencia de 18, 2 ohm.

Cepas bacterianas

Tabla 2.- Cepas bacterianas utilizadas durante el seminario de título

TIPO DE BACTERIA	GENOTIPO
<i>E. coli</i> cepa DH5 α TM -T1 [®]	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1 tonA
<i>E. coli</i> cepa BL21(DE3) tet ^r	F ⁻ <i>ompT hsd S_B (r_B⁻m_B⁺) gal dcm</i> (DE3), pLysS, Cam ^r

Medios de cultivos líquidos**Medio Luria-Bertani (LB)**

Se adicionó 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura sobre 900 ml de H₂O desionizada. El pH se ajustó con NaOH a 7,0 antes de aforar a 1 l esterilizar en autoclave.

Medios de cultivo sólidos**Agar LB**

Para la preparación de los cultivos sólidos, se agregó agar al 1,7 % p/v a un medio LB y se esterilizó en un autoclave. Para suplementar con antibióticos se espera a que el medio se entibiara primero antes de añadirlos.

Vector de expresión pET28b-eczwf

El vector pET28b-eczwf (donación realizada por la doctora Adriana Krapp, Universidad Nacional de Rosario, Argentina y posteriormente modificado por nuestro laboratorio) contiene el gen *zwf*, que se utilizó para la expresión de la enzima silvestre y para realizar la mutagénesis sitio-dirigida (Figura 7).

Este vector posee un tamaño aproximado de 7500 pb y contiene al gen *nptII* cuyo producto confiere resistencia a Kanamicina. El gen *zwf* se encuentra inserto entre los sitios de corte de las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III (conservando el codón de término) adyacente y en marco de lectura con la secuencia que codifica para 6 histidinas. A continuación, se encuentra una secuencia de corte por trombina seguido de una secuencia espaciadora que expresa 12 aminoácidos.

El gen *zwf* se encuentra bajo el control del promotor del bacteriófago T7, que es reconocido por la t-RNA polimerasa de éste último. La producción de esta polimerasa es inducible por isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) en células BL21(DE3).

De acuerdo a la predicción del programa bioinformático ProtParam (www.expasy.org), según la secuencia del gen, ésta correspondería a una proteína de 520 aminoácidos, con una masa molecular de 58731,6 Da y de punto isoeléctrico de 5,83.

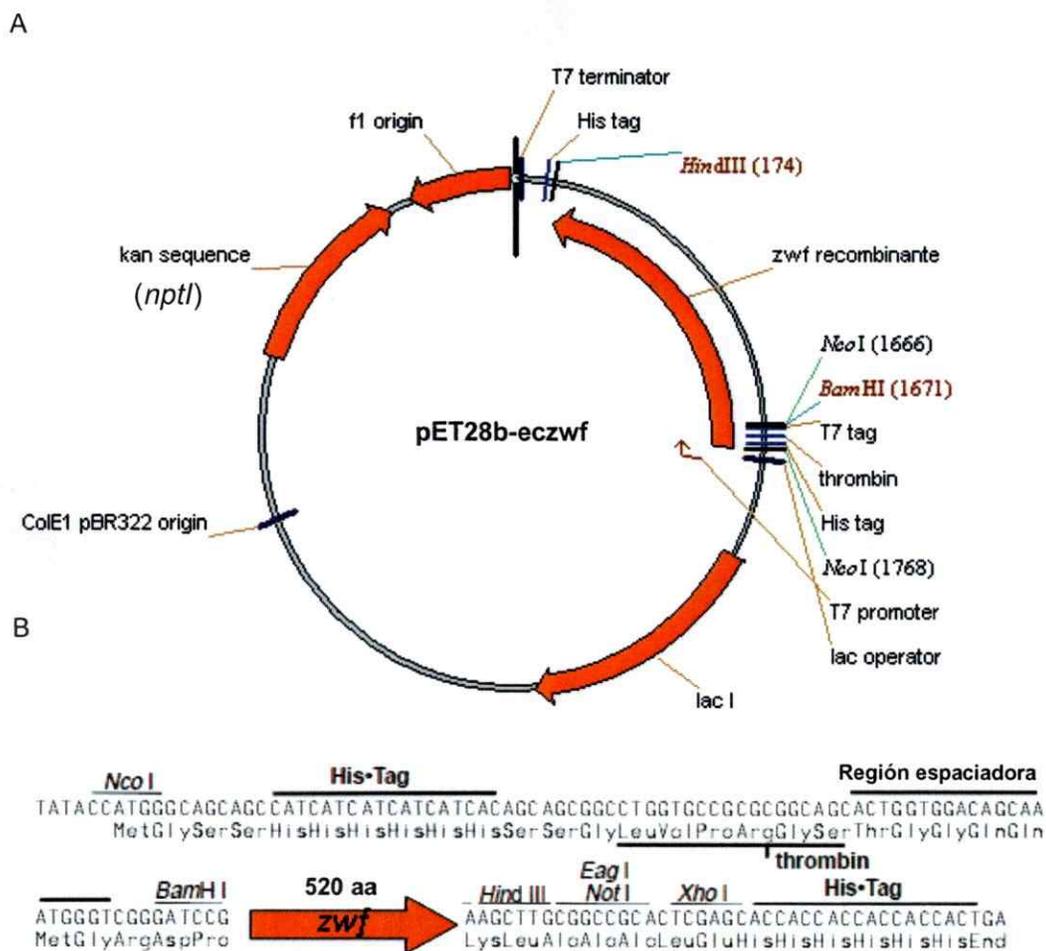


Figura 7.- Mapa del plásmido de expresión pET28b-eczwf. En A, se destacan: Promotor T7: secuencia de reconocimiento para la RNA polimerasa del fago T7; LacI: gen que codifica para el represor lac; ori ColE1 pBR 322: ori bacteriano derivado de pBR 322; f1: origen de replicación del fago f1; nptI (kan sequence): gen de resistencia a kanamicina. En B, Esquema del MCS y regiones contiguas del vector pET28b (+). *zwf*: secuencia del gen que codifica para la enzima G6PDH de *E. coli* fusionado a: His tag: Secuencia codificante para el tag de poli-histidinas; Thrombin: Región codificante para el sitio de corte por trombina; Región espaciadora: secuencia de 36 nucleótidos (12 aminoácidos) previo al codón de inicio de la traducción de la G6PDH.

Partidores

En la tabla 3 se muestran los partidores utilizados para la reacción de mutagénesis. El triplete de bases subrayado corresponde al codón del aminoácido reemplazado y las letras que aparecen en "azul" corresponden a las bases sustituidas. Las letras en "rojo" corresponden a la región de superposición del par de partidores y las letras negras corresponden a la región de extensión (ambas representadas en la figura 8, ver sección mutagénesis sitio-dirigida). Los partidores para R50A fueron sintetizados por Invitrogen (CA-USA) a través de Bios Chile (Chile). El resto de los demás partidores fueron sintetizados por IDT (IA-USA) a través de Fermelo Biotec Chile (Chile).

Tabla 3.- Partidores utilizados para introducir las mutaciones en el gen de *zwf*

Mutación	Secuencia de los partidores de 5' a 3'	T _M (°C)	T _A (°C)
R50A	ATTATCGGCGTAGGG <u>GCT</u> GCTGACTGGGATAAAG	69,4	61,3
NM-R50A	CCCTACGCCGATAATCCGGGTGTCCG	68,2	-
R50Q	CCCGGATTATCGGCGTAGGG <u>CAA</u> GCTGACTGGG	69,6	63,9
R50E	CCCGGATTATCGGCGTAGGG <u>GAA</u> GCTGACTGGG	69,3	65,4
R50V	CCCGGATTATCGGCGTAGGG <u>GTT</u> GCTGACTGGG	69,5	63,9
NM-R50X	CCCTACGCCGATAATCCGGGTGTCCGGTTG	68,9	-

R50A: Arginina por alanina, R50Q: Arginina por glutamina, R50E: Arginina por glutámico, R50V: Arginina por valina, NM: partidor no mutagenico, NM-R50X: partidor no mutagenico de Q, E y V. TM: temperatura de melting, TA: temperatura de annealing.

Métodos

Aislamiento de DNA plasmidial (miniprep)

El DNA plasmidial de los clones recombinantes se purificó mediante el uso del kit E.Z.N.A[®] Plasmid Miniprep Kit II de Omega Bio-Tek (GA-USA). Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm, de una dilución 1:10 de la muestra purificada de DNA, en cubeta de cuarzo. La concentración de la muestra se calculó mediante la ecuación:

$$DNA (\mu g/\mu l) = Abs_{260} \cdot 50 \cdot Factor \ de \ dilución \quad (1)$$

Se estimó el grado de pureza del DNA, mediante la relación Abs_{260} / Abs_{280} . Ésta siempre resulto superior a 1,8, lo cual indica un grado de pureza superior al 95 %.

Análisis de restricción del plásmido pET28b-eczwf

El análisis de restricción del plásmido pET28b-eczwf se realizó por medio del uso de dos enzimas de restricción: *Bam*HI y *Hind*III. La reacción de digestión se realizó en un volumen de 10 μ l. La mezcla de reacción contenía 200 ng de plásmido, 1 μ l de Fast Digest buffer 10 X, 0,4 μ l de fastDigest[®] *Bam*HI o 0,4 μ l de fastDigest[®] *Hind*III dependiendo del caso (la enzima de restricción no debe superar el 10% del volumen total de la reacción) y 4,6 μ l de agua nano pura estéril. La mezcla de reacción se incubó por 20 minutos a 37 °C. Pasado ese tiempo, se colocó a 4 °C, hasta el momento de su uso.

Mutagénesis sitio específica

Para las mutaciones sitio-específicas se utilizó el sistema Genetailor™ de Invitrogen (CA-USA). El procedimiento consiste en la amplificación por PCR del plásmido pET28b-eczwf que contiene al gen de interés, utilizando un par de partidores, de los cuales uno es mutagénico (figura 8). El procedimiento utiliza como molde el plásmido de doble hebra previamente metilado. Luego de la reacción de amplificación, los amplicones lineales generados son transformados en células DH5 α -T1, las cuales degradan el plásmido parental metilado y recircularizan los amplicones, formando de esta manera nuevamente el plásmido, pero con la mutación deseada.

La reacción de metilación se realizó en un volumen de 30 μ l. La mezcla de reacción contenía 188 ng de plásmido, 3 μ l de metilación buffer 10 X, 3 μ l de S-adenosyl-metionina (1,43 veces más concentrado de lo recomendado por el fabricante), 1,9 μ l (8 U) de DNA metilasa y 18,35 μ l de agua nano pura estéril.

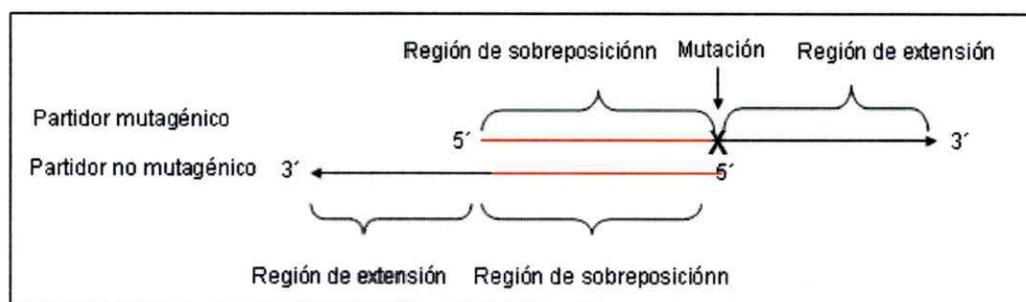


Figura 8.- Diseño de los partidores según kit Genetailor™. En este esquema se muestra el diseño de los partidores para el uso de este kit. En rojo se señala la complementariedad de los partidores (región sobreposición) necesarios para introducir las mutaciones en el gen de zwf.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 μ l. La mezcla de reacción contenía 5 μ l de High Fidelity PCR buffer 10 X, 150 ng de plásmido metilado, 1,5 μ l de ambos oligonucleótidos (0,3 μ M finales para cada uno); 1,5 μ l de la mezcla de deoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1 μ l de $MgSO_4$ 50 mM, 0,3 μ l (1,5 U) de la enzima Platinum[®] *Taq* High Fidelity, y por último 36,2 μ l de agua nano pura estéril.

Todos los reactivos para las reacciones de metilación y mutagénesis fueron aportados por el kit Genetailor[™] (Invitrogen, CA-USA).

Las reacciones de mutagénesis se realizaron en un termociclador Peltier Termal Cyler PTC-100[®] (MJ Research, Waltham-USA). Se utilizó un protocolo que consistía de una etapa inicial de desnaturación a 94 °C por 1 minuto, seguida por 20 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 1 minuto a 94 °C; 1 minuto de alineación a la temperatura de *annealing* de los partidores utilizados (tabla 3) y una etapa de extensión a 68 °C por 8 minutos (1 minuto por cada kilobase de DNA que se quiera amplificar). Los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

La secuencia de nucleótidos de los plásmidos obtenidos por miniprep a una concentración de 50 ng/ μ l en 100 μ l fue realizada por MacroGen Inc (Maryland, USA), utilizando la metodología de Sanger y empleando terminadores *bigdye* en condiciones cíclicas, con el equipo ABI3730XL (PE Applied Biosystems). Para la secuenciación se utilizaron los partidores universales del promotor y terminador del fago T7.

Electroforesis de DNA plasmidial en geles de agarosa

El DNA plasmidial y amplificados de PCR se analizaron mediante electroforesis en una cámara horizontal. Cada muestra se mezcló en proporción 2:1 con una solución de amortiguador de carga 6 X loading dye de fermentas (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,005 % y glicerol 10 %) y luego se cargaron en geles de agarosa a una concentración de 1 % p/v. La agarosa se preparó en solución TAE 1 X (Tris-HCl 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y Gel Red 3 X (Biotium, CA-USA). En los geles, se incluyó el estándar de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder Mix de 10 Kpb. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 80 V (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad, CA-USA). Finalmente, los geles se observaron sobre un transiluminador UV y se fotografiaron.

Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes

Un pre-inóculo de la bacteria receptora BL21(DE3) tet^r o DH5 α -T1, se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm en un agitador orbit environ (Mi-USA). Al día siguiente se inocularon 4 ml del pre-inóculo en 400 ml de medio LB y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ de 0,5. Seguidamente el cultivo se incubó en hielo por 30 minutos y después se centrifugó a 4.000 x g por 15 minutos a 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5810 R utilizando un rotor F-34. Se eliminó tanto sobrenadante como fuera posible y se suspendieron las células en 400 ml de agua nano pura estéril fría. Luego, se centrifugó a 4.000 x g por 15 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se suspendieron las células en 200 ml de agua nano pura estéril fría. En la última etapa se centrifugó nuevamente a 4.000 x g por 15 minutos a 4 °C y se suspendieron las células en 8 ml de glicerol al 10 % estéril

y frió. Finalmente, se centrifugó a 4.000 x g por 15 minutos a 4 °C y se suspendieron las células en 800 µl de glicerol al 10 % estéril y frió. El volumen final de células obtenido se repartió en alícuotas de 40 µl, las cuales fueron almacenadas en tubos Eppendorf a -80 °C hasta el momento de su uso.

Electrotransformación de *E. coli*

Se mezcló 40 µl de células DH5α-T1 electrocompetentes con 2 µl de DNA plasmidial, en cubetas de electroporación de 2 mm. Se utilizó un electroporador GenePulser Xcell (Biorad) en condiciones de voltaje 2,5 KV, capacitancia 25 µF y resistencia de 200 ohm. Se colocaron las cubetas en la cámara de electroporación y se generó el pulso. Inmediatamente después de esto, las células se suplementaron con 500 µl de medio LB y se incubaron en tubos eppendorf por 2 horas a 37 °C con agitación moderada. Luego, se sembraron 100 µl del cultivo en agar LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron por 12-14 horas para obtener colonias, a las cuales se les extrajo el DNA plasmidial para su posterior secuenciación.

Purificación de la G6PDH silvestre y mutantes

200 ml de medio LB suplementado previamente con tetraciclina (20 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) fueron inoculados con 8 ml de un cultivo crecido durante la noche anterior de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) tet^r transformada con el plásmido pET28b-eczwf. Este cultivo, se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5. Luego, éste fue inducido con IPTG 1 mM y se mantuvo la agitación por 4 horas más. Pasado este tiempo, las células fueron colectadas por centrifugación

a 8.000 x g por 5 minutos a 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5810 R utilizando un rotor F-34. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron suspendidas en un volumen equivalente al 10 % del volumen inicial del medio LB, con amortiguador S (Tris-HCl 50 mM pH 8.2, MgCl₂ 10 mM) al cual se le suplementó con NaCl 40 mM e inhibidor de proteasa, PMSF, a una concentración final de 1mM. Para lisar las células y liberar el contenido intracelular, se utilizó un sonicador Branson Digital Sonifier® (CA-USA), con una sonda de 1,2 cm de diámetro. Se aplicaron 7 pulsos de 20 segundos con 1 minuto de pausa entre cada pulso con una amplitud de 40 %. Durante este proceso, la suspensión de células se mantuvo siempre en hielo para evitar que el ultrasonido calentara la muestra. Pasada esta etapa, el extracto obtenido se centrifugó a 82.300 x g, a 4 °C por 30 minutos en una ultracentrífuga Beckman L5-50B. El sobrenadante se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en una columna HiTrap Q HP (GE Healthcare) de 5 ml pre-equilibrada con amortiguador S (Figura 9). En esta etapa la columna se lavó con al menos 10 volúmenes de columna. Luego, la proteína fue eluída de la columna utilizando 100 ml de un gradiente creciente y continuo de NaCl en amortiguador S desde 40 mM hasta 1M. Las fracciones con mayor actividad G6PDH, fueron colectadas y suplementadas con imidazol hasta 40 mM y sometidas a una cromatografía de afinidad a Ni⁺² en una columna HisTrap (GE Healthcare) de 5 ml. De esta segunda columna, la proteína de interés fue lavada tal como se describió para la columna anterior y eluída utilizando un gradiente creciente y continuo de imidazol en amortiguador S desde 40 mM hasta 600 mM, suplementado con 250 mM de NaCl. A las fracciones con mayor actividad G6PDH, se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y fueron colectadas para la siguiente etapa de digestión de la cola de histidina por trombina.

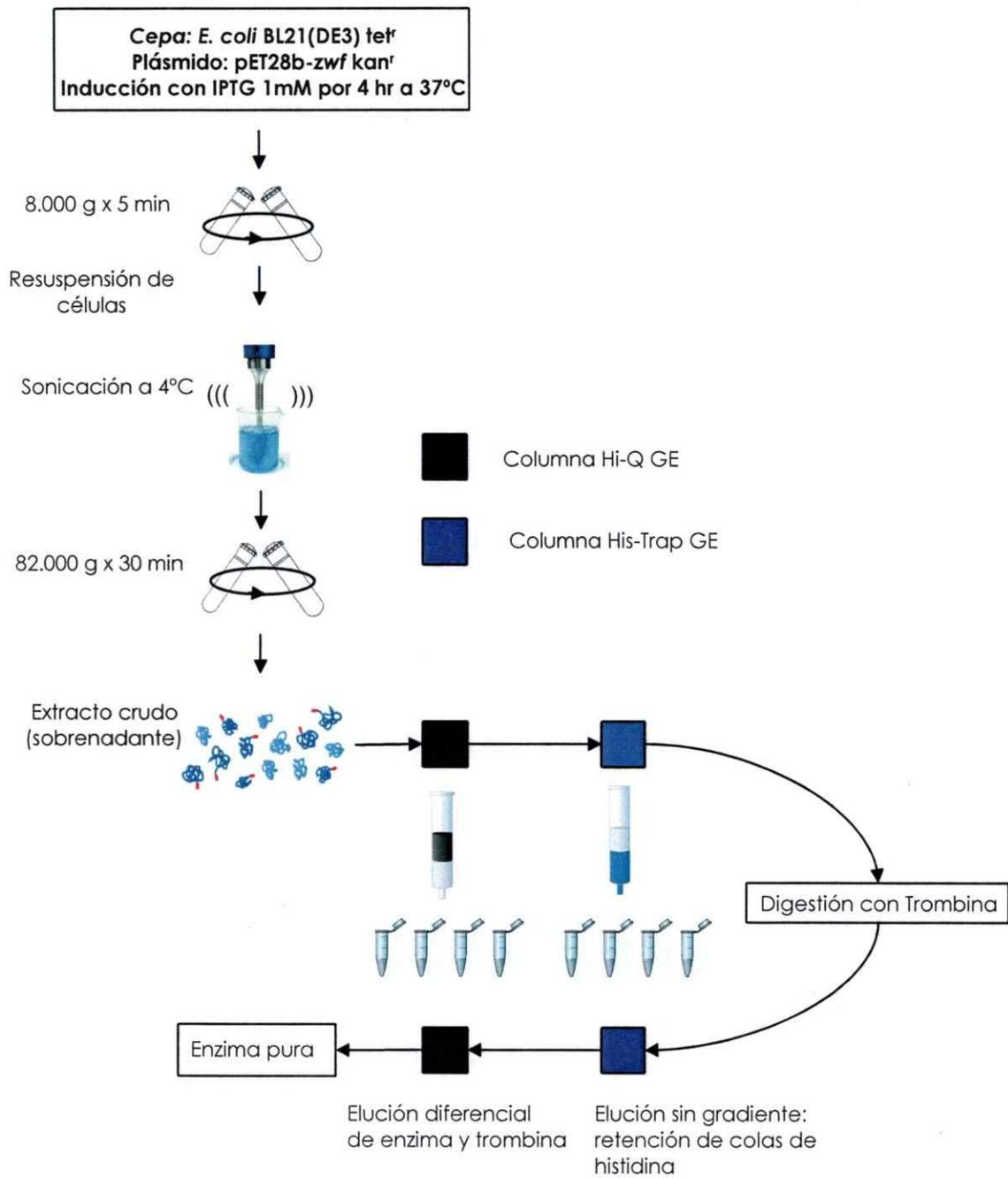


Figura 9.- Esquema de purificación de las G6PDH silvestre y mutantes.

La muestra de proteína pura fue diluida con amortiguador S hasta alcanzar una concentración final de 0,3 µg/µl, la cual fue suplementada con CaCl₂ 10 mM y se le añadió trombina sólida hasta alcanzar una proporción molar de 1:36 proteasa:G6PDH. La reacción de proteólisis procedió durante 5 horas a 37 °C con agitación suave. Terminado este tiempo, la mezcla de reacción se suplementó con β-mercapto etanol 10 mM para prevenir que la enzima formara un precipitado blanco inactivo.

Para poder lograr separar la proteína cortada de la no cortada, la mezcla de reacción se inyectó en una columna HisTrap, y una vez pasada por ésta, se colectó el frente y el primer lavado (las proteínas cortadas ya no tienen la capacidad de unirse a la columna HisTrap). Dado que la trombina co-eluye con la G6PDH cortada, la mezcla se somete a una cromatografía de intercambio iónico en una columna HiTrap Q HP de 5 ml utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente para esta columna. La separación efectiva de las dos proteínas fue confirmada con mediciones de actividad específica y absorbancia a 280 nm en las fracciones colectadas. Para chequear la pureza de la enzima, esta se analizó por SDS-PAGE.

Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE)

El análisis de las masas moleculares sobre las muestras de proteína de cada etapa de la purificación, se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalantes en una cámara vertical Mini PROTEAN[®] 3 cell (BioRad). Las muestras se mezclaron en proporción 3:1 con un amortiguador de carga 4 X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 4 % v/v, SDS 8 % p/v, β-mercapto-etanol 2,8 mM y azul de bromofenol 4 %) y se calentaron a 100 °C por 5 minutos. Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 11,5 %.

Las electroforesis se realizaron a amperaje constante de 30 mA por 1 hora aproximadamente, hasta el momento antes de la caída del frente de corrida (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad, CA-USA). Como solución de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v).

Realizada la electroforesis, se tiñó el gel con azul brillante de comassie R-250 0,3 % p/v disuelto en una mezcla de metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v, durante dos horas con agitación constante, y se destiñó con la misma mezcla sin comassie, hasta obtener un contraste claro de las bandas.

La masa molecular relativa de las proteínas se determinó a partir de su migración electroforética. Se utilizó el estándar de peso molecular SigmaMarker™ Low Range (Sigma) que contiene 7 proteínas patrón de 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14,2 kDa.

Western blot de la cola de histidina por sondas HRP Ni-NTA

A las muestras de proteína que fueron digeridas con la proteasa (ver purificación de la G6PDH), se les realizó SDS-PAGE y posteriormente se las transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Para la transferencia, se formó un "sándwich" compuesto por dos esponjas plásticas, diez láminas de papel Whatman 3 mm, una lámina de nitrocelulosa y el gel SDS-PAGE sin tefir; todo esto apretado por dos soportes de plástico perforado. Este "sándwich" se colocó en una cámara de transferencia con una orientación gel/membrana/ánodo. La transferencia transcurrió a temperatura ambiente a amperaje constante de 200 mA durante 1 hora, en amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 8,4; glicina 192 mM y metanol 20 %. La membrana que contenía las proteínas transferidas fue lavada por 2 veces con amortiguador TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) y se confirmó la eficiencia de la transferencia

mediante tinción reversible con rojo Ponceau S 0,5 %, y ácido acético 1 %. Posteriormente, la membrana fue incubada por 1 hora con amortiguador TBS y seroalbúmina de bovino (BSA) 3 %. Luego, fue lavada tres veces por 15 minutos cada vez con TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; Tween-20 0,05 % p/v) y se incubó por 1 hora con la sonda HRP Ni-NTA Conjugate Qiagen 34530 en una dilución 1/1000, la cual se asocia a la cola de histidina de la proteína. Seguidamente, la membrana fue lavada 3 veces durante 10 minutos cada vez en TBS-T. La detección de la reacción de la sonda de HRP Ni-NTA con la cola de histidina sobre la membrana, se realizó mediante el método del ensayo de la peroxidasa. Este consistió en incubar la membrana en una solución de tinción que contenía: 24 ml de amortiguador Tris-salino 10X (Tris-HCl 1M pH 8,0 NaCl 9 % p/v), 18 mg de 4-cloro-1-naftol, 6 ml de metanol y 60 μ l de 30 % H_2O_2 (la solución de tinción es estable por muy poco tiempo). La reacción se llevó a cabo por 5-15 minutos en la oscuridad y una vez obtenidas una buena intensidad de bandas, la reacción se detuvo con lavados secuenciales en agua destilada. La masa molecular relativa de las proteínas se determinó a partir de su migración electroforética. Se utilizó el estándar de peso molecular BenchMark™ His-tagged (Invitrogen).

Cromatografía de exclusión molecular (HPLC)

Los experimentos se realizaron en una columna de exclusión molecular TSKgel® G200SWL (Tosoh, Bioscience) con dimensiones de 300 mm x 7,8 mm y tamaño de poro de 5 μ m, usando un sistema de HPLC Waters 1525 con bombas binarias. La columna se equilibró con una solución de lavado que contenía amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 5 mM y NaCl 200 mM previamente filtrada para su uso. Se aplicaron volúmenes de muestra de 20 μ l con una concentración de

proteína de 0,15 µg/ µl a un flujo de 0,8 ml/min. La absorbancia del eluyente se registró continuamente a 280 y 260 nm con un detector de absorbancia Dual λ Waters 2487.

Para determinar la masa molecular de la G6PDH pura, se usó una curva de calibración (figura 10) que contenía los volúmenes de elución de diferentes proteínas patrón abastecidas en el Molecular Gel Filtration Standard (BioRad): Tiroglobulina de bovino (670 kDa, 85 Å R_S); γ-globulina de bovino (158 kDa, 41,8 Å R_S); Ovoalbumina de pollo (44 kDa, 30,5 Å R_S); Mioglobina de caballo (17 kDa, 19 Å R_S) y Vitamina B₁₂ (1,35 kDa, 8,5 Å R_S).

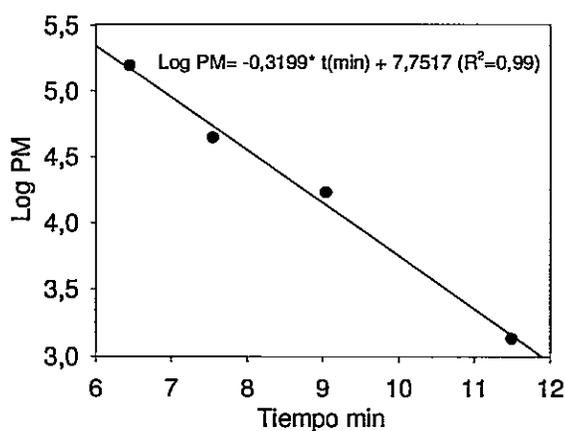


Figura 10.- Curva de calibración HPLC. En la figura se señala la ecuación de la recta obtenida con los patrones estándar de peso molecular para la determinación de las masas molecular de la proteína.

Titulación de sustratos

Todos los sustratos (NADP, NAD y G6P) fueron llevados a pH 7.0. La concentración se determinó mediante el cambio de absorbancia del NAD(P)H a 340 nm, en una mezcla de reacción que contenía a la propia G6PDH de *E. coli* previamente purificada para el caso del NADP y G6P, o a la G6PDH de *L. mesenteroides* (Sigma-Aldrich) para el caso del NAD. Se utilizó una concentración de co-sustrato al menos 20 veces mayor, lo cual garantiza, según el valor de la constante de equilibrio ($k_{eq} = 6.02 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, Glaser & Brown, 1955), que más del 99.9% del sustrato a titular se convierta a producto. Una vez que la reacción alcanza el equilibrio, la diferencia entre las absorbancias inicial y final de la mezcla de reacción, ΔAbs_{340nm} , se utilizó para determinar la concentración real de los sustratos mediante la ecuación:

$$[Sustrato] = \frac{\Delta Abs_{340nm}}{\epsilon \cdot l} \quad (2)$$

En donde, ϵ es el coeficiente de extinción molar del NADPH y l , el paso óptico de la cubeta (1 cm). Debido a que el coeficiente de extinción del NADPH de 6220 U.A $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 340 nm (Bergmeyer, 1974) fue determinado en condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura distintas a las usadas en estas mediciones, es que se optó por utilizar un coeficiente de extinción aparente determinado para nuestras condiciones de trabajo de 5186 U.A. $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Preparados de esta manera, los sustratos se conservaron a -40° C por dos semanas como máximo.

Determinación de la actividad enzimática de G6PDH

La actividad enzimática se determinó en un mezcla de reacción que contenía: amortiguador Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NADP 0.4 mM, G6P 2 mM pH 8,0. Durante la reacción enzimática, se monitoreó la formación de NADPH a 25 °C por medio del aumento en la absorbancia a 340 nm.

Utilizando el coeficiente de extinción de 5186 U.A. M⁻¹ cm⁻¹, se calculó la actividad de la enzima como el numero μ moles de NADPH formados por minuto y por volumen de enzima (ml) lo que equivale a una unidad de enzima (U).

Todos los ensayos cinéticos se realizaron en un espectrofotómetro Biotek Synergy 2 UV-visible a 25 °C, con dos inyectores utilizando placas Nunc® de 96 pocillos (modelo 269620), las cuales tienen propiedades adecuadas de transmitancia y baja adsorción de proteínas.

Se generó un protocolo a través del software Gen5 del espectrofotómetro, para realizar las mediciones cinéticas. La secuencia de pasos se aprecia en la figura 11. En todos los casos, la reacción siempre fue desencadenada con la adición de G6P. Se realizaron cuatro réplicas para cada concentración, con cinéticas de 30 segundos a una tasa de adquisición de datos, que resultaba en 334 observaciones totales: una cada 9 centésimas de segundo. Se midió la absorbancia a 340 nm antes y al final del experimento con el propósito de calcular el sustrato consumido. Adicionalmente, el espectrofotómetro midió la longitud del paso óptico de cada pocillo para normalizar las mediciones a una longitud de paso óptico de 1 cm.

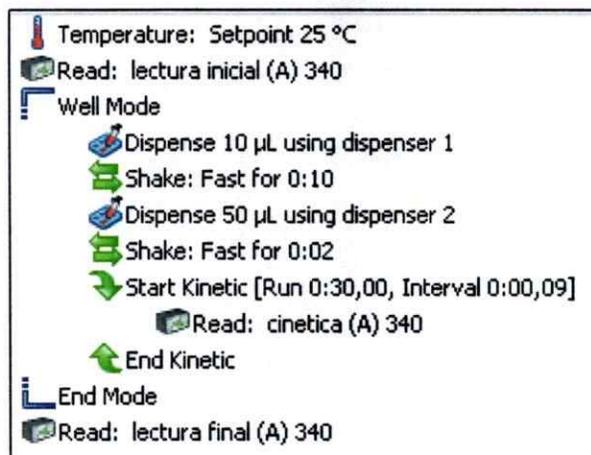


Figura 11.- Protocolo software Gen5. Instrucciones creadas en el software del espectrofotómetro para realizar las mediciones cinéticas. Los iconos pequeños representan los diferentes pasos efectuados para cada medición. En el dispensador 1 se coloca la enzima, la cual es inyectada al pocillo que contiene la mezcla de reacción, seguido de un paso de agitación por 10 segundos. En el dispensador 2 se coloca la G6P, la cual es inyectada para desencadenar la reacción. Este paso es seguido de una segunda agitación por 2 segundos. Finalmente se realiza la cinética. Esta secuencia se repite para cada pocillo de la placa.

Determinación de las constantes cinéticas aparentes

Las constantes cinéticas tanto de la enzima silvestre como mutantes, se calcularon a partir de mediciones de velocidad inicial (v_0) a diferentes concentraciones de sustrato (S) (ver resultados), ajustando a los datos el modelo cinético de Michaelis-Menten (M-M) descrito por la ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

En donde,

$$V_{MAX} = k_{cat} \cdot [E]_T \quad (4)$$

En esta ecuación, La K_M es la constante de M-M, cuyo significado en términos de constantes de velocidad varía según el mecanismo catalítico, pero que en términos operacionales corresponde a la concentración de sustrato a la cual $v_0 = \frac{1}{2} V_{MAX}$. La V_{MAX} por su parte, es la velocidad máxima que puede alcanzar la reacción catalizada por la enzima y a su vez, equivale al producto de la constante catalítica k_{cat} por la concentración de enzima total $[E]_T$. Específicamente, la k_{cat} se calcula por medio de la ecuación:

$$k_{cat}(s^{-1}) = \frac{V_{MAX} \cdot PM_{(G6PDH)} \cdot 0,001}{60} \quad (5)$$

En donde, V_{MAX} es la velocidad máxima expresada en unidades de $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de enzima; PM el peso molecular de la G6PDH expresado en g/mol; 0,001 el factor de conversión para convertir los g/mol en mg/ μmoles y 60 el factor de conversión para convertir los minutos a segundos. Finalmente con todos estos datos, la k_{cat} se expresa en s^{-1} .

Proceso de datos y análisis estadístico

Los ajustes del modelo M-M con los datos experimentales de v_0 y concentración de S, se realizaron en SigmaPlot v11. Este programa entregó para cada ajuste su coeficiente de determinación (R^2) y la desviación estándar (DS) de sus parámetros V_{MAX} y K_M .

Al convertir los datos de V_{MAX} a k_{cat} , se debió re-calcular la DS utilizando la formula de propagación de errores para transformaciones lineales (Lindberg, 2000):

$$\sigma_f^2 = a^2 \sigma_A^2 \quad (6)$$

En donde, σ_A es la DS de la V_{MAX} ; a es el factor de conversión y σ_f es la DS de la k_{cat}

Por otra parte, para determinar la DS de las eficiencias catalíticas (k_{cat} / K_M), se utilizó la fórmula de propagación de errores para cocientes (Lindberg, 2000):

$$\left(\frac{\sigma_f}{f}\right)^2 = \left(\frac{\sigma_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_B}{B}\right)^2 - 2\frac{\sigma_A}{A}\frac{\sigma_B}{B}\rho_{AB} \quad (7)$$

En donde, f es el valor de la media del cociente k_{cat}/K_M ; σ_f , la DS del cociente a determinar; A y B los parámetros k_{cat} y K_M respectivamente; σ_A y σ_B sus DS y ρ_{AB} el coeficiente de correlación de Pearson entre estos dos parámetros.

Mediciones de fluorescencia intrínseca

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluómetro Shimadzu RF-5301PC (Tokio, Japón). Se excitaron los residuos de triptófano a 295 nm y se registró el espectro de emisión entre los 300 y 480 nm, usando aperturas de excitación y emisión de 3 nm. Todas las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo de 1500 μ l a 25^o C. La concentración de proteína que se utilizó para todos los experimentos fue de 0,09 μ g/ μ l en amortiguador Tris-HCl 30 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM y β -mercapto etanol 2 mM. A cada espectro de emisión se le substrajo la contribución del amortiguador y se midió el área bajo la curva entre los 302 y 390 nm utilizando el programa SigmaPlot v11.

Los experimentos de titulación consistieron en la adición de pequeñas cantidades de ligando (NADP o G6P) sobre la solución que contenía a la enzima. Por cada concentración de ligando añadido a la cubeta, se medía el área bajo la curva entre los 302 y 390 nm, corrigiendo siempre por el factor de dilución. Los valores obtenidos se transformaron a porcentaje y se graficaron en contra de la concentración del titulante.

Para el caso del NADP, la saturación fraccional de la unión de este cofactor fue determinada a partir de la disminución del área bajo la curva con la concentración de ligando adicionado mediante la fórmula:

$$\frac{AF_0 - AF_L}{AF^\infty - AF_0} \quad (8)$$

En donde, AF_0 representa el área bajo la curva del espectro de emisión en ausencia de ligando, AF_L representa el área bajo la curva obtenida después de la adición de una cierta concentración de ligando y AF^∞ representa el área bajo la curva a concentración saturante de ligando.

La constante de unión se determinó ajustando la curva de saturación fraccional a la ecuación:

$$F_C = \frac{F_{MAX} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (9)$$

En donde, F_C es la saturación fraccional del NADP, F_{MAX} la saturación fraccional máxima alcanzada a concentración infinita de ligando, L , la concentración de ligando NADP y K_d , la constante de disociación.

Efecto del filtro interno

Para los experimentos que utilizaron NADP como ligando, fue necesario aplicar una segunda corrección a las mediciones. Estos cofactores tienen la propiedad de absorber a los 260 nm, por lo que, a medida que se utilizan concentraciones mayores de estos ligandos para las titulaciones, estos tienden a absorber fotones a longitudes de onda cada vez mayores, interfiriendo de esta manera con la excitación del triptófano a 295 nm. Este fenómeno denominado filtro interno (Lakowicz, 1983) distorsiona las mediciones dando resultados incorrectos. Afortunadamente, este fenómeno se soluciona empleando la función de Gauthier (Gauthier y col, 1986), la cual corrige los datos por las contribuciones de las absorbancias de estos ligandos a las longitudes de onda de emisión y excitación utilizadas en estos experimentos, tomando en cuenta las dimensiones de la cubeta. La función de corrección que se empleó fue la siguiente:

$$\frac{F_{\text{corr}}}{F_{\text{obs}}} = \frac{2.3 d A_{\text{ex}}}{1 - 10^{-d A_{\text{ex}}}} \times 10^{g A_{\text{em}}} \times \frac{2.3 s A_{\text{em}}}{1 - 10^{-s A_{\text{em}}}} \quad (10)$$

En donde, F_{corr} y F_{obs} son la fluorescencia corregida y observada; A_{ex} y A_{em} son las absorbancias del ligando a las longitudes de onda de excitación y emisión y d , g , s las dimensiones de la cubeta de acuerdo con la figura 12.

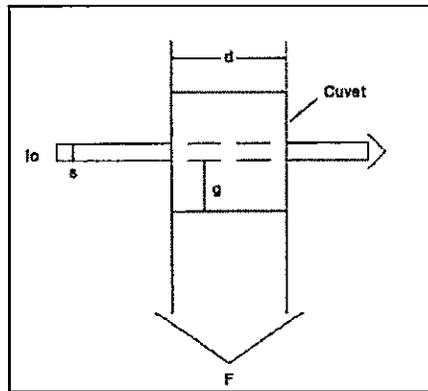


Figura 12.- Dimensiones de la cubeta utilizada en los experimentos de fluorescencia. l_0 , corresponde al haz incidente de excitación; s , grosor del haz incidente (0,6 cm); d , ancho de emisión (0,4 cm); g , distancia entre el haz incidente y el límite de la cubeta y F emisión de la fluorescencia al detector.

RESULTADOS

Generación de mutantes de arginina-50 de G6PDH de *E. coli*

Plásmido pET28b-eczwf

Giró y col (2006) clonaron el gen *zwf* en el vector pET-28b (+) (Novagen), entre los sitios de corte: *Bam*HI y *Hind*III (figura 7A, materiales y métodos). Al recibir el plásmido (pET28b-eczwf) se decidió confirmar la estructura de dicha construcción, mediante análisis de restricción y secuenciación (ver materiales y métodos). De las digestiones con ambas enzimas, se obtuvo dos fragmentos de aproximadamente 1,7 y 5,8 Kb, correspondiente a los pesos moleculares aproximados del gen *zwf* y el vector, respectivamente (figura 13). El fragmento de mayor tamaño presenta la misma migración que el vector pET28b (+) linearizados por digestión con *Bam*HI (figura 13, carriles 2 y 4, respectivamente). Por otro lado, la suma de tamaños del fragmento mayor y menor es aproximadamente de 7,5 Kb, congruente con el tamaño del plásmido pET28b-eczwf. La secuenciación del plásmido pET28b-eczwf, se realizó mediante el uso de partidores universales (promotor y terminador T7). En la figura 7B, se muestra parte de la secuenciación del plásmido con sus aditamentos y al gen *zwf*, el cual conserva su codón de inicio.

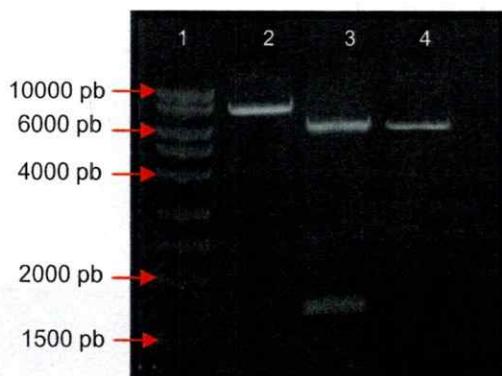


Figura 13.- Electroforesis en gel de del plásmido pET28b-eczwf purificado. La electroforesis se corrió en un gel de agarosa al 1%. Orden de los carriles: carril 1: estándar de peso molecular 1Kb; carril 2: pET28b-eczwf+*Bam*HI; carril 3: pET28b-eczwf+*Bam*HI+*Hind*III y carril 4: vector pET-28b sin inserto digerido con *Bam*HI.

Mutagénesis sitio dirigida

Todas las reacciones de mutagénesis mediante PCR (sección mutagénesis sitio-dirigida, materiales y métodos) dieron una banda de amplificación con una migración electroforética cercana a los 7,5 Kb correspondiente al tamaño del plásmido pET28b-eczwf en su forma lineal (figura 13 y 14A). Usando este producto, se transformaron células de *E. coli* DH5 α -T1 obteniéndose colonias para 3 de los 4 productos de mutagénesis, aunque con una baja eficiencia (2 a 3 colonias por 120 ng de DNA). El producto de mutagénesis R50E no generó transformantes.

Para solucionar este problema, fue necesario variar las condiciones de PCR, mediante el uso de un termociclador en gradiente. Este equipo permite utilizar diferentes temperaturas de *annealing* (T_a) para una serie de reacciones en una misma corrida de PCR.

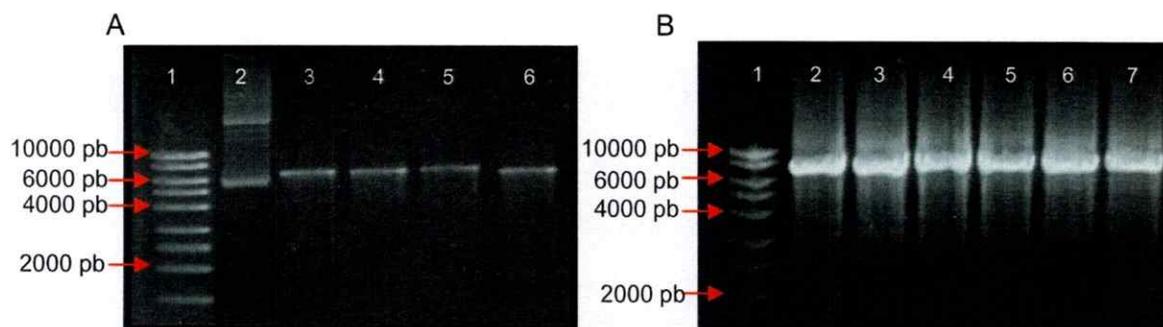


Figura 14.- Electroforesis de los productos de PCR provenientes de la reacción de mutagénesis. En A, electroforesis en gel de agarosa al 1%. Orden de los carriles: carril 1, estándar de peso molecular 1 Kb; carril 2: pET28b-eczwf purificado de miniprep (control); carril del 3 al 5: fragmentos lineales amplificados del plásmido pET28b-eczwf proveniente de las reacciones de mutagénesis: R50A, R50Q, R50E y R50V. En B, productos de la reacción de PCR en gradiente para R50E a diferentes T_a . Orden de los carriles: carril 1, estándar de peso molecular 1 Kb; carril del 2 al 7: fragmentos lineales amplificados del plásmido pET28b-eczwf proveniente de las reacciones de mutagénesis en gradiente. Temperaturas de annealing: 58 (2), 60.9 (3), 62.8 (4), 64.4 (5), 65.4 (6) y 66 °C (7).

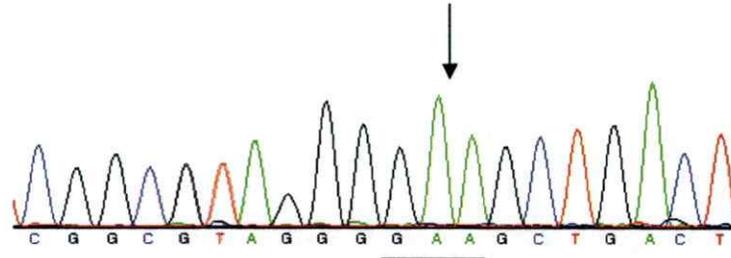
Aunque en todas las condiciones se obtuvo cambios apreciables en la cantidad del amplificado principal, se eligieron para la transformación, los productos con las T_m de 64,4 y 65,4 °C, ya que no presentaban una banda espuria de alrededor de 2 Kb (figura 14B). Esta vez, sí se obtuvieron transformantes.

Dos colonias de cada reacción de mutagénesis fueron seleccionadas. Se les extrajo el DNA plasmidial mediante miniprep y se secuenció el gen completo de *zwf* para confirmar que no tuviera mutaciones adicionales. En todos los casos, ambos clones dieron el mismo resultado. En las figuras 15 y 16, se muestra la secuenciación alrededor de la región del codón mutado.

Sólo R50E dio evidencia de una mutación espuria en una única base. El análisis de la secuencia traducida del gen *zwf* mediante el programa bioinformático <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> (utilizando un marco de lectura coherente con el codón de inicio del gen) confirmó que la mutación espuria era silente, es decir, el codón con la base mutada, codificaba para el mismo aminoácido. Ya que esta mutación no implicó un problema de sesgo de codones para la bacteria en la cual se expresaron las diferentes mutantes, *E. coli* BL21- DE3, (el codón con la base mutada tiene una frecuencia de uso de un 31 %, comparado con un 34 % para el codón original) se decidió continuar con la caracterización de esta mutante.

Arginina 50 por Ácido Glutámico

Silvestre 5'- CGGCGTAGGGCGTGCTGACT -3'
 R50E 5'- CGGCGTAGGGGAAGCTGACT -3'



Arginina 50 por alanina

Silvestre 5'- CGGCGTAGGGCGTGCTGACT -3'
 R50A 5'- CGGCGTAGGGGCTGCTGACT -3'

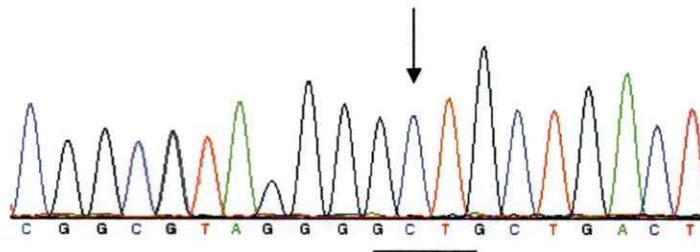
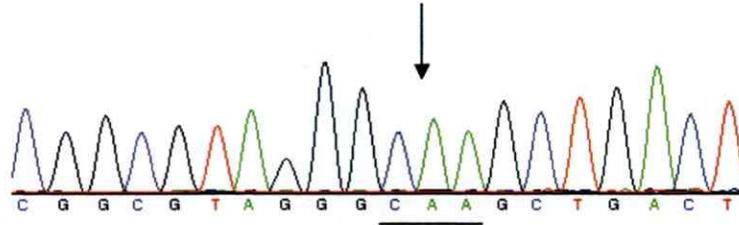


Figura 15.- Resultados de secuenciación de las mutantes R50E y R50A. Arriba de cada secuencia, se muestra la secuencia del gen *zwf* silvestre, desde la citocina 284. El triplete subrayado indica el codón donde se ubica la mutación. El cromatograma asociado se visualizó mediante el programa ContigExpress Project (Invitrogen, CA-USA).

Arginina 50 por Glutamina

Silvestre 5'-CGGCGTAGGGCGTGCTGACT-3'

R50Q 5'-CGGCGTAGGGCAAGCTGACT-3'



Arginina 50 por Valina

Silvestre 5'-CGGCGTAGGGCGTGCTGACT-3'

R50V 5'-CGGCGTAGGGGTTGCTGACT-3'

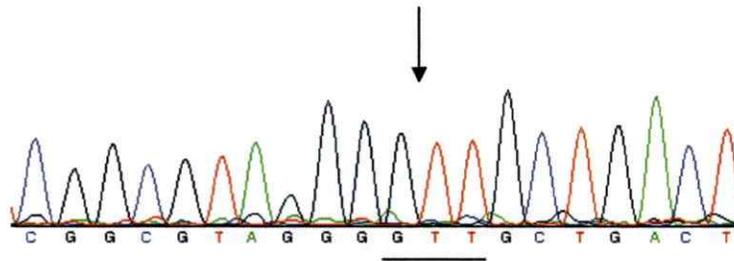


Figura 16.- Resultados de secuenciación de las mutantes R50Q y R50V. Arriba de cada secuencia, se muestra la secuencia del gen *zwf* silvestre, desde la citocina 284. El triplete subrayado indica el codón donde se ubica la mutación. El cromatograma asociado se visualizó mediante el programa ContigExpress Project (Invitrogen, CA-USA).

Condiciones de expresión de las G6PDH silvestre y mutantes

Luego de obtener colonias individuales de *E. coli* BL21(DE3) *tet^r* transformadas con los plásmidos mutados, se seleccionó y picó una por cada mutante. Para inocular 10 ml de medio LB, se procedió como se describe en la sección: purificación de G6PDH silvestre (materiales y métodos), excepto porque después de un tiempo de inducción de 4 horas con una concentración de IPTG de 1 mM, a), los cultivos de células fueron centrifugados a 8.000 x g por 5 minutos, b) las suspensiones celulares se sonicaron empleando una sonda de 0,3 cm de diámetro y c) los extractos sonicados se centrifugaron a 14.000 x g por 15 minutos. Se rescató el sobrenadante de cada muestra y se sacó una alícuota de 50 µg cada una para ser cargadas al gel de SDS-PAGE según como se describe en materiales y métodos. En la figura 17, se muestra el gel obtenido evidenciando la presencia de una banda muy intensa en todos los carriles, con una migración electroforética respecto a los marcadores de peso molecular congruente con la masa molecular de la enzima silvestre (57,8 kDa).

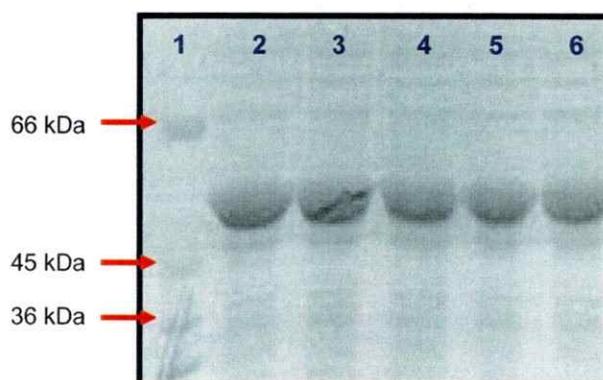


Figura 17.- Electroforesis en condiciones desnaturalantes para la prueba de expresión de la G6PDH en *E. coli* BL21-DE3. Carril 1: patrón de peso molecular; carril 2: extracto G6PDH silvestre; carril 3: extracto R50E; carril 4: extracto R50A; carril 5: extracto R50Q y carril 6: extracto R50V.

Expresión y purificación de la G6PDH silvestre y mutantes

Se obtuvieron alrededor de 80 mg de proteína por extracto crudo proveniente de 200 ml de cultivo. Para el caso de la enzima silvestre, fue determinada una actividad específica de 40 U/mg.

Desde el inicio de la purificación, el pH de los amortiguadores se mantuvo a un valor de 8,2. Se observó que cambios en el pH por debajo de 7,4 (en ensayos de optimización), causaban la precipitación de la enzima.

La proteína expresada por el plásmido presenta una adición de 6 residuos de histidinas en el extremo N-terminal, lo que permite su purificación por medio de columnas de afinidad (His-Trap). Sin embargo, como primera etapa de purificación se empleó una columna de intercambio iónico (Hi-Q). La enzima siempre eluyó de las columnas al alcanzar en el gradiente de elución una concentración de aproximadamente 240 y 190 mM de NaCl e Imidazol, respectivamente (Figura 18, A y B).

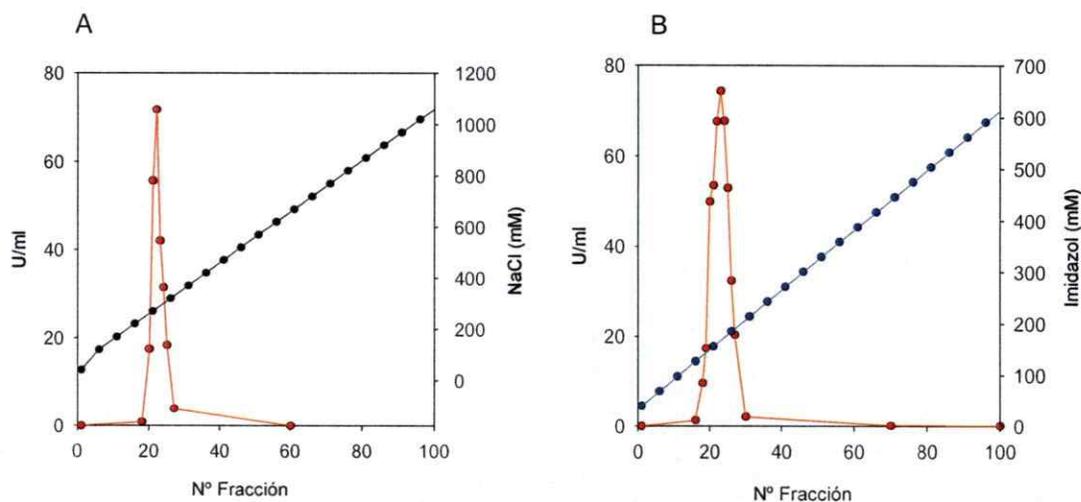


Figura 18- Cromatogramas de las columnas Hi-Q y His-trap. Tanto en A como en B, las líneas rojas representan el perfil de elución de la enzima en los diferentes cromatogramas. Los círculos negros en A, representan el gradiente de 40 a 1 M de NaCl; los círculos azules en B, representan el gradiente de 40 a 600 mM de Imidazol

En la figura 19, se muestra el curso temporal de la digestión con trombina de la enzima silvestre. Ya al cabo de 1 hora de digestión, se observa una disminución del 90% en la señal de la sonda de Ni-HRP por *western blot* (ver *western blot en materiales y métodos*). Finalmente, se fijó el tiempo de incubación para la etapa de proteólisis en 5 horas. Cambios en la concentración de CaCl_2 , así como la concentración de enzima en el ensayo, condujeron a una disminución en la eficiencia del corte y precipitación de la G6PDH.

Posterior a la remoción de la cola de histidina, la enzima eluye de la columna His-Trap en el frente y primer lavado, quedando retenida en la columna, sólo la proteína no digerida. En la figura 20, se muestra el perfil de elución seguido por absorbancia a 280 nm de la última columna Hi-Q, muestra la separación efectiva de la trombina de la enzima.



Figura 19.- Optimización de la digestión del tag de histidina por trombina. A la izquierda se muestra un gel SDS-PAGE con las muestras digeridas a distintos tiempos: carril 1: patrón de peso molecular; carril 2: 0 horas; carril 3: 1 hora; carril 4: 5 horas; carril 5: 8 horas; carril 6: 10 horas y carril 7: toda la noche. A la derecha, los resultados del *western blot* de las mismas muestras. La desaparición gradual en el tiempo de la señal de la sonda de Ni-HRP, vista como una banda intensa negra que desaparece, es indicativa del corte de la cola de histidina.

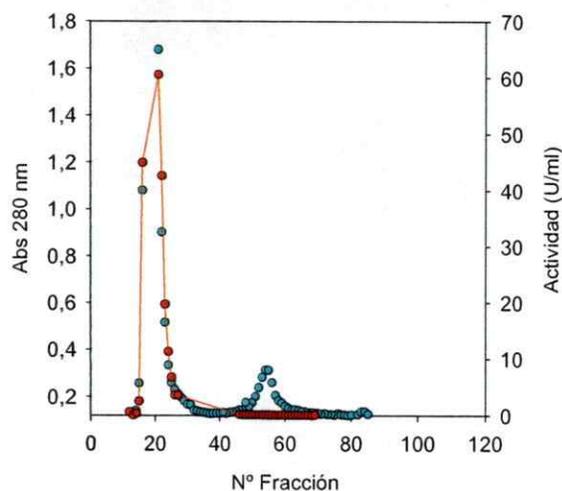


Figura 20.- Separación efectiva de la trombina de la G6PDH. Cromatograma de la última etapa de purificación (columna Hi-Q). La línea roja representa el perfil de elución de la enzima. Los círculos color cian, indican la absorbancia a 280 nm medida en las diferentes fracciones de la columna.

En la tabla 4, se muestran los resultados de las distintas etapas de purificación. Para la enzima silvestre, al final de la purificación se obtiene una actividad específica de 108 U/mg, equivalente con un incremento de 2,8 veces en relación al extracto crudo, lográndose un rendimiento de aproximadamente 70 %. En la figura 21, se muestran los resultados de un gel SDS-PAGE con muestras de las fracciones provenientes de las distintas etapas de la purificación de la enzima.

En el conjunto de fracciones eluidas de la primera columna His-trap (figura 21, carril 4), ya no se observan la mayoría de los contaminantes observados en la etapa anterior. Para el final de la purificación, la proteína se obtuvo con un grado de pureza mayor al 99 %, de acuerdo al análisis densitométrico de los geles a través del programa Gel-Pro analyzer. Se determinó una masa molecular aproximada de 57,8 kDa para la enzima a partir de sus migraciones electroforéticas relativas respecto al marcador de peso molecular utilizado en los geles de SDS-PAGE. Este valor confirma el predicho por la secuencia aminoacídica de la proteína.

Para la purificación de las enzimas mutantes de G6PDH, se utilizó el mismo protocolo que para la enzima silvestre, descrito anteriormente. Para medir la actividad de las enzimas mutantes en las diferentes etapas de purificación, fue necesario incrementar la cantidad de NADP en el ensayo de actividad en aproximadamente 10 veces más que lo usado con la enzima silvestre.

El incremento en número de veces de la actividad específica para las enzimas mutantes, en todos los casos resultó ser similar al incremento observado en la enzima silvestre (aproximadamente 2,8 veces). Los resultados de la purificación de las mutantes se muestran en la tabla 5 y figura 22.

Tabla 4.- Etapas de la purificación G6PDH silvestre

Etapa	Unidades Totales	Act. Especifica (U/mg)	mg totales	Rendimiento %
Extracto	3425	39	88	100
Hi-Q 1	3101	59	53	90
His-Trap 1	2630	69	38	76
His-Trap 2	2716	97	28	79
Hi-Q 2	2384	108	24	69

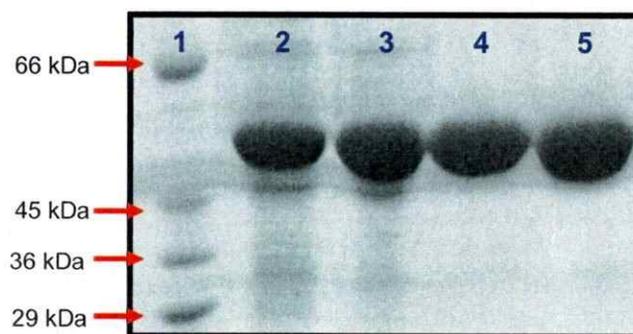


Figura 21.- SDS-PAGE con las muestras de las diferentes etapas de la purificación de la enzima silvestre de *E. coli*. Carril 1: patrón de peso molecular; carril 2: extracto crudo; carril 3: Hi-Q 1; carril 4: His-Trap; carril 5: Hi-Q 2.

Tabla 5.- Etapas de la purificación de G6PDH mutantes: R50E, R50A, R50Q y R50V

Etapa	Unidades Totales	Act. Especifica (U/mg)	mg totales	Rendimiento %
Extracto	541	15	35	100
Hi-Q 1	343	18	19	63
His-Trap 1	464	32	14	86
His-Trap 2	314	44	7,2	63
Hi-Q 2	415	53	7,8	77

Etapa	Unidades Totales	Act. Especifica (U/mg)	mg totales	Rendimiento %
Extracto	3575	55	65	100
Hi-Q 1	3328	73	46	93
His-Trap 1	543	70	20	15
His-Trap 2	294	50	17	8,2
Hi-Q 2	53	117	0,4	1,5

Etapa	Unidades Totales	Act. Especifica (U/mg)	mg totales	Rendimiento %
Extracto	1918	49	40	100
Hi-Q 1	1635	42	38	85
His-Trap 1	902	67	13	47
His-Trap 2	674	87	7,7	35
Hi-Q 2	429	118	4	22

Etapa	Unidades Totales	Act. Especifica (U/mg)	mg totales	Rendimiento %
Extracto	3099	70	44	100
Hi-Q 1	2334	59	39	75
His-Trap 1	1804	85	21	58
His-Trap 2	1091	101	10	35
Hi-Q 2	373	130	2,9	12

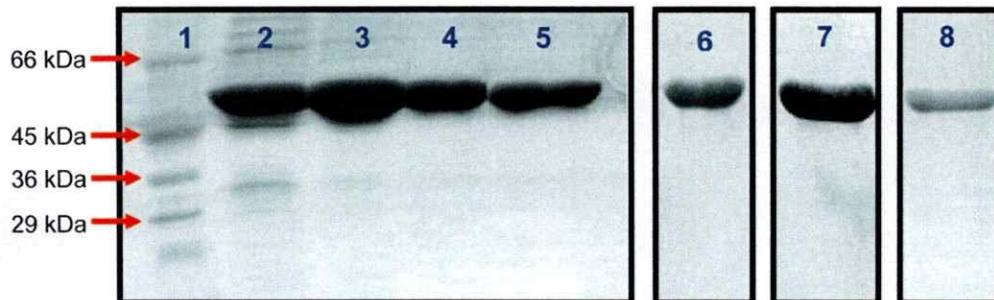


Figura 22.- SDS-PAGE con las muestras de las diferentes etapas de la purificación de las mutantes de G6PDH: En carril 1-5 se muestra las etapas de purificación de R50E. Carril 1: patrón de peso molecular; carril 2: extracto crudo; carril 3: Hi-Q 1; carril 4: His-Trap; carril 5: Hi-Q 2. En los carriles 6-8 se muestran las etapas finales (Hi-Q 2) de las mutantes R50A, R50Q y R50V

Análisis de la estructura cuaternaria por cromatografía de exclusión molecular

Las masas moleculares de las enzimas silvestre y mutantes en condiciones no desnaturalantes, fueron determinadas mediante una cromatografía de exclusión molecular (figura 23). Tanto para la enzima silvestre como mutantes, se observó un pico principal a los 7,8 minutos de elución y un pico menor, de mayor estado oligomérico a los 7 minutos de elución, correspondiente a un 12,5% del pico mayor (este mayor estado oligomérico, corresponde a una forma oxidada de la proteína, estudiada por otras tesis del laboratorio). Con la utilización de una curva de calibración que contiene diferentes proteínas patrón y según los picos de elución (ver HPLC, materiales y métodos), se determinó una masa molecular calculada para la enzima silvestre de 219000 Dalton, lo que equivale a aproximadamente 4 veces la masa del monómero observada por SDS-PAGE. Este resultado indica que la enzima es un tetrámero en solución y que las mutaciones no perturban el estado oligomérico.

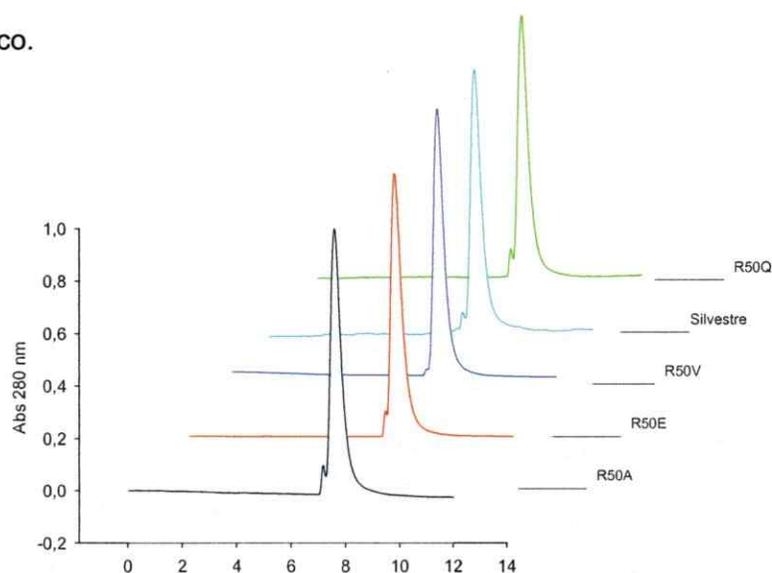


Figura 23.- Cromatografía de exclusión molecular (HPLC). Determinación de la masa molecular de las enzimas mutante y silvestre. En el gráfico se muestran los perfiles de elución obtenidos para cada una de las enzimas.

Caracterización cinética de G6PDH silvestre

Previo a los ensayos cinéticos, la enzima se dializó a 25 °C contra una solución de medición que contenía: amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 8.2, MgCl₂ 10 mM, β-mercapto etanol. Luego de la diálisis, se determinó la concentración de enzima por absorbancia a 280 nm utilizando como blanco la misma solución de diálisis. Se usó como coeficiente de extinción molar el valor 86.860 UA M⁻¹ cm¹, calculado por el programa bioinformático ProtParam (www.expasy.org) a partir de la composición aminoacídica de la G6PDH, asumiendo que todos los residuos de cisteínas están reducidos. La concentración mínima de enzima que se utilizó para los experimentos fue de 8 nM, excepto para los experimentos con enzima silvestre que se utilizó una concentración de 2 nM. La actividad de la enzima a estas concentraciones, se monitoreó periódicamente en un ensayo control con concentraciones de sustrato saturantes, durante el transcurso de todo el experimento para asegurar que ésta se mantuviera constante. Durante los ensayos, la enzima se mantuvo a una temperatura constante de 25 °C.

El objetivo fue obtener parámetros cinéticos en condiciones de velocidad inicial. Se observaron curvas de progreso del incremento de absorbancia a 340 nm, a diferentes concentraciones crecientes del cofactor, comprendidas entre 0 y 600 μM para las reacciones con NADP, y entre 0 y 32 mM para las reacciones con NAD. Cada conjunto de concentraciones se elaboró en presencia de concentraciones crecientes del co-sustrato G6P. Entre 0,12 y 2,1 mM para las reacciones con NADP y entre 0,8 y 12 mM para las reacciones con NAD.

La velocidad inicial de las curvas de progreso, se calculó para el intervalo de tiempo correspondiente al tramo lineal de cada curva. Esto llevó a que la mayoría de

las pendientes se registraran entre los 5 y 20 segundos (figura 24). En todos los casos, la reacción fue desencadenada por la adición de G6P, de otra forma, se observaba frecuentemente una fase lag de unas pocas milésimas de segundos.

Para asegurar condiciones de velocidad inicial, en el intervalo de tiempo observado, se aconseja no haber consumido más del 5 % de la cantidad inicial de sustrato (Segel, IH, 1975). Para las mediciones con NADP, concentraciones por debajo de 100 μM esto no fue un problema, sin embargo a una concentración de 16 μM , el porcentaje de consumo fue del 15% y a una concentración de 4 μM (la más baja usada) el consumo fue de aproximadamente 27% (figura 25).

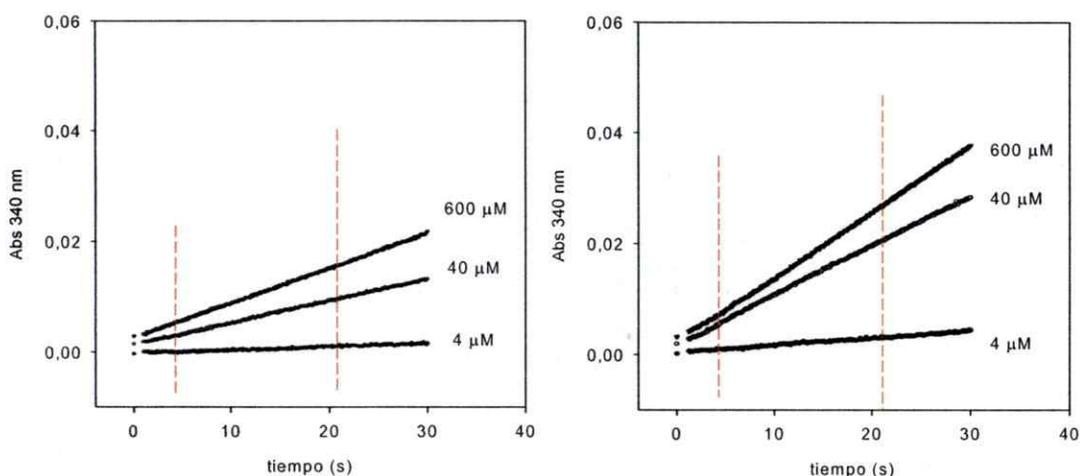


Figura 24.- Curvas de progreso medidas a diferentes concentraciones de NADP obtenidas a baja y alta concentración de co-sustrato G6P. En el gráfico de la izquierda, se muestran las curvas para NADP a 90 μM de G6P, mientras que en el gráfico de la derecha se muestran las curvas medidas a 300 μM de G6P. Las líneas rojas achuradas demarcan el intervalo de tiempo que se utilizó para evaluar las pendientes de las curvas y determinar las velocidades iniciales.

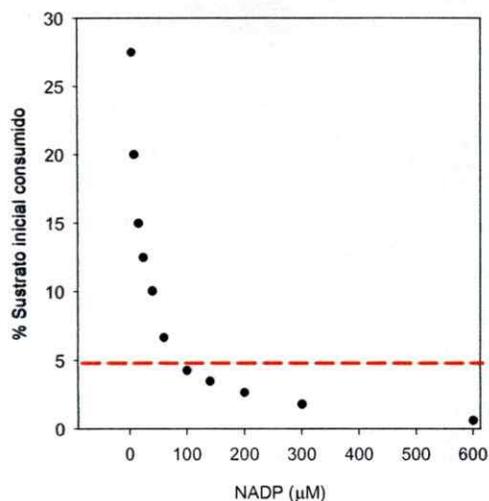


Figura 25.- Porcentajes de sustrato consumido. En el gráfico se muestra el porcentaje de sustrato consumido de NADP para un intervalo de 20 segundos de reacción para cada concentración puntual de este cofactor (4-2100 μM) en un experimento de velocidad inicial a concentración de G6P de 1800 μM ($>10 K_M$).

Con los datos obtenidos del conjunto de curvas de progreso, se graficaron curvas de saturación para NADP y NAD a distintas concentraciones de G6P. A cada curva, se le realizó un ajuste del modelo cinético de Michaelis-Menten (figura 26), así como también al modelo sigmoide, obteniéndose el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de Hill (n_H) de estos ajustes. Aunque los R^2 del modelo de Hill son siempre mejores, el índice de sigmoicidad de la curva nunca fue mayor que 1,4 o menor que 0,88 (tablas 6 y 7).

Se elaboraron gráficos secundarios con los valores de K_M y V_{MAX} obtenidos de los ajustes (figura 27). Se pudo observar un comportamiento decreciente de las K_M aparentes de NADP y NAD, a medida que la concentración G6P aumentaba tendiendo a alcanzar un valor máximo. El mismo comportamiento, pero creciente, se observó para las V_{max} aparentes de ambos cofactores.

Cada conjunto de datos fue ajustado a modelos hiperbólicos de aumento y decaimiento, según los comportamientos descritos. Los ajustes indicaron que las concentraciones de G6P muestrearon más del 90% de cambio total. Los valores de las asintotas, señalan que a concentración saturante de G6P, la K_M estimada es $8.0 \pm 1.05 \mu\text{M}$ para NADP y de $5233 \pm 497 \mu\text{M}$ para NAD, en tanto que la k_{cat} es de $177.4 \pm 5.7 \text{ s}^{-1}$ para NADP y $280 \pm 6.9 \text{ s}^{-1}$ para NAD.

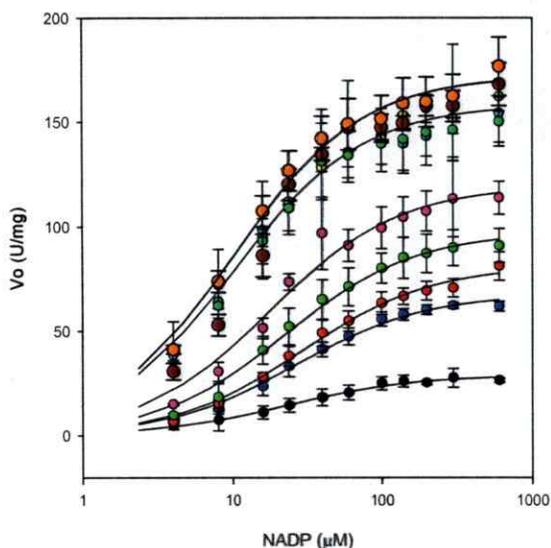


Tabla 6.- parámetros de los ajustes utilizados: M-M v Hill. reacción con NADP.

G6P (uM)	R ²	n _H
120	0,994	1,08
200	0,991	1,29
300	0,979	1,4
600	0,983	1,24
900	0,989	1,18
1200	0,994	1,16
2000	0,984	1,36
2100	0,992	1,17

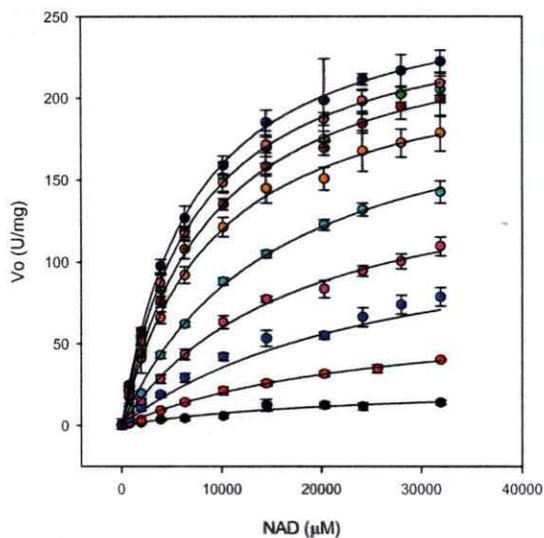


Tabla 7.- parámetros de los ajustes utilizados: M-M v Hill. reacción con NAD.

G6P (uM)	R ²	n _H
800	0,998	1,15
1000	0,992	0,88
1400	0,996	1,02
2000	0,998	1,13
4000	0,998	0,99
6000	0,998	1
8000	0,996	1,03
9000	0,999	1,02
12000	0,999	1

Figura 26.- Curvas de saturación para la enzima silvestre en función de la concentración de NADP y NAD medidas a diferentes concentraciones crecientes de co-sustrato (G6P). Las curvas para NADP a diferencia de las de NAD, se muestran en escala logarítmica con el propósito de obtener una mejor apreciación de las diferencias entre las curvas. A la derecha de cada gráfico, se presentan los parámetros de los ajustes utilizados (R², modelo M-M y n_H, coeficiente de Hill) para cada una de las curvas de saturación medidas a diferentes concentraciones de co-sustrato (G6P).

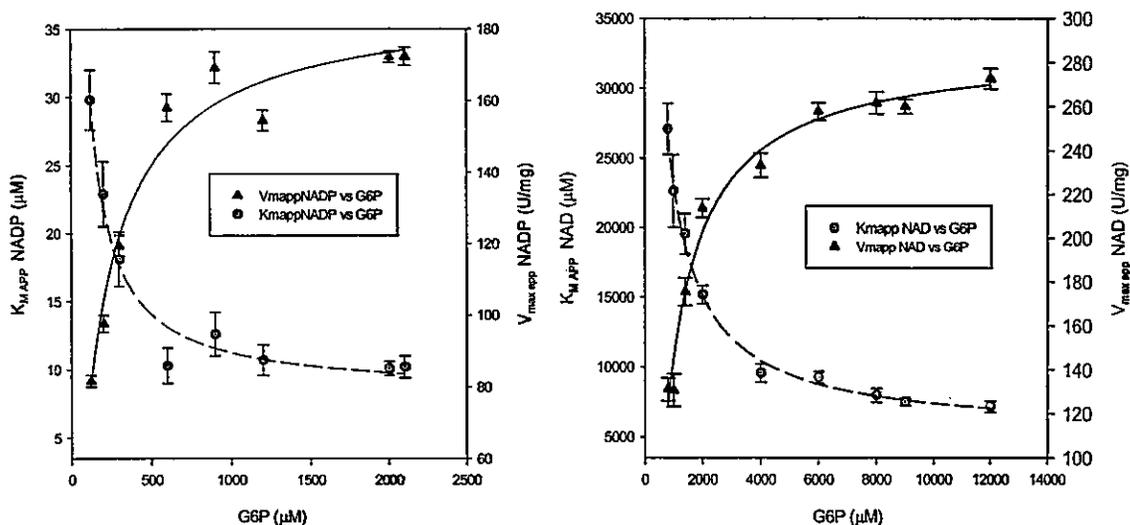


Figura 27.- Gráficos secundarios obtenidos de los valores aparentes de K_M y V_{MAX} . Cada punto del gráfico se determinó a partir de los parámetros cinéticos conseguidos a partir de los ajustes realizados a cada una de las curvas de saturación con ambos cofactores versus la concentración de G6P.

En relación a los parámetros cinéticos de G6P, éstos se obtuvieron usando el mismo conjunto de datos, graficando la dependencia de v_0 respecto de G6P a diferentes concentraciones de NAD(P). El resumen de los parámetros cinéticos se muestra más adelante en la tabla 12.

Obtenidas y reunidas las constantes cinéticas, se calculó la eficiencia catalítica de la enzima para cada cofactor. En la tabla 12, se muestra la k_{cat}/K_M determinada con NADP, la cual es 3 órdenes de magnitud mayor que la determinada para NAD. En relación con G6P, se determinó una k_{cat}/K_M con NADP 5 veces mayor que con NAD. Por último, el cociente entre eficiencias catalíticas de NADP sobre NAD, indica una preferencia por el cofactor NADP de 404 veces sobre el cofactor NAD.

Caracterización cinética de mutantes de arginina-50 de G6PDH de *E. coli*

Generadas y purificadas todas las enzimas mutantes, se procedió a evaluar el efecto de las mutaciones de arginina-50 sobre los parámetros cinéticos aparentes de G6PDH de *E. coli*, utilizando NADP o NAD como cofactores para la oxidación de G6P. Bajo el mismo procedimiento experimental y análisis de datos ya mencionado para la enzima silvestre, se obtuvieron las curvas de saturación para cada mutante con ambos cofactores (figura 28). En estas curvas, con la concentración de sustrato más alta alcanzada, se obtuvo más del 93 % de saturación (de acuerdo con el ajuste hiperbólico), en todas las mutantes. En tanto que para las curvas de NAD, se alcanzó más del 74 %, excepto para la sustitución por glutamina donde alcanzó un 69 %. Concentraciones mayores de NAD, producían fenómenos ópticos que introducían errores en las mediciones (ver discusión).

En cuanto al uso de G6P (figura 29), todas las reacciones que involucraron NADP se realizaron a concentraciones saturantes. Para las reacciones que involucraron NAD, debido a las altas K_M , las curvas de saturación obtenidas alcanzaron más del 64 %.

A todas las curvas cinéticas se le realizó un ajuste del modelo cinético de Michaelis-Menten. El coeficiente de determinación (R^2) de la mayoría de los ajustes se mantuvo superior a un valor de 0,998 (tablas, 8-11).

De los datos obtenidos a partir de los ajustes, en la reacción con NADP, todas las mutantes presentaron aumentos considerables en las K_M , alrededor de 2 a 3 órdenes de magnitud. En tanto que las k_{cat} , se asemejaron a la k_{cat} de la enzima silvestre.

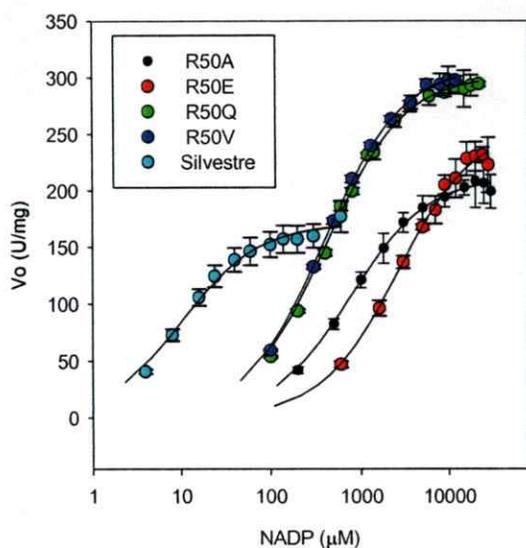


Tabla 8.- Variables de los ensayos cinéticos y parámetros de los ajustes de las mediciones de las mutantes realizadas con NADP

Mutante	% *	R ²	G6P (mM)
R50Q	97	0,998	15
R50V	96	1,000	15
R50A	94	0,998	12
R50E	93	0,996	30

* % obtenido con la concertación más alta

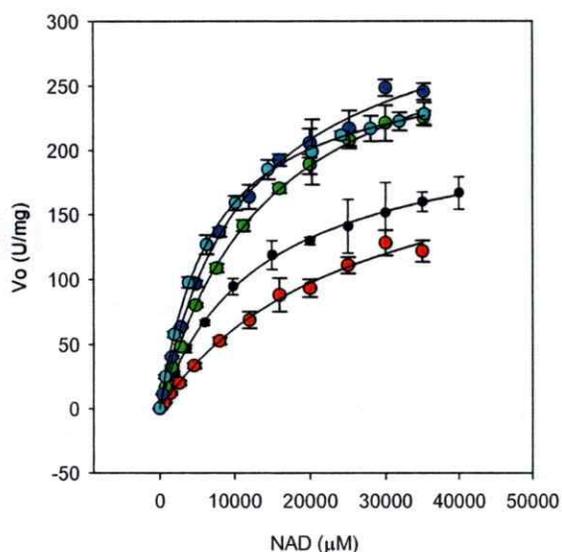


Tabla 9.- Variables de los ensayos cinéticos y parámetros de los ajustes de las mediciones de las mutantes realizadas con NAD

Mutante	% *	R ²	G6P (mM)
R50Q	69	0,999	30
R50V	74	0,998	30
R50A	75	0,999	30
R50E	75	0,994	30

* % obtenido con la concertación más alta

Figura 28.- Curvas de saturación para las enzimas mutante y silvestre en función de la concentración de NADP y NAD. Para el caso del NADP (gráfico de arriba), el eje de concentraciones se muestra en escala logarítmica. A la derecha de cada gráfico, se presentan las variables de los ensayos cinéticos y el R² del ajuste de M-M utilizado para cada una de las curvas de saturación. Para cada mutante señala la cantidad de co-sustrato (G6P) utilizado en las curvas de saturación.

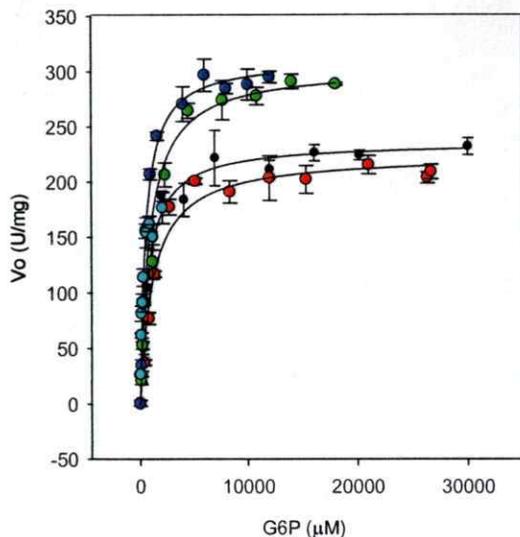


Tabla 10.- Variables de los ensayos cinéticos y parámetros de los ajustes de las mediciones de las mutantes realizadas con G6P (NADP)

Mutante	% [*]	R ²	NADP (mM)
R50Q	95	0,976	20
R50V	95	0,993	20
R50A	98	0,982	12
R50E	93	0,975	30

* % obtenido con la concertación más alta

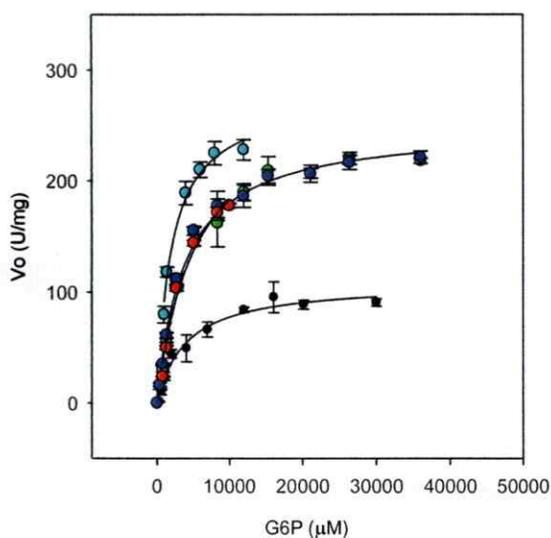


Tabla 11.- Variables de los ensayos cinéticos y parámetros de los ajustes de las mediciones de las mutantes realizadas con G6P (NAD)

Mutante	% [*]	R ²	NAD (mM)
R50Q	88	0,991	30
R50V	89	0,995	30
R50A	83	0,981	30
R50E	64	0,984	30

* % obtenido con la concertación más alta

Figura 29.- Curvas de saturación para las enzimas mutantes y silvestre en función de la concentración de G6P con NADP y NAD. A la derecha de cada gráfico, se presentan las variables de los ensayos cinéticos y el R² del ajuste de M-M utilizado para cada una de las curvas de saturación. Para cada mutante señala la cantidad de co-sustrato (NADP o NAD) utilizado en las curvas de saturación.

Todas las mutantes, debido al incremento en las K_M , presentaron una disminución significativa en sus eficiencias catalíticas, siendo las más afectadas, las sustituciones por alanina y glutámico, donde la disminución fue alrededor de 2 órdenes de magnitud en relación a la enzima silvestre.

En la reacción con NAD, de manera similar a lo sucedido con NADP, todas las mutantes presentaron aumentos en las K_M , pero la diferencia fue de menor magnitud en relación a la enzima silvestre. De acuerdo con esto, la sustitución por glutámico presentó la mayor variación, con un aumento de 5 veces, en tanto que las restantes sustituciones presentaron un aumento de 3 veces. En cuanto a las k_{cat} , las sustituciones por alanina y glutámico provocaron una disminución de 1,5 veces, mientras que las sustituciones por glutamina y valina no generaron cambios evidentes.

En relación con las eficiencias catalíticas se observa una disminución, pero con una variación de menor magnitud. Las sustituciones por alanina y glutámico fueron más afectadas con alrededor de 1 orden de magnitud de disminución en relación a la enzima silvestre.

Sobre los parámetros cinéticos de G6P se observa la misma tendencia. Tanto las K_M como las k_{cat} de todas las mutantes se ven aumentadas en relación a la enzima silvestre, con cambios que se encuentran siempre más afectados en las reacciones que involucran NADP. En todos los casos, estos cambios no alcanzan a ser mayores a un orden de magnitud.

Se aprecia que todas las sustituciones provocaron una disminución en la preferencia por NADP en relación con la enzima silvestre. La sustitución por glutamina disminuyó 11 veces su preferencia, la sustitución por valina 13 veces, la

sustitución por alanina 22 veces y por último, la sustitución por glutámico 33 veces (figura, 30). Las constantes cinéticas de las enzimas mutantes obtenidas con sus diferentes sustratos se muestran en la tabla 12.

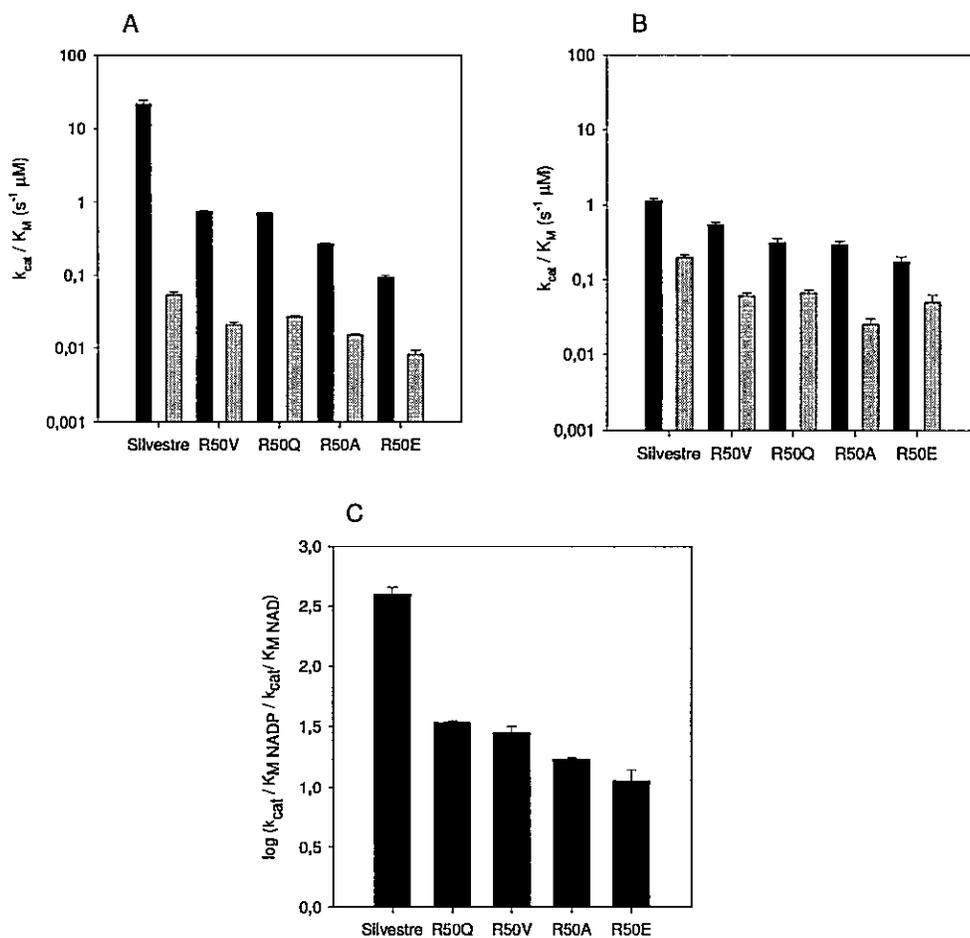


Figura 30.- Eficiencias catalíticas y preferencia por el cofactor de las enzimas mutante y silvestre de *E. coli*. En A y B, eficiencias catalíticas con NAD(P) y G6P (con ambos cofactores), respectivamente (NADP, barras negras y NAD, barras grises). Ambos gráficos de barras se muestran en escala logarítmica. En C, preferencia por el cofactor comprendida como el cociente obtenido entre la eficiencia catalítica con NADP sobre la eficiencia catalítica con NAD ($k_{cat}/K_M \text{ NADP} / k_{cat}/K_M \text{ NAD}$). Los valores del eje Y, se obtienen a partir del logaritmo del cociente.

Tabla 12.- Constantes cinéticas aparentes de las mutantes de Arginina-50 en G6PDH de *E. coli*.

<u>A. Reacción con NADP</u>							
Enzima	K_M G6P (μ M)	K_M NADP (μ M)	k_{cat} G6P (s^{-1})	k_{cat} NADP(s^{-1})	k_{cat}/K_M G6P ($s^{-1} \mu$ M $^{-1}$)	k_{cat}/K_M cofactor ($s^{-1} \mu$ M $^{-1}$)	
Silvestre	158 \pm 12	8,3 \pm 1,1	178 \pm 2	178 \pm 6	1,13 \pm 0,09	21,4 \pm 2,8	
R50Q	931 \pm 153	408 \pm 12	288 \pm 11	286 \pm 2	0,31 \pm 0,05	0,7 \pm 0,02	
R50V	546 \pm 48	394 \pm 8	295 \pm 5	293 \pm 1	0,54 \pm 0,05	0,74 \pm 0,02	
R50A	771 \pm 104	763 \pm 30	224 \pm 6	201 \pm 1	0,29 \pm 0,04	0,26 \pm 0,01	
R50E	1221 \pm 186	2609 \pm 168	213 \pm 6	243 \pm 4	0,17 \pm 0,03	0,092 \pm 0,001	
<u>B. Reacción con NAD</u>							
Enzima	K_M G6P (μ M)	K_M NAD (μ M)	k_{cat} G6P (s^{-1})	k_{cat} NAD (s^{-1})	k_{cat}/K_M G6P ($s^{-1} \mu$ M $^{-1}$)	k_{cat}/K_M cofactor ($s^{-1} \mu$ M $^{-1}$)	
Silvestre	1431 \pm 87	5224 \pm 497	287 \pm 4	280 \pm 7	0,20 \pm 0,01	0,053 \pm 0,005	
R50Q	3895 \pm 420	14967 \pm 558	237 \pm 7	311 \pm 5	0,06 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	
R50V	3547 \pm 287	11784 \pm 778	233 \pm 5	313 \pm 8	0,065 \pm 0,005	0,026 \pm 0,002	
R50A	4030 \pm 709	13570 \pm 460	103 \pm 5	209 \pm 3	0,025 \pm 0,005	0,0154 \pm 0,0005	
R50E	5316 \pm 1231	26028 \pm 3508	264 \pm 28	212 \pm 15	0,050 \pm 0,012	0,0081 \pm 0,63	

Nota. La obtención de los valores de las desviaciones estándar, se detallan en materiales y métodos

Análisis de la fluorescencia intrínseca de la G6PDH silvestre y mutantes

Con el propósito de evaluar el efecto de las mutaciones sobre la estructura terciaria de la enzima, se observó el espectro de fluorescencia intrínseca tanto de la enzima silvestre como de las mutantes. La intensidad de la señal de fluorescencia en el espectro de emisión fue alta, incluso a concentraciones bajas de proteína (alrededor de 0,09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), probablemente debido a las 12 triptófanos. Los resultados de los espectros indican que todas las proteínas a excepción de R50V, presentan el mismo λ_{max} de emisión a 333nm. R50V presenta cierta diferencia en la intensidad de emisión de fluorescencia, con una disminución respecto de la enzima silvestre de aproximadamente 13 % (figura 31).

Tanto para la enzima silvestre como mutantes, se observó una disminución en la intensidad de la fluorescencia en la región de los 333 nm del espectro de emisión a medida que se agregaba NADP (ver fluorescencia, materiales y métodos).

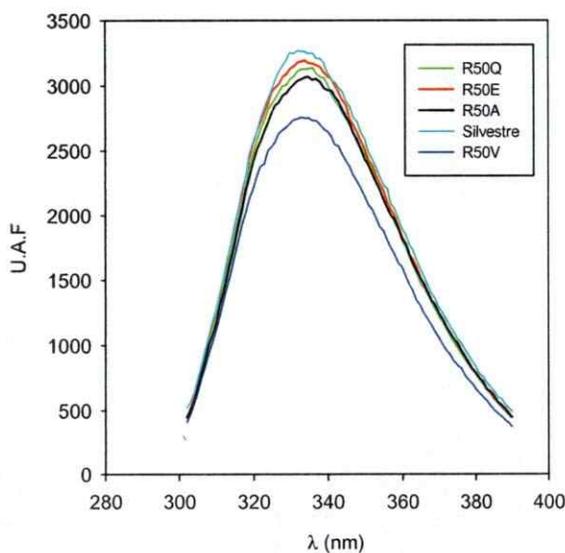


Figura 31.- Espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca de las enzimas mutante y silvestre de *E. coli*. Todas las proteínas se encuentran normalizadas por su concentración

Para la enzima silvestre, la titulación con NADP, resultó en una disminución de la fluorescencia intrínseca en relación a la enzima sin ligando, de aproximadamente un 10 %.

En la figura 32A, se grafica el efecto del NADP sobre la fluorescencia en términos de fracción de cambio, observándose un comportamiento hiperbólico (los datos fueron ajustados mediante la ecuación 9). Los resultados del ajuste permitieron obtener una constante de disociación (K_d) para esa enzima de 17,5 mM (figura 32B).

A diferencia de lo que sucede con NADP, cuando la enzima se titula con G6P como ligando, no se aprecian cambios evidentes en la fluorescencia. La disminución asociada es menos del 2 % (figura 32A).

En cuanto a las enzimas mutantes, todas exhiben comportamientos medianamente similares entre si en cuanto al apagamiento de la fluorescencia (figura 32C).

Para la sustitución por alanina un apagamiento del 10 % se logra con una concentración 4 veces mayor de NADP que lo requerido por la enzima silvestre para lograr tal efecto. Lo mismo sucede con las sustituciones por valina, glutámico y glutamina, en las cuales la concentración de NADP requerida para lograr un 10% del apagamiento se obtiene con concentraciones 5 y 8 veces mayores que lo requerido por la enzima silvestre. Esto involucra también, que las concentraciones a las cuales se alcanza la fluorescencia mínima, se encuentra por sobre 1 mM de NADP, afectando de esta manera la concentración de ligando a la cual se obtiene la mitad de la fluorescencia mínima, dando evidencias de cambios en la unión de la enzima con el NADP.

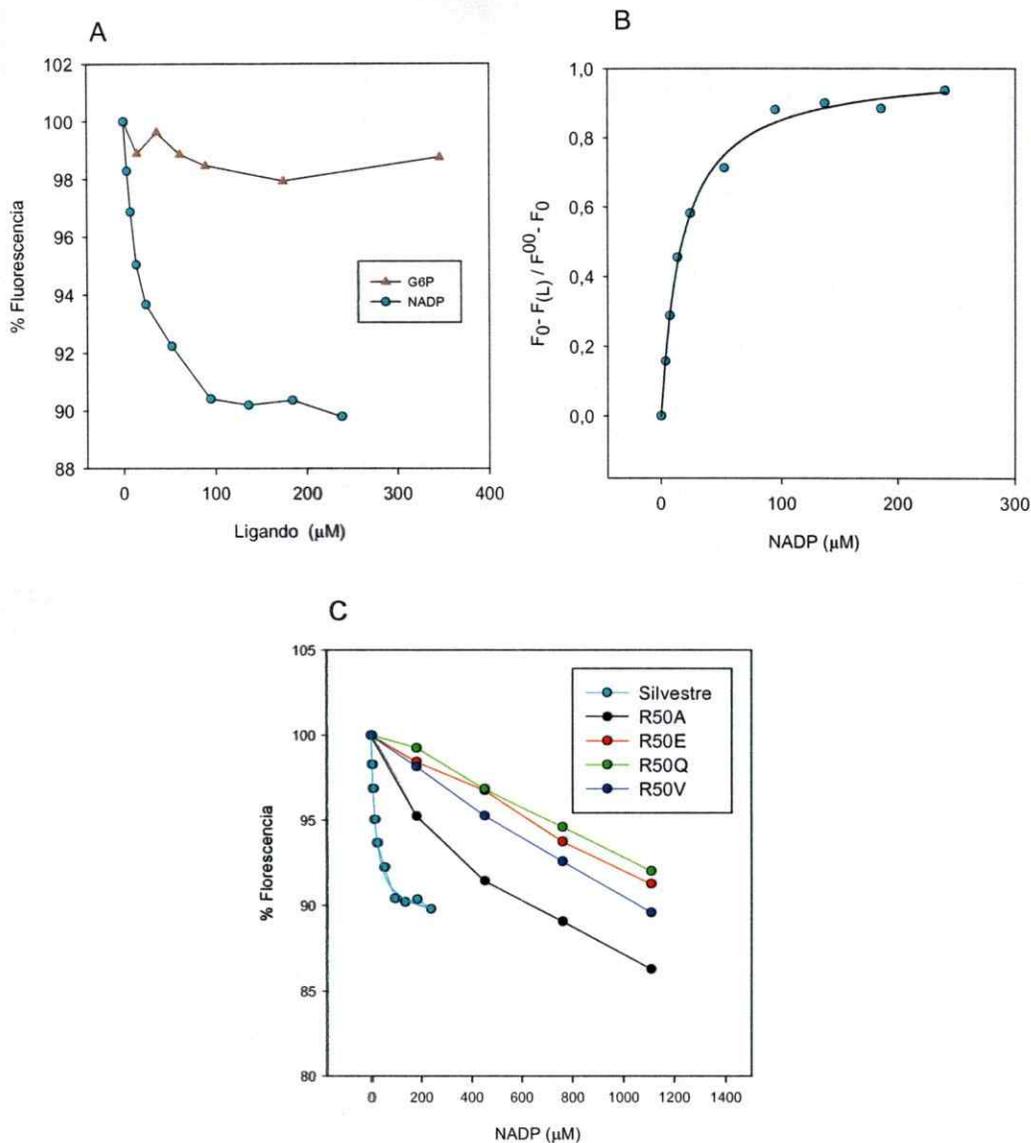


Figura 32.- Experimentos de fluorescencia de las enzimas mutantes y silvestre de *E. coli*. En A, se muestra el apagamiento intrínseco de la enzima silvestre cuando se titula con los ligandos NADP y G6P. La curva con NADP que se muestra resulta del ajuste de los datos experimentales a la ecuación (8). En B, apagamiento intrínseco de la enzima silvestre en términos de fracción de cambio a medida que aumenta la concentración del ligando NADP. La curva que se muestra resulta del ajuste de los datos experimentales a la ecuación 9. En C, apagamiento intrínseco de la enzima silvestre y mutantes cuando se titula con el ligando NADP. Las curvas que se muestran resultan del ajuste de los datos experimentales a la ecuación (8).

DISCUSIÓN

A nivel metodológico hay dos factores que pueden influir en la estimación de las constantes cinéticas de la enzima silvestre estudiada: 1) La mantención de las condiciones de velocidad inicial y 2) La sensibilidad del espectrofotómetro a altas concentraciones de NAD y NADP.

El primer factor tiene relación con evitar que la cantidad de NADP consumido no superase el 5% del sustrato inicial. Para esto, se requirió ocupar una concentración baja de enzima de 2 nM. A pesar de ello, por debajo de 60 μ M se superó este porcentaje, aunque nunca por encima del 27%. En estos casos, una potencial consecuencia es la subestimación de la velocidad inicial.

El hecho de que los coeficientes de Hill sean mayores (aunque nunca superiores a 1,4) en los ajustes para las curvas de NADP, es consistente con que las velocidades iniciales medidas a bajas concentraciones de este cofactor, pueden estar siendo subestimadas. Sin embargo, la mayoría de los R^2 (modelo M-M) son muy cercanos a 1 (tablas 7 y 8), indicando que la introducción de un nuevo parámetro con el ajuste sigmoïdal, no representa una mejora significativa. Para el resto de las condiciones y mutantes, esto no representó un problema, ya que el porcentaje consumido nunca superó el 5%.

El segundo factor, se relaciona con el hecho de utilizar concentraciones elevadas de NAD (en algunos casos por sobre 40 mM), para obtener la saturación. Esto involucraba la obtención de mediciones espectrofotométricas con valores de absorbancia superiores a 2.0 U.A. Por encima de este valor, se produce una respuesta no lineal del espectrofotómetro introduciendo errores en las mediciones que se presentan como consecuencia de los elevados niveles de absorbancia. Para evitar este

artefacto óptico, denominado "straylight" (Cavalieri & Sable, 1973), en varios casos con la enzima silvestre y mutantes, las curvas obtenidas estuvieron limitadas a concentración sub-saturantes de NAD (tabla 9).

De esta manera, se determinó para la enzima silvestre, una K_M de NAD 630 veces mayor a la obtenida con NADP. En el caso de la K_M de la enzima silvestre de *L. mesenteroides*, se observa que dicha diferencia es de sólo 20 veces. En relación a las k_{cat} de ambos cofactores, la enzima de *E. coli* presenta una diferencia tal, que para NAD, el valor es 1,6 veces mayor que con NADP. En tanto que para la enzima de *L. mesenteroides*, esta diferencia es de 2,2 veces.

En términos de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M), la enzima de *E. coli* obtuvo con NADP un valor de $2,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dicha constante es 404 veces mayor que la obtenida con NAD. Este valor corresponde al primer reporte sobre la magnitud de la preferencia en la G6PDH de *E. coli* por NADP, que además, se ha conseguido con enzima purificada a homogeneidad y a concentraciones saturantes de los co-sustratos.

Al analizar las eficiencias catalíticas de la enzima de *L. mesenteroides*, se observa que con NADP, ésta posee un valor de $6,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, siendo solo 9,3 veces superior a la eficiencia catalítica con NAD (Levy y col, 1996). La eficiencia catalítica con NADP, es aproximadamente 3 veces más grande que la de *E. coli*, en tanto que con NAD es 132 veces (figura 33).

A juzgar por la figura 33, se puede concluir que, la ausencia del grupo fosfato 2', impone un costo catalítico en ambos sitios activos, pero en *E. coli* ese costo es aun mayor.

¿Cuáles son entonces los factores que determinan las diferencias observadas en los parámetros cinéticos de ambas enzimas con NADP y NAD?

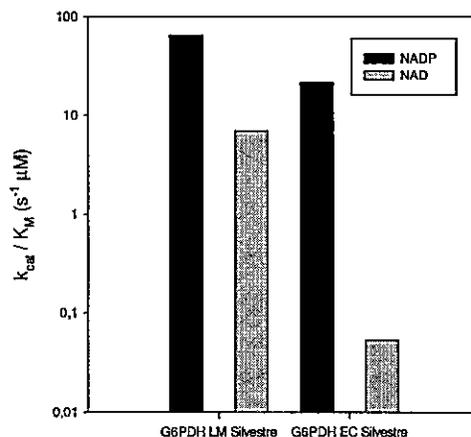


Figura 33.- Eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_M) de la G6PDH de *L. mesenteroides* y *E. coli* con NADP y NAD. En el gráfico, el eje de las ordenadas se muestra en escala logarítmica.

La respuesta a ésta implica, considerar y entender la estructura de los sitios activos y su relación con las estructuras de los sustratos en su estado fundamental y el estado de transición.

Según se menciona en la introducción, los análisis de las dinámicas moleculares para la G6PDH de *E. coli* y *L. mesenteroides*, dieron la evidencia de que los sitios activos presentan distinto número y tipo de interacciones. Estos hallazgos establecen una premisa importante para explicar parte de los cambios observados sobre los parámetros cinéticos de ambas enzimas.

Desde esta posición, nuestro problema en particular puede plantearse desde dos frentes: 1) Diferencias entre NADP y NAD, en cuanto al aporte que realiza la presencia del grupo fosfato 2' (figura 1A, ver introducción) a la unión y catálisis en ambas enzimas; y 2) Contribución de la presencia de la arginina conservada en el sitio activo de cada enzima sobre la interacción con ambos cofactores en términos de eficiencias catalíticas.

De acuerdo con la teoría del estado de transición, que analiza relaciones entre estructuras moleculares y energías libres en una coordenada de reacción, la velocidad de una reacción esta determinada por las diferencias en la energía libre de Gibbs entre el estado de transición y el estado fundamental (figura 34, líneas azules).

De acuerdo con Fersht (1977), las constantes cinéticas K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M en términos de la teoría del estado de transición, se relacionan mediante ecuaciones a las energías libres de Gibbs asociadas a las diferentes etapas de una reacción enzimática (figura 34, líneas negras). Así por ejemplo, la energía de activación ΔG_{ES}^\ddagger se relaciona

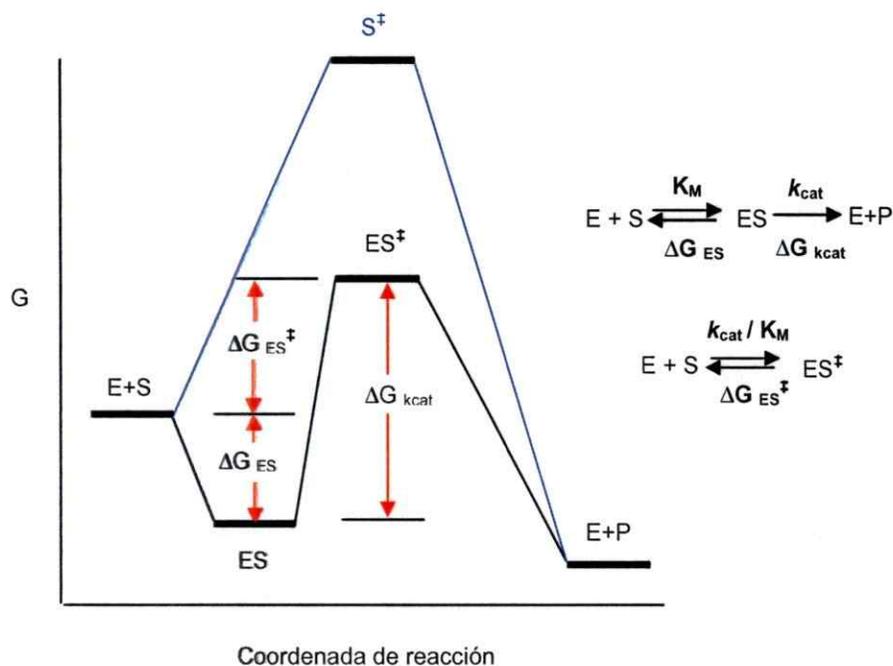


Figura 34.- Diagrama de los niveles de energía de una reacción catalizada por una enzima y la correspondiente reacción química no catalizada (líneas azules). Los símbolos E, S, S[‡], ES, ES[‡] y P representan a la enzima libre, el sustrato libre, el estado de transición libre, el complejo enzima-sustrato, el complejo de estado de transición enzima-sustrato y el producto de la reacción respectivamente. La energía de activación, ΔG_{ES}^\ddagger y sus componentes, ΔG_{ES} y ΔG_{kcat} , son las energías libres correspondientes a cada etapa de la reacción enzimática mostradas en las ecuaciones de la derecha del diagrama.

con k_{cat}/K_M y se compone de dos términos: uno energéticamente desfavorable denominado ΔG_{kcat} , inversamente proporcional a la k_{cat} y que corresponde a la energía de activación de las etapas químicas de rompimiento y formación de enlaces; y el otro compensatorio, energéticamente favorable, que resulta de la energía de unión del complejo ES, denominado ΔG_{ES} y que es inversamente proporcional a la K_M (Fersht, 1977, capítulo 10, p244). De esta manera se construye la igualdad:

$$\Delta G_{\text{ES}}^{\ddagger} = \Delta G_{\text{kcat}} + \Delta G_{\text{ES}} \quad (11)$$

En la cual ΔG_{ES} es algebraicamente negativo. Esto se muestra en la figura 34, para condiciones de equilibrio rápido, donde K_M es igual a la constante de disociación del complejo enzima sustrato, K_S .

La máxima energía de unión entre una enzima y un sustrato ocurre cuando los grupos de unión de ambos se unen. En este caso se dice que la enzima es complementaria en estructura al sustrato. Debido a que la estructura del sustrato cambia a través de la reacción, transformándose primero en el estado de transición y luego en productos, la estructura inicial de la enzima (previa a la reacción) puede ser complementaria a sólo una forma del sustrato. Si es complementaria al estado de transición del sustrato, el incremento en la energía de unión a medida que el sustrato cambia hacia el estado de transición, baja la energía de activación de k_{cat} . Si por el contrario, la enzima es complementaria a la estructura inicial del sustrato, la disminución de la energía de unión en la formación del estado de transición va a incrementar la energía de activación, disminuyendo k_{cat} . De esta manera, cualquier cambio sobre los grupos de unión tanto de la enzima como el sustrato (como por ejemplo, la ausencia del grupo fosfato 2' ó de la arginina conservada), puede alterar la

complementariedad con alguno de los dos estados, obteniendo como consecuencia variaciones en las energías de unión. Según esto último, se presentan tres casos que ejemplifican tales variaciones:

1) Cambio uniforme sobre la energía de unión. En este caso, la modificación en algún grupo de unión del sustrato y/o enzima provoca que el total de la energía de unión asociada a ese cambio (ya sea favorable o desfavorable) se consuma de la misma manera en el complejo enzima-sustrato (ES) como en el estado de transición (ES^\ddagger), a fin de que la energía libre de Gibbs de ambos cambien de igual manera. En otras palabras, la complementariedad entre el complejo enzima-sustrato y enzima-estado de transición sigue siendo la misma. Esto, según la figura 34, implica que los cambios generados produzcan variaciones a nivel de K_M y k_{cat}/K_M , mientras que k_{cat} se mantiene constante. Durante un cambio uniforme, la desestabilización de cualquier complejo es proporcional al cambio en K_M , por lo que la razón entre las K_M para estos casos es un parámetro sencillo para determinar la potencia de discriminación de una enzima entre dos sustratos. Un valor cercano a 1, indica incapacidad de discriminación, mientras que un valor lejano a 1, indica una fuerte capacidad para discriminar entre un sustrato y otro.

2) Cambio diferencial sobre la energía de unión. En estos casos, el total de la energía de unión asociada al cambio, se consume solo en un tipo de complejo (ES ó ES^\ddagger), provocando que su energía aumente o disminuya (dependiendo de si el cambio es favorable o desfavorable), mientras que el otro se mantiene constante. Con esto, si la energía de unión se consume en el complejo ES, los cambios se van a observar solo a nivel de K_M y k_{cat} , en tanto que si se consume en el complejo ES^\ddagger , los cambios se van a observar a nivel de k_{cat}/K_M y k_{cat} .

3) Cambio súper diferencial. En este caso, el total de la energía de unión asociada al cambio, se consume en ambos complejos, pero de manera diferencial. Esto implica que los cambios generados produzcan variaciones a nivel de K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M .

Según esto, al analizar los parámetros cinéticos, tanto de la GP6DH de *L. mesenteroides* como de *E. coli* con ambos cofactores, se puede llegar a una primera conclusión, y es que los cambios en la energía de unión sobre los complejos ES y ES[‡] provocados por la ausencia del grupo fosfato en el NAD (al compararlos con NADP), no corresponden al tipo diferencial, debido a que tanto la K_M como la k_{cat}/K_M aumentan. De este modo, los análisis se simplifican, ya que la manera de distinguir entre los dos tipos de cambio restantes: uniforme y súper diferencial, se basaría según el comportamiento de las k_{cat} .

Bajo esta misma lógica, se puede analizar la contribución del residuo de arginina (y sus componentes principales, tales como grupo guanidinio, cadena lateral, polaridad y carga) en ambas enzimas sobre los cambios en la energía de unión de los complejos ES y ES[‡] provocados por la ausencia del grupo fosfato del NAD. La clasificación se realiza de acuerdo con la razón entre las k_{cat} de ambos cofactores ($k_{cat} \text{ NAD} / k_{cat} \text{ NADP}$). Un valor cercano a 1 sugiere un tipo cambio uniforme, en tanto que un valor lejano a 1, advierte un tipo de cambio súper diferencial. En la tabla 13, se muestran las razones de las k_{cat} , obtenidas a partir de las constantes cinéticas de la tabla 12 (sección resultados).

Para las reacciones con NAD en ambas enzimas silvestres, la ausencia del grupo fosfato de este cofactor provoca cambios del tipo súper diferencial, indicando que se desestabilizan los complejos ES en mayor medida que a los estados de transi-

Tabla 13.- Razón de k_{cat} y K_M para las reacciones de NAD y NADP de las diferentes enzimas silvestres y mutantes

Enzima	$k_{cat}(\text{NAD}) / k_{cat}(\text{NADP})$		$K_M(\text{NAD}) / K_M(\text{NADP})$	
	<i>L. mesenteroides</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>E. coli</i>
Silvestre	2,2	1,6	20	650
R(X)Q	0,9	1,1	0,27	37
R(X)V	ND	1,1	ND	30
R(X)A	0,9	1,0	0,19	18
R(X)E	1	0,9	0,0047	10

Nota: (X), indica la arginina 46 y 50 las enzimas de *L. mesenteroides* y *E. coli*, respectivamente. ND, no hay datos disponibles.

ción respectivos. Según los parámetros cinéticos aportados por Levy y col (1996), y tal como se logra apreciar en la figura 35, la desestabilización del complejo ES en la enzima de *L. mesenteroides* es notoriamente menor que la desestabilización hallada en la enzima de *E. coli*. En tanto que para los estados de transición, si bien se encuentran similarmente estabilizados con NADP, el complejo de transición con NAD en la G6PDH de *L. mesenteroides*, se desestabiliza considerablemente menos que en *E. coli*. El hecho de que tal desestabilización sea menor, implica que la k_{cat}/K_M sea superior en la enzima de *L. mesenteroides*. Esto es congruente con los análisis bioinformáticos, los cuales dan evidencia de una mayor cantidad de residuos en el sitio activo de esta última enzima, que estarían estableciendo un mayor número de puentes de hidrogeno con la región adenosina del NAD. Probablemente estas interacciones ayudarían a impedir un mayor grado de desestabilización de los complejos ES y ES[‡], que los visto con la enzima de *E. coli*.

Por otra parte, el hecho de que estas desestabilizaciones, afecten más al complejo ES que al de transición, tiene una implicancia directa sobre los $\Delta G_{k_{cat}}$, haciéndolos mas pequeños. Esto explicaría porqué en ambas enzimas el cofactor que presenta menor eficiencia, NAD, tiene una k_{cat} mayor, lo que a priori es inesperado.

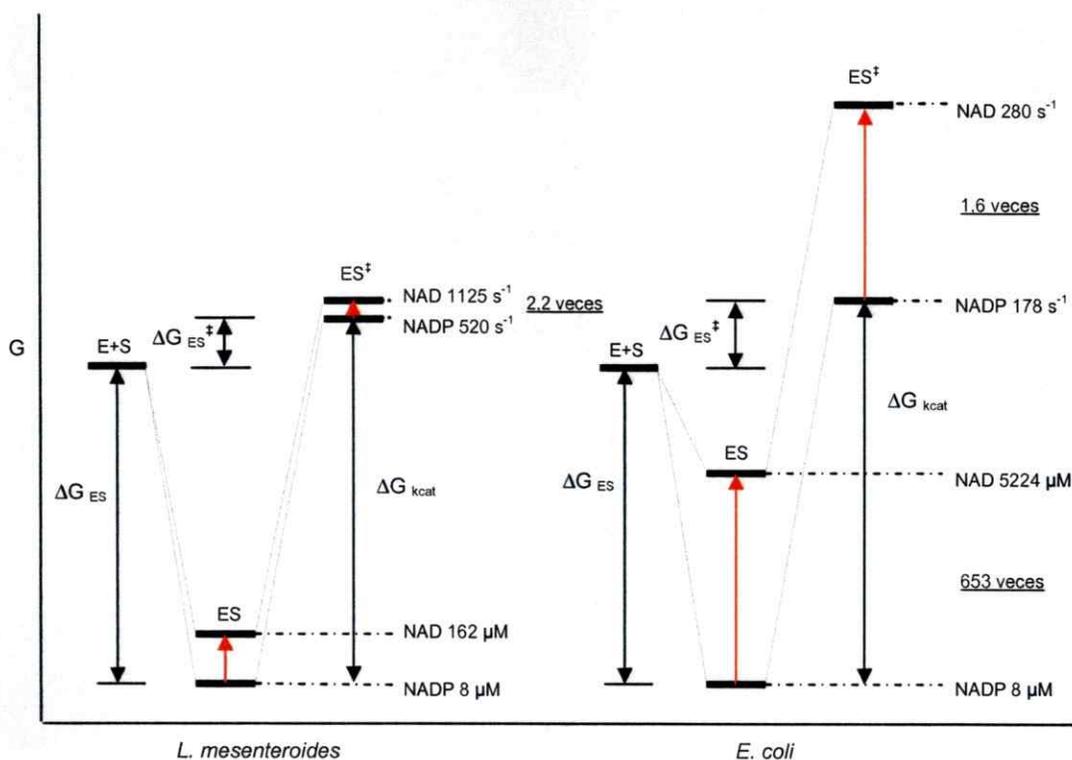


Figura 35.- Niveles de energía, según figura 34, de una reacción catalizada por la G6PDH silvestre de *L. mesenteroides* y *E. coli*, respectivamente. Las flechas rojas hacia arriba, indican el diferencial energético o desestabilización que sufren los diferentes complejos (ES y ES[‡]) cuando las enzimas trabajan con NAD. Los números subrayados, indican el número de veces de los valores de K_M o k_{cat} de NAD sobre los de NADP. Los valores de las constantes cinéticas no se muestran a escala con los niveles energéticos.

Tal como lo demuestra Fersht (Fersht, 1977, capítulos 9 y 10), el término k_{cat}/K_M puede ser usado para calcular la energía de unión de un sustrato en el estado de transición, mediante la ecuación 11:

$$RT \ln (k_{cat}/K_M) = RT \ln (kT/h) - \Delta G_{kcat} - \Delta G_{KM} \quad (12)$$

(En donde, R a la constante de los gases en kcal mol⁻¹ K⁻¹, T la temperatura absoluta en ° K, k es la constante de Boltzmann y h es la constante de Planck). Esta ecuación

puede ser usada para calcular las energías de unión de dos sustratos que difieren por un grupo ϵ , y que poseen la habilidad de reaccionar con una misma enzima. La energía de unión entonces, contribuida por aquel grupo, puede ser calculada mediante la ecuación:

$$\Delta G_{\epsilon} = RT \ln [(k_{cat}/K_M)_1 / (k_{cat}/K_M)_2] \quad (13)$$

(En donde 1 y 2 se refieren al sustrato que carece y contiene al grupo ϵ , respectivamente). Siempre y cuando se cumplan tres condiciones básicas: primero, el grupo ϵ se encuentre involucrado en la unión y no en la catálisis; segundo, la enzima debe exhibir un comportamiento cinético Michaeliano y tercero, la energía de activación para los pasos de formación y ruptura de enlaces no debe verse afectada en mayor medida.

Kurlandsky y col (1988), aplicaron esta ecuación a la interacción de los cofactores NADP y NAD con la G6PDH de *L. mesenteroides*. Así, revelaron que la energía de unión aportada por el grupo fosfato del NADP contribuye con 1,38 kcal/mol a la estabilización del estado de transición, mientras que en la G6PDH de *E. coli* a (partir de los datos de la tabla 12), este grupo contribuye con 3,5 kcal/mol a la estabilización del estado de transición. El hecho de que la presencia del mismo grupo fosfato aporte de manera desigual, es otra evidencia más de las diferencias en la arquitectura del sitio activo de ambas enzimas (en la enzima de *E. coli*, a diferencia de la enzima de *L. mesenteroides*, la presencia de una lisina (Lisina-18), aporta con una segunda carga positiva al sitio activo), y que podría explicar parte del comportamiento del entorno químico del sitio activo de las G6PDH. En el caso de las enzimas de *L. mesenteroides* y *E. coli*, la magnitud de esa desigualdad ($\Delta G_{\epsilon E. coli} - \Delta G_{\epsilon L. mesenteroides}$) es

de 2,1 kcal/mol. Este valor, refleja la importancia del grupo fosfato en la estabilización del complejo ES[‡]-NADP en la enzima de *E. coli*, en tanto que en *L. mesenteroides*, la contribución de este grupo es menos significativa para dicha estabilización. Probablemente, las interacciones de la enzima *L. mesenteroides* con otras regiones del NAD (por ejemplo, región difosfato y nicotinamida) permiten que la ausencia del grupo fosfato no sea determinante en la desestabilización del complejo de transición, a diferencia de lo observado con la enzima de *E. coli*. Por otra parte, estas interacciones sumadas a las otras predichas por dinámica molecular, probablemente, ayudarían a estabilizar el complejo ES-NAD, provocando una disminución en la K_M de este cofactor con un concomitante aumento de la k_{cat} . Según Wilkinson y col (1983), la energía de unión intrínseca contribuida por un grupo determinado, puede ser utilizada tanto para incrementar k_{cat} , así como para reducir K_M .

Queda por aclarar el aporte del sitio activo de estas enzimas a las diferencias de las constantes cinéticas para NAD y NADP.

Levy y col (1996), afirman que la arginina-46 juega un rol crítico en la unión con NADP, pero no con NAD; el hecho de remover este residuo (mediante la sustitución por alanina), generó una desestabilización en los complejos ES de ambos cofactores que afectaron considerablemente más al NADP (ver niveles de energía de la figura 35). El efecto es tal, que la ausencia del grupo fosfato provoca que el complejo ES-NAD, se encuentre más estabilizado que el complejo ES-NADP.

De acuerdo con la tabla 13, las razones entre las k_{cat} , indican que en todas las sustituciones, la ausencia del grupo fosfato ahora, genera cambios del tipo uniforme en la energía de unión. Esto sugiere que la presencia de la arginina (tanto como sus componentes: tamaño de la cadena lateral, grupo guanidinio, polaridad, etc.) favorece

la complementariedad de los complejo ES y ES[‡] con ambos cofactores, con un efecto mayoritario sobre el NADP.

Al analizar y comparar la contribución del homólogo arginina-50 en la enzima de *E. coli*, se aprecian principalmente los mismos efectos, excepto porque a) Los cambios en la K_M de las mutantes respecto de la enzima silvestre, son de menor magnitud que los de la enzima de *L. mesenteroides*, lo cual sugiere, que los complejos ES se desestabilizan en una menor proporción; b) Las sustituciones en la G6PDH de *E. coli*, siempre mantienen la estabilidad del complejo ES-NAD menos que la del complejo ES-NADP y c) de acuerdo con la tabla 13, los cambios del tipo uniformes, indican que las diferentes sustituciones, afectan la capacidad de discriminación entre ambos cofactores, pero ninguna es capaz de revertirla.

Los análisis de las constantes cinéticas vistas en términos termodinámicos aportados por los diferentes componentes del residuo de arginina, indican que la sustitución por glutamina, cuya principal diferencia con este residuo radica en la ausencia de una parte importante del grupo guanidinio, afecta considerablemente la preferencia por NADP. Del total de las interacciones por puentes de hidrógeno vistas por dinámica molecular, la mayoría son realizadas por este grupo, por lo que su ausencia puede afectar drásticamente dichas interacciones. A pesar de esto, el grupo amida aun puede ser capaz de generar puentes de hidrógeno con el grupo fosfato, aunque la distancia entre estos dos sea mayor, por el tamaño de la cadena lateral. El grupo guanidinio es capaz de generar interacciones con el anillo de la adenina protegiéndolo del solvente (Levy y col 1996). La remoción de este grupo por lo tanto, afecta la interacción con NAD, aunque en un menor grado que para NADP.

Al analizar la sustitución por valina, se observan efectos prácticamente idénticos con el residuo de glutamina recién descrito. Si se considera que la única diferencia

entre estos dos, es el grupo polar amida que posee la glutamina, se podría concluir que tal grupo no establece ninguna contribución a la energía de unión. Interesantemente, al analizar la sustitución por glutámico, cuya única diferencia con glutamina es la presencia de un grupo carboxilato en vez de una amida, se observan diferencias con valina. Este hecho sugiere que probablemente el grupo amida, si establece una contribución, pero que en el caso de la sustitución por valina, el metilo extra compensaría la ausencia de dicha contribución mediante nuevas interacciones realizadas por la cadena alifática.

Visto desde el punto de vista termodinámico, la contribución que realiza la cadena lateral de la arginina-50 a la unión del NADP en el estado de transición puede ser estimada por la ecuación 13, en donde ϵ ahora pasa a representar a la cadena lateral de la arginina-50 de la enzima silvestre, en tanto que 1 y 2, se refieren a la enzima mutante alanina y silvestre, respectivamente. Esta ecuación será solo válida para enzimas bi-sustratos que obedezcan cinéticas de M-M, siempre y cuando la cadena mutada sea más corta que la que se encuentra en la enzima silvestre, que la mutación afecte la unión de sólo uno de los dos sustratos y que por su puesto ϵ , solo se encuentre implicado en la unión y no en la catálisis (Wilkinson y col, 1983). De esta manera, Levy y col (1996, 2000) calcularon la contribución de la cadena lateral de la arginina-46 a la unión con NADP en el estado de transición. Obviando los pequeños cambios que obtuvieron con las mutantes sobre las k_{cat}/K_M de NAD y G6P, y asumiendo que la cadena lateral reemplazante, alanina-46, no interactúa con NADP, evaluaron que la cadena lateral de la arginina-46 contribuye con aproximadamente 3,1 y 0,9 kcal/mol a la unión del NADP y NAD, respectivamente.

Si se aplica esta ecuación a la G6PDH de *E. coli*, bajo los mismos criterios (a partir de los datos de la tabla 12, sección resultados), encontramos que la arginina-50

contribuye con 2,6 y 0,7 kcal/mol a la unión del NADP y NAD, respectivamente. El hecho de que la contribución aportada por la arginina en *E. coli* sea menor, probablemente se debe al residuo lisina-18. Si bien las lisinas tienen una menor tendencia que las argininas a unir fosfatos (Copley & Barton 1994), como se mencionó en la introducción las dinámicas moleculares demostraron que ésta lisina es capaz de presentar un alto número de interacciones entre la cadena lateral del aminoácido y el fosfato del NADP. De esta manera, aparece razonable suponer que tanto la lisina-18 como la arginina-50 se encuentren implicados en estabilizar la carga del fosfato del NADP.

En conclusión, la arginina-50 parece tener un rol menos importante que su homólogo en *L. mesenteroides* en cuanto a la unión con NADP. Si bien esta arginina es determinante para la eficiencia catalítica de la enzima con NADP más que con NAD, no es clave para la discriminación molecular. Esta habilidad sería llevada a cabo no únicamente por la arginina, sino que por el aporte de otros residuos adicionales del sitio activo, tales como lisina-18. Estos cálculos son coherentes con las evidencias cinéticas halladas para las mutantes (tabla 12, figura 36).

Los resultados de los experimentos de fluorescencia demostraron que todas las mutantes presentaron cambios importantes en la unión con el ligando NADP. Esto sugiere que el residuo de arginina-50, estaría afectando drásticamente la constante de disociación de la enzima y NADP.

Por último, el reemplazo de la arginina-50 por los diferentes aminoácidos propuestos en esta tesis, produjo además otros cambios en los parámetros cinéticos importantes de mencionar: se observaron incrementos en relación a la enzima silvestre en los valores de las K_M para las reacciones de G6P con ambos cofactores (tabla 12, resultados). Estos resultados siguen siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio.

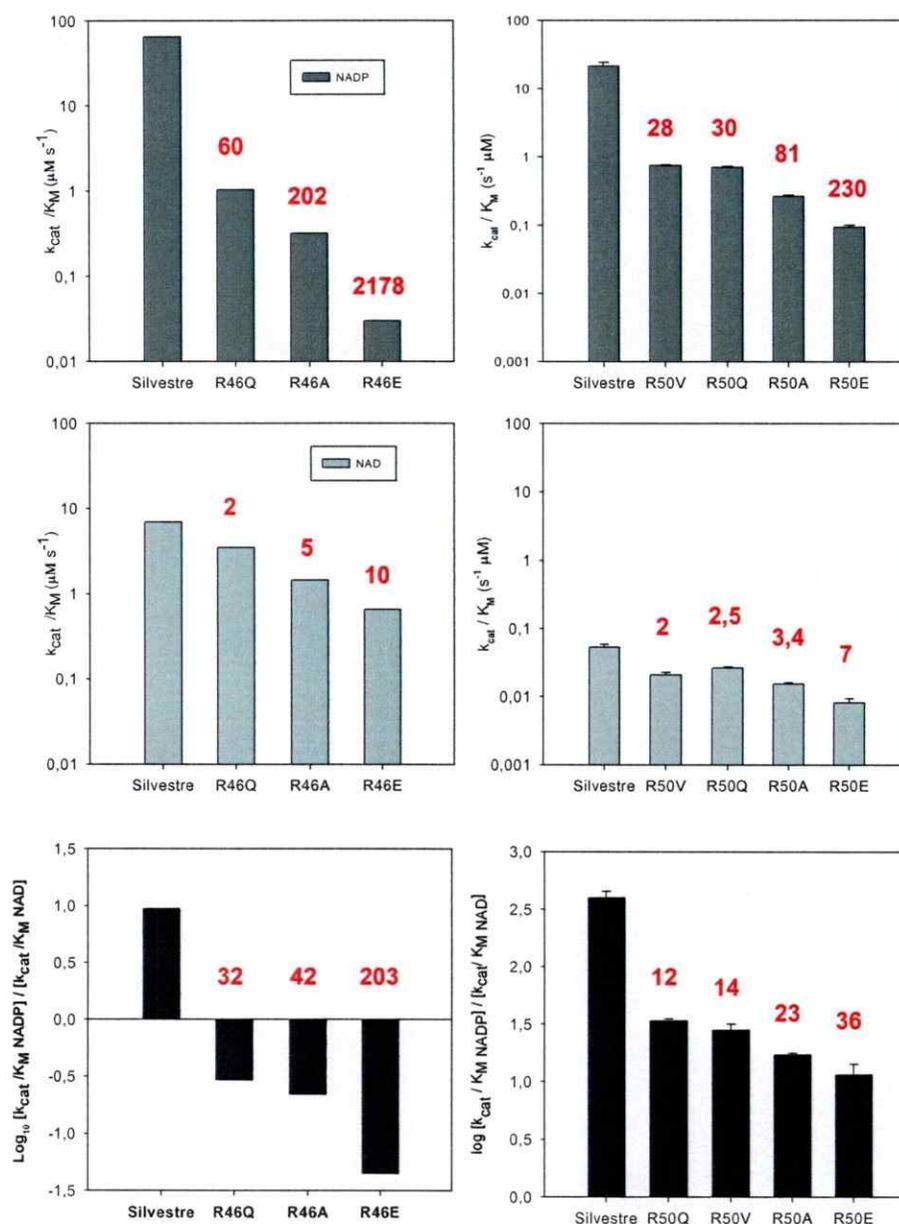


Figura 36.- Eficiencias catalíticas y preferencias por el cofactor de las enzimas mutante y silvestre de *L. mesenteroides* y *E. coli*. A la izquierda, los parámetros cinéticos calculados por Levy y col en el año 1996. A la derecha, los parámetros cinéticos calculadas en este seminario de título. En rojo se destacan las veces de cambio en relación a la enzima silvestre.

CONCLUSIONES

- Se logró obtener por primera vez parámetros cinéticos k_{cat} , K_M , k_{cat}/K_M de la G6PDH de *E. coli* purificada a homogeneidad y a concentraciones saturantes de los co-sustratos. Estos datos permitieron registrar la magnitud de la preferencia por NADP.
- Para la reacción con NAD, la ausencia del grupo fosfato 2' en este cofactor genera cambios que desestabilizan al complejo ES en mayor medida que al estado de transición (ES^\ddagger). Esto implica que el grupo fosfato contribuye principalmente a la complementariedad del complejo ES.
- La ausencia del grupo fosfato 2' en NAD, provoca que las desestabilizaciones de los complejos ES como de ES^\ddagger sean notoriamente mayores que las halladas en la enzima de *L. mesenteroides*. Esto sugiere que en la G6PDH de *E. coli*, el aporte del grupo fosfato 2' del NADP es principalmente importante para estabilizar ambos complejos.
- El residuo conservado arginina-50, cumple un rol importante en la estabilización de los complejos ES y ES^\ddagger con NADP más que con NAD. A pesar de la importancia de este residuo, éste no es determinante para la preferencia por el cofactor.
- La acentuada preferencia de la G6PDH de *E. coli* por NADP, no estaría determinada únicamente por la arginina-50, sino que por el aporte de residuos adicionales del sitio activo (lisina-18).
- De acuerdo con los experimentos de fluorescencia, éstos sugieren que el residuo de arginina-50, estaría afectando drásticamente la constante de disociación de la enzima con NADP.

REFERENCIAS

Banerjee, S. and Fraenkel, D. G. (1972). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Escherichia coli* and from a "High-Level" Mutant. *J. Bacteriol.* 110(1): 155-160.

Bergmeyer, H. U. (1974). Methods of enzymatic analysis. Vol. 1, Academic Press. pp. 545-546. Verlag Chemie;Academic Press, Weinheim New York.

Cavaleri, R. L., Sable, H. Z. and With the technical assistance of Judith, D. (1973). Enzymes of Pentose Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 248(8): 2815-2817.

Copley, R. R. and Barton, G. J. (1994). A Structural Analysis of Phosphate and Sulphate Binding Sites in Proteins : Estimation of Propensities for Binding and Conservation of Phosphate Binding Sites. *Journal of Molecular Biology* 242(4): 321-329.

Cornish-Bowden, A. (1979). Fundamentals of enzyme kinetics. p. 240. Butterworths, London; Boston.

Fersht, A. (1977). Enzyme structure and mechanism. Capítulos 2, 3, 10 y 11. San Francisco, W. H. Freeman.

Fuentealba, M. y Cabrera, R. (2011). Análisis de las interacciones de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa bacterianas con NADP y NAD mediante dinámica molecular. XXXIII Reunión anual de sociedad de bioquímica y biología molecular de Chile. Chillan, Chile.

Fuhrer, T. and Sauer, U. (2009). Different Biochemical Mechanisms Ensure Network-Wide Balancing of Reducing Equivalents in Microbial Metabolism. *J. Bacteriol.* 191(7): 2112-2121.

Gauthier, T. D., Shane, E. C., Guerin, W. F., Seitz, W. R. and Grant, C. L. (1986). Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science & Technology* 20(11): 1162-1166.

Giro, M., Carrillo, N. and Krapp, A. R. (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin-NADP(H) reductase contribute to damage repair during the soxRS response of *Escherichia coli*. *Microbiology* 152(4): 1119-1128.

Glaser, L. and Brown, D. H. (1955). PURIFICATION AND PROPERTIES OF d-GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE. *Journal of Biological Chemistry* 216(1): 67-79.

Haghighi, B. and M. Akmal (2003). "Interaction of NAD and NADP with native and pyridoxal phosphate-modified glucose 6-phosphate dehydrogenase purified from *Streptomyces aureofaciens*." Iranian Journal of Science & Technology 28(A1): 150-160.

Haghighi, B. and Levy, H. R. (1982). Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Conformational transitions induced by NAD, NADP and glucose 6-phosphate monitored by fluorescent probes. *Biochemistry* 21(25): 6421-6428.

Hansen, T., Schlichting, B. and Schönheit, P. (2002). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: expression of the g6pd gene and characterization of an extremely thermophilic enzyme. *FEMS Microbiology Letters* 216(2): 249-253.

Kurlandsky, S. B., Hilburger, A. C. and Levy, H. R. (1988). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*: Ligand-induced conformational changes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 264(1): 93-102.

Lakowicz, J. R. (1983). Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York.

Levy, H. R. and Daouk, G. H. (1979). Simultaneous analysis of NAD- and NADP-linked activities of dual nucleotide-specific dehydrogenases. Application to *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 254(11): 4843-4847.

Levy, H. R., Vought, V. E., Yin, X. and Adams, M. J. (1996). Identification of an Arginine Residue in the Dual Coenzyme-Specific Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* That Plays a Key Role in Binding NAD⁺ but Not NAD⁺. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 326(1): 145-151.

Naylor, C. E., Gover, S., Basak, A. K., Cosgrove, M. S., Levy, H. R. and Adams, M. J. (2001). NADP⁺ and NAD⁺ binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Acta Crystallographica Section D* 57(5): 635-648.

Ragunathan, S. and Levy, H. R. (1994). Purification and Characterization of the NAD-Preferring Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Acetobacter Hansenii* (*Acetobacter xylinum*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 310(2): 360-366.

Rosemeyer, M. A. (1987). The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase. *Cell Biochemistry and Function* 5(2): 79-95.

Sanwal, B. D. (1970). Regulatory Mechanisms Involving Nicotinamide Adenine Nucleotides As Allosteric Effectors. *Journal of Biological Chemistry* 245(7): 1626-1631.

Segel, I. H. (1975). Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. pp 18-24. Wiley, New York.

Vought, V., Ciccone, T., Davino, M. H., Fairbairn, L., Lin, Y., Cosgrove, M. S., Adams, M. J. and Levy, H. R. (2000). Delineation of the Roles of Amino Acids Involved in the Catalytic Functions of *Leuconostoc mesenteroides* Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. *Biochemistry* 39(49): 15012-15021.

Wilkinson, A. J., Fersht, A. R., Blow, D. M. and Winter, G. (1983). Site-directed mutagenesis as a probe of enzyme structure and catalysis: tyrosyl-tRNA synthetase cysteine-35 to glycine-35 mutation. *Biochemistry* 22(15): 3581-3586.