

VCH-FC
DOC-BMCN
R618
c.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



“Cambios conformacionales, estabilidad mecánica y determinantes moleculares de la especificidad por ligando de la glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis*”

JAIME ANDRES RIVAS PARDO

Santiago, Chile

Enero 2012

**“Cambios conformacionales, estabilidad mecánica y
determinantes moleculares de la especificidad por
ligando de la glucoquinasa dependiente de ADP de
Thermococcus litoralis”**



Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y
Neurociencias**

Facultad de Ciencias

por

Jaime Andrés Rivas Pardo

Enero, 2012

Director de Tesis:

Dra. Victoria Guixé Leguía



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

JAIME ANDRÉS RIVAS PARDO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 27 de Diciembre del 2011

Director de Tesis:

Dra. Victoria Guixé Leguía

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Antonieta Valenzuela

Dra. María Victoria Encinas

Dr. Danilo González Nilo

Dr. Carlos Jerez

DEDICATORIA



*Para cada uno de los que se apasionan con lo que hacen
Para los que ven en la derrota una nueva oportunidad
Para todos los que están y para los que ya partieron*



AGRADECIMIENTOS

Siempre esta sección se deja al final, luego de escribir la tesis completa, de haber revisado las referencias y tener lista la tapa. Pero lo curioso es que en todas las ocasiones esta parte va en el principio, como portada del trabajo a continuación. Probablemente, la razón por la cual se deja al último es porque no existe modo correcto de escribirlos. No hay molde, esquema ni indicación alguna de cómo debe hacerse. Todos improvisamos. Algunos parten dando las gracias a su familia, otros al laboratorio que los alojó durante el desarrollo de la tesis, etc. Yo lo haré partiendo según por lo que creo es lo más importante y que es actualmente mi sentido día a día. Entonces, previo a recordar y dar gracias a todas y cada una de las personas que de alguna forma contribuyeron a mi formación durante estos casi 5 años en la Universidad, debo hacer una pausa y dedicarle estas primeras líneas a lo más importante. Sin El, no hubiera hecho realidad cada uno de mis sueños y metas, sin El mis logros y derrotas, hubieran sido en vano. Es gracias a Dios que hoy puedo escribir estas líneas.

A mi directora de tesis la Dra. Victoria Guixé, le quiero dedicar un par de líneas para agradecerle no tan solo por la oportunidad de haber sido miembro de su laboratorio y desarrollar mi investigación en él, sino que además por toda la confianza que depositó en mi desde un principio, lo que fue fundamental para el desarrollo de una gran idea, la cual más tarde llamamos: *Tesis*. Muchas gracias por todo.

Gracias a cada uno de los miembros del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Los que están y los que ya partieron. Alejandra H., Ana P., Andrés C., Cesar R., Christian W., Diego Q., Diego V., Gabriel V., Felipe M., Ivonne G., Jazmín H., Jorge B., Karel O., Magaly L., Matías F., Mauricio B., Nieves A., Pablo V., Patricia A., Rodrigo M., Ricardo C., Tito U., Víctor C. y Victoria G. Un abrazo para cada uno de ustedes.

De manera especial me gustaría agradecerle por todo el apoyo que me brindaron durante mi estadía en Brasil, al grupo del Dr. Richard Garrat y en general a los miembros del laboratorio de cristalografía del Instituto de Física de Sao Carlos. Probablemente una de las experiencias más enriquecedoras, no tan solo profesional sino que también personal.

También, de la misma manera debo agradecer a todos los miembros del laboratorio del Dr. Julio Fernández, Columbia University. Carmen B., David G., Jorge AC.,

Julio F., Pallav K., Raúl PJ., Rodolfo H. y Sergi GM., todos ustedes de alguna manera me llevaron al mundo de las moléculas individuales, mundo fascinante que transformó bastante mi visión de la bioquímica y biología molecular.

No quiero olvidar a los compañeros de los primeros años del doctorado. Con quienes debimos luchar frente a rufas de artículos a la espera de ser leídos. Consuelo I., Daniel B., Mauricio L., Christian W. y Mauricio S., para cada uno de ustedes mis sinceros agradecimientos por la oportunidad de conocerlos y compartir gratos momentos.

También están los amigos de siempre, los que de alguna manera influyeron en este trabajo durante estos últimos años. Alberto O., Felipe A., Felipe R., Freddy I., Leonardo P., Marcelo O., Sebastian R., un abrazo para todos, gracias por los momentos que compartimos juntos, intercambio de ideas y mas que todo por escuchar. Otros amigos que he tenido la oportunidad de conocer durante los últimos años: Carolina S., María José G., Valentina P., para todos ustedes un gran abrazo.

Para que no se me olvide, parte de mi familia primos, primas, tíos, tíos, abuelos y abuelas, cuñados, cuñadas, concuñados, suegros, gracias por todo. No subestimen lo que hicieron, por que todo tuvo una consecuencia que me permitió crecer, un abrazo para todos.

Finalmente he dejado para el final los agradecimientos para mi familia. Papá y Mamá, muchas gracias por todo lo que me entregaron, sin duda hoy día yo soy más consecuencia de sus virtudes que de sus errores. Pablo y Natalia, gracias por el apoyo que me brindaron en especial en el ultimo año y disculpas si muchas veces ni tuve el tiempo para escucharlos.

Desde hace unos pocos meses atrás ya mi familia dejó de estar constituida únicamente por mis padres y hermanos. Con Paulina hemos unido nuestros caminos para formar una nueva familia. Para ti Paulina solo tengo palabras de agradecimientos, muchas gracias por la paciencia y el apoyo, en particular en los momentos más complicados del último año.

Gracias a todos.

PUBLICACIONES y CONGRESOS

Artículos publicados durante el periodo de tesis

- Merino, F.‡, **Rivas-Pardo, J.A. ‡**, Caniuguir, A., García, I. y Guixé, V. Catalytic and regulatory roles of divalent metal cations on the phosphoryl-transfer mechanism of ADP-dependent sugar kinases from hyperthermophilic archaea. (2012). *Biochimie.*, 94, 516-524. ‡ *ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo.*
- Alegre-Cebollada, J., Kosuri, P., **Rivas-Pardo, J. A.** y Fernandez, J., M. Direct observation of intramolecular disulfide isomerization in a single protein. (2011). *Nat. Chem.*, 3, 882-887.
- **Rivas-Pardo, J. A.**, Caniuguir, A., Wilson, C.A.M., Babul, J. y Guixé, V. Divalent metal cation requirements of phosphofructokinase-2 from *E. coli*. Evidence for a high affinity binding site for Mn^{2+} . (2011). *Arch. Biochem. Biophys.*, 505, 60-66.

Participación en reuniones científicas durante el periodo de tesis

Internacionales

- Alegre-Cebollada, J., **Rivas-Pardo, J. A.** y Fernández, J.M. Direct observation of isomerization of disulfide bonds in a single protein. XI Congreso de la Sociedad de Biofísica de España. Murcia, España Junio, 2011.
- Ramírez, C., **Rivas-Pardo, J. A.** y Guixé, V. Similarities between the mechanical unfolding pathways of ribokinase superfamily enzymes resolved by molecular dynamics simulations. The case of a hyperthermophile glucokinase and a mesophile adenosine kinase. 55th annual meeting Biophysical Society. Baltimore, EE.UU., Marzo, 2011.

- **Rivas-Pardo, J., A.**, Wilson, C.A.M., Caniuguir, A. y Guixé, V. Kinetic and EPR studies of the role of divalent metal cations in *E. coli* Pfk-2. 23rd Symposium of the Protein Society, Protein in motion. Boston, EE.UU., Julio, 2009.

- Guixé, V., **Rivas-Pardo, A.**, Caniuguir, A., García, I. y Merino, F. Role of divalent metal cations in the catalytic mechanism and regulation of members of the ADP-dependent sugar kinase family. Keystone Symposia, Protein Dynamics, Allostery and Function. Keystone, EE.UU., June 2009.

Nacionales

- **Rivas-Pardo, J. A.**, Alegre-Cebollada, J., Ramirez, C., Fernández, J.M. y Guixé, V. Independence between thermal and mechanical stability in a hyperthermophilic enzyme. Single molecule Studies reveal the modulation of the mechanical stability triggered by ligands. XXXIV Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Valdivia, Chile, Septiembre, 2011.

- **Rivas-Pardo, J., A.**, Caniuguir, A. y Guixé, V. Ligand induced Conformational changes in the ADP-dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis*. A small angle X-ray scattering study. XXXIII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Chillan, Chile, Septiembre, 2010.

- **Rivas-Pardo, J., A.** y Guixé, V. Function of divalents cations in the catalysis of glucokinase of *Thermococcus litoralis*. Molecular determinants involve of ADP-metal complex estabilization. XXXII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile.. Chillan, Chile, Septiembre, 2009.

- **Rivas-Pardo, J., A.**, Wilson, C.A.M. Caniuguir, A. y Guixé, V. Kinetic and EPR studies of the role of divalent metal cations in *E. coli* Pfk-2. XXXI Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Chillan, Chile, Septiembre 2008.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- FONDECYT 1070111 y 1110137
- Beca de doctorado, Departamento de Biología, Universidad de Chile, 2007.
- Beca de doctorado nacional, CONICYT 2008-2010.
- Beca de apoyo a la tesis doctoral, CONICYT, 2009-2010.
- Beca de pasantía en el extranjero, Departamento de Postgrado y Postítulo, Vicerrectoría Académica, Universidad de Chile, 2009.
- Beca de congresos internacionales, CONICYT, 2009.
- Beca de pasantía en el extranjero, programa Becas-Chile, 2009.
- Beca de pasantía en el extranjero, programa MECESUP, 2011.
- LNLS, Brasil, SAXS-Beamline, 2009 y 2010.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
BIOGRAFIA	iii
AGREDECIMIENTOS	iv
PUBLICACIONES y CONGRESOS	vi
FUENTES DE FINANCIAMIENTO	viii
INDICE DE CONTENIDOS	ix
INDICE DE TABLAS	xiii
INDICE DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ESQUEMAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xxii
INTRODUCCION	1
Archaeas.....	1
La Superfamilia Riboquinasa y la GK dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i>	6
Cambios conformacionales y mecanismo cinético.....	9
Sitio de unión del nucleótido. Residuos importantes para la unión y catálisis.....	11
Estabilización del metal y su relación con la transferencia.....	16
Arreglos conformacionales, estabilidad y efecto de los ligandos.....	18
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	23
Hipótesis.....	23
Objetivos generales.....	23
Objetivos específicos.....	24
MATERIALES Y METODOS	25
Materiales.....	25

Material biológico.....	25
Vectores.....	25
Partidores.....	25
Enzimas.....	26
Sistemas de purificación de producto PCR, DNA plasmidial y búsqueda de clones.....	27
Reactivos y materiales químicos.....	27
Medios de cultivo.....	28
Métodos.....	29
Transformación de células <i>Escherichia coli</i>	29
Purificación de DNA plasmidial. DH5a /JM109/Xl-1.....	29
Mutagénesis sitio-específica.....	30
Análisis de DNA por minigeles de electroforesis de agarosa.....	30
Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	30
Crecimiento de células para la purificación de la TIGK. <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS – pET17b-glkA.....	30
Purificación de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i>	31
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes.....	33
Determinación de la concentración de proteínas.....	33
Determinación de la actividad enzimática.....	33
Determinación de constantes cinéticas aparentes, K_M y k_{cat}	36
Determinación mecanismo cinético.....	36
Determinación de la concentración de los sustratos.....	37
Determinaciones de estructura secundaria.....	38
Determinación de la afinidad proteína-ligando.....	38
Determinación de la distribución de la población de las partículas en solución.....	40
Determinación del radio de giro de la enzima en solución.	
Dispersión de rayos X en bajo ángulo (SAXS)	41

Generación de modelos conformación-Abierta/Cerrada.....	42
Espectroscopia de fuerza mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Construcción y purificación de la poliproteína.....	42
Experimentos de manipulación.....	45
Desplegamiento <i>in silico</i> . Dinámica molecular dirigida.....	47
RESULTADOS.....	49
I. Purificación de la enzima y mecanismo cinético.....	49
I.A. Clonamiento y sobre-expresión.....	49
I.B. Mecanismo cinético.....	51
Estudios cinéticos en velocidad inicial.....	51
Análisis de velocidad inicial en presencia de los productos.....	59
II. Cambio conformacional.....	72
II.A. Cambios conformacionales inducidos por ligandos.....	72
II.B. Mecanismo catalítico.....	80
III. Rol de los residuos Glu203 y Arg205.	87
III.A. Estabilización del Mg-ADP ⁻	87
III.B. Estabilización del estado de transición.....	89
IV. Especificidad de metales y rol del motivo conservado NXXE.....	91
IV.A. Especificidad del metal-nucleótido.....	91
IV.B. Efecto inhibitorio del ión metálico libre.....	93
IV.C. Papel del residuo NXXE ³⁰⁸ en la estabilización del metal.....	102
V. Desplegamiento mecánico de la enzima y efecto de los sustratos....	105
V.A. Purificación y caracterización de la poliproteína.....	105
V.B Espectroscopia de fuerza mediante AFM.....	108
V.C. Desplegamiento <i>in silico</i> mediante dinámica molecular dirigida (<i>steered molecular dynamics, SMD</i>).....	115
V.D. Intermediario mecánico sensible a la unión a la unión de ligandos.....	121
V.E. Intermediarios mecánicos: mejoramiento de la resolución.....	122
V.F. Estimación de energía libre en el despliegamiento.....	129

DISCUSION.....	135
Determinación del mecanismo cinético.....	135
Cambios conformacionales inducidos por ligandos.....	137
Papel de los residuos Glu203 y Arg205 en la unión y catálisis.....	139
Especificidad de metales y el papel del motivo conservado NXXE en la unión de metales.....	141
Desplegamiento mecánico de la enzima.....	143
CONCLUSIONES.....	152
REFERENCIAS.....	154

LISTA DE TABLAS

Tabla M.1	Partidores usados para la tarea de biología molecular del gen de la TIGK.....	26
Tabla 1.1	Resumen pasos de purificación de la enzima TIGK.....	50
Tabla 1.2	Parámetros cinéticos para los sustratos MgADP ⁻ y glucosa, en la reacción catalizada por la enzima TIGK silvestre.....	58
Tabla 1.3	Resumen de parámetros cinéticos para los sustratos MgADP ⁻ y glucosa, en la reacción catalizada por la enzima TIGK silvestre.....	59
Tabla 1.4	Resumen de parámetros cinéticos para la inhibición de los sustratos MgADP ⁻ y glucosa, en la reacción catalizada por la enzima TIGK silvestre.....	71
Tabla 2.1	Radios de giros deducidos para la proteína a diferentes temperaturas.....	74
Tabla 2.2	Radios de giros para la proteína en presencia y ausencia de los sustratos.....	75
Tabla 2.3	Estadística de los datos cristalográficos y refinamiento.....	82
Tabla 3.1	Resumen de parámetros cinéticos aparentes para las enzimas silvestre y mutante Glu203Ala, para el sustrato MgADP ⁻	89
Tabla 3.2	Parámetros cinéticos aparentes para las enzimas silvestre y mutante Arg205Gln.....	90
Tabla 4.1	Parámetros cinéticos de la glucoquinasa ADP-dependiente silvestre, en presencia de diferentes complejos metal-nucleótido.....	93
Tabla 4.2	Constantes cinéticas y de equilibrio determinadas mediante ajustes globales.....	98
Tabla 4.3	Constantes cinéticas y de equilibrio determinadas mediante ajuste al modelo de ciclo termodinámico.....	101
Tabla 4.4	Parámetros cinéticos de la glucoquinasa silvestre y mutante Glu308Gln.....	103
Tabla 4.5	Constantes termodinámicas para el complejo MgADP-enzima, en la glucoquinasa silvestre y mutante Glu308Gln.....	104
Tabla 5.1	Hebras beta participantes de la lámina beta presente en el dominio mayor y la lamina beta presente en el dominio menor, de la enzima TIGK.....	120

LISTAS DE FIGURAS

Figura I	Modelo tridimensional de la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de <i>Thermococcus litoralis</i> (TIGK).....	7
Figura II	Dominios en la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i>	8
Figura III	Estructuras tridimensionales de glucoquinasas dependientes de ADP.....	11
Figura IV	Representación del bolsillo de unión a ADP en la enzima TIGK.....	13
Figura V	Estabilización del ADP en las enzima TIGK y PfgK.....	14
Figura VI	Transferencia del fosforilo β del ADP en la enzima TIGK.....	16
Figure VII	Estabilización del metal-nucleótido en la enzima TIGK.....	18
Figura VIII	Espectroscopia de fuerza en moléculas individuales.....	21
Figura 1.1	Purificación de la enzima TIGK.....	50
Figura 1.2	Curvas de saturación para los sustratos complejos MgADP ⁻ y glucosa...	52
Figura 1.3	Parámetros cinéticos aparentes para los sustratos MgADP ⁻ y glucosa...	53
Figura 1.4	Estudios de velocidad inicial para los sustratos complejos MgADP ⁻ y glucosa.....	54
Figura 1.5	Gráficas secundarias calculadas para la determinación de los parámetros cinéticos bajo supuesto de mecanismo cinético ordenado secuencial.....	57
Figura 1.6	Curvas de saturación para los sustratos MgADP ⁻ y glucosa, en presencia de los productos de la reacción MgAMP y glucosa-6-fosfato.....	61
Figura 1.7	Efecto del MgAMP sobre los parámetros cinéticos de los sustratos MgADP ⁻ y glucosa.....	62
Figura 1.8	Efecto del producto glucosa-6-P sobre los parámetros cinéticos de los sustratos MgADP ⁻ y glucosa.....	64
Figura 1.9	Gráficas de dobles recíprocos para los ensayos de inhibición por producto.....	68
Figura 1.10	Gráficas secundarias calculadas para la determinación del efecto del producto MgAMP sobre los parámetros cinéticos para los sustratos MgADP ⁻ y glucosa.....	69
Figura 1.11	Gráficas secundarias calculadas para la determinación del efecto del producto glucosa-6-P sobre los parámetros cinéticos para los sustratos MgADP ⁻ y glucosa.....	70

Figura 2.1	Curva de dispersión de la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i>	73
Figura 2.2	Gráficos de función de densidades de probabilidades (PDF) para las distancias de la proteína bajo las diferentes condiciones experimentales.	76
Figura 2.3	Modelos <i>ab initio</i> construidos a partir de los datos de SAXS para la enzima en presencia de los diferentes sustratos.....	77
Figura 2.4	Comparación entre los modelos cristalográficos respecto a los obtenidos por medio de los experimentos de SAXS.....	78
Figura 2.5	Cristales de la enzima <i>TIGK</i> en presencia de los dos sustratos.....	81
Figura 2.6	Bolsillo hidrofóbico de unión al nucleótido de la enzima <i>TIGK</i>	83
Figura 2.7	Enlaces de hidrógeno presentes en el bolsillo de unión al nucleótido en la enzima.....	84
Figura 2.8	Enlaces de hidrógeno presentes en el bolsillo de unión de la glucosa en la enzima <i>TIGK</i>	85
Figura 2.9	Modelo tridimensional obtenido por difracción de rayos X de la enzima.....	86
Figura 3.1	Ubicación del residuo Glutámico 203 en la enzima <i>TIGK</i> y el Glu195 equivalente perteneciente a la enzima homóloga glucoquinasa de <i>P. furiosus</i> (<i>PfGK</i>).	87
Figura 3.2	Evaluación del contenido de estructura secundaria en las enzimas silvestres y mutante Glu203Ala.....	88
Figura 3.3	Evaluación del contenido de estructura secundaria en las enzimas silvestres y mutante Arg205Gln.....	90
Figura 4.1	Metal divalente presente en la mezcla de reacción.....	92
Figura 4.2	Especificidad y efecto de metal divalentes en la catálisis.....	94
Figura 4.3	Efecto del ADP ³⁻ libre sobre la reacción catalizada por la glucoquinasa ADP-dependiente.....	96
Figura 4.4	Inhibición de la glucoquinasa por metal libre.....	97
Figura 4.5	Unión de manganeso libre a glucoquinasa, determinada mediante resonancia magnética del electrón (EPR).....	99
Figura 4.6	Evaluación del contenido de estructura secundaria en las enzimas silvestres y mutante Glu308Gln mediante dicroísmo circular.....	102
Figura 4.7	Determinación de la constante de equilibrio del complejo MgADP ⁻ por medio de calorimetría isotérmica de titulación.....	104
Figura 5.1	Esquema del proceso de construcción de la poliproteína quimera (I27) ₂ -GK-(I27) ₂	106

Figura 5.2	Determinación de la pureza y funcionalidad de la proteína quimera (I27) ₂ -TIGK-(I27) ₂	107
Figura 5.3	Estiramiento mecánico de la proteína quimera (I27) ₂ -GK-(I27) ₂	109
Figura 5.4	Desplegamiento mecánico de la poliproteína quimera (i27) ₂ -GK-(i27) ₂ por medio de espectroscopía de fuerza.....	111
Figura 5.5	Histogramas de los delta de longitud, presentes en los registros de despliegamientos de la proteína quimera, usando 400 nm s ⁻¹	112
Figura 5.6	Histogramas para el ΔL bajo las diferentes condiciones proteína-ligando.....	114
Figura 5.7	Eventos de despliegamiento observados en las dinámicas moleculares.....	116
Figura 5.8	Esquemas del intermediario "mechanical clamp" ubicado en la dinámica molecular, durante diferentes tiempos de la trayectoria.....	118
Figura 5.9	Intermediario mecánico propuesto para el despliegamiento de la TIGK	121
Figura 5.10	Intermediarios mecánicos presentes en el despliegamiento de la proteína quimera detectados por medio de rampa de fuerza.....	123
Figura 5.11	Intermediarios presentes en la ruta de despliegamiento de la TIGK.....	124
Figura 5.12	Histogramas de los intermediarios presentes en el despliegamiento de la TIGK.....	125
Figura 5.13	Eventos L1 y L4, en la ruta de despliegamiento de la TIGK.....	127
Figura 5.14	Desplegamiento mecánico del constructo (I27) ₂ -TIGK-(I27) ₂	131
Figura 5.15	Cinéticas de despliegamiento de la TIGK bajo fuerza constante.....	132

LISTAS DE ESQUEMAS

Esquema 1.1	Mecanismo de reacción ordenado tipo Bi-Bi, para la reacción fosforilación de la glucosa catalizada por la TIGK.....	71
Esquema 4.1	Unión del metal libre inhibidor Mn ²⁺ a la enzima TIGK.....	98
Esquema 4.2	Ciclo termodinámico de la unión del metal libre inhibidor Mn ²⁺	100

LISTAS DE ABREVIATURAS

AFM	Microscopio de fuerza atómica
ADP	Adenosina 5-difosfato
ADP β S	Adenosina 5-difosfato β tio
ADP-GLC	Adenosina 5-disfosfato-glucosa
AMP	Adenosina 5-monofosfato
CD	Dicroísmo circular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ΔL	Diferencia de extensión entre el intermediario mecánico y el estado desplegado
ΔG_G	Diferencia de energía libre de Gibbs asociada al proceso de desplegamiento
Δx	Distancia al estado de transición para el proceso de desplegamiento
EA	Complejo enzima-sustrato A
EB	Complejo enzima-sustrato B
EAB	Complejo ternario enzima-sustrato A-sustrato B
EI	Complejo enzima-inhibidor
EP	Complejo enzima-producto P
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
EPQ	Complejo ternario enzima-producto P-producto Q
EQ	Complejo enzima-producto Q
ES	Complejo enzima-sustrato
ESI	Complejo ternario enzima-sustrato-inhibidor
ES \ddagger	Complejo de transición enzima-sustrato
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GLC	Glucosa
I(0)	Intensidad de los rayos X a un ángulo 0
I(q)	Intensidad de los rayos X a un ángulo q
I27	Módulo tipo inmunoglobulina I27, presente en la Titina
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactósido
ITC	Titilación calorimétrica isotérmica
k0	Constante de velocidad
k_{cat}/K_M	Eficiencia catalítica
k_{cat}	Constante catalítica
K_A	Constante de Michaelis para el sustrato A

K_B	Constante de Michaelis para el sustrato B
K_D	Constante de disociación
KDa	KiloDaltons
K_i	Constante de inhibición
K_{ip}	Constante de inhibición para el producto P
K_{iq}	Constante de inhibición para el producto Q
K_{ia}	Constante de disociación para el complejo enzima-sustrato A
K_{Mapp}	Constante de Michaelis-Menten aparente
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_P	Constante de Michaelis para el producto P
K_Q	Constante de Michaelis para el producto Q
L_0	Extensión inicial
Me	Metal
L_f	Extensión final
NAD	Nicotinamida adenosina dinucleótido, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenosina dinucleótido, forma reducida
Rg	Radio de giro de la proteína
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PDF	Función de densidades de probabilidades
Pfk-2	Fosfofructoquinasa-2
pN	PicoNewton
TIGK	Glucoquinasa de <i>Thermococcus litoralis</i>
SAXS	Dispersión de rayos X en bajo ángulo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SMD	Dinámica molecular dirigida
V_0	Velocidad inicial
V_{max}	Velocidad máxima
WLC	Modelo de elasticidad vermiforme

RESUMEN

La glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis* es la enzima responsable de catalizar el primer paso en la vía modificada de Embden-Meyerhoff en este archeon hipertermófilo. Esta enzima cataliza la fosforilación de la glucosa para obtener como producto de la reacción glucosa-6-fosfato, usando ADP como dador de fosforilo. Considerando que la mayoría de las quinasas conocidas emplean nucleótidos trifosforilados para la catálisis, la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* es una enzima poco común en términos de la selección del nucleótido. Además, la enzima posee propiedades estructurales extraordinarias que le permiten llevar cabo la catálisis a temperaturas muy altas, próximas a los 90° C.

Actualmente existen pocos estudios disponibles sobre quinasas dependientes de ADP; tres de ellos involucran glucoquinasas dependientes de ADP y están estrictamente relacionados con el clonamiento y la caracterización de la enzima. Asimismo, hay muy pocos estudios estructurales en enzimas hipertermófilas, considerando que el conocimiento respecto al fenómeno de la termoestabilidad es aún controversial. Por otro lado, la determinación de la estructura tridimensional de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* permitió clasificarla como miembro de la superfamilia Riboquinasa. Además, considerando la presencia de diferentes modificaciones estructurales y su relación filogenética con otras enzimas de la superfamilia, esta glucoquinasa fue clasificada en un nuevo clado, denominado "quinasas de azúcares dependientes de ADP".

Aunque la estructura tridimensional de esta glucoquinasa se encuentra disponible, no existen estudios funcionales sobre el mecanismo cinético; solo un artículo discute acerca de la preferencia por los dadores y aceptores del grupo fosforilo. Por lo tanto, una parte de este trabajo la enfocamos al estudio del comportamiento cinético de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* (TIGK) por medio de la determinación del mecanismo cinético y su relación con los cambios conformacionales desencadenados por la unión de los sustratos.

Los estudios de velocidad inicial e inhibición por producto son compatibles con un mecanismo cinético en secuencia ordenado, el cual comienza

con la unión del MgADP⁻ al sitio activo, seguido por la unión de glucosa al complejo enzima-MgADP⁻, lo que lleva a la formación del complejo ternario. Los cambios conformacionales asociados con la unión de los ligandos se determinaron mediante dispersión de rayos X en bajo ángulo. A través de esta estrategia determinamos que la unión del complejo MgADP⁻ genera un cierre de 0,3 nm en el radio de giro, mientras que en la presencia de ambos sustratos (glucosa y MgADP⁻) el cierre alcanza los 0,5 nm. Por otro lado, la unión de glucosa no produce cambios en el radio de giro de la enzima. La unión de los ligandos también tiene efecto sobre la estabilidad mecánica de la enzima. Usando espectroscopia de fuerza a nivel de molécula individual, determinamos que la enzima tiene una estabilidad mecánica más bien discreta, a pesar de la gran estabilidad térmica y química que posee. En presencia de MgADP⁻ y glucosa, es decir, en la conformación cerrada, la fuerza para alcanzar al intermediario mecánico se incrementa desde 40 pN hasta 60 pN, lo cual representa un 50% de incremento en la estabilidad. Simulaciones de dinámica molecular dirigida propusieron un intermediario mecánico formado por dos hebras β paralelas, las cuales forman entre ellas 6 enlaces de hidrógeno, constituyendo de esta forma la hebra más larga presente en la enzima. Estas hebras forman la bisagra que comunica ambos dominios y por lo tanto participan en el cambio conformacional propuesto, desde el estado abierto al estado cerrado.

Además, evidencia proveniente de la estructura tridimensional de la proteína, así como de alineamientos estructurales de secuencia, postulan varios residuos de aminoácidos importantes para la estabilización del MgADP⁻ y la catálisis. Nuestros resultados muestran que el residuo Glu203 no está involucrado en la unión del complejo MgADP⁻, mientras que el residuo Arg205 participa en la transferencia del fosforilo durante la catálisis. Por otra parte, el residuo Glu308, el cual pertenece al motivo conservado NXXE, no sólo participa en la unión del complejo MgADP⁻, sino que además tiene un papel fundamental en la catálisis.

Aunque el verdadero sustrato de la enzima es MgADP⁻, otros metales como Mn²⁺ y Co²⁺ pueden formar complejos con el nucleótido, constituyéndose

en sustratos para la enzima. Experimentos cinéticos demostraron que la enzima es promiscua en relación al uso del metal, donde las consideraciones necesarias para la catálisis se encuentran relacionadas sólo al radio iónico y la geometría del catión.

La determinación de las constantes cinéticas y termodinámicas, el orden de adición de los sustratos, la identificación de residuos de aminoácidos claves para la unión de los sustratos y la estabilización del estado de transición, así como la estabilidad mecánica de la enzima, nos permitirá tener una mejor comprensión del comportamiento de la enzima. Además, estos estudios proveerán las bases para realizar comparaciones con otros miembros de la superfamilia de modo de proponer una historia evolutiva que considere las diferencias y similitudes observadas en las enzimas que pertenecen a los tres clades de la superfamilia Riboquinasa.

ABSTRACT

The ADP-dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis* is an enzyme responsible for the first step of a modified version of the Embden-Meyerhoff pathway in this hyperthermophilic archeon. This enzyme catalyzed the glucose phosphorylation reaction to yield glucose-6-phosphate, using ADP such as phosphoryl donor. Considering that most of the known kinases use triphosphorylated nucleotides for catalysis, the *T. litoralis* ADP-dependent glucokinase is an uncommon enzyme in terms of its nucleotide selection. Also, the enzyme has extraordinarily structural properties that allow it to work at very high temperatures, near to 90° C.

Currently, there are only a few studies about ADP-dependent kinases; two of them involved ADP-dependent glucokinases and are strictly related with the cloning and a general characterization of the enzyme. Also, there are very few structural studies in hyperthermophilic enzymes, considering that knowledge regarding the thermostability phenomena is still controversial. On the other hand, the three-dimensional structure determination of the ADP-dependent glucokinase from *T. litoralis* allows classified it as member of the Ribokinase superfamily. In addition, considering the presence of different structural modifications and its phylogenetic relationship with other enzymes of the superfamily, this glucokinase was classified in a new clade, called "ADP-dependent sugar kinases" like.

Although the tridimensional structure of this glucokinase is available, there are not functional studies about its kinetic mechanism; only one article discusses about the donor and acceptor phosphoryl preference of this enzyme. Then, in a part of this work we addressed the study of the kinetic behavior of the ADP-dependent glucokinase from *T. litoralis* (TlGK) through the determination of the kinetic mechanism and its relationships with the conformational changes triggered by substrate binding.

Initial velocity and product inhibition studies are compatible with an ordered sequential kinetic mechanism which starts with binding of the MgADP⁻ complex to the active site, followed by binding of glucose to the enzyme-MgADP⁻ complex, leading to ternary complex formation. Conformational changes associate with ligand binding were determinate by small angle X rays scattering. We determine that binding of MgADP⁻ generates a closure of 0.3 nm in the radius of gyration, while in the presence of both substrates (glucose and MgADP⁻) the closure reaches 0.5 nm. On the other hand, binding of glucose does not produce any change in the radius of gyration. Binding of ligands also has an effect on the mechanical stability of the enzyme. Using force spectroscopy at single molecule level, we determine that the enzyme has a very low mechanical stability despite its great chemical and thermal stability. In the presence of MgADP⁻ and glucose, i.e., in the close conformation, the force to reach the mechanical intermediate increases from 40 pN to 60 pN, which represents a 50% increase in stability. Steered Molecular Dynamic simulations proposed a mechanical intermediate formed by two parallel β strands, which shows the presence of 6 H bonds between them, constituting the longest β strand in the enzyme. This strand is the hinge that communicates both enzyme domains and then participates in the conformational change, going from an open to a close conformation.

Also, evidence coming from the three dimensional structure of the protein, as well as from structural based sequence alignments, postulated several aminoacids as important for MgADP⁻ stabilization and catalysis. Our results show that the Glu203 residue is not involved in MgADP⁻ binding, whereas Arg205 participates in phosphoryl transfer during catalysis. On the other hand, the Glu308 residue that belongs to the conserved NXXE motif, not only participates in MgADP⁻ stabilization, but also has a key role in the transfer reaction.

Although the true substrate is MgADP⁻, other metals like Mn²⁺ and Co²⁺ can form nucleotide complexes that are substrates for the enzyme. Kinetics experiments demonstrate that the enzyme is rather promiscuous in relation to

their metal usage where the only considerations for metal assisted catalysis seem to be related to the ionic radii and coordination geometry of the cations.

Determination of kinetic and thermodynamic constants, the substrate order addition, identification of key amino-acid residues related with substrate binding and transition state stabilization, as well as the mechanical stability of the enzyme, will allow us to gain a deeper understanding of its behavior. Also, these studies will provide the basis to make comparisons with other superfamily members and to propose an evolutive history that account for differences and similarities observed in enzymes belonging to the three clades of the superfamily.

INTRODUCCIÓN

Archaeas

Los seres vivos necesitan un suministro constante de energía la cual es destinada a 3 fines principales: trabajo mecánico y movimientos moleculares y/o celulares, transporte activo de iones y moléculas y por último, síntesis de macromoléculas. Todos estos procesos se llevan a cabo por medio de una serie de reacciones químicas, que de forma colectiva se denominan como "metabolismo" (Stryer, 1995).

Independiente del tipo de organismo que se trate, ya sea fototrófico o quimiotrófico, la energía necesaria para llevar a cabo los procesos metabólicos debe ser almacenada y movilizada a través de algún mecanismo. El nucleótido adenosina trifosfato (ATP) es la molécula encargada de realizar este trabajo, debido a que la hidrólisis del enlace fosfodiéster libera una gran cantidad de energía libre, lo que puede explicarse tanto por la repulsión electrostática que existe entre los tres grupos fosfatos que en parte se compensa por la estabilización por resonancia que experimentan estos mismos grupos fosfatos. En la molécula de ADP, producto de la hidrólisis de la molécula de ATP, la repulsión resultante entre los grupos fosforilos es menor que la presente en el ATP y la resonancia en las moléculas de fosfato (Pi) y ADP es mayor en comparación a la encontrada en la molécula de ATP, favoreciendo energéticamente en este sentido la reacción (Stryer, 1995).

El ATP es el principal dador de grupo fosforilo involucrado en las reacciones catalizadas por las enzimas quinasas, muy recurrentes en todas las vías metabólicas como la glicólisis, gluconeogénesis, glicógenolisis, ciclo de los ácidos tricarbóxicos, vías de las pentosas, etc. En la mayoría de estos casos, el ATP se encuentra formando complejos con algún metal catiónico que usualmente es divalente como el Mg^{2+} , Ca^{2+} o Mn^{2+} (Morrison y Heyde, 1972).

La ruta de la glicólisis, también conocida como la vía de Embden-Meyerhoff (EM), comienza con la fosforilación de la molécula de glucosa para terminar con la

formación de piruvato, precursor de una serie de otras vías metabólicas, como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, síntesis de aminoácidos, etc. La fosforilación de esta molécula de glucosa se lleva a cabo por la acción de la enzima hexoquinasa, la cual emplea al ATP como molécula dadora de fosfato (Stryer, 1995). Aunque es usual que a lo largo de toda la ruta glicolítica se empleen 2 moléculas de ATP como dadores de fosforilo, algunos organismos como los pertenecientes al dominio *Archaea*, presentan una variación sobre la vía de EM, donde dos enzimas de la vía sustituyen la molécula dadora de fosforilo ATP, por el nucleósido difosforilado ADP (Verhees y col., 2003 y Sakuraba y col., 2004).

Los organismos pertenecientes al dominio *Archaea* comenzaron a ser descritos apenas 30 años atrás, cuando en 1977 se comenzaron a estudiar organismos que poseían muchas características comunes con los organismos del dominio bacteria, pero que ocupaban hábitats bastante particulares, principalmente de altas temperaturas y que a su vez presentaban un metabolismo que tiene como producto final la formación de metano, por lo que en un inicio fueron descritas como bacterias metanogénicas (Fox y col., 1977 y Friend, 2007). Sin embargo, no fue hasta la llegada de la década de los 90 cuando realmente se acuñó el termino del “tercer dominio” de la vida que agrupa a organismos arqueas, con lo que se adicionaba una nueva rama en el árbol de la filogenia de los organismos vivientes, de modo que éste quedó constituido por los dominios *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya* (Woese y col., 1990).

Aunque en una primera instancia los organismos del dominio *Archaea*, se relacionaron con hábitats bastante extremos como salares, suelos ácidos, conos volcánicos, chimeneas hidrotermales, géiser, y glaciales, con el pasar de los años sumado a la gran acumulación de conocimientos que se ha logrado en esta área, se demostró que este tipo de organismos son capaces de ocupar todo tipo de lugares, llegando a habitar nuestros océanos, lagos, suelos, al igual como lo hacen las bacterias y eucariontes. Por lo tanto, desde el punto de vista del hábitat y nichos ecológicos que ocupan, se consideran como los organismos más ampliamente

distribuidos hasta ahora conocidos, lo que ha despertado un gran interés en una serie de científicos que ven en este tipo de organismo un enorme potencial tanto para la industria como para ser utilizados como modelos relacionados al origen de la vida (Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006 y Friend, 2007).

El dominio *Archaea* puede dividirse en tres phyla, Crenarchaeota y Euryarchaeota son los phyla principales y oficialmente reconocidos, mientras que el tercer phylum denominado Koraarchaeota, es el más recientemente descrito y consta de solo de unos pocos individuos, los cuales se incluyeron sólo gracias a su identificación basada en estudios de rRNA. Hasta el día de hoy tan solo un par de organismos de este phylum se han podido cultivar en laboratorio, lo que produce discrepancia en su reconocimiento como phylum (Madigan y col., 2003 y Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006).

Los individuos del phylum Crenarchaeota se caracterizan por ocupar los hábitats de más altas temperaturas hasta hoy conocidas, que en promedio superan los 100 °C, por lo que gran parte de ellos son hipertermófilos (existen algunas especies descritas en este phylum que se desarrollan a temperaturas inferiores e incluso habitan en glaciales) (Madigan y col., 2003).

Por otro lado, el phylum Euryarchaeota se caracteriza por estar constituidos por organismos con muy diversa fisiología, como por ejemplo, individuos que emplean minerales inorgánicos como fuente de energía, que habitan lugares de muy bajas temperaturas o productores de gas metano (metanógenos), etc. (Madigan y col., 2003). Al interior de las Euryarchaeota solo unos pocos individuos habitan en ambientes de altas temperaturas (la cual es una característica común de los individuos que forman parte del otro phylum Crenarchaeota). Estos euryarchaeon hipertermófilos forman un orden totalmente diferente que es denominado como *Thermococcales*. Es en este último orden donde encontramos a los géneros *Thermococcus* y *Pyrococcus*, que se caracterizan por ocupar hábitats de muy altas temperaturas, por presentar un metabolismo del tipo

quimiorganotrófico, ser anaeróbicos obligados y utilizar el S^0 como aceptor final de electrones (Neuner y col., 1990 ; Kengen y col., 1995 y Madigan y col., 2003).

Ambos géneros se ubican muy cercano a la raíz del árbol filogenético, que es consecuencia de su lento reloj molecular, que si lo relacionamos con el hábitat donde se desarrollan, podemos elucubrar que este tipo de hipertermófilos sufren una gran presión evolutiva que lleva a una gran selección sobre los genes, permitiendo muy pocas variaciones a nivel genético (Madigan y col., 2003 y Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006). Además, si tomamos en cuenta las condiciones donde se supone que la vida comenzó, altas temperaturas y alta presión, gran presencia mineral, ausencia de una atmósfera oxidante (ausencia de O_2), y todo esto lo relacionamos con el paradigma que ofrecen estos organismo hipertermófilos en cuanto a su reloj molecular, podemos considerar que estas células son verdaderas reliquias vivientes, que han sufrido muy pocos cambios desde el ultimo ancestro común universal (LUCA). Por lo tanto, al estudiar diferentes aspectos relacionados a las vías metabólicas en este tipo de organismos, ya sea proteínas, enzimas o metabolitos, puede ser una gran herramienta para entender como fueron las rutas metabólicas primitivas, las estrategias que estas archaeas empleaban, y quizás lo más fundamental desde un punto de vista de biología estructural, conocer cómo las características arquitectónicas que estas enzimas poseían les permiten hasta el día de hoy llevar a cabo su función bajo condiciones extremas.

Thermococcus litoralis pertenece al orden de los *Thermococcales*. Es un coco anaerobio marino que fue aislado desde aguas termales submarinas de la costa italiana y se desarrolla a temperaturas entre 50 a 96 °C con un óptimo a los 85° C. Presenta un metabolismo del tipo quimiorganotrófico y emplea péptidos y piruvato como fuentes de carbono (Neuner y col., 1990). Otras fuentes de carbono como hidratos de carbono parecen no ser utilizados por el *archaeon*. Sin embargo, se ha demostrado que la maltosa logra aumentar el crecimiento cuando se emplean péptidos como fuente de carbono (Makund y Adams, 1993). La maltosa se

incorpora al interior de la célula por medio de un transportador del tipo ABC muy similar al que se encuentra en *E. coli* (Xavier y col., 1996) y es metabolizada por dos enzimas que actúan de forma concertada para formar precursores de la vía Embden-Meyerhoff (Xavier y col., 1999). Finalmente, la presencia de S^0 el cual es utilizado con aceptor final de electrones, permiten que *T. litoralis* produzca H_2S (Neuner y col., 1990).

Thermococcus litoralis, al igual que otros microorganismos del orden *Thermococcales*, presenta modificaciones en la ruta glicolítica, donde el primer paso de fosforilación de la glucosa es llevado a cabo por una glucoquinasa (GK) que emplea ADP como dador de fosforilo (Xavier y col., 1999). Este es un caso bastante poco común ya que existen muy pocas quinasas dependientes de ADP descritas en la literatura. La explicación tal fenómeno, se basa en el hecho de que este tipo de organismos se encuentran en ambientes de muy altas temperaturas, donde el ADP se vería favorecido debido a su mayor termoestabilidad en comparación del ATP. Además, el ADP puede provenir de las reacciones anabólicas del microorganismo, por lo que la enzima podría llevar a cabo la fosforilación de la glucosa aún cuando se encuentre en condiciones de baja carga energética o baja concentración de ATP, privilegiando de esta manera a los nucleótidos de adenina trifosforilados para otro tipo de procesos (Ito y col., 2001).

De todo lo anterior, se desprende la importancia que tiene encontrar los determinantes estructurales y funcionales que dictan que la enzima utilice un nucleósido difosforilado en reemplazo de uno trifosforilado y que además, sea una reacción que se lleva a cabo a muy alta temperatura, lo que nos indica que la enzima debe no tan solo ajustar un nucleótido poco común en su sitio activo, sino que además debe poseer una serie de características de termoestabilidad que le permitan llevar a cabo la catálisis sin desnaturarse y sin que el complejo enzima-estado transición (ES^\ddagger) sea atacado por moléculas de solvente. Con la dilucidación de estas interrogantes podemos entender mejor cuáles son las estrategias que

estos organismos “primitivos” han elaborado y como este tipo de vías metabólicas pudieron haber evolucionado.

La Superfamilia Riboquinasa y la GK dependiente de ADP de *T. litoralis*

La GK de *T. litoralis* (TIGK) es una enzima monomérica que pertenece a la superfamilia riboquinasa. Esta superfamilia incluye una serie de enzimas que, desde el punto de vista funcional, tienen en común que catalizan la transferencia de un grupo fosforilo hasta una molécula aceptora, por lo que pueden ser clasificadas como quinasas de moléculas pequeñas. Las enzimas pertenecientes a esta superfamilia se encuentran distribuidas en un gran número de vías metabólicas, tales como la glicólisis, síntesis de vitaminas y nucleótidos, vía de las pentosas, etc. Desde un punto de vista estructural, los miembros de esta superfamilia conservan un tipo de plegamiento común, el popular plegamiento de tipo Rossmann, que consiste en un motivo estructural formado por una sábana β central que es rodeado por ambos lados por hélices α , razón por la cual es común también llamarlo como un plegamiento del tipo sándwich $\alpha/\beta/\alpha$. Este plegamiento, aunque inicialmente se describió como plegamiento típico para alojar el NADH o NADPH de las deshidrogenadas, actualmente se relaciona con la unión de nucleótido en general. En el caso particular de la superfamilia riboquinasa, este plegamiento se encuentra modificado y está constituido por una sábana β central, principalmente del tipo paralelas, las que al igual que el motivo estructural canónico se encuentran rodeadas por una serie de hélices α . Al observar los diagramas de topología disponibles de las estructuras de la superfamilia, encontramos que existen tres variaciones en el plegamiento (Zhang y col., 2004). Las quinasas dependientes de ADP, se caracterizan por la correlación entre el uso del nucleótido y la presencia de hebras β no consecutivas en el C-terminal. Estas quinasas además presentan un *dominio menor* constituido por inserciones de elementos de estructura secundaria, que comienza siempre con una hebra β a continuación de la hebra N-terminal de la sábana β central. Este rasgo estructural, la presencia de un dominio extra con

elementos de estructura secundaria, es compartido por la riboquinasa, adenosina quinasa, aminoimidazol ribosido quinasa y la 2-ceto-3-deoxigluconato quinasa y todas las proteínas de la familia riboquinasa. De esta manera, el segundo subgrupo constituido por estas últimas enzimas, presenta hebras consecutivas en el C-terminal y el dominio menor. Finalmente, el tercer subgrupo de la superfamilia de la riboquinasa no presenta dominio menor, pero contiene hebras β consecutivas en el dominio mayor. Las funciones de los miembros de este subgrupo están asociadas con la fosforilación de intermediarios de la síntesis de coenzimas como piridoxal y tiamina (ej. piridoxal quinasa). En resumen, la superfamilia puede ser descrita con tres familias principales: familia de las enzimas quinastas de azúcares *dependientes de ADP*, familia *Riboquinasa o quinastas de azúcares dependientes de ATP* y familia de enzimas *sin dominio menor* (Merino y Guixé, 2008).

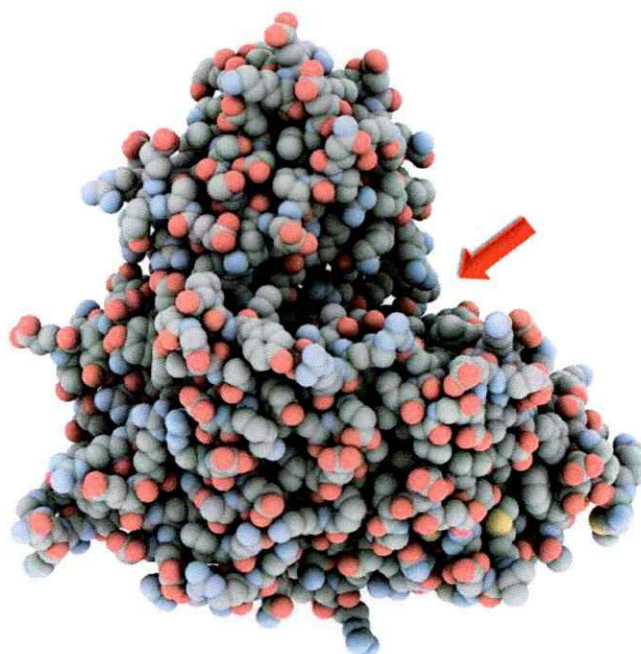


Figura I. Estructura tridimensional de la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* (TIGK). La hendidura que se forma entre los dos dominios constituye el sitio activo, el cual es indicado por una flecha roja. Las esferas grises corresponden a los átomos de carbono, rojas átomos de oxígeno, moradas átomos de nitrógeno y amarillas átomos de azufre. Figura se preparó usando la estructura disponible en la base de datos de proteínas, PDB ID 1gc5.

La estructura tridimensional de la glucoquinasa de *T. litoralis* (TlGK), nuestro modelo de estudio, se encuentra determinada por difracción de rayos X, en presencia del nucleótido de ADP (Ito y col., 2001). La enzima es un monómero de 467 residuos aminoacídicos, los que se disponen formando una proteína globular de dos dominios entre los cuales se encuentra una hendidura donde se ubica el sitio activo (**Figura I**). Estos dos dominios, denominados de acuerdo a su tamaño como dominio mayor y dominio menor, se encuentran comunicados por 4 elementos interdominios, lo que significa que cada uno de estos dominios están formados por segmentos no consecutivos de la secuencia lineal (**Figura II**). A este tipo de topología se le ha denominado reentrante, en la cual la secuencia lineal pasa de un dominio a otro en varias ocasiones.

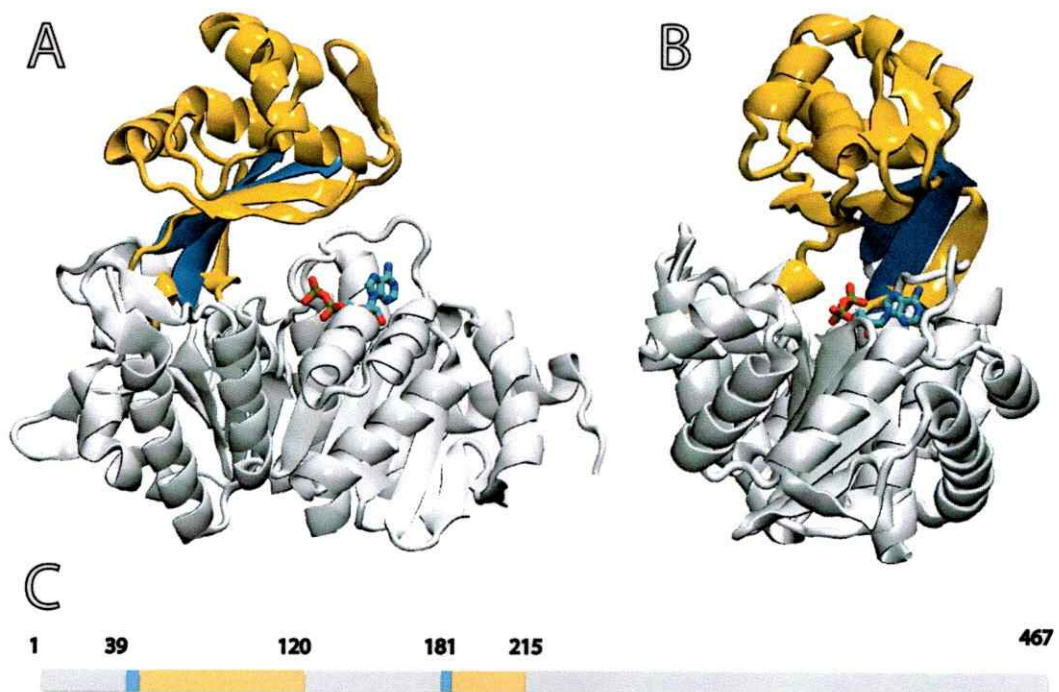


Figura II. Dominios en la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*. A, En el modelo se pueden distinguir dos dominios, el mayor ubicado en la parte inferior de la representación representado en color blanco y el dominio menor, ubicado sobre el anterior coloreado en amarillo. La bisagra que comunica ambos dominios se encuentra coloreada en color azul. B, corresponde a la misma representación presentada en A rotada en 90 grados. Figura se preparó usando la estructura disponible en la base de datos de proteínas, PDB ID 1gc5. Modificado desde Wilson (2011).

Cambios conformacionales y mecanismo cinético.

Estudios estructurales, en ausencia y presencia de sustratos en enzimas de la superfamilia que poseen dominio menor (riboquinasa y adenosina quinasa), sugieren una función para este último: en la conformación abierta permitiría la entrada de ribosa o adenosina, la que induciría un cambio conformacional que, por una parte, atrapa al sustrato en la posición correcta para la catálisis y por otra hace más favorable la unión de ATP. Este es un fenómeno que ha sido descrito en otros miembros de la familia, por ejemplo, en el caso de la fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *E. coli*, donde la unión de fructosa-6-fosfato gatilla el cierre de los dominios (Cabrera y col., 2003). Este cierre de dominios puede ser relacionado directamente con el mecanismo catalítico que presenta la Pfk-2, el que en este caso particular consiste en un mecanismo en secuencia ordenado, donde la entrada del azúcar al sitio sería el primer evento para la catálisis (Campos y col., 1984), llevando a la enzima hasta una conformación de mayor afinidad por el segundo sustrato MgATP²⁻. Así, una consecuencia de este mecanismo de unión de sustratos sería prevenir la hidrólisis temprana de ATP.

La comparación de la estructura de la piridoxal quinasa de oveja con otras enzimas de la superfamilia, ha revelado que ésta no presenta el dominio menor y que, por ende, uniría los sustratos de manera diferente (Li y col., 2002), siendo los experimentos cinéticos consistentes con un mecanismo en secuencia al azar (Churchich y Wu, 1981). En este caso, impedir la hidrólisis prematura del ATP cuando éste se une en ausencia de piridoxal, constituye un elemento clave del mecanismo al azar. La determinación reciente de la estructura de la piridoxal quinasa humana, indica que esta enzima no presenta el *loop* que cubre el sitio activo, sino un *flap* β /*loop*/ β (Cao y col., 2006), por lo que este elemento estructural es el encargado de proteger el estado de transición de la reacción del ataque de moléculas del solvente.

Para el caso de las glucoquinasas dependientes de ADP con estructura tridimensional resuelta (glucoquinasas de *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus*

horikoshii y *T. litoralis*), se ha propuesto una relación entre la entrada de los sustratos y la disposición del dominio menor. La comparación de la estructura de la glucoquinasa de *P. horikoshii* (PhGK) cristalizada en la ausencia de ligandos (Ito y col., 2003) con la estructura cristalográfica de la enzima homóloga glucoquinasa de *P. furiosus* (PFGK) en complejo con un análogo de ADP y glucosa sugiere un cierre de dominios inducido por el sustrato (Figura III.A y C). Por otra parte, la enzima de *T. litoralis*, cristalizada sólo con ADP, presenta un cambio respecto a la enzima PhGK pero que no es de la misma magnitud que el encontrado en la enzima cristalizado con los dos sustratos (PFGK). Es decir, la TlGK se encontraría en una conformación a mitad de camino (semi-cerrada) entre las conformaciones abierta y cerrada (Ito y col., 2001 y Ito y col, 2003) (Figura III.B). A partir de estos datos se puede sugerir que la unión de ADP no desencadenaría el cierre total de los dominios, sino que el cambio estructural se debería conseguir luego de la unión de la glucosa al sitio activo. Aun cuando no se ha determinado el mecanismo cinético de la TlGK, ni de ninguna de las enzimas de la familia dependientes de ADP, si tomamos en cuenta la información disponible en la literatura y los arreglos conformacionales de enzimas homólogas, es posible sugerir un mecanismo en secuencia ordenado, donde en una primera instancia entraría ADP y luego glucosa, cerrando el sitio activo. Sin embargo, algunos investigadores ya han propuesto que la TlGK presentaría el mismo mecanismo que emplean otras enzimas de la superfamilia, esto es un mecanismo cinético en secuencia al azar (Ito y col., 2001). Siendo ésta la única explicación para poder conciliar la idea de un cambio conformacional inducido por la glucosa y entrada al azar de los sustratos, es que luego del arreglo conformacional aún existe espacio suficiente para permitir la entrada del ADP (Ito y col., 2001).

La metodología de dispersión de rayos-X en bajo ángulo (del inglés *Small Angle X-ray Scattering*, SAXS) permite determinar el efecto que tienen los ligandos sobre la conformación de una enzima, ya que permite calcular el radio de giro de la macromolécula en solución. De esta forma, cualquier cambio en el empaquetamiento o cierre de dominios experimentado por la enzima, producto de

la acción de los ligandos, debería ser registrada por esta metodología. Si juntamos la información extraída desde este tipo de experimentos con aquellos que intenten dilucidar el tipo de mecanismo cinético, es decir, establecer el orden de entrada de cada uno de los sustratos, podremos establecer una visión más completa de la función que desempeña el dominio menor en la catálisis. De esta forma *la correlación entre el mecanismo cinético presentado por la GK de T. litoralis con los cambios conformacionales inducidos por los ligandos, permitirá establecer relaciones comparativas con otros miembros de la superfamilia, entregando bases para explicar porque enzimas de la superfamilia presentan elementos estructurales que ocluyen el sitio activo durante la catálisis.*

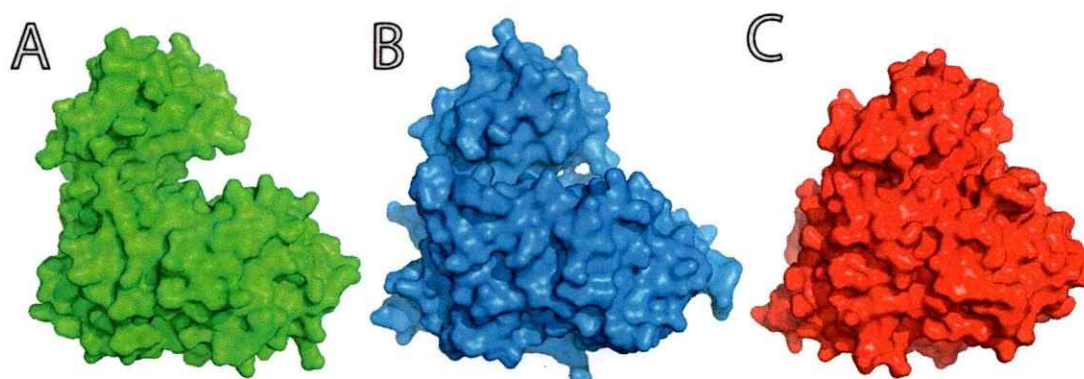


Figura III. Estructuras tridimensionales de glucoquinasas dependientes de ADP. A, GK de *Pyrococcus horikoshii* (PhGK, apoenzima, PDB ID 112I). B, GK de *Thermococcus litoralis* (TlGK, en presencia de ADP, PDB ID 1gc5). C, GK de *Pyrococcus furiosus* (PfGK, en presencia de ADP β S y glucosa, PDB ID 1ua4). La secuencia de eventos sugieren que la transición entre un estado abierto (A) hasta uno cerrado (C), es consecuencia de la unión de los ligandos.

Sitio de unión del nucleótido. Residuos importantes para la unión y catálisis.

Si suponemos que la entrada de los sustratos se inicia con la incorporación del ADP al sitio activo, podemos suponer inmediatamente que la estabilización del nucleótido es crítica para los procesos que se desencadenen luego de su unión. A partir de la estructura resuelta por Ito y col. (2001), se pueden encontrar una serie de motivos estructurales involucrados en esta estabilización. Los fosfatos son

estabilizados por los denominados “*loop mayor*” y “*loop menor*”, constituidos por el extremo N-terminal de la hélice α 17 (Tyr437-Ile453) y las sábanas β 13-14 (His352-Tyr357). También el extremo N-terminal de α 12 (Asn305-Glu308) y C-terminal de la hélice α 15 (Ser376-Ala383), participan en esta estabilización (**Figura IV, panel A**).

La base nitrogenada es acomodada gracias a una serie de residuos aminoacídicos: Tyr356, Ala383, Ala379, Ile439, Pro443, Ile449 y Ile453, los que forman un bolsillo hidrofóbico, permitiendo que el nucleótido adopte una orientación óptima para la catálisis (**Figura IV, panel B**). Además, existen otras interacciones entre la proteína y la base nitrogenada. El esqueleto polipeptídico estabiliza por medio de dos enlaces de hidrógeno la adenina, desde el grupo NH y C=O de Val440 hasta el N1 y NH6 de la base de adenina, respectivamente. A pesar que se forman varios enlaces de hidrógenos entre la proteína y el ADP, la mayoría de ellos son entre el esqueleto de la proteína y el ligando, exceptuando al residuo His352, que establece un enlace de hidrógeno con el hidroxilo de la ribosa constituyente del nucleótido (**Figura IV, panel C**). En el sector de la base no existe residuo alguno que se encargue del reconocimiento de la base de adenina, vale decir, que sea capaz de discriminar entre los diferentes nucleótidos ya sean ADP, GDP, CDP, UDP u otro. No obstante, sabemos que la enzima utiliza preferentemente nucleótidos como ADP y CDP por sobre otros nucleótidos (Ito y col., 2001), por lo que se puede concluir que el elemento encargado del reconocimiento se hace evidente sólo luego que la proteína ha experimentado un arreglo estructural.

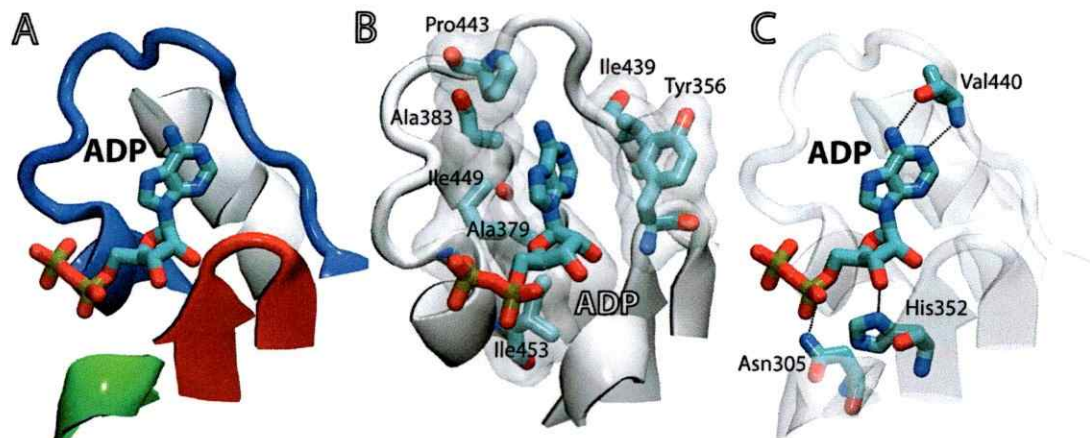


Figura IV. Representación del bolsillo de unión a ADP en la enzima TIGK. **A**, se muestran los elementos participantes del acomodo del nucleótido. En azul se muestra la hélice α 17, constituida por los residuos Tre437-Ile453 (*loop* mayor), en rojo parte de las sábanas β 13-14, constituida por los residuos His352-Tyr357 (*loop* menor), en gris la parte C-terminal de la hélice α 15 (Ser376-Ala383) y finalmente en verde la parte N-terminal de la hélice α 12 (Asn305-Glu308). **B**, total de aminoácidos apolares que en conjunto forman el cavidad que ajusta la base nitrogenada del nucleótido. **C**, residuos que establecen enlaces de hidrógeno con el nucleótido. La figura fue preparada usando la estructura de la TIGK, PDB ID 1gc5.

En la estructura de la enzima homóloga, GK de *P. furiosus*, la cual esta en una conformación cerrada, el residuo de Glu195 se encuentra formando un enlace de hidrógeno a través del grupo carboxílico de la cadena lateral y el H-N⁶ del ADP (**Figura V, panel B**). Lo mismo podría estar ocurriendo en la enzima de *T. litoralis*, donde el residuo equivalente Glu203 se aproximaría hasta la adenina, solo luego de que ha ocurrido el arreglo conformacional de los dominios (**Figura V, panel A**). De esta forma, una sustitución en esta posición por un residuo como Ala, el cual no es capaz de aceptar el H-N⁶ de la base, nos permitirá conocer sobre el papel que desempeña esta posición en la unión del dador de fosforilo.

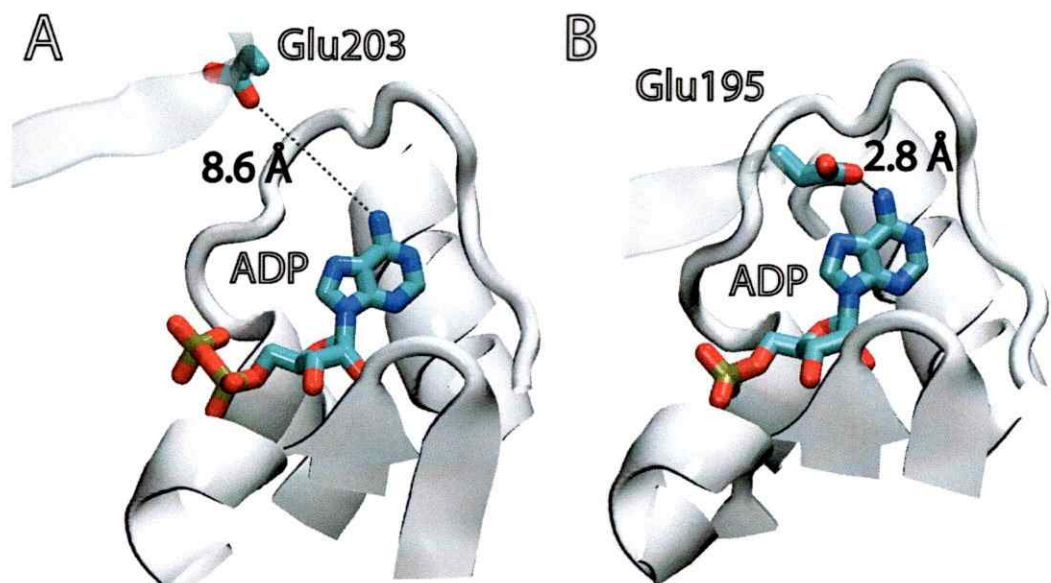


Figura V. Estabilización del ADP en las enzima TIGK y PFGK. **A**, Distancia encontrada entre la cadena lateral de Glu203 y el grupo N⁶ de la adenina del ADP en la enzima TIGK (PDB ID, 1gc5). **B**, Bolsillo de unión al ADP en la enzima PFGK (PDB ID, 1ua4). En él se muestra la interacción que se presenta entre el residuo Glu195 y el N⁶ de la adenina del ADP. El bolsillo que acomoda el nucleótido se muestra en cintas mientras que el residuo 203 y 195 para las enzimas se muestra en barras.

Si consideramos la evidencia documentada para otras enzimas homólogas a la TIGK, como la fosfofructoquinasa 2 de *E. coli* (Pfk-2) y Riboquinasa de *E. coli*, el papel de al menos un residuo importante para el mecanismo catalítico se encuentra muy bien descrito. En ellas se ha propuesto la presencia de un ácido aspártico, el cual activa al grupo hidroxilo aceptor, favoreciendo el ataque nucleofílico sobre el fosfato γ del ATP. En el caso de la TIGK este residuo es el Asp451, el cual está ubicado en la última hélice α de la enzima. Por lo tanto, al igual a lo encontrado en otras enzimas de la superfamilia, el papel del Asp451 debe ser activar al grupo hidroxilo aceptor de la glucosa, favoreciendo en este caso particular el ataque sobre el fosfato β del ADP. Sin embargo, al inspeccionar con mayor detalle la disposición y el microentorno de este fosfato β , se puede observar que a pesar de la falta de

enlaces de hidrógeno o de coordinación con algún residuo de la enzima o con moléculas de agua de las proximidades, existe una interacción de naturaleza electrostática entre uno de sus oxígenos y el residuo de Arg205. Este residuo se encuentra ubicado en el dominio menor de la enzima, la que debido a su carga positiva debe contribuir a la estabilización del fosfato β y probablemente también en la estabilización del estado de transición (ES^\ddagger) de la reacción de transferencia (**Figura VI**). Este residuo se encuentra conservado en todos los miembros de la familia de quinasas dependientes de ADP, inclusive en homólogos más distantes como la Pfk-2, se puede encontrar un residuo equivalente en posición y función, aunque para éste tipo de enzimas el residuo es sustituido por una lisina (Lys27) que también por medio de su carga positiva interactúa con los fosfatos del ATP. A la fecha, no hay una descripción clara del papel que tendrían esta carga positiva en el evento de transferencia de fosfato en los miembros de la superfamilia riboquinasa. *Entonces, una sustitución en la posición 205 en la enzima TIGK, que persiga eliminar la carga positiva pero conservando el largo de cadena y polaridad, permitirá determinar el papel de la Arg en la unión del ADP como en la transferencia del fosforilo hasta la glucosa.*

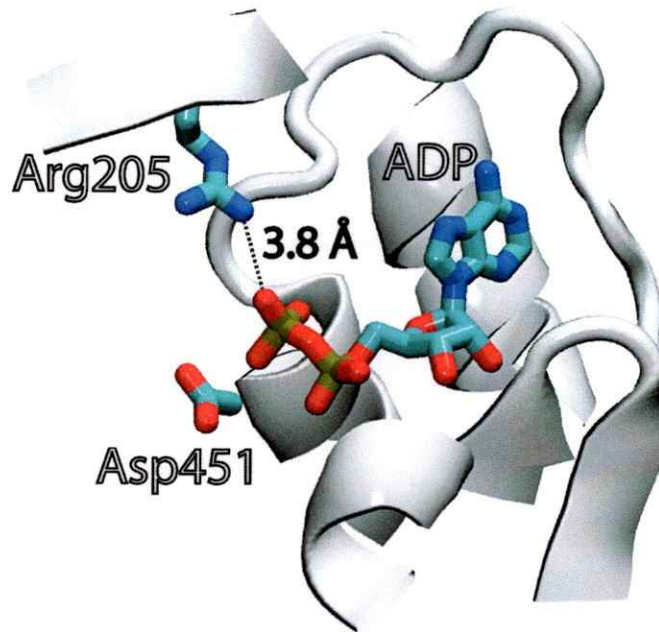


Figura VI. Transferencia del fosforilo β del ADP en la enzima TIGK. Los residuos Asp451 y Arg205 participan activamente en la transferencia del fosfato β del ADP hasta la molécula de glucosa. El bolsillo que acomoda el nucleótido se muestra en cintas mientras que los residuos participantes del evento de transferencia se muestran en barras. La figura fue preparada usando la estructura de la TIGK, PDB ID 1gc5.

Estabilización del metal y su relación con la transferencia.

Para la mayoría de las quinasas estudiadas el verdadero sustrato es el complejo $MgADP^-$ y por lo tanto considerar los residuos que participan en la estabilización del magnesio es muy importante. En diferentes quinasas, se ha determinado un requerimiento de un catión divalente (en la mayoría de los casos es Mg^{2+}) para su actividad, ya sea como un catalizador electrofílico, que ayuda a la transferencia del grupo fosforilo, o formando parte del complejo metal-nucleótido y constituyendo así el verdadero sustrato (Parducci y col., 2006). En el caso particular de enzimas de la superfamilia riboquinasa, se ha descrito que además del metal que forma parte del sustrato al formar un complejo con el nucleótido, éste se une a la enzima en su forma libre, funcionando como un efector de la catálisis. Sin embargo, el metal libre no puede ser vinculado a una función particular en el mecanismo catalítico en éstas enzimas. Se ha reportado que Mg^{+2} es un efector de adenosina quinasa (Maj y col., 2002; Fisher y Newsholme, 1984). Por otra parte, se

ha sugerido que el motivo de secuencia NXXE, conservado en todos los miembros de la superfamilia riboquinasa, estaría involucrado en la regulación mediada por Mg^{2+} y fosfato, ya que mutagénesis sitio-dirigida de estos residuos en la adenosina quinasa de hámster chino, resulta en enzimas con requerimientos muy alterados de fosfato y magnesio (Maj y col., 2002). Experimentos cinéticos realizados en otro miembro de la superfamilia riboquinasa, Pfk-2 de *E. coli*, sugieren la presencia de un ión Mg^{2+} , adicional al presente en el complejo $MgATP^{2-}$, necesario para la catálisis (Parducci y col., 2006).

Se ha demostrado que la *TIGK* utiliza un metal para formar el sustrato ADP-Me (Koga y col., 2000), sin embargo, en la estructura resuelta por difracción de rayos X no se logró determinar de forma concluyente la posición del ión metálico, debido a que la densidad electrónica del sitio no era suficiente para atribuir la adecuada posición del Mg^{2+} y sólo se propusieron los residuos que hipotéticamente podrían participar en la coordinación basado en los alineamientos y comparación con las enzimas homólogas (Ito y col., 2001). El ambiente hidrofílico en el cual debería alojarse el Mg^{2+} , estaría formado por los residuos Glu279, Glu308 y Asp451 (Figura VII). El Glu308 parte del motivo conservado NXXE, supuestamente podría estar involucrado en la coordinación del metal. En el caso de la enzima de *T. litoralis*, el motivo se encuentra constituido por Asn³⁰⁵-Glu-Val-Glu³⁰⁸ (Figura VII). Mutaciones en este motivo en enzimas homólogas, han mostrado grandes cambios en la afinidad cinética para el complejo nucleótido- Mg^{2+} . Por ejemplo, para el caso de la Pfk-2 de *E. coli*, la sustitución E190Q presenta un K_M de cerca de diez vez mayor para el complejo $MgATP^{2-}$ respecto a la enzima silvestre (Parducci y col., 2006). *De esta manera la sustitución del residuo ácido del motivo NXXE, por un residuo ausente en carga como glutamina y por lo tanto impidiendo la estabilización del metal por la carencia del enlace de coordinación, dará luces sobre el papel que juega este motivo en la catálisis.*

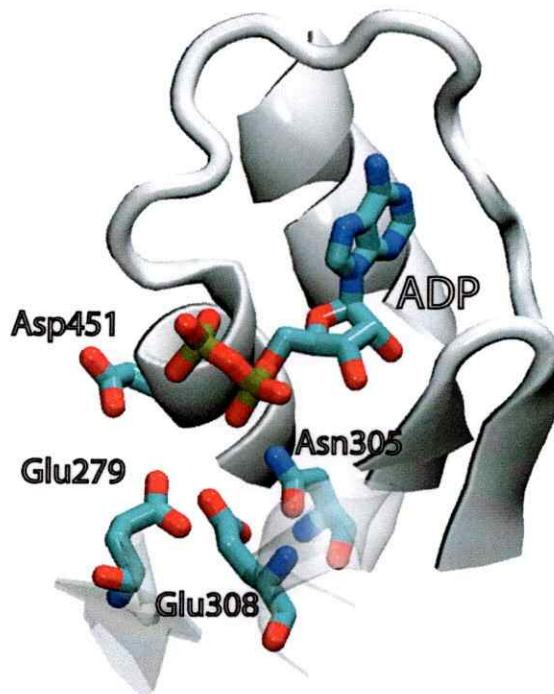


Figura VII. Estabilización del metal-nucleótido en la enzima TIGK. Los residuos que hipotéticamente participan en la estabilización del metal divalente se muestran en barras. El residuo de Asn305, a pesar de que no se ha vinculado con la estabilización del metal, si participa en la estabilización del fosfato α y forma parte del motivo conservado NXXE. La figura fue preparada usando la estructura de la TIGK, PDB ID 1gc5.

Arreglos conformacionales, estabilidad y efecto de los ligandos.

Una aproximación tradicional para el estudio de la estabilidad de las proteínas es utilizar el desplegamiento reversible, inducido por un agente químico (GdHCl, urea, pH) o físico (temperatura), para determinar la energía libre comprometida en la mantención del estado plegado de la proteína. El desplegamiento puede ser monitoreado siguiendo alguna propiedad de la proteína como actividad enzimática, contenido de estructura secundaria u otra. Sin embargo, las proteínas provenientes de organismos hipertermófilos como *T. litoralis*, tienen propiedades estructurales que les permiten mantenerse a muy altas temperaturas sin experimentar grandes cambios estructurales, lo que hace muy difícil obtener las condiciones de equilibrio cuando se induce el desplegamiento por agentes como calor, urea o guanidinio.

El desplegamiento mecánico ofrece una alternativa para poder realizar este tipo de estudios en proteínas con estas características, ya que el desplegamiento no es efectuado por la adición de un agente perturbador como urea o temperatura, sino que es llevado a cabo simplemente estirando la molécula, vale decir aplicando una fuerza que es proporcional a la ruptura de los enlaces no covalentes presentes en la estructura plegada. De esta forma se puede relacionar la fuerza empleada en el despliegue con la energía libre asociada al proceso de desplegamiento de la proteína.

En este tipo de metodologías de desplegamiento de proteínas mediante fuerza destacan dos tipos diferentes de instrumentación: pinzas ópticas láser (LOT) y el microscopio de fuerza atómica (AFM). La primera, emplea luz de manera de establecer una trampa óptica que es capaz de manipular objetos, usando una esfera de poliestireno sobre la cual se ubica la proteína bajo estudio, de manera que se pueden realizar los estudios de desplegamiento (Cecconi y col., 2008). Por otro lado, el uso del AFM se basa en la manera en que este microscopio construye las imágenes, que no es por medio de lentes como es tradicional en los microscopios, sino que mas bien lo hace por el simple contacto entre una sonda propia del instrumento y la muestra. Esta sonda que es conocida como palanca o "cantilever" y es utilizada en los experimentos de despliegue mecánico, permitiendo la manipulación de moléculas de manera individual gracias a que la macromolécula se puede fijar de manera covalente a la superficie, mientras que el otro extremo es adsorbida por la palanca (Carrion-Vazquez y col., 1999) (**Figura VIII, paneles A y B**).

Estudios de desplegamiento de la enzima GK de *T. litoralis* llevados a cabo por medio manipulación mecánica mediada por AFM, pueden ser la solución para sobrellevar los problemas encontrados en los estudios de desplegamientos mediados por agentes perturbadores tradicionales. El desplegamiento mecánico, a diferencia de las otras estrategias experimentales, se realiza empleando cada una de las moléculas en estudio de manera individual, por lo que resulta muy útil para

el caso de proteínas en las cuales la agregación es un problema con el que se debe lidiar durante el proceso de desplegamiento, como en el caso de la TIGK.

El trabajo con moléculas individuales permite seguir en tiempo real el desplegamiento de una molécula, de manera que se puede acceder a la información que tradicionalmente las técnicas de ensambla de moléculas no entregan, que son los bordes de la población (Bustamante, 2008), los que en muchas ocasiones distan bastante del promedio de la población. Sin embargo, al inspeccionar un grupo finito de moléculas, se puede también extraer información del conjunto de moléculas, es decir, el promedio de la población tal como lo hacen las técnicas de ensambla. El avance tecnológico en este tipo de técnicas ha permitido incluso el monitoreo en tiempo real del colapso y plegamiento de una proteína a nivel de una molécula (Fernández y Li, 2004).

A través del estudio de las cinéticas de desplegamiento mecánico para una proteína en particular, es posible obtener el valor de la energía libre comprometida en el evento de desplegamiento (ΔG_U), al asociar las velocidades de las constantes de desplegamiento respecto a la fuerza aplicada. En este sentido, es fácil correlacionar las constantes termodinámicas comprometidas en el proceso de desplegamiento bajo perturbación mecánica y compararlo con estrategias corrientes como lo es la perturbación química o térmica (Carrion-Vazquez y col., 1999).

Tal como se expuso anteriormente, la TIGK tiene dos dominios entre los cuales se aloja el sitio activo. Durante la catálisis estos dominios podrían rotar con la intención de ocluir el sitio activo. Por lo tanto, al desplegar la proteína en diferentes conformaciones, será necesario vencer el total de interacciones no covalentes, el que será diferente para el caso de la conformación abierta respecto a una conformación cerrada (**Figura VIII, panel C**). Entonces, los sustratos pueden ser usados para capturar las diferentes conformaciones de la proteína y determinar a nivel de molécula individual como estos sustratos inducen un incremento en la estabilidad mecánica, equivalente al efecto que tienen los ligandos para el caso de la denaturación térmica o química.

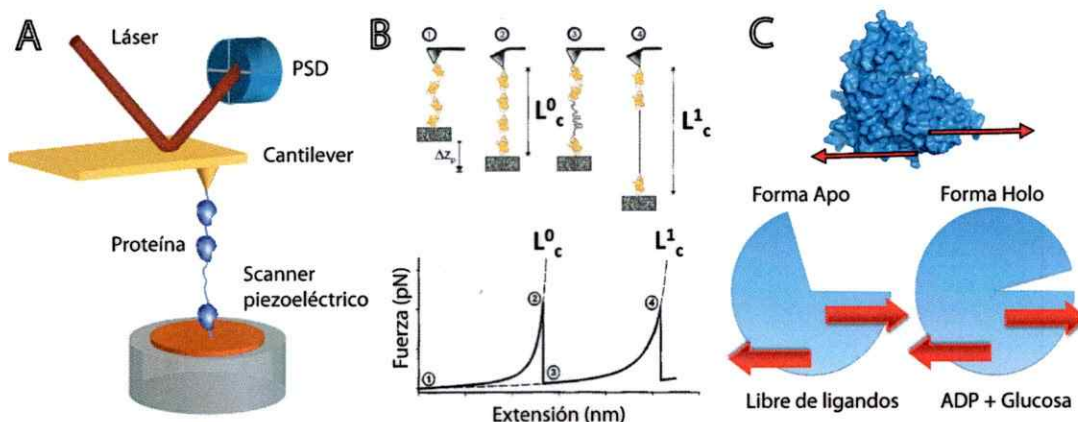


Figura VIII. Espectroscopía de fuerza en moléculas individuales. **A**, Configuración experimental tradicional para la realización de los experimentos de desplegamientos bajo fuerza (adaptado desde Neuman y Nagy, 2008). **B**, Esquema de la trayectoria de desplegamiento bajo fuerza para una proteína. En el panel superior se esquematizan en la sucesión de eventos desde 1 hasta 4, los que se relacionan con el registro en fuerza durante el estiramiento (adaptado desde Carrion-Vazquez y col, 1999). **C**, Propuesta experimental para el estudio del desplegamiento mecánico de la enzima TIGK. En la parte superior se esquematiza los puntos desde donde se tomará la proteína durante el desplegamiento. En la parte inferior, se muestra las hipotéticas transiciones entre los estados abiertos y cerrados en la enzima, inducidos por los ligandos. Las flechas en rojo esquematizan los puntos de aplicación de tensión sobre la enzima, que corresponden a la posición del amino y carboxilo terminal. La figura fue preparada usando la estructura de la TIGK, PDB ID 1gc5.

Como hay evidencia que sugiere que la proteína tiene un mecanismo cinético ordenado de entrada de los sustratos, puede ponerse a prueba esta idea, tomando en cuenta que las diferentes conformaciones de la proteína pueden lograrse luego de una combinación particular de los sustratos.

Sin embargo, la explicación de cómo operan los intermediarios mecánicos, cual o cuales son, y como estos se relacionan con los sustratos no es fácil de describir considerando sólo la estructura de la proteína. Por este motivo, durante el último tiempo se ha hecho rutinario combinar las estrategias de desplegamiento mecánico con la información obtenida desde estudios *in silico* (Lee y col., 2010). Una metodología de simulación molecular, que nació producto de las primeras manipulaciones de molécula por AFM y LOT, denominada como dinámica molecular dirigida o "Steered Molecular Dynamics" (SMD). Ésta permite simular el

desplegamiento de una proteína por la aplicación de una tensión sobre uno de los extremos de la proteína, ya sea en el N-terminal o en el C-terminal. Mediante este tipo de estudios se ha logrado predecir, por ejemplo, cuáles son los residuos involucrados en la estabilización de la estructura y conocer sobre intermediarios de desplegamiento. Este tipo de predicciones ha podido ser corroborada por experimentos *in vitro* utilizando AFM, encontrándose buenas correlaciones entre estos experimentos y las predicciones *in silico* (Marszalek y col., 1999). *De esta forma, en este proyecto se plantea estudiar el desplegamiento mecánico de la TIGK, a través de a combinación de AFM y SMD, determinando el efecto que tienen los ligandos sobre el intermediario mecánico y la fuerza del desplegamiento.*

En síntesis, en este trabajo se propone realizar un estudio que se aboque a relacionar la importancia de la armonía que existe entre el funcionamiento de una enzima hipertermófila y los diferentes arreglos conformacionales que ella debe experimentar para tal tarea, todo en esto en un ambiente totalmente extremo y muy poco considerado en estudios biofísicos tradicionales. Para esto, hemos propuesto como necesario determinar el mecanismo cinético de la enzima TIGK, realizar una serie de sustituciones tendientes a demostrar cuáles son los residuos involucrados tanto en la unión y transferencia del ADP, y su relación con los cambios conformacionales que experimenta luego de la unión de los sustratos, abordado por estrategias poco convencionales, como SAXS y AFM. La novedad del trabajo, se basa esencialmente en la complejidad y estrategias experimentales escogidas para responder la pregunta sobre el cambio en la estructura y función.

HIPÓTESIS

“La enzima glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* tiene un mecanismo cinético del tipo ordenado, el cual se inicia con la unión del MgADP⁻ seguido por la adición de la glucosa, evento que desencadena el cierre de los dominios. En esta unión secuencial de los sustratos, la participación de los residuos Glu203, Arg205 y NXXE³⁰⁸ resultan crítica para la estabilización del MgADP⁻, primer sustrato en el orden de entrada. Tales arreglos conformacionales inducen a una estructura que es resistente al desplegamiento mecánico”.

OBJETIVOS

Con la finalidad de poner a prueba la hipótesis planteada es que sean propuesto los siguientes objetivos:

Objetivos generales

1. Determinar los cambios conformacionales inducidos por ligandos y su correlación con el mecanismo cinético de la enzima.
2. Establecer los determinantes moleculares de la especificidad de ligando, centrándose en el nucleótido y metal divalente.
3. Estudiar el comportamiento mecánico de la enzima, determinando intermediarios mecánicos y el efecto de cambios conformacionales inducidos por ligandos sobre estos mismos intermediarios mecánicos.

Objetivos específicos

1. Determinar el mecanismo cinético de la reacción catalizada por la enzima glucoquinasa ADP dependiente de *T. litoralis*, mediante estudios cinéticos en velocidad inicial y por medio de inhibición por producto.
2. Evaluar los cambios conformacionales inducidos por ligandos mediante dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) y correlacionarlos con el mecanismo cinético de la enzima glucoquinasa ADP dependiente de *T. litoralis*.
3. Evaluar el papel de los residuos Glu203 y Arg205 en la unión de los sustratos y en la catálisis, en la glucoquinasa ADP dependiente de *T. litoralis*.
4. Determinar la especificidad de metales divalentes y el papel del motivo conservado NXXE en la unión de metales de la glucoquinasa ADP dependiente de *T. litoralis*.
5. Estudiar el desplegamiento mecánico de la proteína termófila ADP dependiente de *T. litoralis*, por medio de espectroscopía de fuerza y mediante la aproximación *in silico* usando SMD.

MATERIALES

Material biológico.

Se emplearon las cepas de *E. coli* DH5 α (Invitrogen, EE.UU.), JM109 (Promega), XL-1 blue (Stratagene), BL21(DE3) pLysS (Invitrogen), y BLR(DE3) pLysS (Novagen), todas ellas disponibles en el cepario del laboratorio. Las células se crecieron rutinariamente en medio LB en agitación a 37° C.

El gen de la enzima TIGK (EMBL-BANK E14589.1), fue proporcionado por el Dr. Takayoshi Wakagi, investigador miembro del Biotechnology Department, University of Tokio, Japón. Las diferentes cepas de *E. coli* se transformaron con el vector adecuado para el experimento en particular, el cual incluía el inserto de la enzima. Estas bacterias se almacenaron en medio Luria-Bertani suplementado con 50% glicerol a -80° C.

Vectores.

Para el desarrollo del trabajo de biología molecular se empleó una serie de vectores, que permitieron el clonamiento del gen que codifica para la enzima y su consecutiva expresión. Por lo que, se usó los vectores de clonamiento pT7-Blue (Novagen) y los vectores de expresión pET17b (Novagen) y pQE80L (QIAGEN).

Partidores.

Los partidores empleados en el trabajo experimental se sintetizaron por la empresa Invitrogen (CA, E.E.U.U.). De los partidores empleados podemos distinguir, según su objetivo, dos clases de oligos: partidores necesarios para la introducción de mutaciones en el marco de lectura de la enzima y los necesarios para la secuenciación del gen de la enzima TIGK usados para la confirmación y chequeo de la secuencia en los diferentes pasos de biología molecular, requeridos en el desarrollo del trabajo experimental. En la siguiente tabla se resume el total de partidores usados a largo del trabajo experimental:

Tabla M1. Partidores usados para la tarea de biología molecular del gen de la TIGK.

Partidor	Secuencia	características
<i>P1</i>	5'-TTAATACGACTCACTATAGG-3'	para secuenciación
<i>P2</i>	5'-ACTTAAGGGAATGGGGATGG-3'	para secuenciación
<i>P3</i>	5'-ATCCCGACGGAACAACATAC-3'	para secuenciación
<i>P4</i>	5'-TAGAGCAGATTAGAGATGCC-3'	para secuenciación
<i>E203A-F</i>	5'-GGTTTTTGTATGTTCAAGCACCAAG AGCGAATAGATTCATAGCCAATG-3'	sustitución <i>Glu203Ala</i>
<i>E203A-R</i>	5'-CATTGGCTATGAATCTATTCGCTCT TGGTGCTTGAACATCAAAAACC-3'	sustitución <i>Glu203Ala</i>
<i>R205Q-F</i>	5'-GGTTTTTGTATGTTCAAGCACCAAGA GAGAATCAATTCATAGCCAATGCCG-3'	sustitución <i>Arg205Gln</i>
<i>R205Q-R</i>	5'-CGGCATTGGCTATGAATTGATTCT CTCTTGGTGCTTGAACATCAAAAACC-3'	sustitución <i>Arg205Gln</i>
<i>E308Q-F</i>	5'-GCGTCGGCCTTAATGAAGTACAACCTGCCTCAA-3'	sustitución <i>Glu308Gln</i>
<i>E308Q-R</i>	5'-TACTTCATTAAGGCCGACGCTTGTGAACTT-3'	sustitución <i>Glu308Gln</i>
<i>Ares-F</i>	5'-AATCCACCTGAAAAGATATCCTCCATTG-3'	Eliminación <i>BglII</i>
<i>Ares-R</i>	5'-CTTTTCAGGTGGATTTTCAATAATT-3'	Eliminación <i>BglII</i>
<i>Quimera-F</i>	5'-GACGGATCCATGAAGGAAAGCCTTAAAGATAGG-3'	Introducción <i>BamHI</i>
<i>Quimera-R</i>	5'-CTCGGTACCTTAGCAACAAGATCTTGCCTT TTTGCTCATGCCAAATTCAC-3'	Introducción <i>BglII</i> , <i>KpnII</i>

Enzimas.

A lo largo del trabajo experimental fue necesario emplear una serie de enzimas. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (G6PDH), deshidrogenas láctica de músculo de conejo (LDH), quinasa pirúvica (PK) de músculo de conejo, fueron obtenidas de Sigma Chem. Co. (MO, EE.UU.)

Para el trabajo de biología molecular se emplearon las enzimas de restricción Fastdigest® *BamHI*, *BglII* y *KpnI* y las enzimas de restricción tradicionales *EcoRI* y *NdeI* obtenidas desde Fermentas, Thermo Scientific (MA, EE.UU.). Otras enzimas de restricción *BamHI*, *BglII* y *KpnI*, empleadas también durante el trabajo experimental fueron obtenidas desde NEB (MA EE.UU.).

La enzima DNA polimerasa Taq supermix platinum high fidelity, se obtuvieron de

Invitrogen (CA, EE.UU.). Mientras que la enzima DNA ligasa proveniente del fago T4, se obtuvo de NEB (MA EE.UU.).

Sistemas de purificación de producto PCR, DNA plasmidial y búsqueda de clones.

Los productos de PCR se purificaron a través del sistema QIAquick PCR purification kit, de QIAGEN (EE.UU.), mientras que los plásmidos se purificaron usando QIAprep spin miniprep y QIAGEN plasmid mini, obtenidos de QIAGEN (EE.UU.). Además se empleó el sistema plasmid mini kit II, EZNA, OMEGA Bio-tek (EE.UU.).

Los fragmentos de DNA se purificaron desde geles, usando Ultraclean 15, MO BIO (CA, EE.UU.).

La búsqueda de colonias transformantes se realizó por medio del sistema plasmid screening toothpick, de Gbiosciences (MO, EE.UU.).

Reactivos y materiales químicos.

Acrilamida, azul de bromofenol, bisacrilamida, glicina y N',N',N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y el estándar de masa molecular de amplio rango para geles de electroforesis de poliacrilamida con SDS (SDS- PAGE) se obtuvieron de BIO-RAD Laboratories (CA, EE.UU.).

Etanol, metanol, cloruro de calcio, cloruro de sodio, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), agar-agar, D(+)-glucosa monohidratada, peptona de carne, extracto de levadura, sulfato de amonio, β -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sodio (SDS), tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), cloruro de potasio y glicerol se obtuvieron de Merck & Co., Inc. (Alemania).

Adenosina-5'-difosfato (ADP) sal disódica, adenosina-5'-monofosfato (AMP) sal disódica, ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico (MOPS), D(+)-glucosa monohidratada, agarosa, ampicilina, azida de sodio, azul de Coomassie, bromuro de

etidio, Chelex 100, cloruro de manganeso, cloruro de magnesio, cloruro de cobalto, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-ácido 2-etanosulfónico (HEPES), adenosina-5'-β-tio-difosfato (ADPβS) sal de litio, adenosina-5'-α-β-metileno-difosfato y adenosina-5'-difosfoglucosa sal disódica (ADPGLC), se obtuvieron de Sigma Chem. Co., (MO, EE.UU.).

Los antibióticos hidrocloreto de tetraciclina (Tetraciclina), 6-d-alfa-aminofenilacetoamido-penicilinato de sodio (Ampicilina) y cloromicetina (cloranfenicol) se obtuvieron de USBiological (MA, EE.UU.).

Los capilares empleados para los ensayos de EPR, tubos capilares de hematocrito, se obtuvieron desde BOECO (Alemania).

Finalmente, el medio de cultivo triptona, bactotriptona, se obtuvo de BD (NJ, EE.UU.)

Medios de cultivo

En el trabajo experimental se emplearon una serie de medios de cultivo. Rutinariamente se empleó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) el que estaba constituido por: extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1 % y triptona 1 %, ajustado a pH 7 con NaOH.

Para el crecimiento de las células en medio sólido, se escogió medio LB-agar, el que está constituido por: agar 1,5 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1 % y triptona 1 %, ajustado a pH 7 con NaOH.

Para la preparación de células competentes se usó el medio SOC, el que está constituido por: extracto de levadura 5 g·L⁻¹, glucosa 20 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 0,5 g·L⁻¹, y triptona 20 g·L⁻¹, ajustado a pH 7 con NaOH.

En el caso que los medios de cultivos debieron ser suplementados con un antibiótico para la selección de transformantes, se usaron los antibióticos ampicilina (100 μg·mL⁻¹), tetraciclina (12,5 μ·mL⁻¹) y/o cloranfenicol (35 μ·mL⁻¹).

MÉTODOS

Transformación de células de Escherichia coli

Células quimicompetentes de *E. coli* de los genotipos: DH5 α , JM109, XL-1, BL21 (DE3) pLysS y BLR (DE3) pLysS, se prepararon a través del método de cloruro de calcio, de acuerdo a Sambrook y col. (2001). Luego, 200 μ L de células competentes fueron transferidos de manera estéril a tubos de microcentrífuga que contenían el plásmido a transformar. Los tubos se mantuvieron en hielo por 30 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, se aplicó un golpe térmico a 42 °C por 90 segundos, y luego se trasladaron hasta hielo por 2 minutos. Más tarde, a cada tubo se le adicionaron 800 μ L de medio SOC, incubando a 37 °C por 60 minutos con agitación. Luego las células se centrifugaron a 1.000 g por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 μ L de medio fresco para suspender la pella. De esta suspensión se tomaron diferentes alícuotas para aplicar en placas en medio LB-agar suplementado con el o los correspondientes marcadores de selección, ampicilina, tetraciclina o cloranfenicol, incubando las placas por 12-16 horas a 37 °C.

Purificación de DNA plasmidial. DH5 α /JM109/XL-1

Las células de *E. coli* transformantes se crecieron en 5 mL de medio LB suplementado con 100 μ g·mL⁻¹ de ampicilina, durante 8-12 horas a 37 °C. Luego las células se sedimentaron a 13.000 g por 2 minutos y se suspendieron en Tris-HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo lisozima (400 mg·mL⁻¹). El DNA plasmidial se obtuvo empleando el kit Spin Miniprep® de QIAGEN (EE.UU.). El DNA se analizó a través de geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, con previa cuantificación espectrofotométrica según Sambrook y col. (2001).

Mutagénesis sitio-específica

Las mutaciones necesarias para el desarrollo del proyecto, se incluyeron al gen de la TIGK por medio del sistema GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System™, de Invitrogen (CA., EE.UU.), utilizando los partidores adecuados para las mutaciones. Cada una de las sustituciones se corroboraron por secuenciación del gen completo, con el objeto de chequear la introducción de la sustitución propuesta y para descartar la introducción de mutaciones no deseadas.

Análisis de DNA por mini geles de electroforesis de agarosa

Se usaron mini geles de 8 x 5,5 cm de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. Se cargaron las muestras a analizar preparadas con 1 mL de amortiguador de carga de electroforesis. Luego se procedió a la aplicación de campo eléctrico de 100 volts constante, por un período de 30 a 40 minutos con amortiguador TAE 1X. Por último el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio 0,5 mg·mL⁻¹ por 20 minutos, y luego se trasladaron los geles hasta el transiluminador UV donde se visualizaron y fotografiaron las bandas de DNA.

Digestión de DNA con enzimas de restricción

Para la digestión del DNA plasmidial con las respectivas enzimas de restricción se usaron los amortiguadores, temperaturas y tiempos sugeridos por el fabricante. Generalmente se empleó un exceso de 5 unidades de enzima de restricción para la digestión de 1 µg de DNA. Los fragmentos de la digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

Crecimiento de células para la purificación de la TIGK. E. coli BL21(DE3) pLysS - pET17b-glkA

La gen de la enzima TIGK (EMBL-BANK E14589.1) se encontraba clonado en el vector de expresión inducible por IPTG pET17b (Novagen), que a su vez se encontraba transformado en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3) pLysS, las que

fueron crecidas en medio LB suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y cloranfenicol ($35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La purificación se realizó según lo descrito por Ito y col. (2001), esencialmente empleando los mismos pasos de purificación, pero con algunos cambios en las estrategias o resinas cromatográficas empleadas, detalladas a continuación.

Purificación de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*

Las células provenientes de un litro de cultivo (aproximadamente 3,5 g peso húmedo) se indujeron por 4 horas a 37°C , se cosecharon por centrifugación y resuspendieron en 25 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,8 MgCl_2 5 mM (amortiguador A). La integridad celular de la suspensión de células se rompió por sonicación, siguiendo un protocolo de 30 ciclos, constituidos por 30 segundos de pulso seguido por 30 segundos de descanso, procedimiento realizado en hielo. La nueva suspensión se sometió a centrifugación de 14.000 g a 4°C por 20 minutos, para separar las proteínas solubles del debris celular. La solución sobrenadante fue sometida a un golpe térmico a 90°C durante 30 min. Nuevamente, la solución de proteínas se centrifugó a alta velocidad a 14.000 g para separar las proteínas desplegadas de las que aún se mantenían solubles. A continuación se realizó la precipitación de las proteínas contaminantes por la adición de sulfato de amonio al 60%, durante 30 minutos empleando el mismo amortiguador. Esta solución se centrifugó a 14.000 g a 4°C y el sobrenadante se aplicó a una resina de fenil sefarosa, Hitrap™ Fenil HP (GE healthcare) de 5x1 mL, preequilibrada con el buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 MgCl_2 5 mM suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% (amortiguador B). La resina con la proteína en su interior fue lavada con el mismo amortiguador B (5 volúmenes) para luego iniciar la elusión de la enzima por medio del uso de un gradiente lineal, desde 100% amortiguador B y 0% amortiguador A, para terminar con 0% amortiguador B y 100% amortiguador A, con un volumen total de la gradiente de 100 mL. Todo el procedimiento cromatográficos se realizó a temperatura ambiente y las fracciones que contenían la enzima, se seleccionaron

usando el ensayo de actividad enzimática para la reacción de fosforilación de la glucosa.

La proteína eluida se preparó para el siguiente paso cromatográfico, y debido a que mantenía como co-solvente una concentración importante de sulfato de amonio, fue necesario dializarla contra el amortiguador A, procedimiento que se realizó dos veces usando 1 L de diálisis cada vez, para asegurar totalmente el cambio del amortiguador.

La proteína dializada se pasó a través de una resina de intercambio aniónico, HiTrapQ™ HP (GE Healthcare) de 5x1 mL, pre-equilibrada con el amortiguador A. Luego de lavar con al menos 5 volúmenes al columna, se continuó con la elución de la proteína usando un gradiente lineal de 80 mL, partiendo desde un 100% amortiguador A y 0% amortiguador C (Tris-HCl 50 mM pH 7,8 MgCl₂ 5 mM suplementado con KCl 1 M), para terminar con 0% amortiguador A y 100% amortiguador C. Todo el procedimiento cromatográfico fue realizado a temperatura ambiente y las fracciones que contenían la enzima, fueron seleccionadas usando el ensayo de actividad enzimática para la reacción de fosforilación de la glucosa.

Las fracciones seleccionadas se sometieron a un análisis electroforético bajo condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE). Se reunieron sólo las fracciones con una homogeneidad sobre 95% en una única fracción y almacenadas para los posteriores análisis, manteniendo la enzima a 4 °C. Para estudios distantes en el tiempo la proteína fue almacenada a -20 °C, suplementando el amortiguador con 50% glicerol. Antes de cada experimento, la enzima proveniente de 4 °C ó -20 °C, el amortiguador fue sustituido por amortiguador Hepes 25 mM pH 7,8, para lo cual fue necesario intercambiarlo mediante el uso de diálisis al equilibrio o mediante el procedimiento de dilución-concentración.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes

Se utilizaron geles de acrilamida-bisacrilamida al 12%, siguiendo la técnica descrita por Laemmli y col. (1970). El gel concentrador contenía 0,4 M de Tris-HCl pH 6,8, 6% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,1% de SDS, 0,1% de persulfato de amonio (PSA) y 10 μ L de TEMED, en tanto que el gel separador incluía 0,4 M de Tris-HCl pH 8,8, 15 % de acrilamida/bis-acrilamida, 0,1% de SDS, 0,1% de persulfato de amonio (PSA) y 20 μ L de TEMED. Las muestras se cargaron en paralelo con un estándar de masa molecular de bajo rango (Sigma Chem. Co.) para a continuación iniciar la migración por la aplicación de un campo eléctrico a voltaje constante de 120 voltios. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie y destiñeron con ácido acético 10%.

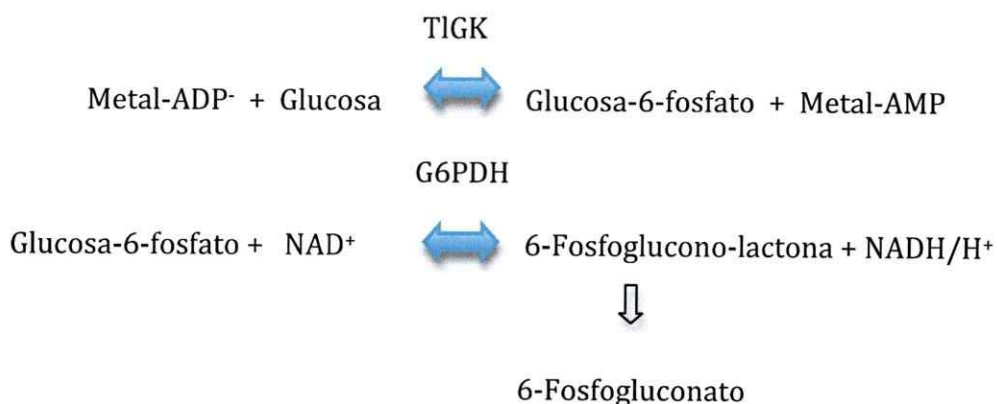
Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteína se estimó usando dos estrategias espectrofotométricas. Empleando la técnica de tinción de proteínas sugeridas por Bradford (1976) o midiendo el total de cromóforos presentes en la proteína que absorben a 280 nm y calculando la concentración de la proteína usando el coeficiente de extensión teórico de $50310 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ó $0,939 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1}$ (ExpASY proteomics server).

Determinación de la actividad enzimática

La determinación de los parámetros cinéticos se realizó a través de mediciones de velocidad inicial, para lo cual la reacción catalizada por la enzima TIGK fue acoplada a la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (G6PDH) que usa como sustrato la glucosa-6-P y NAD^+ . En esta reacción el NAD^+ es reducido, por lo que las medidas pueden ser registradas por seguimiento de la absorbancia a 340 nm. Las determinaciones fueron realizadas a 40° C , temperatura en la cual la enzima

auxiliar permanece activa y la enzima de *T. litoralis* está lo suficientemente activa (Kengen y col., 1995). Todas las determinaciones se llevaron a cabo usando el espectrofotómetro-UV HP 8453, con el porta celda termoestabilizado a 40 °C. El cálculo de la velocidad de la reacción catalizada por la enzima se obtuvo estimando la pendiente de la curva de progreso, usando el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm, valor de 6,22 mM⁻¹·cm⁻¹ (Bergmeyer, 1974), expresando de esta manera la velocidad como número de µmoles de producto glucosa-6-fosfato formados, por mg de enzima por unidad de tiempo.



Tomando en cuenta que el sustrato de la enzima corresponde al complejo metal-nucleótido, fue necesario calcular la concentración de cada una de las especie que se presentan producto del equilibrio. Para ello, se ajustó los datos tomando en cuenta la concentración del complejo metal-nucleótido, a concentraciones conocidas de metal libre y nucleótido libre. Las constantes de asociación para los diferentes complejos empleados en los experimentos cinéticos, fueron tomadas desde la base de datos de Critically:

$$\text{HADP}^{2-} = 1,86 \times 10^6 \text{ M}$$

$$\text{H}_2\text{ADP}^- = 8,91 \times 10^3 \text{ M}$$

$$\text{MgADP}^- = 1,48 \times 10^3 \text{ M}$$

$$\text{MnADP}^- = 1,07 \times 10^4 \text{ M}$$

$$\text{CoADP}^- = 1,51 \times 10^4 \text{ M}$$

Estas constantes fueron introducidas en el programa para cálculos de complejos Complex versión 6, para expresar los datos cinéticos en función de la especie de interés.

En la determinación de la velocidad en la presencia del producto glucosa-6-fosfato, se modificó el protocolo tradicional de medición por otro ensayo que permitiera emplear una concentración elevada de glucosa-6-fosfato y no entorpeciera en la determinación. Por esto, se escogió la determinación que involucró la cuantificación de la desaparición del sustrato ADP para lo cual fue necesario realizar ensayos discontinuos y cuantificar el ADP sin reaccionar. Las reacciones fueron detenidas a diferentes intervalos de tiempo, 0, 30, 60 y 120 segundos, por la denaturación de la enzima usando ácido perclórico al 3%. El ADP fue cuantificado indirectamente mediante el ensayo auxiliar de las enzimas piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH), cuantificando los moles de NADH oxidados por medio del coeficiente de extensión molar teórico del NADH a 340 nm (valor de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Bergmeyer, 1974).



Reacción detenida por la adición de H^+ y posterior neutralización.



En todos los experimentos una unidad de enzima corresponde a la cantidad de TIGK capaz de fosforilar $1 \mu\text{mol}$ de sustrato en 1 minuto, bajo las condiciones experimentales comentadas anteriormente.

Determinación de constantes cinéticas aparentes, K_M y k_{cat}

Las constantes cinéticas, constante de Michaelis (K_M) y constante catalítica (k_{cat}), fueron calculadas ajustando los datos de velocidad inicial de manera independiente para cada uno de los sustratos, usando la estrategia de variar uno de los sustratos manteniendo constante la concentración del co-sustrato se mantenía constante. Los datos fueron ajustados al modelo hiperbólico de Michaelis-Menten (Segel, 1975):

$$v = \frac{v_{max} \cdot S}{K_M + S}$$

Las gráficas se construyeron empleando el software de libre acceso qtiplot, en la plataforma OSX de MAC.

Determinación mecanismo cinético

La nomenclatura escogida para el tratamiento de los datos a los modelos cinéticos, corresponde a la propuesta por Cleland (Cleland, 1970). En ella, para una reacción de tipo Bi-Bi (dos sustratos y dos productos) A y B representan al primer y segundo sustrato, respectivamente, mientras que P y Q representan el primer y último producto liberado desde la enzima, respectivamente. Las constantes K_A , K_B , K_P y K_Q representan las constantes de Michaelis para A, B, P y Q, respectivamente. Finalmente K_{iA} y K_{iB} representan las constantes de inhibición o disociación por los sustratos A y B.

La determinación del mecanismo cinético se realizó utilizando los protocolos clásicos de velocidad inicial. En particular usamos dos estrategias para discriminar el orden de entrada de los sustratos. La primera estrategia consistió en la discriminación entre un mecanismo ping-pong, que involucra la salida de un producto antes de la unión de todos los sustratos a la enzima, o un mecanismo secuencial, que involucra la formación de un complejo ternario entre la enzima y los dos sustratos (EAB). Para esto, fue necesario realizar medidas de velocidad inicial para el sustrato MgADP⁻ a diferentes concentraciones fijas del co-sustrato

glucosa. Lo mismo se realizó en el sentido inverso, mediciones de velocidad inicial para la glucosa a diferentes concentraciones del MgADP⁻. De esta forma con los dos grupos de curvas se estableció el tipo de mecanismo cinético.

Para establecer el orden de entrada de los sustratos, recurrimos a la inhibición por producto. De esta forma estimamos las constantes cinéticas aparentes para MgADP⁻ y glucosa a diferentes concentraciones de ambos productos, glucosa-6-fosfato y MgAMP (Cleland, 1970; Segel, 1975; Campos y col., 1984; Zhang y col., 2006).

Determinación de la concentración de los sustratos

La concentración de ADP, se estimó a través de dos metodologías: cuantificación espectrofotométrica empleando el coeficiente de extensión molar a 260 nm (valor de $15,4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Cole y col., 1997) y por medio de la titulación del ADP usando la misma reacción catalizada por la enzima TIGK, acoplada a la enzima auxiliar glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En esta última metodología se cuantificaron los moles de ADP consumidos a partir de la medida de los moles de NAD⁺ reducidos, empleando el coeficiente de extensión molar del NAD⁺ a 340 nm, $6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Bergmeyer, 1974). Siguiendo esta última estrategia, también se estimó la concentración de la glucosa.

Para el caso de los productos glucosa-6-fosfato (G6P) y AMP la estrategia fue diferente. Para el primero, se empleó sólo la reacción catalizada por la enzima auxiliar G6PDH, cuantificando los moles de G6P, a través de los moles de NAD⁺ reducidos. Para el AMP se empleó el coeficiente de extensión molar de la adenina, utilizado para la cuantificación del ADP.

Determinaciones de estructura secundaria

Los análisis se llevaron a cabo mediante espectroscopia de dicroísmo circular, en el rango de luz ultra-violeta lejano. Las determinaciones fueron realizadas en un espectropolarímetro, JASCO modelo J-815, disponible en el laboratorio del Dr. Richard Garrat, colaborador de nuestro laboratorio, académico del Instituto de Física de Sao Carlos, Universidad de Sao Paulo, Brasil (IFSC-USP). Los registros fueron tomados en el UV lejano, en el intervalo de longitud de onda de 190 a 240 nm, en amortiguador Hepes 20 mM pH 7,8 a 40 °C, empleando una concentración de proteína de 0,15-0,20 mg·mL⁻¹, usando una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico. Los datos se ajustaron usando el programa controlador del instrumento, Spectra Manager, versión 1.53.01 (JASCO Corporation, Japón).

Determinación de la afinidad proteína-ligando

Proteína-metal-nucleótido: La determinación de la afinidad de este complejo se realizó mediante el uso de la técnica de calorimetría isotérmica de titulación (ITC), que nos entregó no solo la información de la afinidad entre la enzima y el complejo metal-nucleótido, sino que además obtuvimos información sobre el ΔH , la estequiometría y por lo tanto ΔS de la reacción. Las determinaciones se realizaron empleando el microcalorímetro VP-ITC (Microcal, GE healthcare), también disponible en el laboratorio del Dr. Richard Garrat. Para cada titulación se preparó un volumen ≈ 2 mL de reacción, que contenía a la TIGK a una concentración de entre 2-10 mg·mL⁻¹, preparada en amortiguador Hepes 25 mM pH 7,8 y MgCl₂ 1 mM. A la muestra se le eliminó el gas disuelto por al menos 10 minutos en vacío termoestabilizado y se incluyó en la celda de medición. Por otro lado, la inyección se preparó con una solución del mismo amortiguador Hepes 25 mM pH 7,8 con ADP 1-5 mM y MgCl₂ equimolar. Las mediciones se registraron a 40 °C.

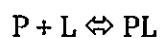
Los datos obtenidos para cada una de las isotermas, se trataron y ajustaron por medio del programa Origin Microcal versión 5.0.

Proteína-Mn²⁺: En este caso se empleó la técnica de resonancia paramagnética del electrón (EPR), que cuantifica las especies libres paramagnéticas en solución. Para estos experimentos se usó el metal divalente Mn²⁺ que cumple con estos criterios electrónicos requeridos para el experimento.

El instrumento empleado para estas determinaciones fue un espectrómetro EPR Bruker Biospin GmbH modelo EMX 1572, disponible en el laboratorio de la Dra. Carolina Aliaga, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. El instrumento fue operado en la banda-X en la frecuencia 9,2-9,9 GHz, usando la cavidad estándar TE₁₀₂, que contaba con un puente de microondas de máximo poder. La cavidad donde se ubicó la muestra se encontraba termoestabilizada a 313 K (40 °C). Los parámetros del equipo fueron ajustados a través del programa WinEPR Acquisition® versión 4.33 y los registros fueron obtenidos y procesados mediante el programa Bruker EMX. El cálculo del cambio para cada condición fue llevado a cabo mediante el programa GRAMS.

Una solución patrón de ≈2 mM de TIGK en amortiguador Hepes 25 mM pH 7,8 se trató con la resina Chelex-100 para la eliminación de metales interferentes en la determinación paramagnética. La concentración total de enzima se varió en cada determinación en un rango de 0-600 μM a una concentración fija de Mn²⁺ de 50 μM. El volumen de muestra incluida en el capilar fue de 70 μL, los que se incubaron en la misma cavidad por 3 minutos previo a la toma del registro. Cada condición se midió 5 veces.

Usando los equilibrios para la formación del complejo proteína-ligando es posible determinar la constante de disociación del complejo. De esta manera los equilibrios quedan definidos como:



$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]}$$

Donde P corresponde a la concentración de proteína libre, L a la concentración de Mn^{2+} libre y PL a la concentración del complejo proteína- Mn^{2+} . Los resultados encontrados para todas las determinaciones proteína-ligando se ajustaron a la ecuación de Scatchard (Fersht, 1998):

$$v = \frac{n \cdot L}{K_D + L}$$

Donde v corresponde al cociente entre el complejo [PL]/[P]total, n la estequiometría, L la concentración del ligando libre y K_D la constante de disociación del complejo proteína-metal. El modelo predice una hipérbola, donde la mitad del cambio corresponde al valor de la K_D del complejo proteína-metal. Sin embargo, en las mediciones el titulado no es la proteína sino que es el Mn^{2+} , por lo que para el ajuste de los datos las especie P y L se intercambian de manera que la expresión de Scatchard queda de la siguiente forma:

$$v = \frac{n \cdot P}{K_D + P}$$

Donde v corresponde al cociente entre el complejo [PL]/[Mn^{2+}] total, n la estequiometría, P la concentración de enzima libre y K_D la constante de disociación del complejo proteína-metal. El ajuste de los datos obtenidos, se realizó empleando el programa Sigma-Plot 10.0 (Systat Software, Inc.).

Determinación de la distribución de la población de las partículas en solución

Para el éxito de las mediciones de SAXS, era necesario contar con una población de moléculas que tuvieron comportamiento monodisperso en solución. Para ello se evaluó el comportamiento de la enzima en solución, a través de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Para esto, se empleó el instrumento Zetasizer Nano, modelo ZS, equipo disponible en el laboratorio de la Dra. Elsa Buin, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. Los datos obtenidos, fueron tratados mediante el programa controlador del instrumento, Dispersion Technology Software 5.10 (Malvern Instruments Ltd.).

Determinación del radio de giro de la enzima en solución. Dispersión de rayos X en bajo ángulo (SAXS)

Para este propósito se empleó la instrumentación disponible en el Laboratorio nacional de Luz Sincrotrón (LNLS), Campinas, Brasil, el cual tiene entre sus instalaciones dos líneas de SAXS, con la cavidad adecuada para mediciones de muestras líquidas. En diferentes ocasiones, se emplearon las líneas SAXS1 y SAXS2, que a pesar de mantener los mismos parámetros, las diferencias se establecen en el detector empleado en cada una de ellas. La línea SAXS1 tiene un detector PILATUS mientras que SAXS2 tiene un detector MarCCD 165.

Los parámetros empleados en la medición fueron los siguientes:

Energía: 8,3 KeV
Vacío: 2-10 mbar
Longitud de onda: 1,488 Å
Distancia detector: 1028 mm
Temperatura celda: 313 K

Para cada condición explorada, se realizó al menos dos registros, los cuales se promediaron, luego de haber sustraído la dispersión proveniente del amortiguador o simplemente de la condición sin enzima. La nueva imagen obtenida se trató con el fin de obtener la correspondiente curva de dispersión que relaciona intensidad a los diferentes ángulos versus ángulo de los rayos dispersados. Este tratamiento de los datos se llevo a cabo por medio del programa FIT2D (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/index.html>).

Las curvas de dispersión obtenidas se emplearon para el estudio del empaquetamiento de la enzima. Para ello se usó una serie de programas incluidos en el paquete de programas ATSAS 2.4 (EMBL). AutoRg fue el primer programa usado (Petoukhov y col., 2007), que permite rápidamente evaluar la calidad de los datos por el empleo de la relación de Guinier. A continuación se usó el programa GNOM para construir las gráficas de distribución de distancias, las que se usaron

para evaluar los radios de giro (R_g) para cada una de las condiciones exploradas (Svergun, 1992). Los programas Gasbor (Svergun y col., 2001) y Dammin (Svergun, 1999), se usaron para construir los modelos tridimensionales *ab initio*, utilizando las curvas de distancias preparadas con el programa GNOM.

Generación de modelos conformación-abierta/cerrada

El modelo de la estructura resulta de la TIGK disponible en la base de datos (www.rcsb.org), presenta una molécula de ADP unida a su sitio activo, en una conformación semi-abierta (1gc5). Los modelos de las estructuras de las GK de *P. horikoshii* (1l2l) y GK de *P. furiosus* (1ua4), enzimas homólogas de la TIGK, están resueltas en ausencia de ligandos y en la presencia de ADP y glucosa, respectivamente. Estas estructuras disponibles, se usaron como templados para construir modelos por homología de la TIGK en conformaciones equivalentes encontradas experimentales para estas dos enzimas. Para la construcción de los modelos tridimensionales se empleó el programa Modeller (Sali y Blundell, 1993). La optimización de estos modelos se realizó mediante el empleo de simulación molecular, usando el programa NAMD, a través de la estrategia de dinámica molecular, explorando un tiempo adecuado para obtener un mínimo de energía para la estructura. La calidad de los modelos construidos se evaluó usando los programas Procheck (Laskowski y col., 1993) y Verify3D (Luthy y col., 1992).

Espectroscopía de fuerza mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Construcción y purificación de la poliproteína

En este caso se empleó la estrategia planteada inicialmente por Carrion-Vázquez y col. (1999), que comprende la construcción de una poliproteína a partir del clonamiento repetitivo del marco de lectura de la proteína formando un concatámero. Como nuestro interés era estudiar el desplegamiento de la TIGK, se preparó una poliproteína que contenía cuatro copias del modulo inmunoglobulina

de la titina I27, los que se encontraban interrumpidas con una copia el gen que codificaba para la TIGK, estrategia equivalente a la empleada por Pérez-Jiménez para el estudio de la proteína fluorescente verde (Pérez-Jiménez y col., 2006). Debido a que durante el proceso de clonamiento es necesario emplear el sitio de restricción *BglII* para permitir la introducción de los nuevos marcos de lectura en la construcción de ácido nucleico, es que fue necesario eliminar el sitio de restricción *BglII* que se encontraba naturalmente en el medio del gen de la TIGK. La eliminación se llevó a cabo usando la misma estrategia que anteriormente se empleó para la fabricación de versiones mutantes de la enzima TIGK, pero que en esta ocasión fue con el propósito de fabricar una versión mutante sinónima para el codón 75, constituido por los nucleótidos ²²³ATC²²⁵, el cual se mutó hasta ATA, ambos codificantes para isoleucina. Más tarde, este nuevo gen modificado, se amplificó mediante PCR, usando partidores que adicionaron el sitio de restricción *BamHI* en el 5', mientras que en el 3' se eliminó el codón de término de la traducción y adicionó dos nuevos sitios de restricción *BglII* y *KpnI*, dos cisteínas terminales, además del nuevo codón de término. El producto de esta reacción se trató con las enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI*, para luego purificarlo y ligarlo a un vector pT7Blue que ya contenía dos repeticiones de I27 y que había sido previamente tratado con las enzimas de restricción *BglII* y *KpnI*, dando origen al primer paso de la construcción. Este nuevo constructo, luego de ser confirmado por secuenciación nucleotídica, se trató con las enzimas *BglII* y *KpnI*, para permitir la entrada de dos repeticiones de I27, de esta forma terminar con el constructo propuesto. En la sección de resultados, **Figura 5.1**, se encuentra un esquema resumen que incluye cada uno de los pasos necesarios para la fabricación del constructo.

El constructo (I27)₂-TIGK-(I27)₂ se liberó desde el vector de clonamiento por medio del uso de las enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI*, y se trasladó hasta un vector de expresión, pQE80L (QIAGEN). Este vector con el nuevo inserto se

empleó para transformar células *E. coli* BLR (DE3) pLysS, sistema de expresión inducible por IPTG.

Las células se crecieron a 37 °C hasta un valor de 0,7 unidades de absorbancia a 600 nm, punto desde donde se inició la expresión de la proteína por la adición de 1 mM de IPTG, modificando la temperatura hasta a 25° C donde se incubaron durante 8 a 12 horas. Los cultivos se cosecharon por centrifugación y las células se lavaron con amortiguador Fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0.

Para solubilizar la proteína, las células provenientes de 400 mL de cultivo se resuspendieron en un volumen de 16 mL del mismo amortiguador fosfato, suplementado con 1 mg·mL⁻¹ de inhibidor de proteasas y lisozima. La solución se incubó en hielo por 30 minutos desde donde luego se trasladó para su agitación por 10 minutos más. A continuación, se adicionaron Triton X-100 al 1%, DNAasa 1 mg·mL⁻¹, RNAasa 1 mg·mL⁻¹ y MgCl₂ 10 mM, incubando la solución por 10 minutos bajo agitación a 4 °C. Luego las células se sometieron a 7 ciclos de sonicación de 1 minuto de extensión. Para asegurar la solubilidad de la enzima la muestra a continuación se sometió a ruptura celular mediante el uso de la prensa de *French*. La solución obtenida se centrifugó a 39.000 g por 40 minutos a 4 °C. El sobrenadante, se trasvasió hasta un nuevo tubo donde se incubó durante 60 minutos a 4 °, con 2 mL de resina Talon (CloneTech) preequilibrada con el mismo amortiguador en el que se encontraba la TIGK. Finalizado este tiempo, la resina con la proteína se centrifugó a 3.000 g por 5 minutos a 4 °C. La resina decantada se lavó con el mismo amortiguador por 20 minutos a 4 °C, bajo agitación. Nuevamente la resina se centrifugó a 3.000 g por 5 minutos a 4 °C, y la resina decantada fue resuspendida en 3 mL de amortiguador y trasladada hasta una columna para continuar con la cromatografía. Se usaron 50 mL del mismo amortiguador, para lavar la resina, seguido por 50 mL extras del amortiguador pero ahora suplementado con 7,5 mM de imidazol. La elución final se llevó a cabo usando el mismo amortiguador pero esta vez suplementado con 150 mM de imidazol. Se colectaron fracciones de 500 µL las que fueron cuantificadas

espectrofotométricamente por absorbancia a 280 nm. Las fracciones seleccionadas se reunieron en un único pool y se prepararon para la aplicación al siguiente paso de purificación que consistió en una cromatografía de exclusión molecular, Sephacryl S200, sistema conectado a un AKTA-FPLC y pre-equilibrado con el amortiguador Hepes 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,2 y EDTA 1 mM. Las fracciones de elevada absorbancia, se sometieron a un análisis de SDS-PAGE.

Experimentos de manipulación

Un volumen variable de entre 5 a 20 μ L de muestra se depositó sobre la lámina con oro evaporado. La muestra fue incubada por al menos 10 minutos, permitiendo la interacción de las proteínas con la superficie y favoreciendo la reducción del volumen de la muestra depositada. Luego de esto, sobre la muestra se ubica la cabeza junto con la celda de fluido, dejando de esta manera la palanca (cantilever) en el ambiente acuoso sobre el oro donde se encuentra depositada la poliproteína.

Para la manipulación se establecieron al menos 3 protocolos. El primero de ellos fue el protocolo de velocidad constante (conocido como Force-eXtension, FX), en el cual el sistema de retroalimentación del instrumento posiciona al piezoeléctrico alejándolo desde la posición de contacto entre la palanca y la superficie a una velocidad constante, predefinida al inicio del experimento. Para cumplir con este protocolo, y en el caso de que la palanca establezca una interacción con la macromolécula depositada en la superficie, el sistema de retroalimentación entregará la información adecuada para que el instrumento deba aplicar mayor fuerza con el propósito de mantener la misma velocidad con la cual se retrae. Este protocolo de estiramiento a velocidad constante, fue empleado para conocer la fuerza en la cual la proteína se despliega. Además, se empleó como herramienta para determinar probables cambios en la fuerza y en la extensión que la proteína o intermediarios mecánicos podía experimentar, gracias a la incorporación de ligandos que inducen cambios estructurales en la enzima.

El segundo protocolo usado, es esencialmente equivalente anterior, es decir, permite obtener las fuerzas y extensiones que tienen los intermediarios mecánicos. Este nuevo protocolo de manipulación, rampa de fuerza (conocido como Force Ramp, FR), tiene la diferencia sobre el protocolo de velocidad constante, en que ahora la señal monitoreada corresponde a la extensión, mientras que la fuerza se modifica en el tiempo a una tasa preestablecida al principio del experimento. De esta forma, se logra explorar una gran cantidad de fuerzas en un breve periodo de tiempo. La ventaja de este último procedimiento, es que presenta una resolución bastante mayor permitiendo encontrar intermediarios o eventos que para los experimentos de FX se ubican apenas por sobre del límite de detección del instrumento.

Finalmente, el tercer protocolo empleado consiste en un régimen de fuerza constante (conocido como Force Clamp, FC), en el cual se observa la evolución del desplegamiento de la poliproteína en el tiempo, en virtud que una fuerza preestablecida con anterioridad se aplica sobre el polímero. De los tres protocolos, este es quizás el mas rico en información, ya que en el se puede establecer con claridad cinéticas de desplegamiento, extensión de los intermediarios, extensión total del polímero, tiempo de pausas para diferentes intermediarios pertenecientes para una proteína, etc.

Para el caso de los registros obtenidos mediante el protocolo de FX, los datos fueron ajustados al modelo de elasticidad de polímeros vermiforme, conocido en el ingles como Worm-Like Chain (WLC):

$$\frac{F \cdot p}{K_B \cdot T} = 0.25 \cdot (1 - x/L)^{-2} - 0.25 + x/L$$

Donde F es fuerza, p es el largo de persistencia del polímero, K_B corresponde a la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, x es la extensión obtenida y L es el largo de contorno del polímero. En el caso de los protocolos FR y FC, la extensión de cada uno de los eventos fueron ajustados por la simple inspección de

las trazas. Todos los datos se trataron y ajustaron usando el programa Igor Pro versión 6.1 (Wavemetrics, Inc.)

La instrumentación empleada para los experimentos de manipulación de moléculas individuales fue proporcionada en el laboratorio del Dr. Julio M. Fernández (Columbia University, New York, EE.UU.), quienes se han dedicado a la fabricación de los instrumentos para poder llevar a cabo este tipo de tareas, no disponible en otros AFM comerciales.

Desplegamiento in silico. Dinámica molecular dirigida

Las simulaciones se realizaron empleando una estrategia similar a la empleada por Carrion-Vazquez (Carrion-Vazquez y col., 2003), que perseguía obtener resolución atómica para correlacionar con los datos obtenidos desde los experimentos de AFM. Sin embargo, para nuestras simulaciones escogimos una estrategia más simplificada, tal como lo realizaron Lee y col. (Lee y col. 2010), que basados en una representación simplificada de la proteína lograron explicar el desplegamiento mecánico de la arquitectura armadillo. Las simulaciones se realizaron usando la aproximación de modelos de Gô implementada en el programa de dinámica molecular Gromacs. Estos modelos tienen la ventaja de imponer un sesgo nativo al incluir información de la estructura de la proteína (proveniente de una estructura cristalográfica, por ejemplo) explícitamente en la función de energía potencial. Esto se realiza al representar de manera simplificada las interacciones no-locales que ocurren entre distintos residuos de la proteína al considerar solamente la componente geométrica (por ende, topológica) que define a estos contactos en la estructura nativa de las proteínas, mientras que desecha la componente energética de dichas interacciones. Este *sesgo nativo* tiene como consecuencia una dramática reducción de la complejidad del campo de fuerza resultante, permitiendo poder simular un sistema en particular en escalas de tiempo de relevancia biológica/experimental, requiriendo un poder de cómputo discreto. Por lo tanto, para casos como es el caso de la TlGK, que se encuentra constituido por gran

numero de átomos (consecuencia del gran numero de aminoácidos constituyentes), esta estrategia es totalmente adecuada. Como el propósito de dinámica molecular era retratar lo más próximo a la realidad la trayectoria de desplegamiento de la enzima, es que se necesitaba disponer una estructura de la proteína que simulara la disposición estructural de la enzima en su conformación abierta. Sin embargo, hasta la fecha de desarrollo de este trabajo sólo existe una estructura con resolución atómica para la TIGK y se encuentra en una disposición denominada semi-abierta, consecuencia de la molécula de ADP que tiene acomodada en el sitio activo (PDB ID 1gc5). Tal como se comentó anteriormente, para los experimentos de SAXS fue necesario constar con un modelo tridimensional de la enzima en la ausencia de ligando. Entonces el mismo modelo de la TIGK construido a partir de la estructura de la enzima PhGK, fue usado como estructura inicial para las dinámicas moleculares de desplegamiento mecánico. Como la idea de estos experimentos era obtener información sobre la trayectoria teórica que tendrían los experimentos de desplegamiento de molécula individual, es que se simularon condiciones que emularon tanto los experimentos de velocidad constante como los de fuerza constante. Para estas simulaciones, se representaron explícitamente todos los átomos pesados de la proteína, descartando solo los hidrógenos. Además, se generó un mapa de contacto representando solo interacciones no-enlazantes entre residuos i y j (donde $j > i+3$) mediante el servidor SMOG (Noel y col., 2010). Estas interacciones fueron analizadas mediante un potencial de Lennard-Jones 6-12, mientras que otras interacciones no-locales fueron consideradas como repulsivas. La forma funcional de este potencial se encuentra descrita previamente (Whitford y col., 2009). Las simulaciones fueron acopladas a un baño de temperatura mediante dinámicas de Langevin, con un tiempo de integración de 0.002τ por paso de simulación, donde τ corresponde a ~ 1 us. La temperatura escogida fue de $0.6-0.7 T/T_f$, donde T_f corresponde a la temperatura a la cual ocurre la transición entre el estado nativo y el estado desplegado. Se escogió una velocidad de estiramiento de $1 \text{ nm} \cdot \tau^{-1}$ y una constante de resorte de $21 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$.

RESULTADOS

I. Purificación de la enzima y mecanismo cinético.

I.A. Clonamiento y sobreexpresión

Células de *E. coli* XI-1Blue se transformaron con el vector pET17b que contenía el gen de la enzima TIGK (**Figura 1.1.A**). La construcción plásmido-inserto se confirmó por medio de electroforesis, encontrando una migración que se ubicó entre la banda de 5.000 pb y 4.000 pb del estándar de tamaño molecular, lo que está de acuerdo con el tamaño del vector (~3.300 pb) sumados a los nucleótidos del gen de la enzima (~1.400 pb).

Las células se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina para poder seleccionar sólo las bacterias que exitosamente habían incluido una copia del vector. Se almacenaron alícuotas de las bacterias transformantes en el cepario del laboratorio, para asegurar la copia de la construcción de ácido nucleico vector-gen-TIGK para los próximos pasos experimentales.

Para la sobreexpresión de la enzima, se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS con el vector pET17b-TIGK, propagado desde el paso anterior en las células de clonamiento. Las células de expresión se crecieron y cosecharon tal como se planteó en la sección anterior. La enzima se purificó siguiendo la estrategia planteada en métodos, encontrando luego del análisis de SDS-PAGE una proteína que migró a los 50,2 KDa y una homogeneidad superior al 95% después del último paso cromatográfico (**Figura 1.1.B y C**). Los diferentes pasos cromatográficos, se evaluaron y resumieron en la **Tabla 1.1**. En ella se puede observar como aumenta la presencia de la enzima TIGK a lo largo de los diferentes pasos cromatográficos, siendo el último paso de purificación la cromatografía de intercambio iónico, y el

que más aumentó la actividad específica. La proteína purificada se almacenó a 4 °C para su posterior empleo.

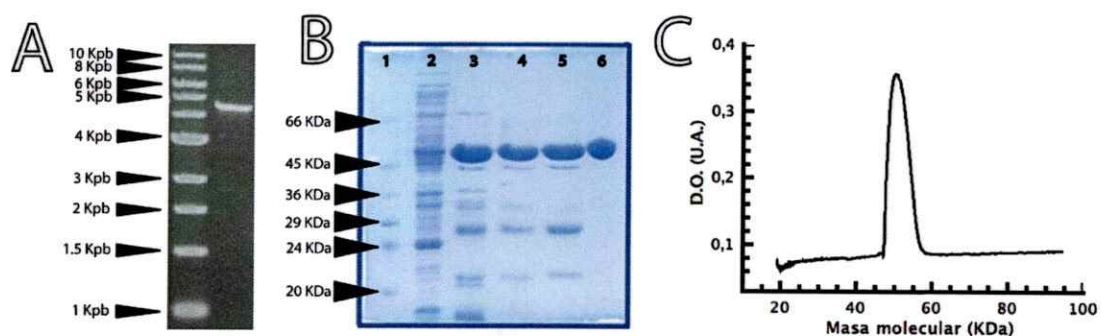


Figura 1.1. Purificación de la enzima TIGK. A. Migración electroforética de vector pET17b con el inserto génico de la enzima TIGK, previamente digerido con la enzima de restricción *NdeI*. B. Análisis de SDS-PAGE para los diferentes pasos de purificación de la enzima TIGK. Carril 1: estándar de masa molecular; carril 2: extracto crudo; carril 3: golpe térmico; carril 4: precipitación con sulfato de amonio; carril 5: cromatografía de interacción hidrofóbica y carril 6: cromatografía de intercambio aniónico. Al costado del carril 1, se encuentran detalladas las masas moleculares de las bandas del estándar de masa molecular. C. Análisis densitográfico de la enzima purificada. La proteína proveniente del último paso cromatográfico (carril 6) se sometió al análisis, encontrando un 99% de homogeneidad. El análisis se llevo a cabo por medio del programa GelPro Analyzer (Métodos).

Tabla 1.1. Resumen pasos de purificación de la enzima TIGK.

Pasos	U/mL	U totales	U/mg	Rendimiento	Purificación
Extracto Crudo	1,8	144	2,8	100	1
Golpe Térmico	1,7	116	13,4	80	4,9
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄	8,5	64	18,9	46	6,9
Interacción hidrofóbica	5,3	53	24,1	36	8,8
Intercambio iónico	4,4	15	41,0	11	14,9

La purificación proviene de 500 mL de cultivo.

I.B. Mecanismo cinético

Estudios cinéticos en velocidad inicial

La reacción catalizada por la enzima involucra la entrada de dos sustratos, MgADP⁻ y glucosa, y la salida de dos productos que han experimentado la redistribución del grupo fosforilo, glucosa-6-fosfato y MgAMP. De esta forma, el mecanismo cinético de la enzima constituye un mecanismo de tipo Bi-Bi, es decir, involucra la entrada de dos sustratos y la salida de dos productos.

La determinación de las constantes cinéticas para los sustratos MgADP⁻ y glucosa, por medio de los estudios de velocidad inicial, tenían como objetivo no tan solo determinar los valores de las constantes cinéticas verdaderas, sino que además discriminar entre los modelos cinéticos ping-pong y secuencial. El primero de ellos involucra una modificación de la enzima, por la entrada del primer sustrato y la liberación de uno de los productos antes de la entrada del segundo sustrato. Mientras que el mecanismo secuencial, requiere la formación del complejo ternario E-A-B, antes de la liberación de los productos.

En el caso del sustrato MgADP⁻ la enzima mostró un comportamiento de tipo hiperbólico para todas las condiciones cinéticas exploradas, razón por la que fue posible aplicar los protocolos habituales empleados para la determinación del mecanismo cinético (**Figura 1.2.A**). Sin embargo, al explorar concentraciones elevadas del co-sustrato glucosa, independiente de la concentración de co-sustrato MgADP⁻, se observó un comportamiento de disminución de la velocidad de la reacción catalizada por la enzima, indicando la inhibición por la presencia del sustrato glucosa (**Figura 1.2.B**). Estos datos se ajustaron a un modelo que considera la inhibición por sustrato, logrando obtener la K_i de la glucosa la cual tiene un valor de 7,5 mM. Debido a que esta inhibición es más bien discreta y solo se genera a concentraciones muy elevadas glucosa, para el estudio de velocidad inicial consideró solo hasta concentraciones menores que 3,5 mM de glucosa.

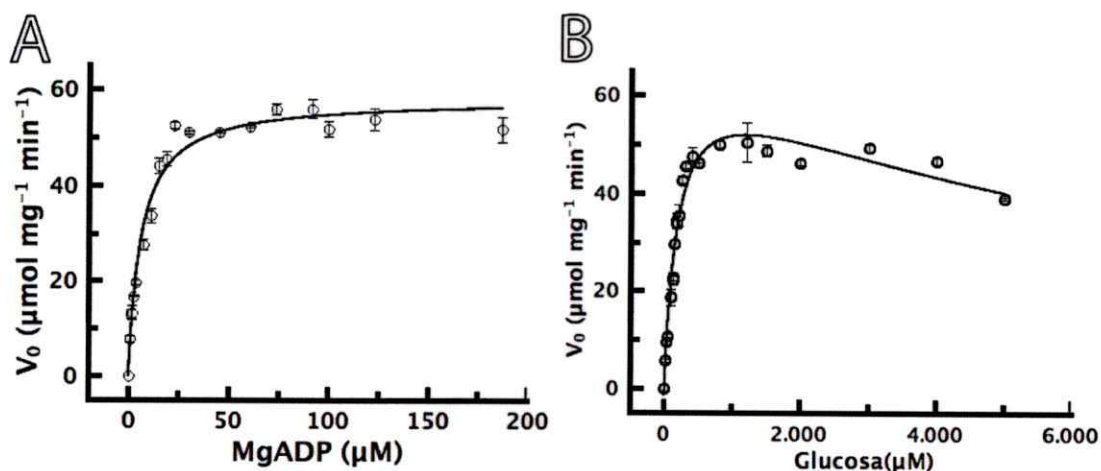


Figura 1.2. Curvas de saturación para los sustratos complejos MgADP⁻ y glucosa. A, curva de saturación para el complejo MgADP⁻ a una concentración fija de glucosa de 1 mM. **B,** curva de saturación de glucosa a una concentración fija de MgADP⁻ de 1 mM. En el caso de A, los datos experimentales fueron ajustados al modelo hiperbólico propuesto por Michaelis, mientras que en B, se empleó un modelo que además consideraba la inhibición por sustrato. Las mediciones se llevaron a cabo a 40 °C y consideran la desviación estándar para cada una de las medidas registradas por triplicado.

El simple ajuste a un modelo hiperbólico como el propuesto por Michaelis-Menten (Métodos), para el total de las curvas de saturación para el sustrato MgADP⁻, a las diferentes concentraciones de glucosa, indican que solo existe una modificación de la velocidad máxima, la cual incrementa de acuerdo al aumento de la glucosa, sin que ocurran cambios significativos en la K_M (Figura 1.3.A y B). El mismo comportamiento se observó para el caso de la glucosa, donde al aumentar la concentración del co-sustrato MgADP⁻, la velocidad máxima de la reacción aumentó pero no así la K_M de la glucosa (Figura 1.3.C y D). En resumen, el aumento de la concentración del co-sustrato, modifica solo la $V_{\text{máx}}$ de la reacción, manteniéndose sin cambios la afinidad por los sustratos. El ajuste a una concentración infinita de glucosa en las gráficas de velocidad para las curvas de saturación de MgADP⁻, entregó un valor de 59,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 1.3.B). Un valor muy próximo se encontró para el del ajuste a una concentración de MgADP⁻ infinita en las curvas de saturación de glucosa, un valor de 62,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 1.3.D).

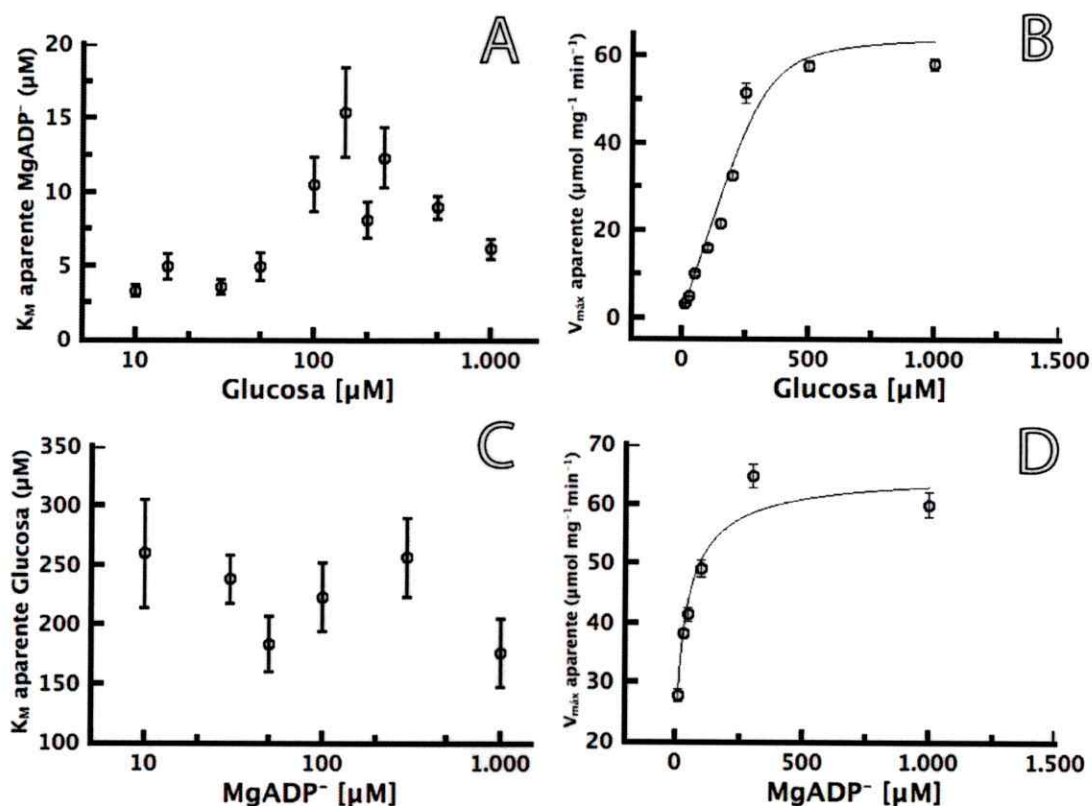


Figura 1.3. Parámetros cinéticos aparentes para los sustratos MgADP $^-$ y glucosa. A y B, corresponden a la constante de afinidad y velocidad aparente para el complejo MgADP $^-$ a diferentes concentraciones del co-sustrato glucosa. C y D, corresponden a la constante de afinidad y velocidad aparente para el sustrato glucosa a diferentes concentraciones del complejo MgADP $^-$. Solo las curvas de velocidad se ajustaron de manera de obtener el valor de la velocidad de la reacción a una concentración de co-sustrato infinita. Las curvas de afinidad cinética, no muestran una tendencia clara de cambio respecto a la variación del co-sustrato.

La representación de dobles recíprocos, gráficas de Lineweaver-Burk ($1/v$ en función de $1/S$) evidencian el claro comportamiento de las curvas, donde para el caso del MgADP $^-$ como sustrato variable, diferentes concentraciones glucosa generan curvas intersectantes (Figura 1.4.C). Lo mismo se encontró para el caso contrario, donde se usó glucosa como sustrato variable (Figura 1.4.D). Este comportamiento refleja un mecanismo cinético de tipo secuencial, indicando que la adición de sustratos es de tipo consecutiva y por lo tanto la formación de un

complejo ternario previo a la liberación de los productos. Por otro lado, mecanismo que incluyen la sustitución de la enzima, como el tipo ping-pong, el estudio de las curvas de dobles recíprocos debe necesariamente entregar curvas que son paralelas entre sí. De esta manera, las curvas presentadas en la **Figura 1.4**, deja fuera de opciones el mecanismo de enzima sustituida.

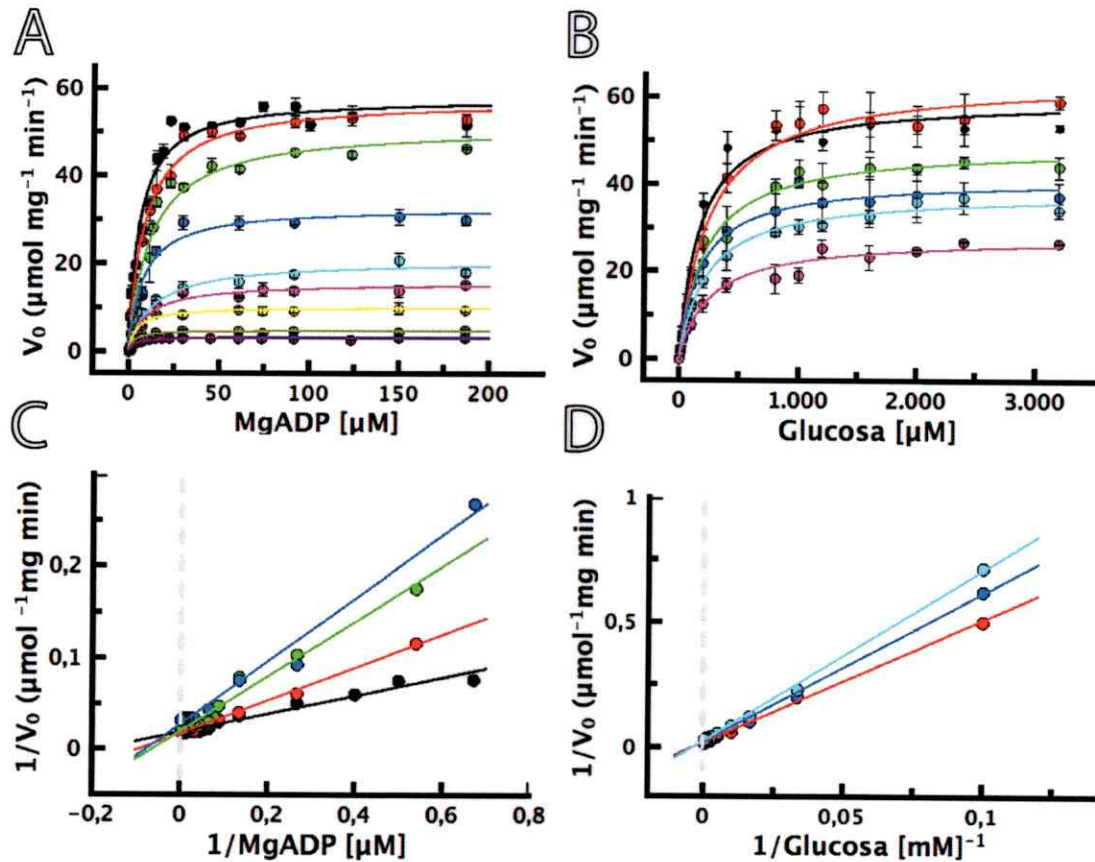


Figura 1.4. Estudios de velocidad inicial para los sustratos complejos MgADP y glucosa. **A**, Curvas de saturación para MgADP a diferentes concentraciones de glucosa. **B**, curvas de saturación de glucosa a diferentes concentraciones de MgADP. Los símbolos en **A**, corresponden a las siguientes concentraciones de glucosa: círculos negros 1000 μM , rojos 500 μM , verdes 250 μM , azules 200 μM , celestes 150 μM , rosados 100 μM , amarillos 50 μM , cafés 30 μM , azules oscuros 15 μM y púrpuras 10 μM . Mientras, que en **B**, los símbolos corresponden a las siguientes concentraciones de MgADP: círculos negros 1000 μM , rojos 300 μM , verdes 100 μM , azules 50 μM , celestes 30 μM y rosados 10 μM . **C** y **D**, corresponden a gráficas de dobles recíprocos de los mismos datos presentados en la figura **A** y **B**. Las mediciones se llevaron a cabo a 40 $^{\circ}\text{C}$ y consideran la desviación estándar para cada una de las medidas registradas por triplicado.

Con el objetivo de determinar de manera más adecuada los parámetros cinéticos de los experimentos de velocidad inicial, es que se recurrió a un modelo que considerará ambos sustratos de manera independiente. Conociendo de que el mecanismo cinético de la enzima consiste en un mecanismo secuencial, como primera tarea se puso a prueba la posibilidad de explicar los datos cinéticos se ajustaron a un modelo bi-sustrato para un mecanismo en secuencia ordenado en régimen de estado estacionario.

$$V_0 = \frac{V \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_B + K_A \cdot B + K_B \cdot A + A \cdot B} \quad \text{(Ecuación 1.1)}$$

Donde V corresponde a la velocidad máxima de la reacción, A y B las concentraciones de los sustratos A y B , K_{ia} la constante de disociación para el complejo enzima- A y K_A y K_B las constantes de Michaelis para los sustratos A y B , respectivamente. Es posible usar la expresión recíproca de la ecuación 1.1 y interpretar los mismos datos de doble recíproco antes comentado, pero esta vez bajo el modelo en secuencia ordenado en régimen de estado estacionario. En este caso la expresión de velocidad para el sustrato A queda de la siguiente forma:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_B}{B}\right) + \frac{K_A}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B}\right) \cdot \frac{1}{A} \quad \text{(Ecuación 1.2)}$$

Mientras que para el caso del sustrato B , el doble recíproco para la expresión de velocidad de la reacción queda de la siguiente forma:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A}\right) + \frac{K_B}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \cdot \frac{1}{B} \quad \text{(Ecuación 1.3)}$$

Con el total de los ensayos de velocidad inicial realizados para los sustratos MgADP y glucosa (**Figura 1.4.A y B**), se construyeron gráficas de dobles recíprocos las que fueron usadas para determinar los parámetros cinéticos bajo el modelo cinético secuencial ordenado (**Figura 1.4 C y D**). Con las intersecciones obtenidas

de cada una estas curvas de dobles recíprocos, se construyeron gráficas secundarias que relacionaron el cambio en la intersección (n) respecto al co-sustrato, tanto para las curvas de saturación de MgADP⁻ como para le curvas de glucosa. Desde estas nuevas gráficas presentadas en la **Figura 1.5**, paneles A y B, fue posible calcular el valor de la velocidad de la reacción además de las constantes de Michaelis para el sustrato B y sustrato A, denominadas como K_B y K_A , respectivamente.

$$n = \frac{1}{V} + \left(\frac{K_B}{V}\right) \cdot \frac{1}{B} \quad \text{(Ecuación 1.4)}$$

$$n = \frac{1}{V} + \left(\frac{K_A}{V}\right) \cdot \frac{1}{A} \quad \text{(Ecuación 1.5)}$$

Las **ecuaciones 1.4 y 1.5**, corresponden a la intersección en la expresión de velocidad para los experimentos de saturación del sustrato A y B, respectivamente (**Ecuación 1.2 y 1.3**). De este modo, la constante de afinidad para el complejo EA tiene una constante K_A calculada desde los ensayos de saturación de B a concentraciones fijas de A, un valor de 3,4 μM . Mientras que la constante K_B calculada desde los ensayos de saturación de A, a concentraciones fijas de B, un valor de 125,7 μM (**Tabla 1.2**).

Tomando ahora en cuenta el cambio de las pendientes (m) desde la gráficas de Lineweaver-Burk para los diferentes ensayos de saturación de A y B (**Figura 1.4.C y D**), es posible calcular la K_{ia} que corresponde a la constante de disociación para el complejo EA o también denominada como la constante de inhibición para el sustrato A. Al relacionar el cambio de las pendientes encontradas en las graficas de dobles recíprocos respecto a las diferentes concentraciones del co-sustrato glucosa en los ensayos de saturación de MgADP⁻ (**Ecuación 1.6**), la intersección de la recta en el eje de las abcisas corresponde a $-K_A/K_{ia}K_B$ y cuando el co-sustrato es MgADP⁻

en los ensayos de saturación de glucosa (**Ecuación 1.7**), la intersección de la recta en el eje de las abscisas corresponde a $-1/K_{ia}$.

$$m = \frac{K_A}{V} + \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{V}\right) \cdot \frac{1}{B} \quad (\text{Ecuación 1.6})$$

$$m = \frac{K_B}{V} + \left(\frac{K_B \cdot K_{ia}}{V}\right) \cdot \frac{1}{A} \quad (\text{Ecuación 1.7})$$

El valor calculado por uno u otro ensayo, arrojó un valor para la K_{ia} de 33,9 y 13,6 μM , dependiendo si la determinación se realizó con la curva **1.3.C** ó **1.3.D**.

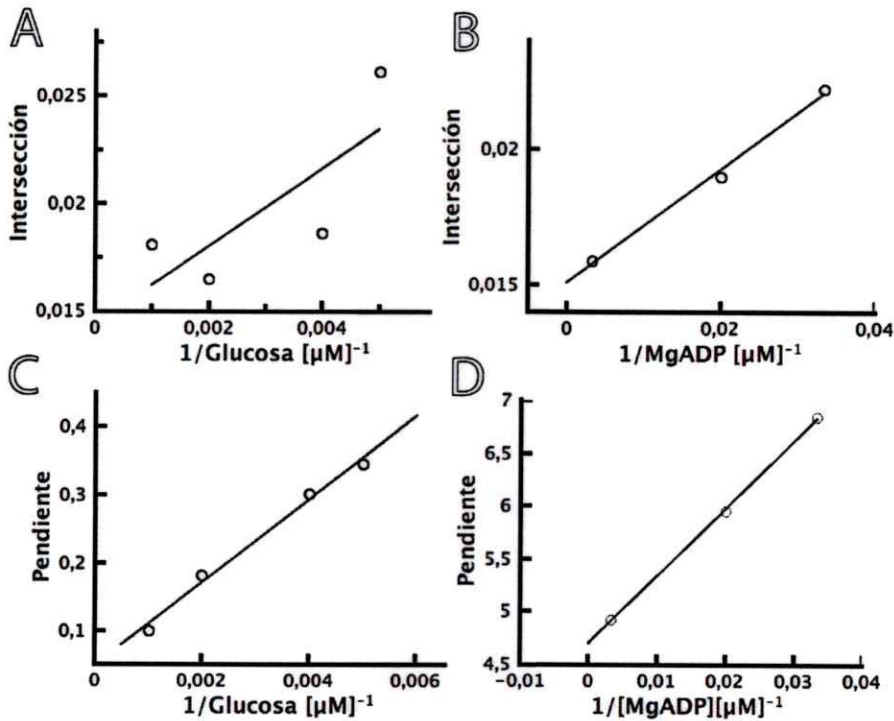


Figura 1.5. Gráficas secundarias calculadas para la determinación de los parámetros cinéticos bajo supuesto de mecanismo cinético ordenado secuencial. **A**, Relación entre la intersección y el co-sustrato glucosa, para la saturación de MgADP⁻ de la figura 1.2.C. **B**, Relación entre la intersección y el co-sustrato MgADP⁻, para la saturación de glucosa de la figura 1.2.D. **C**, Relación entre la pendiente y el co-sustrato glucosa, para la saturación de MgADP⁻ de la figura 1.2.C. **D**, Relación entre la pendiente y el co-sustrato MgADP⁻, para la saturación de glucosa de la figura 1.2.D.

En la **Tabla 1.2** se resumen los valores para las diferentes constantes cinéticas calculadas para el sustrato MgADP⁻ y glucosa, además de la velocidad máxima de la reacción, estimados por medio del ajuste al modelo cinético bi-sustrato secuencial ordenado, presentado en la ecuación 1.1.

Tabla 1.2. Parámetros cinéticos para los sustratos MgADP⁻ y glucosa, en la reacción catalizada por la enzima TIGK silvestre.

	Ajuste con MgADP ⁻ variable	Ajuste con Glucosa variable
K_A (μM)	3,4	13,8
K_B (μM)	125,7	311,3
K_{ia} (μM)	33,9	13,6
$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	69,4	66,2

Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 40 °C.

El ajuste de las curvas al modelo cinético secuencial ordenado, permitió obtener un valor de velocidad máxima y las diferentes constantes cinéticas K_M para los sustratos, las que fueron bastante próximas a las encontradas por el simple ajuste al modelo hiperbólico (**Tabla 1.2** respecto **Figura 1.3**). Sin embargo, la K_{ia} solo fue posible determinar luego de la interpretación de los datos bajo el supuesto del modelo ordenado secuencial. El valor de esta constante de inhibición es bastante pequeño, de hecho muy próximo al valor de la K_M para el sustrato A. Para caso mas extremos, donde la K_{ia} es mas pequeña que la K_A , es corriente encontrar curvas que se vuelven insensibles a los cambios en la concentración del co-sustrato y la familia de rectas aparecen como rectas paralelas, a pesar de que el mecanismo sea en secuencia.

Tabla 1.3. Resumen de parámetros cinéticos para los sustratos MgADP⁻ y glucosa, en la reacción catalizada por la enzima TIGK silvestre.

	K_M (μM) [¶]	K_M (μM) [‡]	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) [¶]	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) [‡]	k_{cat} (s^{-1}) [¶]	k_{cat} (s^{-1}) [‡]	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$) [¶]	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$) [‡]
MgADP ⁻	8,1	8,6	60,8	67,8	54,2	60,5	$6,7 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$
Glucosa	208,3	218,5	60,8	67,8	54,2	60,5	$2,6 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$

¶ corresponden al ajuste presentado en la **Figura 1.3** empleando el modelo hiperbólico

‡ corresponde al ajuste empleando el modelo bi-sustrato secuencial ordenado. Para el caso de la K_M y $V_{\text{máx}}$ estimada para los datos (‡), se informa la media obtenido entre los ajuste para los ensayos con el sustrato variable MgADP⁻ y glucosa (**Tabla 1.2**).

Análisis de velocidad inicial en presencia de los productos

Para distinguir entre las distintas posibilidades de un mecanismo en secuencia, es decir, entre un mecanismo que no tiene predeterminado el orden de entrada de los sustratos, mecanismo al azar, o un mecanismo donde el orden de entrada de los sustratos es obligado, mecanismo ordenado, fue necesario realizar experimentos que permitieran discriminar entre ambas posibilidades. La inhibición por producto fue la estrategia escogida, debido a que sin lugar a duda el inhibidor clásico para cualquier reacción catalizada por una enzima es el mismo producto por lo que este tipo de estudios forman parte de cualquier tipo de estudios cinéticos, debido a que los productos son los sustratos de la reacción en el sentido contrario por lo que se espera que formen complejos con la enzima. Cada uno de estos complejos entre la enzima y los productos llevan a una forma no catalítica, por lo que se desencadena una inhibición de la reacción, en la cual su naturaleza de inhibición dependerá respecto al sustrato que es variado y cual producto es el que ha sido empleado como inhibidor. En este sentido, estudiando el tipo de inhibición mostrado por los diferentes productos respecto a los sustratos, es posible determinar por que tipo de forma de enzima compiten los sustratos y productos. Para el caso del mecanismo al azar Bi-Bi, donde no existe un orden predeterminado en la adición de los sustratos, la inhibición que ejercen los productos sobre los

sustratos es de tipo competitiva, esto debido a que tanto los sustratos A y B, como los productos P y Q, pueden unirse a la forma libre de la enzima, E. Por otro lado, para el caso de un mecanismo Bi-Bi con adición ordenada de los sustratos, solo el sustrato A y Q se unen a formas de enzima equivalentes, la denominada forma libre o E. Mientras que el sustrato B, se une al complejo binario EA y el producto P se une a la forma EQ. De este modo, del total de las cuatro combinaciones de inhibición Q sobre A, Q sobre B, P sobre A y P sobre B, sólo la combinación que involucra al producto Q sobre el sustrato A, tiene una inhibición de tipo competitiva, mientras que las otras tres combinaciones presentan una inhibición de tipo no competitiva ya que compiten por formas de diferentes de enzima.

Para el caso de la TIGK se usaron los producto de la reacción, el MgAMP y glucosa-6-fosfato, estimando el tipo de inhibición que éstos generaban sobre los sustratos MgADP⁻ y glucosa. Cuatro grupos de curvas de inhibición se estudiaron: MgAMP sobre MgADP⁻, MgAMP sobre glucosa, glucosa-6-fosfato sobre MgADP⁻ y finalmente glucosa-6-fosfato sobre glucosa (**Figura 1.6**). El ajuste de los datos a un modelo hiperbólico simple como el propuesto por Michaelis (Métodos), permite conocer rápidamente el comportamiento que tienen los productos sobre las curvas de saturación para los sustratos MgADP⁻ y glucosa, a través de la determinación de las constantes cinéticas aparentes K_M y $V_{m\acute{a}x}$.

En el caso particular de los ensayos de inhibición por MgAMP sobre el sustrato MgADP⁻, fue necesario previamente confirmar efectivamente que la inhibición era producto de la acción del complejo MgAMP y no AMP libre en solución. De este modo, para estos ensayos se fijó la concentración de Mg²⁺ libre en 3 mM para favorecer la formación del complejo MgAMP y permitir variar la concentración del sustrato MgADP⁻ en el rango de trabajo. El co-sustrato glucosa, fue mantenido en estos ensayos a una concentración de 1000 μ M, que corresponde a una concentración de 6 veces K_M , por lo que podríamos decir que se encuentra en bajo la saturación pero tiene la ventaja que esta lejos de la concentración donde comienza el fenómeno de inhibición de sustrato (**Figura 1.2**).

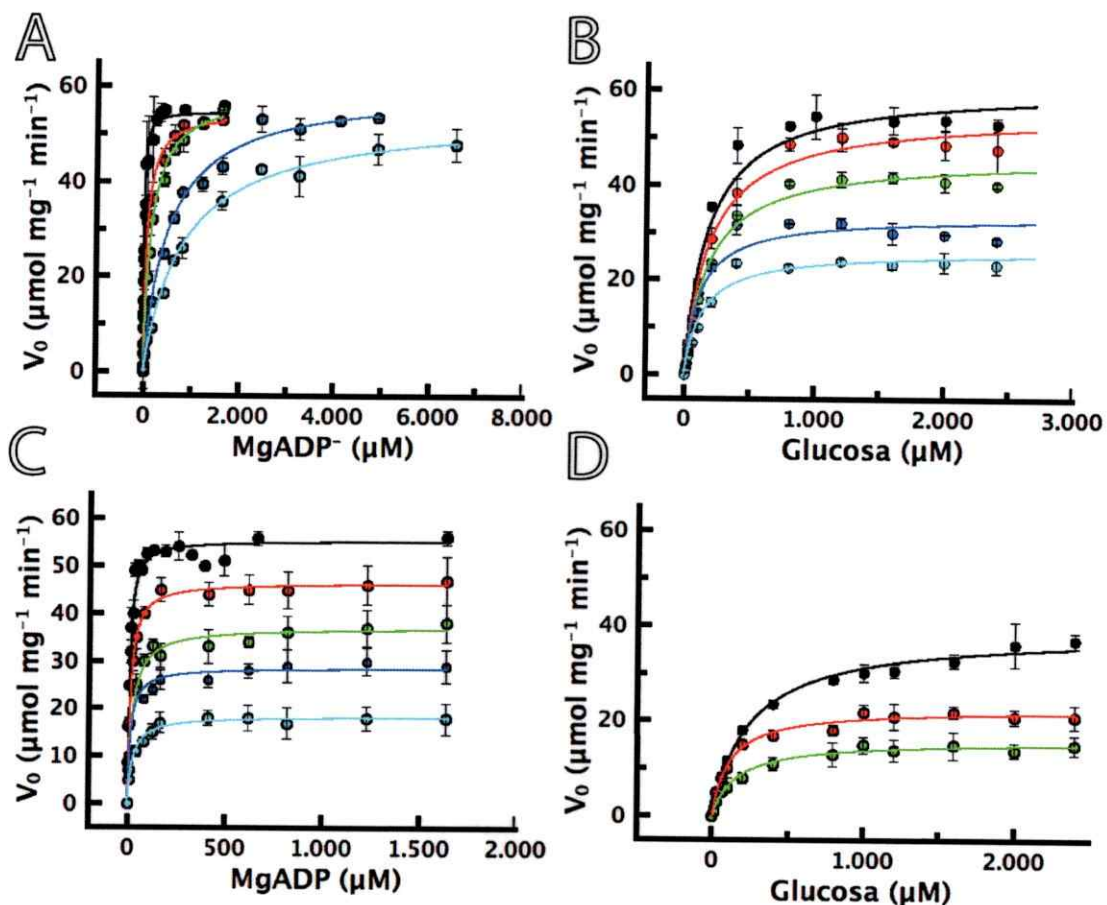


Figura 1.6. Curvas de saturación para los sustratos MgADP⁻ y glucosa, en presencia de los productos de la reacción MgAMP y glucosa-6-fosfato. **A**, Curvas de saturación para MgADP⁻ a una concentración fija de glucosa de 500 μM , a diferentes concentraciones de MgAMP. **B**, curvas de saturación de glucosa a diferentes concentraciones de MgAMP. **C**, Curvas de saturación para MgADP⁻ a diferentes concentraciones de Glucosa-6-P. **D**, curvas de saturación de glucosa a diferentes concentraciones de glucosa-6-P. Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 40 °C.

Se ensayaron diferentes concentraciones del producto MgAMP, donde el aumento de la concentración del producto provocó que fuese necesario aumentar la concentración del sustrato MgADP⁻ para lograr la misma velocidad máxima de la reacción. Experimentalmente se ensayaron condiciones de 100 (círculos rojos), 200 (círculos verdes), 600 (círculos azules) y 1000 μM (círculos celestes) de MgAMP, además de la condición control en la ausencia de inhibidor (círculos negros),

graficas presentadas en la **Figura 1.6.A**. La estimación de las constantes aparentes por medio del ajuste hiperbólico indican la ausencia de cambios en la $V_{m\acute{a}x}$ pero la modificación de la afinidad cinética K_M (**Figura 1.7.A y B**). En concreto, esta condición modificó la afinidad cinética K_M pero no así la $V_{m\acute{a}x}$. Estos resultados son consistentes con una inhibición de tipo competitiva del MgAMP con respecto a $MgADP^-$, por lo que podemos estar seguro de que ambos ligandos, $MgADP^-$ como MgAMP, compiten por la misma forma de enzima.

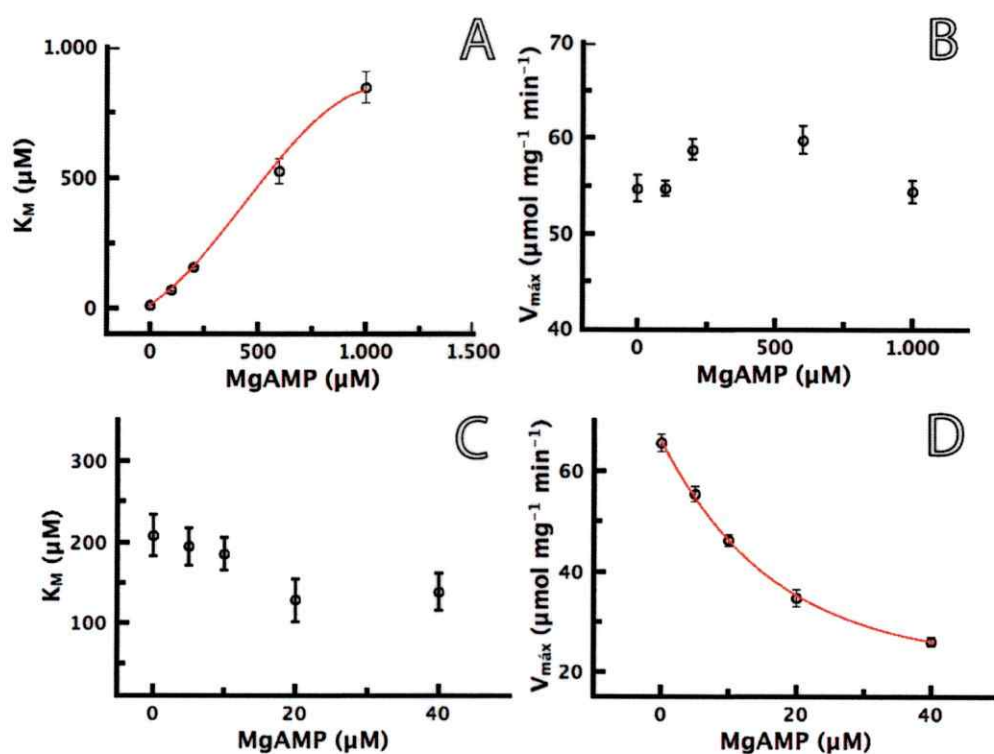


Figura 1.7. Efecto del MgAMP sobre los parámetros cinéticos de los sustratos $MgADP^-$ y glucosa. A, efecto del MgAMP sobre la K_M para el complejo $MgADP^-$. B, efecto del MgAMP sobre la $V_{m\acute{a}x}$ para el en los ensayos de saturación con el complejo $MgADP^-$. C, efecto del MgAMP sobre la K_M de la glucosa. D, efecto del MgAMP sobre la $V_{m\acute{a}x}$ en los ensayos de saturación con glucosa. Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 40 °C.

Por otro lado, en el caso del co-sustrato glucosa, MgAMP tiene un comportamiento totalmente diferente. Para concentraciones fijas de $MgADP^-$ y de Mg^{2+} libre de 1 mM, el producto MgAMP el que fue empleado a 425 μM (círculos

rojos), 858 μM (círculos verdes), 1738 μM (círculos azules) y 3658 μM (círculos celestes), además de la situación en la ausencia de inhibidor (círculos negros), ejerce su efecto inhibitor únicamente sobre la $V_{\text{máx}}$ (Figura 1.6.B). Los ajustes hiperbólicos permiten comprobar éste fenómeno de cambio en la velocidad máxima de la reacción con una mantención de la afinidad cinética por el sustrato glucosa K_M glucosa (Figura 1.7.C y D). De este modo, MgAMP se comporta como un inhibidor no competitivo por lo que MgAMP y el sustrato glucosa compiten por formas de enzima totalmente diferentes.

En el caso del otro producto de la reacción glucosa-6-fosfato, la inhibición sobre MgADP⁻ empleando concentraciones constantes de glucosa y Mg²⁺ de 1 mM, el producto glucosa-6-P el que se usó a 100 μM (círculos rojos), 500 μM (círculos verdes), 1000 μM (círculos azules) y 2000 μM (círculos celestes), además de la condición control en la ausencia de inhibidor (círculos negros), generó una comportamiento típico inhibición de tipo no competitivo sobre el MgADP⁻, afectando solo la $V_{\text{máx}}$ de la reacción pero no la K_M , lo cual es indicativo que los ligandos compiten por diferentes formas de enzima (Figura 1.6.C). El ajuste de los datos al modelo hiperbólico permitió determinar los cambios sobre la $V_{\text{máx}}$ y la ausencia de cambios sobre la afinidad cinética K_M (Figura 1.8.A y B).

Finalmente, se estudió el efecto de la glucosa-6-fosfato sobre la glucosa. Como se conocía que la enzima tenía un mecanismo de tipo secuencial y con la evidencia de que sólo una de las inhibiciones hasta aquí descritas era competitiva, era indicativa de que el orden de la adición de los sustrato era ordenada, MgADP⁻ como primer sustrato en unirse y MgAMP como último producto en ser liberado (evidencia la inhibición competitiva, o competencia por la misma forma de enzima). De este modo, antes de este experimento se sospechaba de que glucosa y glucosa-6-fosfato eran las especies B y P, respectivamente. De esta forma, debía evitarse la conexión entre la reacción para la formación de glucosa-6-P con su correspondiente reacción inversa, por lo que los ensayos para la inhibición ejercida por glucosa-6-P sobre la entrada de glucosa, debían ser realizados a

concentraciones próximas a la K_M para el complejo $MgADP^-$, evitando la conexión entre sustratos y productos. Glucosa-6-fosfato se usó como inhibidor a dos concentraciones diferentes de $500 \mu M$ (círculos rojos) y $2000 \mu M$ (círculos verdes), a concentraciones constantes de $MgADP^-$ y Mg^{2+} libre de 1 mM (Figura 1.6.D). El ajuste de los datos al modelo hiperbólico, permitió calcular los cambios sobre la $V_{m\acute{a}x}$ y la ausencia de cambios sobre la afinidad cinética K_M (Figura 1.8.C y D). El resultado encontrado indica una inhibición de tipo no competitiva del producto glucosa-6-P sobre la glucosa, lo que es indicador de que ambos ligandos se unen a formas no equivalente de enzima.

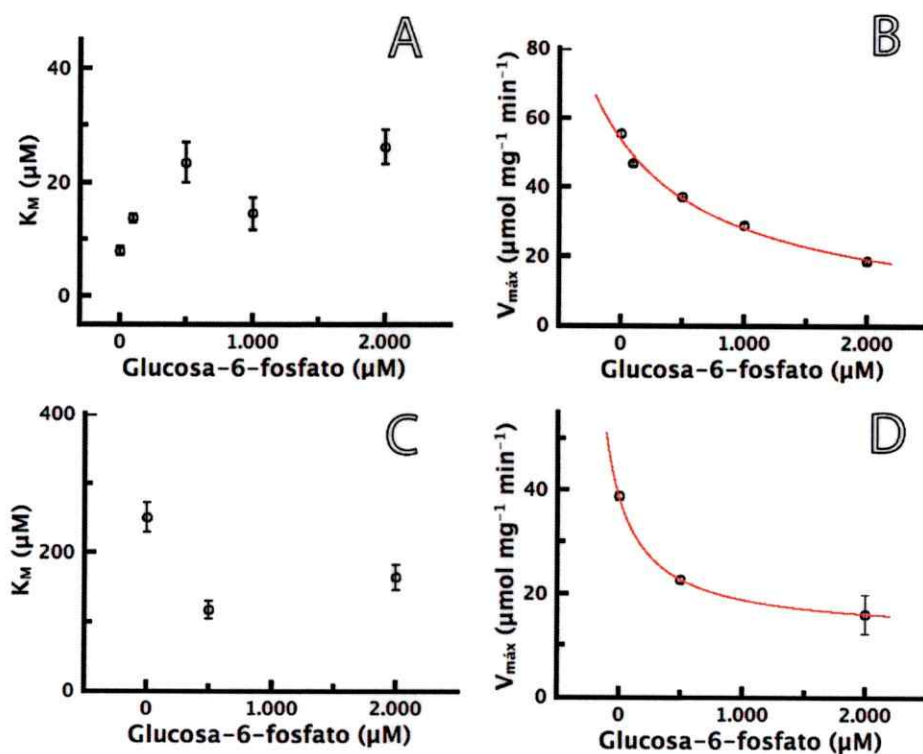


Figura 1.8. Efecto del producto glucosa-6-P sobre los parámetros cinéticos de los sustratos $MgADP^-$ y glucosa. **A**, efecto de la glucosa-6-P sobre la K_M para el complejo $MgADP^-$. **B**, efecto de la glucosa-6-P sobre la $V_{m\acute{a}x}$ para el en los ensayos de saturación con el complejo $MgADP^-$. **C**, efecto de la glucosa-6-P sobre la K_M de la glucosa. **D**, efecto de la glucosa-6-P sobre la $V_{m\acute{a}x}$ en los ensayos de saturación con glucosa. Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 40° C .

Con la intención de darle una interpretación más adecuada a los resultados de inhibición por producto, permitiéndonos sugerir el orden de entrada de los sustratos además de determinar las constantes de inhibición para los productos K_{iq} y K_{ip} , es que se decidió ajustar los datos de inhibición a un modelo que considerará la presencia de los productos P y Q para un mecanismo de dos sustratos con entrada secuencial ordenada.

La expresión de velocidad para la inhibición del producto Q sobre el sustrato A, a concentraciones constantes del co-sustrato B es la siguiente:

$$v_0 = \frac{A \cdot V_{\max}}{K_A \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_{iq} \cdot K_B}{K_A \cdot B}\right) + A \cdot \left(1 + \frac{K_B}{B}\right)} \quad \text{(Ecuación 1.8)}$$

Donde V_{\max} , es la velocidad máxima de la reacción, A corresponde a la concentración del sustrato A, variable en estos ensayos, B la concentración del sustrato B la cual se mantiene constante en estos ensayos, K_A la constante de afinidad para A, K_B la constante de afinidad para B, Q la concentración del producto Q y K_{iq} la constante de disociación del producto Q.

Por otro lado, la expresión de velocidad para la inhibición del producto Q sobre el sustrato B, a concentraciones constantes del co-sustrato A es la siguiente:

$$v_0 = \frac{B \cdot V_{\max}}{K_B \cdot \left[1 + \frac{K_{iq}}{A} \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}}\right)\right] + B \cdot \left[1 + \frac{K_A}{A} \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}}\right)\right]} \quad \text{(Ecuación 1.9)}$$

Nuevamente V_{\max} es la velocidad máxima de la reacción, B la concentración de B, variable en estos ensayos, A corresponde a la concentración del sustrato A fijo en estos ensayos, Q la concentración del producto Q, K_A la constante de afinidad para el sustrato A, K_B la constante de afinidad para el sustrato B y K_{iq} la constante de disociación del producto Q.

Ambas expresiones de velocidad, permiten determinar la K_{iq} , lo cual se puede llevar a cabo por medio de la evaluación de las pendientes e intersecciones de las graficas de doble recíprocos para estas expresiones de velocidades. Para el caso de la inhibición de Q sobre el sustrato A, esta nueva ecuación queda expresada de la siguiente manera:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_A}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B}\right) \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}}\right) \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_B}{B}\right) \quad \text{(Ecuación 1.10)}$$

Para el otro sustrato, la expresión queda de la siguiente forma:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_B}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq} \cdot \left(1 + \frac{A}{K_A}\right)}\right) \cdot \frac{1}{B} + \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A}\right) \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq} \cdot \left(1 + \frac{A}{K_A}\right)}\right) \quad \text{(Ecuación 1.11)}$$

El producto Q tiene un comportamiento como inhibidor que es diferente para cada uno de los sustratos. Por ejemplo para A, el producto Q como se puede observar desde la expresión de velocidad **Ecuación 1.10**, sólo afecta la afinidad aparente, por lo que genera una inhibición de tipo competitivo Q sobre A. Mientras que para el caso de B, Q tiene un comportamiento diferente ya que en este caso el producto Q afecta el término de la velocidad de la reacción. Por lo que Q sobre B genera un comportamiento de tipo no competitivo.

Para el caso de P, el primer producto en ser liberado luego del proceso catalítico, tiene una relación muy particular con los sustratos A y B. Como P se une a una forma de enzima diferente a la que lo hace A y B, el producto P tiene un comportamiento de tipo no competitivo tanto sobre A como sobre B. La expresión de velocidad para la inhibición de P sobre A, es la siguiente:

$$v_0 = \frac{A \cdot V_{\max}}{K_A \cdot \left[1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B} \cdot \left(1 + \frac{K_Q \cdot P}{K_{iq} \cdot K_P}\right)\right] + A \cdot \left[1 + \frac{K_B}{B} \cdot \left(1 + \frac{K_Q \cdot P}{K_{iq} \cdot K_P}\right) + \frac{P}{K_{ip}}\right]} \quad \text{(Ecuación 1.12)}$$

En el caso de B, la expresión de velocidad para la inhibición generado por P es la siguiente:

$$v_0 = \frac{B \cdot V_{\max}}{K_B \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_Q \cdot P}{K_{iq} \cdot K_P}\right) + B \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A} + \frac{P}{K_{ip}}\right)} \quad \text{(Ecuación 1.13)}$$

Ambas ecuaciones de velocidad pueden ser también expresadas a través de sus respectivos recíprocos:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_A}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B}\right) \cdot \left(1 + \frac{P}{K_P \cdot \frac{K_{ia}}{K_Q} \cdot \left(1 + \frac{K_A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_B}\right)}\right) \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_B}{B}\right) \cdot \left(1 + \frac{P}{\frac{\left(1 + \frac{K_B}{B}\right)}{\frac{1}{K_{ip}} \cdot \left(\frac{K_Q \cdot K_B}{K_P \cdot K_{iq}}\right) \cdot B}}\right)} \quad \text{(Ecuación 1.14)}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_B}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \cdot \left(1 + \frac{P}{K_P \cdot \frac{K_{ia}}{K_Q}}\right) \cdot \frac{1}{B} + \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A}\right) \cdot \left(1 + \frac{P}{K_{ip} \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A}\right)}\right)} \quad \text{(Ecuación 1.15)}$$

En ambos casos, el producto P se comporta como un inhibidor de tipo no competitivo, el cual afecta el parámetro cinético relacionado a la velocidad máxima de la reacción. Tomando entonces en consideración todo lo anterior, evaluado por medio de gráficas de dobles recíprocos los datos de las inhibición será posible conocer la identidad de las especies A, B, P y Q. Como ya se tenía la información de los ajustes para la determinación aparente de las constantes cinéticas (Figura 1.6, 1.7 y 1.8), se empleó el ajuste bajo el supuesto de que la especie A correspondía al complejo MgADP⁻, la especie B al sustrato glucosa, el producto P a la glucosa-6-fosfato y finalmente Q al producto MgAMP.

En la representación de Lineweaver-Burk para la inhibición de MgAMP sobre el sustrato MgADP⁻ se encontraron curvas intersectantes que coinciden en el eje de las ordenadas (Figura 1.9.A). Este tipo de comportamiento es típico de inhibiciones de tipo competitivas, donde la intersección en el eje de las ordenadas

se mantiene ya que la inhibición afecta sólo la afinidad cinética, la cual se deduce por cambios en la intersección de las curvas sobre el eje de las abscisas. Con el valor de las pendientes y de las intersecciones obtenidas en la **Figura 1.9.A**, se construyeron gráficas secundarias que relacionaron estos parámetros con la concentración del inhibidor MgADP (**Figura 1.10.A y B**). Empleando la expresión de velocidad considerando ya sea la pendiente o la intersección de la **Ecuación 1.10**, se logró calcular el valor de la K_{iq} , que corresponde a la constante de inhibición del producto Q (**Tabla 1.4**).

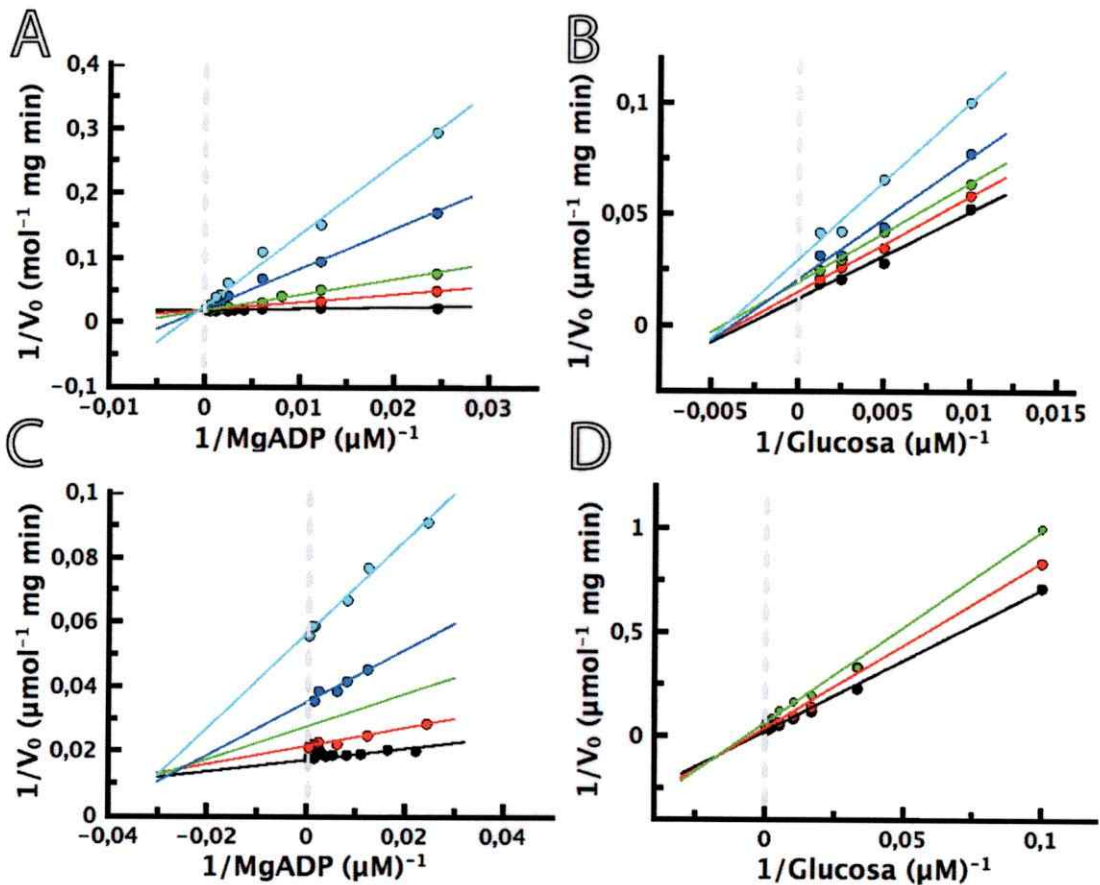


Figura 1.9. Gráficas de dobles recíprocos para los ensayos de inhibición por producto. A, B, C y D, corresponden a las mismas curvas de saturación presentadas en la **Figura 1.6**. Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 40 °C.

El mismo producto MgAMP, para el caso de la glucosa las curvas coinciden en la intersección sobre el eje de las abscisas, por lo que la K_M se mantiene a pesar de la adición del inhibidor. Sin embargo, la pendiente modificó en virtud de la adición del MgAMP, por lo que este afectaría la velocidad de la reacción (Figura 1.9.B). Al igual que en el caso anterior, el empleo de gráficas secundarias para las diferentes pendientes e intersecciones y usando la expresión de velocidad presentado en la Ecuación 1.11, permitió nuevamente calcular el valor de la constante de inhibición del producto MgAMP (K_{iq}) (Figura 1.10.C y D) (Tabla 1.4).

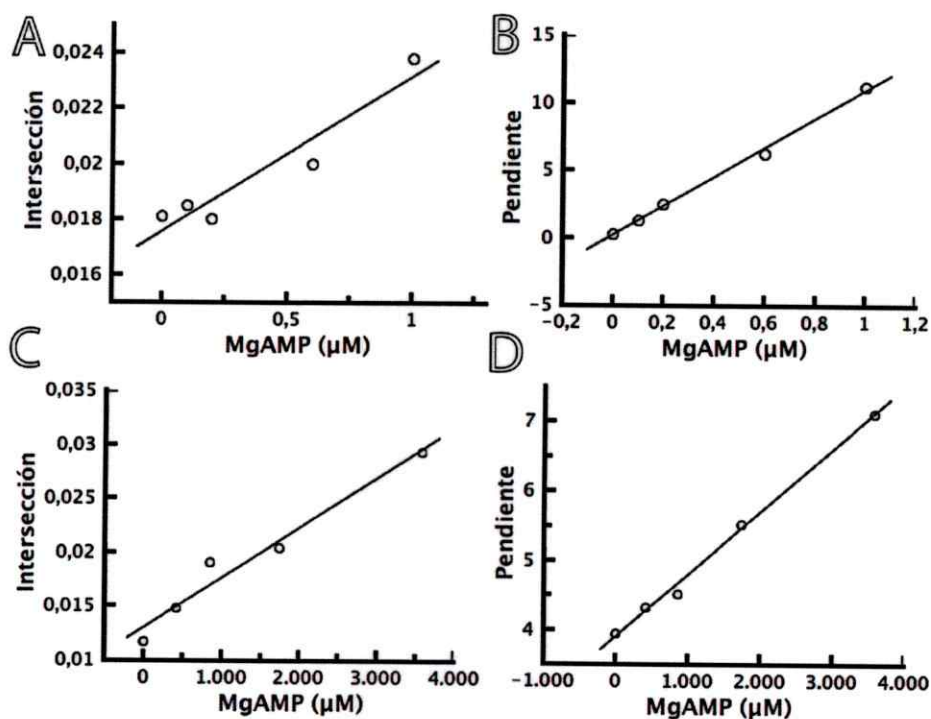


Figura 1.10. Gráficas secundarias calculadas para la determinación del efecto del producto MgAMP sobre los parámetros cinéticos para los sustratos MgADP⁻ y glucosa. **A**, Relación entre la intersección y el producto MgAMP, para los ensayos de saturación de MgADP⁻ de la figura 1.9.A. **B**, Relación entre la pendiente y el producto MgAMP, los ensayos de saturación de MgADP⁻ de la figura 1.9.A. **C**, Relación entre la intersección y el producto MgAMP, para la saturación de glucosa de la figura 1.9.B. **D**, Relación entre la pendiente y el producto MgAMP, para la saturación de glucosa de la figura 1.9.B.

Para el otro producto de la reacción, glucosa-6-fosfato, en la representación de Lineweaver-Burk en el caso del sustrato MgADP^- , se obtuvieron curvas intersectantes en las que se mantuvo el punto de intersección en el eje de las abscisas pero con cambio en las pendientes para las curvas a las diferentes concentraciones del producto glucosa-6-fosfato (**Figura 1.9.C**). Lo mismo se encontró para el caso de la inhibición de la glucosa-6-fosfato sobre el sustrato glucosa, donde solo se observaron cambios en la pendiente con ausencia de cambios en la intersección de las curvas en el eje de las abscisas (**Figura 1.9.D**). El estudio de las pendientes e intersecciones (**Figura 1.11**), ajustadas a las expresiones de velocidad presentadas en las **Ecuaciones 1.14** y **1.15**, nos permitieron determinar la constante de inhibición del producto P para las cinéticas de los sustratos A y B (K_{ip}) (**Tabla 1.4**).

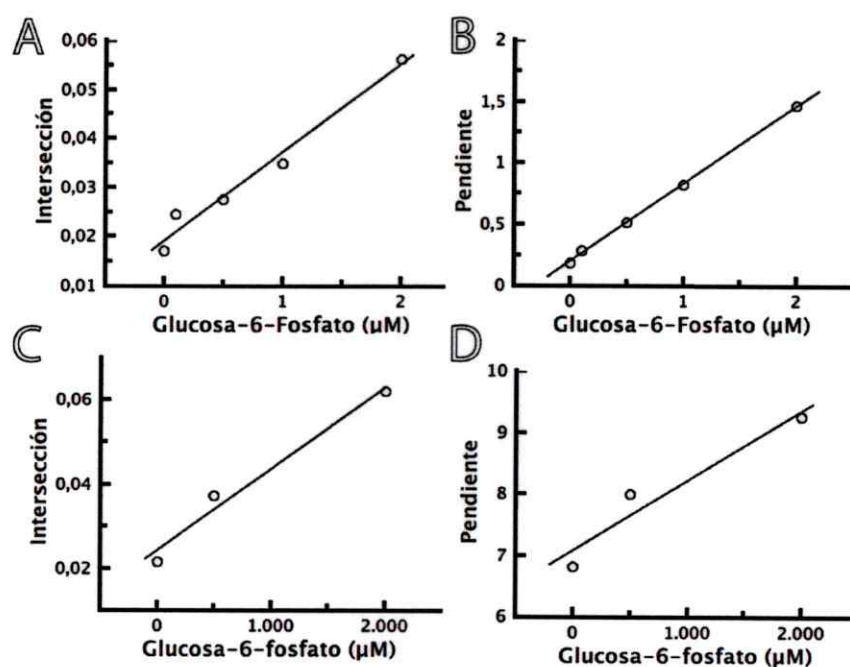


Figura 1.11. Gráficas secundarias calculadas para la determinación del efecto del producto glucosa-6-P sobre los parámetros cinéticos para los sustratos MgADP^- y glucosa. **A**, Relación entre la intersección y el producto glucosa-6-P, para los ensayos de saturación de MgADP^- de la figura 1.9.C. **B**, Relación entre la pendiente y el producto glucosa-6-P, los ensayos de saturación de MgADP^- de la figura 1.9.C. **C**, Relación entre la intersección y el producto glucosa-6-P, para la saturación de glucosa de la figura 1.9.D. **D**, Relación entre la pendiente y el producto glucosa-6-P, para la saturación de glucosa de la figura 1.9.D.

En la **Tabla 1.4** se resume el valor de cada una de las constantes cinéticas obtenidas respecto al empleo de productos como inhibidores de los sustratos MgADP⁻ y glucosa, además del tipo de inhibición encontrado para cada una de las combinaciones producto-sustrato.

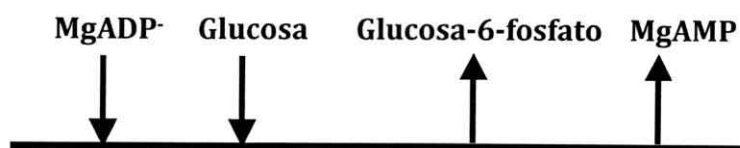
Tabla 1.4. Resumen de parámetros cinéticos para la inhibición de los sustratos MgADP⁻ y glucosa, en la reacción catalizada por la enzima TIGK silvestre.

Inhibidor	Sustrato variable	Inhibición	K _{iq} (μM)	K _{ip} (μM)
MgAMP	MgADP ⁻	C	28,0	-
MgAMP	Glucosa	NC	72,2	-
Glucosa-6-P	MgADP ⁻	NC	-	-
Glucosa-6-P	Glucosa	NC	-	782,3

C, inhibición competitiva, NC, inhibición no competitiva.

Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 40 °C.

Tomando en conjunto todos los experimentos de velocidad inicial presentados en esta sección, podemos ver que sólo MgADP⁻ y MgAMP compiten por la misma forma de enzima, mientras que el resto de sustratos y productos, MgAMP respecto a glucosa, glucosa-6-P respecto a MgADP⁻ y glucosa-6-P respecto a glucosa, se unen a formas de enzima diferentes. En resumen, nuestros hallazgos son indicativos de un mecanismo en secuencia ordenado, que se ilustra en el siguiente esquema:



Esquema 1.1. Mecanismo de reacción ordenado tipo Bi-Bi, para la reacción fosforilación de la glucosa catalizada por la TIGK. Las flechas indican la entrada de los sustratos y salida de los productos.

II. Cambio conformacional

II.A. Cambios conformacionales inducidos por ligandos

Para llevar a cabo este objetivo, que planteaba que la enzima experimenta cambios estructurales por la unión de los sustratos al sitio activo, lo que ocurriría de manera secuencial, recurrimos al estudio de las propiedades hidrodinámicas de la macromolécula. En particular, escogimos la técnica de dispersión de rayos X en bajo ángulo (SAXS) que además de ser una de las técnicas biofísicas estructurales de mejor resolución disponibles, tiene la ventaja sobre otras estrategias, en que los experimentos se realizan en solución acuosa, por lo que todas las conclusiones obtenidas de estos experimentos, pueden considerarse como cambios dinámicos de la proteína en solución.

En la **Figura 2.1**, se muestra una curva experimental de la dispersión de la enzima en la condición control, es decir, en ausencia de ligandos. Como es necesario establecer una independencia entre el resultado obtenido en la curva de dispersión con procesos de agregación como consecuencia de la masa de proteína empleada en el experimento, es que las determinaciones se realizaron a diferentes concentraciones de proteína. Para este propósito se empleó la relación de Guinier (**Ecuación 2.1**) donde el comportamiento de la curva de dispersión a muy bajos ángulos, en la ausencia de agregación o interacciones entre las macromoléculas, debe comportarse como una recta (**inserto Figura 2.1**).

$$I_{(q)} = I_{(0)} e^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

En la **Ecuación 2.1**, $I_{(q)}$ corresponde a la intensidad de los rayos dispersados a una distancia ángulo (q), $I_{(0)}$ es la intensidad a distancia ángulo cero, q distancia del ángulo dispersado o llamado también como amplitud y R_g es el radio de giro del cuerpo que dispersa los rayos incidentes.

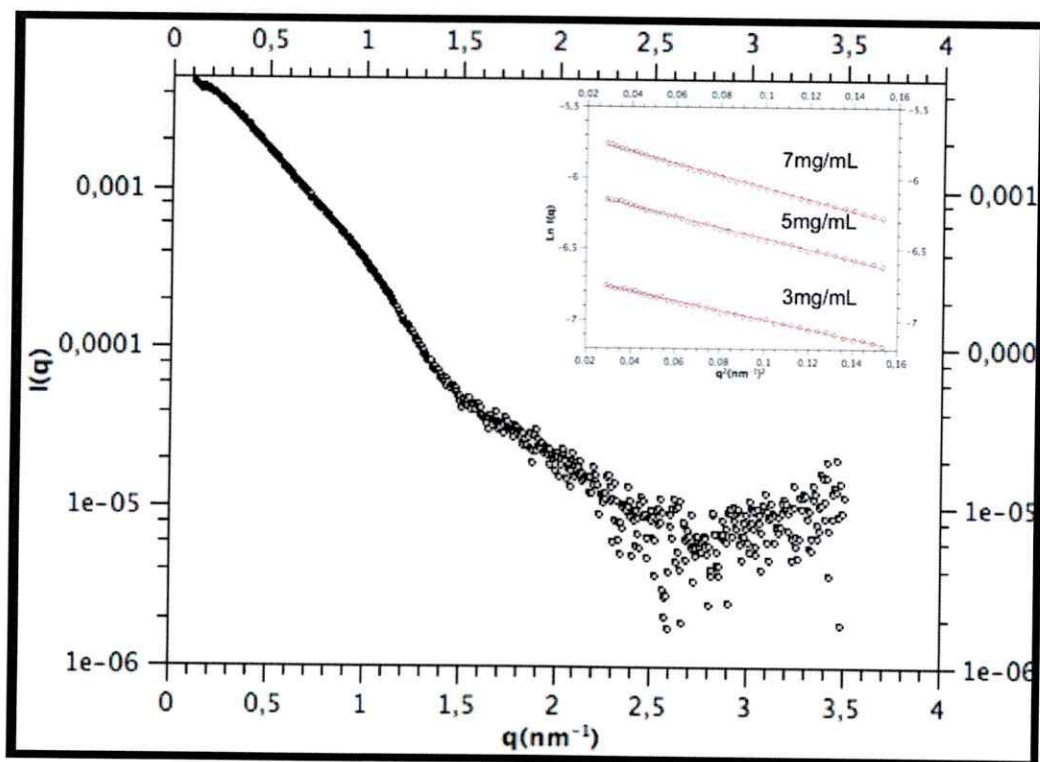


Figura 2.1. Curva de dispersión de la glucoquinasa de *T. litoralis*. Las determinaciones se realizaron en presencia de amortiguador Hepes 25 mM pH 7,8, con la cámara de lectura termoestabilizada a 40 °C, la concentración de proteínas fue de 3 mg·mL⁻¹. Inserto superior derecho, relación de Guinier, para tres diferentes concentraciones de proteína.

Además de permitir evaluar la calidad de los datos, la relación de Guinier, permite determinar el radio de giro del cuerpo que es responsable de la dispersión de los rayos incidentes, a partir sólo de la curva experimental de dispersión. Entonces, usando la misma relación de Guinier que antes usamos para determinar el comportamiento lineal a muy bajo ángulo, ahora lo usamos para calcular el valor del radio de giro de la proteína (R_g) y por ende conocer el empaquetamiento de la proteína en solución. Como la TIGK es una enzima que debe llevar a cabo su reacción a temperaturas muy elevadas, la primera experiencia que realizamos fue averiguar el efecto de la temperatura sobre la enzima, para lo cual usamos la medición del R_g como herramienta que permitiera reflejar cualquier cambio

estructural que la enzima experimentase. Para esto modificamos la temperatura en la cual se encontraba la enzima, en un rango desde los 10 °C hasta los 80 °C, rango de temperatura en cual conocíamos previamente que al superarlo comienzan a ocurrir los primeros cambios estructurales, promoviendo la denaturación y agregación de la enzima. Lo que encontramos experimentalmente es que a una concentración fija de proteína, el Rg no varía de manera significativa entre las temperaturas 10 y 60 °C, mientras que a temperaturas superiores a ésta, el Rg aumenta dramáticamente (**Tabla 2.1**) posiblemente debido a que comienzan a regir sobre las macromoléculas las interacciones de tipo apolares favorecidas a estas temperaturas, generándose dímeros u otros agregados no nativos. Por esta razón, la temperatura escogida para realizar todos los estudios de dispersión fue de 40 °C, que a pesar de que no está en el límite de lo que consideramos la temperatura libre de agregación, nos permite un trabajo sin grandes problemas técnicos y de manipulación, además de poder emplear una temperatura única que coincide para el resto de las experiencias planteadas en el trabajo experimental.

Tabla 2.1. Radios de giros deducidos para la proteína a diferentes temperaturas.

T (° C)	P (mg·mL ⁻¹)	Rg (nm)	I ₍₀₎	Puntos	Calidad (%)
80	7	3,37	0,00240	28-49(22)	82
70	7	3,11	0,00189	8-35(28)	95
60	7	2,87	0,00182	23-51(29)	88
50	7	2,74	0,00325	28-62(35)	86
40	7	2,79	0,00288	26-59(34)	87
30	7	2,71	0,00268	38-65(28)	78
20	7	2,77	0,00274	29-61(33)	85
10	7	2,67	0,00259	40-66(27)	77

Los Rg se evaluaron usando el programa AutoRg. P, es la concentración de enzima empleada en mg·mL⁻¹, Rg, radio de giro en nm, I₍₀₎, intensidad a ángulo σ cero, Puntos, es el número considerado para evaluar el Rg usando la aproximación de Guinier. Calidad, es el valor de la regresión lineal.

A continuación, realizamos las medidas a la temperatura escogida de 40 °C, para las diferentes condiciones propuestas previamente, apoenzima (libre de ligandos), en presencia de MgADP⁻, en presencia de glucosa y finalmente en el

escenario que simula a los dos sustratos unidos al sitio activo, la combinación de glucosa, magnesio y en análogo no hidrolizable ADPβS. En la **Tabla 2.2**, se resumen los Rg para la proteína en las diferentes condiciones.

Tabla 2.2. Radios de giros para la proteína en presencia y ausencia de los sustratos.

	Apoenzima	Glucosa	Mg-ADP	Mg-ADPβS-Glu
Rg^s (nm)	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,5	2,7 ± 0,4	2,3 ± 0,3
Rg^g (nm)	2,90 ± 0.01	3,00 ± 0.01	2,59 ± 0.01	2,40 ± 0.01
Rg^t (nm)	2,44	N.D.	2,37	2,31

Rg^s corresponde a los valores determinados experimentalmente por medio de los ensayos de SAXS, mediante el empleo de la relación de Guinier. Rg^g corresponde a los valores determinados experimentalmente usando las graficas de distribución de distancias (PDF, Figura 1.2). Rg^t, son valores teóricos obtenido por medio del programa Crysol, usando estructuras cristalográficas, GK-ADP (1gc5) y GK-ADP-Glucosa (obtenida en este trabajo), y el modelo por homología para la proteína libre de ligando construido previamente. N.D. , no determinado, debido a que no existe modelo disponible en presencia de glucosa.

De la **Tabla 2.2**, se observa que la proteína experimenta un cambio en su empaquetamiento y que éste tiene relación con la adición de ligandos. Glucosa no genera cambio, mientras que la unión del complejo Mg-ADP genera un cambio de 0,4 nm, en tanto que la presencia de ambos ligandos en la solución, tiene como consecuencia un cambio en el radio de giro de 0,8 nm, ambos cambios respecto al estado libre de ligando (apoenzima). Al revisar los Rg evaluados teóricamente usando los modelos tridimensionales determinados o disponibles en la base de datos (www.pdb.org), el cambio en el empaquetamiento no es tan evidente pero hace reflejo de al menos un cambio de 1,3 Å al comparar la estructura de la apoenzima y el complejo con los dos ligandos (**Tabla 2.2**, Rg^t).

Usando estos mismos datos de dispersión se construyeron gráficas de distribución de distancias (del inglés *Probability Density Function*, PDF) del cuerpo responsable de dispersar los rayos X. Esta estrategia permite evaluar el total de distancias que posee el cuerpo responsable de la dispersión de los rayos y en

consecuencia determinar de manera más exacta el radio de giro de la proteína en solución, desde el valor de distancia más probable presente en la distribución. En la **Figura 2.2**, se encuentran las gráficas de PDF calculadas usando los datos de dispersión en el programa GNOM que permite tomar los datos del espacio recíproco y convertirlos hasta el espacio real, para evaluar las distancias en el cuerpo que ha dispersado los rayos X. De esta forma se evaluaron diferentes condiciones experimentales: libre de ligandos, en presencia de MgADP⁻, glucosa y finalmente en la presencia del complejo MgADPβS y glucosa.

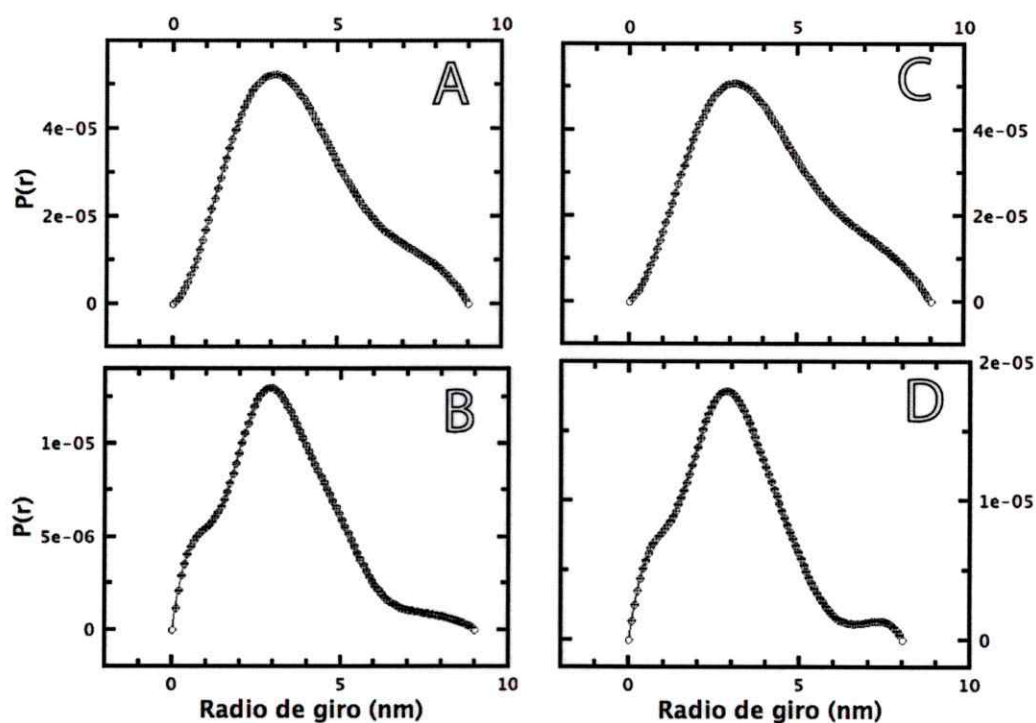


Figura 2.2. Gráficos de función de densidades de probabilidades (PDF) para las distancias de la proteína bajo las diferentes condiciones experimentales. **A**, corresponde a la condición en ausencia de ligandos. **B**, en presencia de glucosa. **C**, en presencia del complejo Mg-ADP y **D**, en presencia de MgADPβS y glucosa.

De manera similar a lo encontrado usando la aproximación de Guinier, las gráficas de PDF (R_g^{96} en la **Tabla 2.2**), muestran un cambio en el R_g desde un valor de 2,90 nm en ausencia de los sustratos hasta 2,59 nm en presencia del MgADP⁻ y hasta 2,40 nm en presencia de los dos ligandos. Nuevamente, la presencia de

glucosa en la solución, como único ligando de la enzima, no modifica el Rg de la proteína. Por lo tanto, los experimentos muestran que los cambios que sufre la proteína son más dramáticos en la transición de la apoenzima hasta la forma unida a MgADP⁻, donde el cambio en el Rg es de 0,31 nm, en tanto que el cambio en el Rg en presencia de los dos sustratos es de tan solo 0,19 nm.

Para tener una visión tridimensional de los datos obtenidos, realizamos modelamiento *ab initio* con los datos de SAXS, es decir, la construcción de modelos de la proteína usando pequeñas esferas que en su conjunto reconstituyen un cuerpo que tiene las distancias evaluadas previamente con las curvas de PDF. Empleando los programas de modelamiento Gasbor y Dammin se generaron 10 modelos por cada una de las condiciones exploradas, esto es, apoenzima, MgADP⁻, glucosa y la condición complejo MgADPβS-glucosa. Los modelos para cada una de las condiciones, se presentan en la **Figura 2.3** (se muestran solo las condiciones que mostraron cambios en el Rg). Los modelos tridimensionales muestran la presencia de los dos dominios de la enzima, pudiendo identificar el dominio mayor y menor en cada una de las estructuras y el cambio que este último experimenta dependiendo de la condición. En la transición desde el panel A hasta el C de la **Figura 2.3**, se observa el acercamiento del dominio menor hacia el dominio mayor, provocando que el espacio entre los dos dominios, donde se ubica el sitio activo de la enzima, esté cada vez más ocluido.

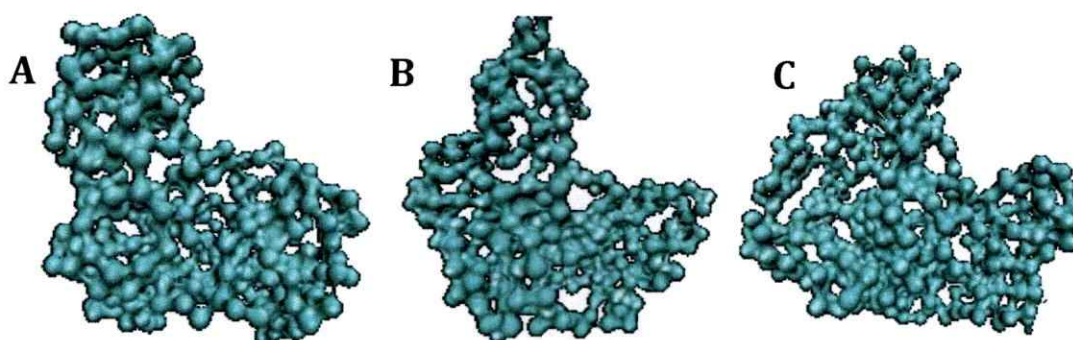


Figura 2.3. Modelos *ab initio* construidos a partir de los datos de SAXS para la enzima en presencia de los diferentes sustratos. A, corresponde al modelo de la apoenzima. B, modelo de la enzima en presencia de Mg-ADP y C, modelo en la presencia del complejo MgADPβS y glucosa.

A continuación comparamos los modelos construidos para cada una de las condiciones con los modelos obtenidos desde las dos estructuras cristalográficas disponibles para la enzima TIGK (ADP y ADP-glucosa) y el modelo por homología construido para este trabajo (apoenzima). La **Figura 2.4**, muestra la comparación entre modelos tridimensionales construidos con datos de cristalografía de rayos X, respecto a los modelos construidos con los datos de SAXS para la TIGK. En ellos se puede observar que existe una gran coincidencia entre las estructuras/modelos, mostrando el cambio estructural que sufre la enzima producto de la adición de los diferentes sustratos.

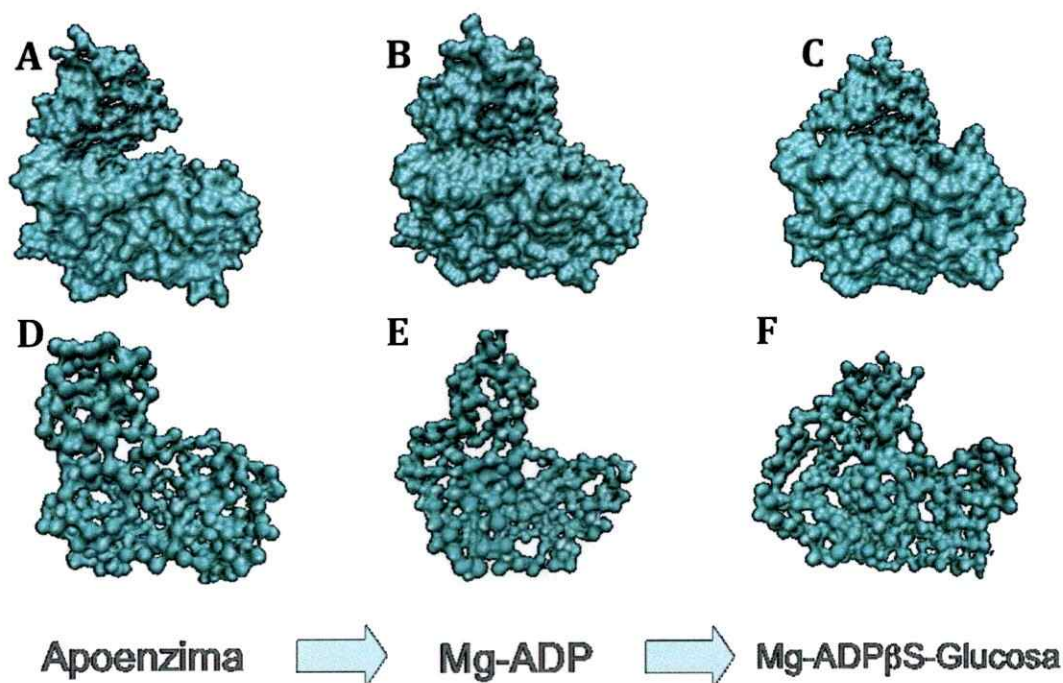


Figura 2.4. Comparación entre los modelos cristalográficos respecto a los obtenidos por medio de los experimentos de SAXS. A, B y C, son los modelos para las condiciones apoenzima, MgADP β S y MgADP β S -glucosa, respectivamente. Modelo A, corresponde a la estructura de la TIGK obtenido por medio de modelamiento por homología usando la estructura de la GK de *Pyrococcus horikoshii* (PDB ID 112L). Modelo B, corresponde a la estructura de la TIGK (PDB ID 1GC5). Modelo C, corresponde a la estructura de la TIGK unida a los dos sustratos, obtenida recientemente por nuestro laboratorio. D, E y F, corresponden a los modelos de SAXS, para las condiciones apoenzima, MgADP β S y en la presencia del complejo MgADP β S -glucosa, respectivamente.

En resumen, al reunir todos los datos obtenidos de los experimentos de dispersión de rayos X podemos concluir que la enzima experimenta un cambio en su empaquetamiento, producto de la aproximación del dominio menor sobre el dominio mayor, lo que se traduce en una disminución en el diámetro de la macromolécula, de al menos 10 Å (según las curvas PDF). Estos cambios en la conformación de la enzima dependen de los ligandos, en el cual la entrada del MgADP⁻ al sitio activo induce el mayor cambio con 6,2 Å, al comparar el diámetro de la enzima libre de ligandos con la enzima en presencia del complejo metal-nucleótido. Mientras que la presencia de ambos sustratos, glucosa y MgADP⁻ adiciona una disminución en el diámetro de la enzima de tan solo 3,8 Å, para completar de esta forma el cambio de 10 Å totales.

II.B. Mecanismo catalítico

Estructura cristalográfica de la TIGK en presencia de los sustratos

A pesar de que la obtención de la estructura en presencia de ambos ligandos no estaba planteada inicialmente como objetivo en el proyecto presentado, gracias a una colaboración con la Dra. Cristina Vega, investigadora perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España, logramos obtener un modelo de la enzima mediante difracción de rayos X. Como ya se encontraba disponible en la base de datos la enzima en presencia del ADP, nuestro propósito era obtener la enzima en presencia de los dos sustratos. Para esto usamos ADP β S, que es el análogo no hidrolizable que usamos en los experimentos de SAXS, junto a glucosa en la solución de cristalización. De esta forma, los cristales se crecieron y difractaron en presencia del análogo y glucosa.

La información que logramos obtener desde el modelo tridimensional fue importante para conocer las nuevas interacciones presentes en este complejo ternario proteína-ADP-glucosa. Además de constituir un nuevo ejemplo de estructura cristalográfica para esta familia de enzimas quinasas dependientes de ADP, nos entregó información muy valiosa que permitió comprender mejor los cambios en el empaquetamiento que experimentaba la enzima y su relación con la unión de los dos ligandos al sitio activo. La **Figura 2.5** muestra una fotografía del cristal obtenido bajo estas condiciones antes ya comentadas.

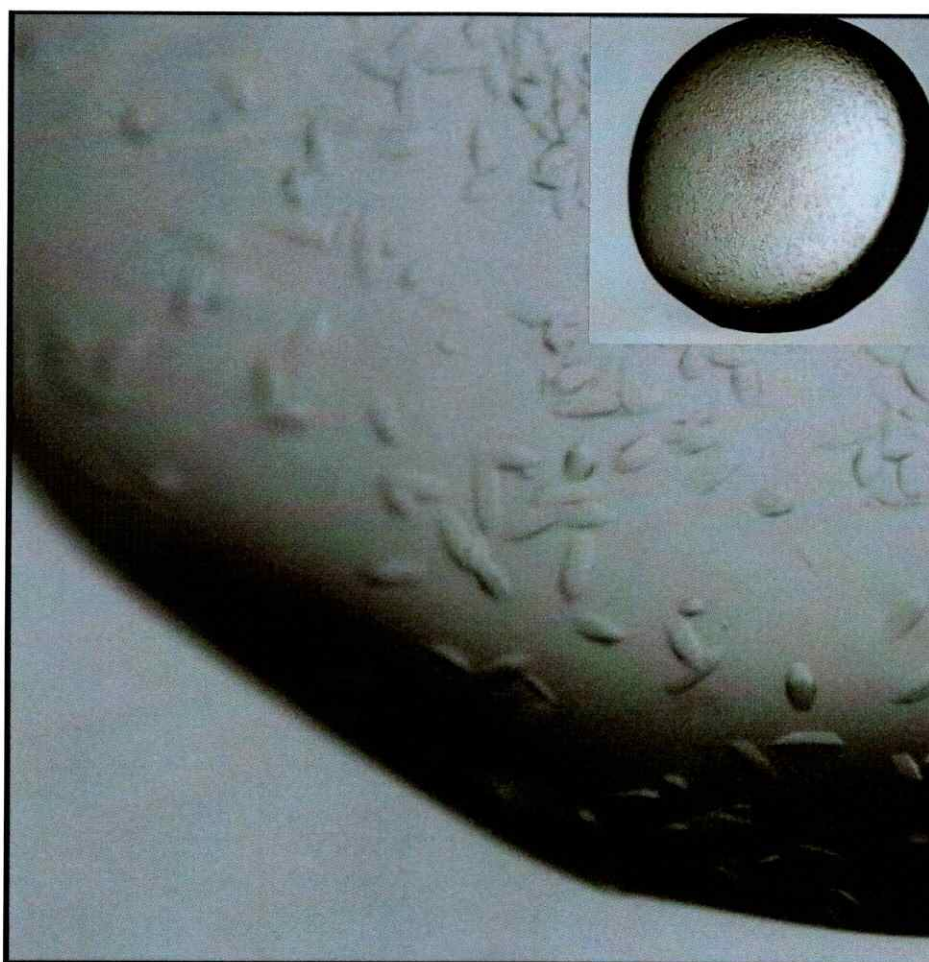


Figura 2.5. Cristales de la enzima TIGK en presencia de los dos sustratos. Los cristales se obtuvieron mediante el método de difusión de vapor por la estrategia de gota sentada (del inglés *sitting drop*). Los cristales se crecieron a 20 °C, empleando 15 mg·mL⁻¹ de enzima, en amortiguador citrato de sodio 1,5 M pH 5,2, suplementado con 6 mM de ADPβS y glucosa 30 mM. El inserto, muestra el campo completo donde se ubica la gota donde crecieron los cristales.

Luego del refinamiento adecuado, logramos obtener un modelo de la enzima con ADPβS y glucosa a una resolución de 2,58 Å. Desde el modelo tridimensional, observamos que los aminoácidos involucrados en la estabilización del nucleótido y por tanto las interacciones correspondientes, son prácticamente las mismas que las observadas en el modelo disponible en la base de datos, en presencia de sólo de ADP. La novedad de la estructura resuelta, radica en que este modelo muestra las interacciones presentes entre la proteína con la glucosa cuando el nucleótido se encuentra presente, lo que de alguna manera se asemeja a las interacciones

presentes en la formación del complejo E-A-B, que lleva hasta el estado de transición de la reacción. La **Tabla 2.3** resumen los datos de la colección de los datos y del respectivo refinamiento del modelo tridimensional.

Tabla 2.3. Estadística de los datos cristalográficos y refinamiento.

COLECCIÓN DE DATOS	
Grupo espacial	$P3_221$
Dimensión celda	$a = b = 106,47 \text{ \AA}, c = 130,09 \text{ \AA}$ $a = b = 90^\circ, g = 120^\circ$
Resolución (Å)	35,0-2,58 (2,65-2,58)
No. Reflexiones totales	234,319 (33,911)
No. Reflexiones únicas	25,936 (1,884)
Cantidad incluida	99,9 (100,0)
REFINAMIENTO	
Factor R/R _{free} (%)	0,18/0,22
RMSD largo de enlaces (Å)	0,009
RMSD ángulo de enlace (°)	1,134
B factor (Å ²):	
Proteína	47,64
ADPβP	49,76
D-glucosa	64,89
Solvente	34,35
Gráfico de Ramachandran	
Favorecidos	455 (97,43 %)
Permitidos	9 (1,93%)
No permitidos	3 (0,64%)

A pesar que la cristalización se realizó en la presencia del análogo ADPβS, la difracción obtenida para el cristal expuesto fue suficiente sólo para permitir ubicar el fosfato alfa del ADP, por lo que de alguna manera el ajuste del nucleótido se encuentra incompleto. Tal como en el caso de la estructura de la enzima TIGK

disponible en la base de datos, el nucleótido es acomodado por la acción de tipos de interacción de diferente naturaleza; apolares y enlaces de hidrógeno. Los primeros, restringen un bolsillo donde se aloja la base nitrogenada, mientras que los enlaces de hidrógeno se distribuyen a lo largo de toda la molécula de ADP, estabilizándola. En las **Figuras 2.6 y 2.7**, se muestran los aminoácidos involucrados en este tipo de estabilización.

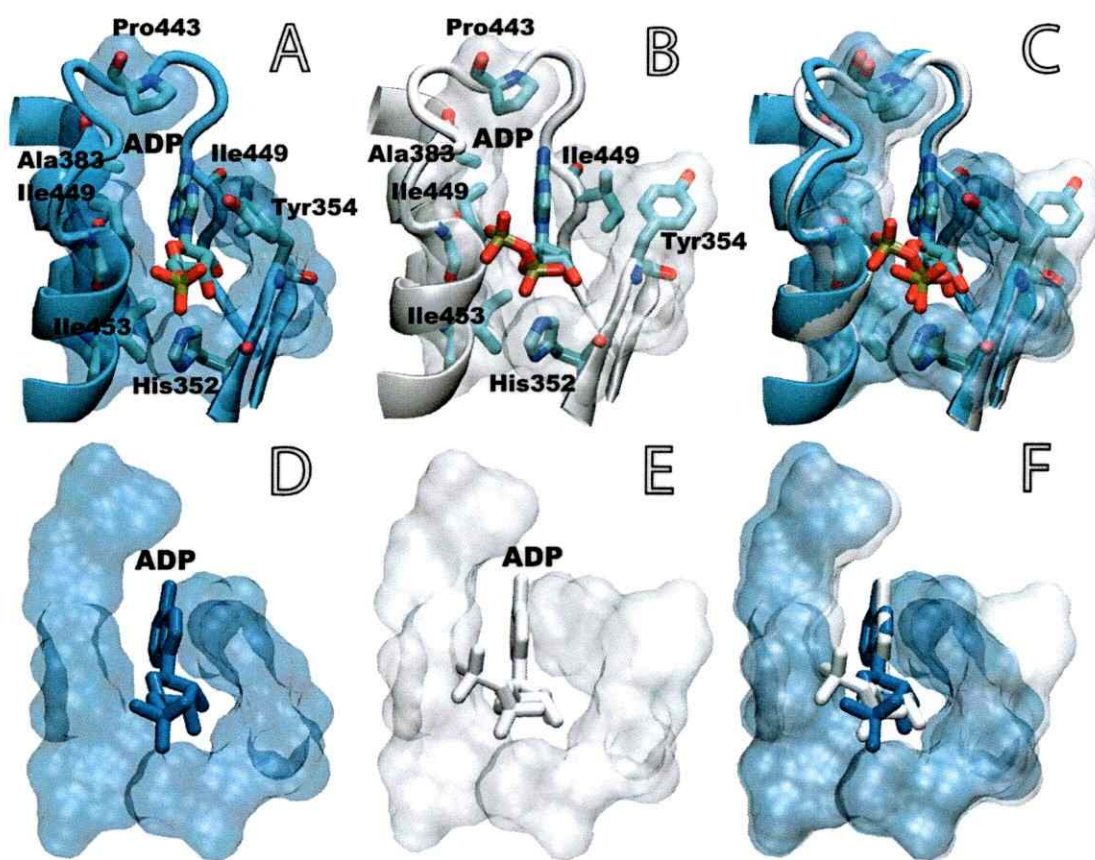


Figura 2.6. Bolsillo hidrofóbico de unión al nucleótido de la enzima TIGK. **A**, representación del bolsillo de unión del nucleótido en la enzima TIGK en la presencia de ADP β S. **B**, bolsillo unión del nucleótido en la enzima TIGK en la presencia de ADP (PDB ID 1gc5). **C**, corresponde a la sobreposición de ambos bolsillos. **D**, **E** y **F**, corresponden a las mismas representaciones mostradas en **A**, **B** y **C**, pero esta vez esquematizando solo la superficie generada por las cadenas laterales de los aminoácidos apolares.

La diferencia más significativa encontrada respecto al modelo de la enzima previamente resuelta solo en presencia de ADP (pdb 1gc5), consiste en la ubicación

del residuo Tyr354, la cual ha rotado hasta ubicar su cadena lateral por sobre del azúcar de ribosa del nucleótido, disminuyendo la libertad que tiene ahora el ligando ADP en el sitio activo (**Figura 2.6.A y B**). El resto de cadenas laterales de los aminoácidos que constituyen el bolsillo apolar, se mantienen prácticamente sin alteración. La representación del volumen ocupado por estos aminoácidos apolares explica claramente este escenario, pudiendo encontrar que ADP en el caso del nuevo modelo se ve algo más restringido (**Figura 2.6.D, E y F**).

Por otro lado, los enlaces de hidrógeno se mantienen sin alteración al comparar ambos modelos. Son los residuos de Asn305, His352, Tre353 y Val440, los encargados de esta tarea. Asn305 establece mediante su cadena lateral un enlace de hidrógeno con el fosfato alfa. His352 y Tre353, lo hacen con el 2' y 3' de la ribosa del ADP, por medio de la cadena lateral y el grupo carbonilo del esqueleto, respectivamente. Mientras que Val440, establece una interacción sobre el N6 de la adenina, a través por el grupo carbonilo del esqueleto (**Figura 2.7**).

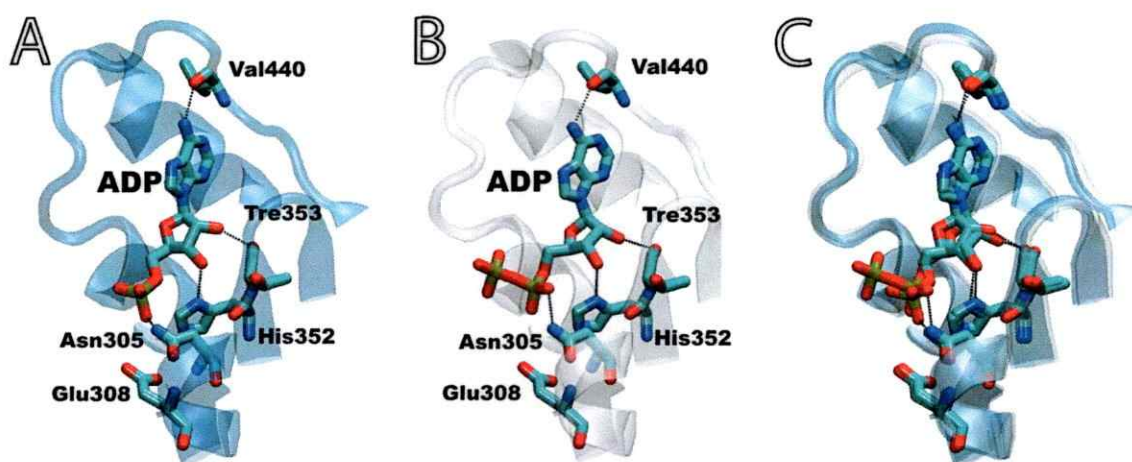


Figura 2.7. Enlaces de hidrógeno presentes en el bolsillo de unión al nucleótido en la enzima. A, representación del total de las interacciones de hidrógeno en la enzima, resuelta en la presencia de ADPβS. B, enlaces de hidrógeno presentes en la estructura disponible en la base de datos (PDB ID 1gc5). C, superposición de los modelos presentados en A y B. Las cadenas laterales de los aminoácidos que participan en la estabilización del azúcar son mostrados en barras.

El escenario de la glucosa es diferente. Anterior a la disponibilidad de este modelo tridimensional, no se conocían los residuos involucrados en la unión del azúcar, sumado al hecho de que ahora estas interacciones se encuentran en el contexto de una condición que simula ambos ligandos unidos al sitio catalítico. La glucosa, es acomodada en el bolsillo inmediatamente contiguo al ADP, donde destacan tres residuos aminoacídicos importantes en esta estabilización. Aspártico 42, por medio de su cadena lateral, recibe dos enlaces de hidrógenos provenientes desde los grupos oxidrilo 3' y 4' de la glucosa, mientras que histidina 184, ubicada en la hebra contigua, recibe los hidrógenos de los hidroxilos 2' y 3', pudiendo establecer un enlace de hidrógeno con estas posiciones equivalentes. Finalmente, el residuo glutámico 96, con su cadena lateral estabiliza recibiendo dos enlaces de hidrógeno provenientes de los oxidrilos 1' y 2' del azúcar (**Figura 2.8.A**). Los residuos Arg205 y Asp451, íntimamente relacionados en el mecanismo catalítico de la enzima, se posicionan apuntando el extremo de sus cadenas laterales, grupo guanidino y carboxílico, hacia el oxidrilo 6' de la glucosa, que aceptará más tarde el fosfato en transferencia desde el nucleótido.

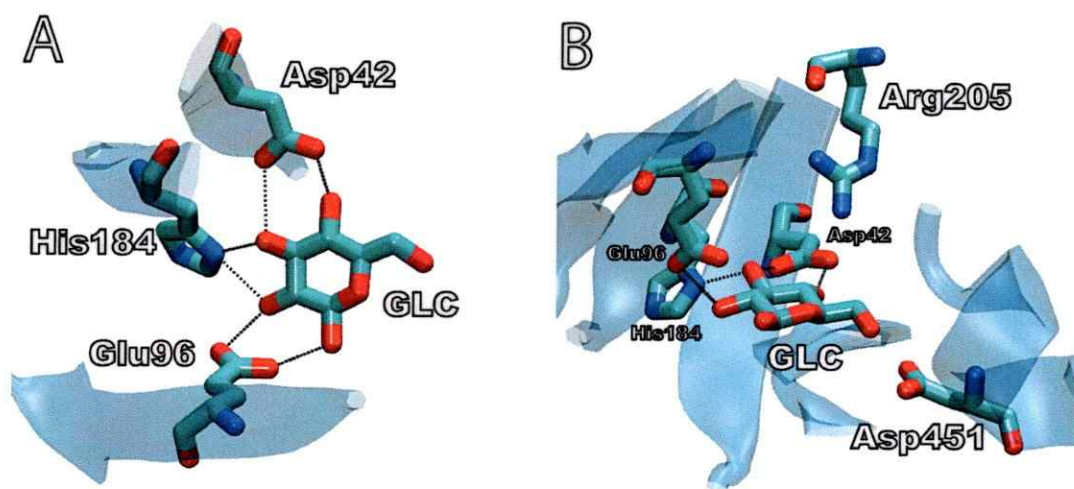


Figura 2.8. Enlaces de hidrógeno presentes en el bolsillo de unión de la glucosa en la enzima TIGK. A, aminoácidos involucrados en la estabilización de la glucosa. **B,** vista lateral respecto a **A,** del mismo bolsillo de unión a glucosa. En este último cuadro se destaca la posición de los residuos Arg205 y Asp451, involucrados en la transferencia del fosfato desde el ADP hasta la glucosa.

En general, la disposición de los diferentes elementos estructurales en la enzima se encuentran sin alteraciones respecto al modelo ya resuelto. El empaquetamiento es levemente diferente, de hecho al evaluar el Rg este cambia desde 2,37 nm hasta 2,31 nm, lo que significa un aumento en el empaquetamiento de tan solo 0,06 nm. A pesar de estos cambios discretos en el Rg, es evidente que existe un reacomodo de los elementos de estructura secundaria, en particular en la bisagra que comunica ambos dominios (**Figura 2.9**). En el modelo se observó que la ubicación del dominio menor ha cambiado. Al determinar los grados de rotación encontramos que este se encuentra rotado $7,2^\circ$ y que existe una distancia de 12 Å entre el eje de rotación y la línea que une los centros de masa de los dos dominios. Todo esto indica que glucosa la que ancla el cierre de ambos dominios (**Figura 2.9**).

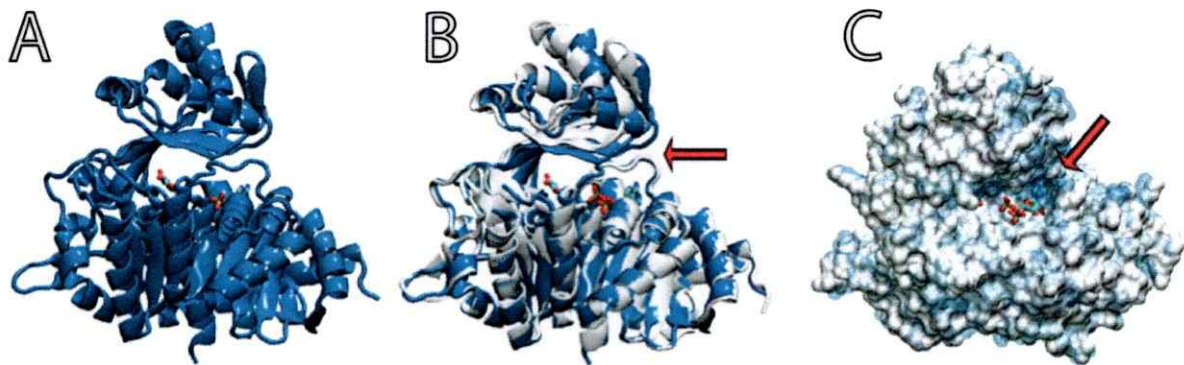


Figura 2.9. Modelo tridimensional obtenido por difracción de rayos X de la enzima. A, muestra en el modelo de cintas en presencia de ADP β S y glucosa, esquematizados en barras. **B,** sobreposición de los modelos de la enzima ya disponible en la base de dato representada en color blanco (PDB ID 1gc5), mientras que en azul se encuentra la enzima en presencia de los dos ligandos. La flecha en rojo enfatiza la región de mayor cambio entre las dos estructuras comparadas. **C,** esquema de comparación de las superficies de ambos modelos presentados anteriormente en B. La flecha nuevamente hace referencia a la región de la bisagra y aminoácidos del bolsillo apolar que mayor cambio experimentan.

III. Rol de los residuos Glu203 y Arg205

III.A. Estabilización del Mg-ADP

La mutante Glu203Ala se construyó para comprobar el rol que tendría este residuo en la estabilización de la base nitrogenada por medio del enlace de hidrógeno que establecería la cadena lateral del ácido glutámico (grupo COO-) y el grupo amino N6 de la base nitrogenada del ADP, interacción que se haría evidente tan solo luego de la unión del MgADP⁻ y glucosa en la enzima (**Figura 3.1.A y B**). Esta idea fue planteada luego de explorar la situación en enzimas homólogas de la TIGK, donde en el caso de la GK de *Pyrococcus furiosus* el residuo Glu195 se ubica sobre el N6 de la adenina, a una distancia prudente para la formación de un enlace de hidrógeno. De esta forma, la ubicación de una alanina en la posición 203 en la enzima TIGK, anularía la posibilidad de establecer el enlace de hidrógeno y por lo tanto entorpecería la estabilización del nucleótido en el bolsillo de unión.

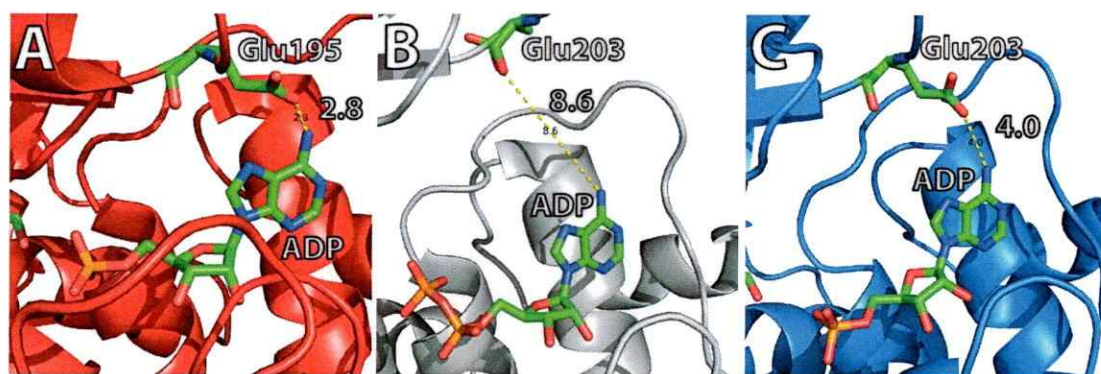


Figura 3.1. Ubicación del residuo Glutámico 203 en la enzima TIGK y el Glu195 equivalente perteneciente a la enzima homóloga glucoquinasa de *P. furiosus* (PfGK). **A**, enzima PfGK (PDB ID 1ua4), mostrando la posición del residuo Glu195 sobre el ADP, estableciendo el enlace de hidrógeno con el N6 de la base nitrogenada. **B**, actual posición del residuo Glu203 en la enzima TIGK (pdb 1gc5), a una distancia del N6 de la adenina de 8.6 Å. **C**, ubicación del residuo Glu203 en la estructura recientemente resuelta por colaboradores del CSIC. La distancia en este caso es de 4.0 Å.

La proteína mutante Glu203Ala se purificó a homogeneidad y se realizaron determinaciones de dicroísmo circular para comprobar el estado de la estructura secundaria. Como muestra la **Figura 3.2**, la enzima mutante no presenta cambios significativos en el espectro, con respecto a la enzima silvestre. La caracterización cinética de la enzima, no mostró cambios significativos tanto en la afinidad cinética por el sustrato MgADP⁻ como en la velocidad de la reacción catalizada por la enzima (**Tabla 3.1**). Esto nos da prueba de que el residuo Glu203, a diferencia de lo propuesto inicialmente, no participa en la unión del complejo MgADP⁻ aún en presencia de glucosa, lo que también fue confirmado al observar la estructura resulta en la presencia de ambos ligandos (**Figura 3.1.C**). A pesar de que el grupo COO⁻ del Glu203 ha cambiado su ubicación aproximándose hasta al grupo H-N⁶ de la base nitrogenada, aún permanece a una distancia superior a la adecuada para el establecimiento de un enlace de hidrógeno, por lo que la hipótesis de que este residuo participa en la unión del MgADP⁻ está totalmente descartada.

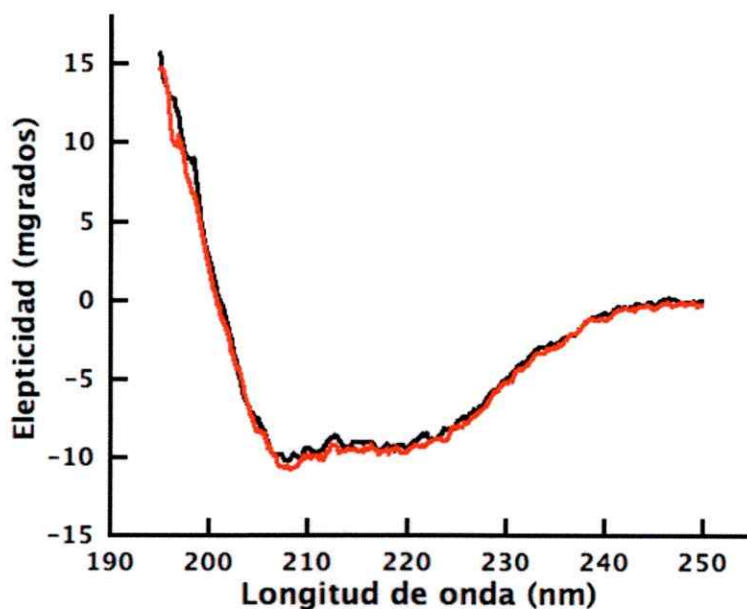


Figura 3.2. Evaluación del contenido de estructura secundaria en las enzimas silvestres y mutante Glu203Ala. La figura muestra la señal dicroica para cada una de las enzimas estudiadas. La curva negra corresponde a la enzima silvestre, mientras que la curva de color roja la enzima mutante Glu203Ala. En ambos registros se empleó una concentración de proteína de 0,1 mg·mL⁻¹, con la cámara termoestabilizada a 40° C.

Tabla 3.1. Resumen de parámetros cinéticos aparentes para las enzimas silvestre y mutante Glu203Ala, para el sustrato MgADP⁻:

	Glu203Ala	Silvestre
K_M (μM)	$17,9 \pm 2,2$	$8,1 \pm 0,7$
k_{cat} (s^{-1})	$54,9 \pm 1,3$	$54,2 \pm 0,9$
k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$3,1 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$

Las mediciones se llevaron a cabo empleando una concentración constante de Mg²⁺ libre de 1 mM y temperatura controlada de 40 °C.

III.B. Estabilización del estado de transición

La mutante Arg205Gln se diseñó pensando en determinar el papel que tiene la Arg205 sobre el estado de transición de la reacción y la transferencia del fosforilo beta desde el ADP hasta la glucosa, en particular probar la acción de la carga positiva sobre la estabilización del fosforano/metafosfato (intermediario transitorio que existe durante el proceso de transferencia). Con el fin de estudiar el efecto de la carga positiva en esta posición es que se preparó una enzima con la sustitución de arginina por glutamina que mantiene volumen y largo de cadena pero elimina la carga positiva.

La enzima mutante se purificó a homogeneidad, sin embargo, los experimentos de dicroísmo circular mostraron que la enzima presentaba un menor contenido de estructura secundaria que la enzima silvestre, lo que puede invalidar las conclusiones extraídas sobre la información funcional de esta enzima mutante (**Figura 3.3**). De todas formas, se caracterizó, determinando los parámetros cinéticos aparentes para el complejo MgADP⁻. Tal como era de esperar, los parámetros cinéticos están alterados, en particular la constante catalítica, la cual es 20 veces menor comparado con la enzima silvestre pero sin cambios significativos en la constante de afinidad cinética (**Tabla 3.2**). Entonces tomando en cuenta estos resultados, podríamos concluir que el residuo de arginina en la posición 205,

participa en la transferencia del fosforilo hasta la glucosa. Sin embargo, si tomamos en cuenta la veces de cambio de la k_{cat} , se puede observar que si bien el cambio existe no es del todo dramático, indicando que deben existir otros aminoácidos responsables de esta transferencia, como el residuo vecino Asp451, comentado en la sección anterior (**Figura 2.8**).

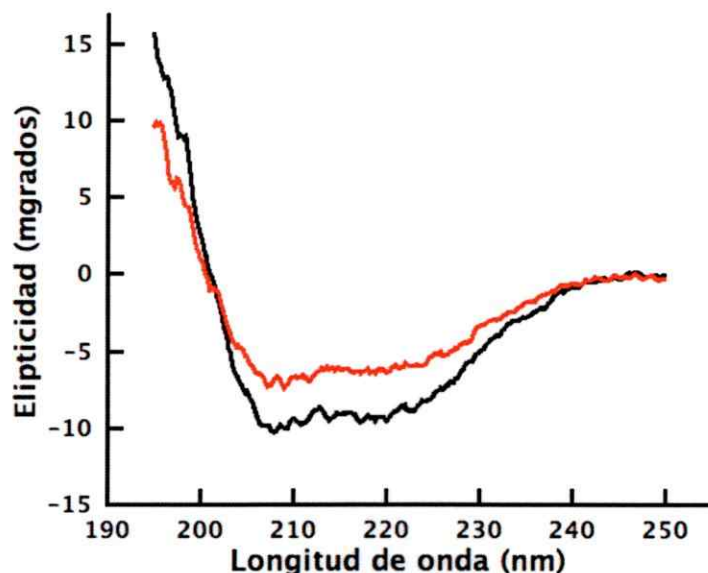


Figura 3.3. Evaluación del contenido de estructura secundaria en las enzimas silvestres y mutante Arg205Gln. La figura muestra la señal dicróica para estas enzimas. La curva negra corresponde a la enzima silvestre, mientras que la curva de color roja la enzima mutante Arg205Gln. En ambos registros se empleó una concentración de proteína de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, con la cámara termoestabilizada a 40°C .

Tabla 3.2. Parámetros cinéticos aparentes para las enzimas silvestre y mutante Arg205Gln.

	Arg205Gln	Silvestre
$K_M (\mu\text{M})$	$18,9 \pm 2,0$	$8,1 \pm 0,7$
$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	$2,6 \pm 0,1$	$54,2 \pm 0,9$
$k_{cat}/K_M (\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$	$1,4 \times 10^5$	$6,7 \times 10^6$

Las mediciones se llevaron a cabo empleando una concentración constante de Mg^{2+} libre de 1 mM y temperatura controlada de 40°C .

IV. Especificidad de metales y rol del motivo conservado NXXE

IV.A. Especificidad del metal-nucleótido

Este objetivo, tenía como finalidad determinar el papel del motivo conservado N³⁰⁵XXE³⁰⁸ en relación a la catálisis, específicamente respecto a la estabilización del ión metálico que acompaña al nucleótido necesario para que ocurra la reacción catalítica. Como primera tarea se planteó estudiar la especificidad de la enzima por el metal que utiliza para llevar a cabo la reacción de transferencia del fosforilo. Sin embargo, es necesario previamente determinar la esencialidad del metal divalente en la catálisis, en particular en la formación del complejo metal-nucleótido. De esta forma se realizaron controles en la ausencia de metal en la mezcla de reacción. El uso del quelante EDTA en la solución, aseguró la ausencia de metal libre y por lo tanto impidiendo la formación del complejo metal-nucleótido. Bajo estas condiciones, hubo ausencia de catálisis, lo que apoya la idea de que la enzima no es capaz de efectuar la transferencia en la ausencia del complejo metal-nucleótido (**Figura 4.1**).

Para probar la especificidad que tiene la enzima por el metal divalente que forma el sustrato metal-nucleótido, se realizaron mediciones en la presencia de al menos 5 sales de cloruro, de las cuales sólo las sales de los metales divalentes de magnesio, manganeso y cobalto son efectivamente empleados por la enzima para la catálisis. Además, con la finalidad de demostrar independencia del efecto del contra-ión cloruro empleado en los experimentos con metales, se usó como control la sal de sulfato de magnesio, sustituyendo de esta forma el anión cloruro manteniendo el catión divalente. Este control demostró que el comportamiento de la enzima al usar una u otra sal es el mismo (**Figura 4.1**).

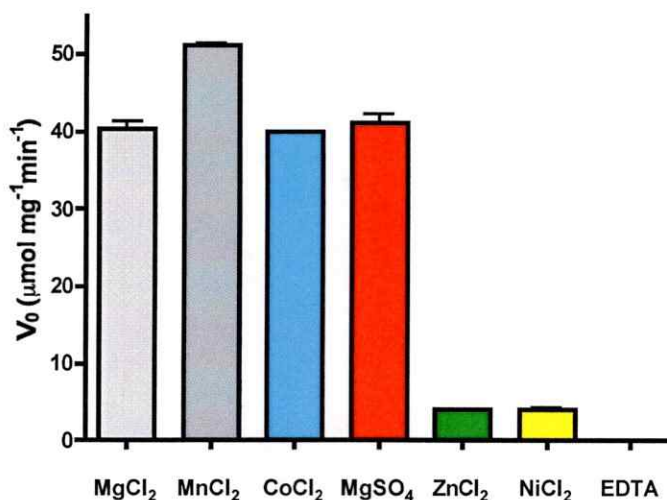


Figura 4.1. Metal divalente presente en la mezcla de reacción. En los experimentos la concentración de los sustratos se mantuvo constante. Cada ensayo fue suplementado con una concentración de 2 mM de metal libre. La concentración de ADP empleada fue de 1 mM y de glucosa 3 mM. Los determinaciones se realizaron a 40 °C y consistieron en triplicado. Las barras representan el promedio de las mediciones considerando la desviación estándar del promedio.

Tomando en cuenta de que la enzima es capaz de emplear como sustrato diferentes metales divalentes, magnesio, manganeso y cobalto para formar los respectivos complejos metal-nucleótido, es que se decidió caracterizar las constantes cinéticas aparentes de forma independiente para cada uno de los complejos, MgADP⁻, MnADP⁻ y CoADP⁻. En la **Tabla 4.1** se resumen el total de parámetros cinéticos calculados para las diferentes especies. La afinidad cinética, expresada a través de la constante de Michaelis (K_M) para cada uno de los diferentes complejos metal-nucleótido, es muy similar, en tanto que con respecto al valor de la constante de velocidad de la reacción (k_{cat}), sólo se observan diferencias discretas. Los resultados muestran que cualquier metal, ya sea magnesio, manganeso o cobalto pueden formar efectivamente el sustrato para que la enzima pueda llevar a cabo reacción de transferencia y que no existen diferencias ni en la afinidad ni en la velocidad de la reacción.

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos de la glucoquinasa ADP-dependiente silvestre, en presencia de diferentes complejos metal-nucleótido.

	Complejo metal-nucleótido		
	MgADP ⁻	CoADP ⁻	MnADP ⁻
K_M (μM)	23,0 ± 0,2	15,0 ± 0,2	17,0 ± 1,0
k_{cat} (s^{-1})	35,0 ± 0,3	44,0 ± 1,0	21,0 ± 0,4
k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	1,5 x 10 ⁶	2,9 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶

Las mediciones se llevaron a cabo usando el cosustrato glucosa a una concentración fija de 3 mM y Me^{2+} libre en 1 mM. Las determinaciones se realizaron a una temperatura controlada de 40 °C.

IV.B. Efecto inhibitorio del ión metálico libre

Sin embargo, otro fenómeno que se observó relacionado con el empleo selectivo de metales divalentes, fue el efecto que desencadenaba la variación de la concentración del metal libre en cuestión. En la **Figura 4.2.A**, se muestra que en medida que la concentración del metal total aumenta, y por tanto la del metal libre en solución, la velocidad de la reacción disminuye. Para describir el fenómeno con mayor detalle, se varió el metal libre buscando describir el comportamiento de esta especie sobre la catálisis. En la **Figura 4.2.B**, se muestra el escenario recién comentado, efecto inhibitorio aparente de la catálisis.

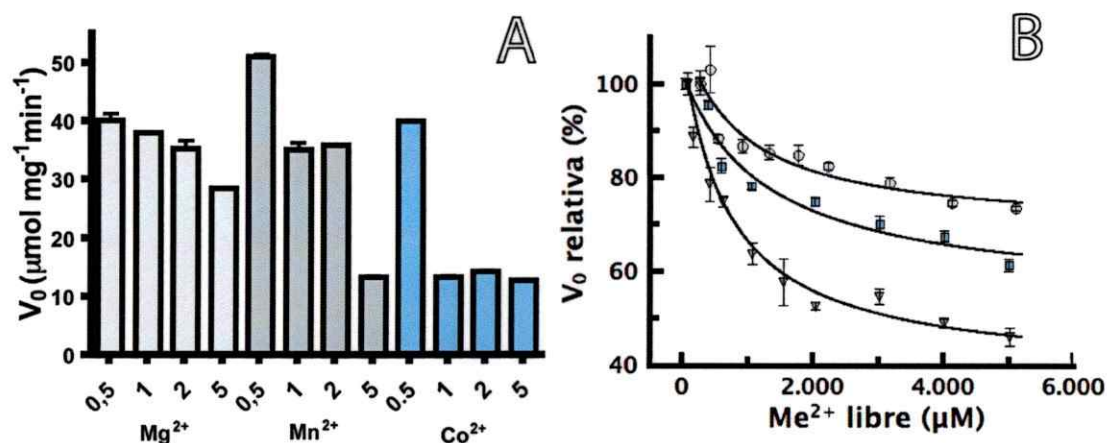


Figura 4.2. Especificidad y efecto de metal divalentes en la catálisis. A. Diferentes metales divalentes capaces de llevar a cabo la catálisis, de izquierda a derecha, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM y 5 mM de metal total. B. Efecto del metal libre sobre la catálisis. Los experimentos se realizaron a 1 mM de ADP, 7 mM glucosa y concentraciones variables de Mg^{2+} (\circ), Mn^{2+} (∇) y Co^{2+} (\blacksquare). La velocidad se expresó relativo a la condición en ausencia de inhibición. Las barras y puntos representan el promedio de las mediciones considerando la desviación estándar del promedio.

De los tres metales que emplea la enzima, manganeso es el que presenta mayor efecto inhibitorio, con una inhibición próxima al 30% respecto a la velocidad en ausencia de inhibición (valor estimado de la asíntota obtenida desde el ajuste). Por esta razón se decidió continuar con un estudio apuntado a determinar el mecanismo cinético de la inhibición ejercido por este metal. Como la reacción de transferencia involucra dos sustratos, glucosa y el complejo metal-nucleótido, es que escogimos como objetivo de la caracterización la inhibición, sólo el efecto que tiene el metal libre desencadena sobre el complejo metal-nucleótido, ya que ambas especies involucran el metal divalente.

Como los experimentos debían hacerse de manera de variar la concentración del complejo metal-nucleótido a una concentración fija del metal libre, se tuvieron precauciones sobre la presencia de otras especie que pudieran entorpecer la determinación de las constantes de inhibición por parte del metal libre. Producto del equilibrio que se forma entre el nucleótido y el metal, concentraciones de ADP^{3-} libre aumentan de manera importante, en particular a grandes concentraciones del sustrato de metal-ADP. Por lo tanto, se hizo necesario

determinar el efecto que tendría esta especie ADP^{3-} libre sobre la catálisis y en particular sobre el sustrato en el cual se enfocó más tarde el estudio, el complejo metal-nucleótido. Como el fin era averiguar el efecto que tiene ADP^{3-} libre sin la participación que tienen otras especies inhibidoras como el metal libre, se realizaron los experimentos para la inhibición del nucleótido en la presencia de Mg^{2+} , ya que es el metal que menor efecto tiene sobre la catálisis permitiendo el estudio del ADP^{3-} libre de la manera más pulcra posible (**Figura 4.2.B**). La primera observación realizada referente a la acción del nucleótido libre, mostró claramente que este lograba inhibir la velocidad de la reacción (**Figura 4.3.A**). De esta manera continuamos estudiando el efecto del nucleótido sobre la especie catalítica, el MgADP^- , para lo cual se realizaron curvas de saturación para MgADP^- a diferentes concentraciones fijas de ADP^{3-} libre de manera de encontrar el tipo de inhibición y la constatación de inhibición del ADP^{3-} (**Figura 4.3.B**). El análisis de las gráficas de doble recíproco, para las curvas de saturación de MgADP^- a diferentes concentraciones fijas de ADP^{3-} libre, mostraron curvas intersectantes que coinciden en el eje de las ordenadas, es decir, misma velocidad máxima pero con diferente intersección en el eje de las abscisas, por lo tanto diferente K_M , comportamiento típico de la inhibición competitiva (**Figura 4.3.C**). Usando estos datos, se construyó un gráfico secundario que relaciona las constantes de Michaelis aparentes con las diferentes concentraciones del inhibidor (ADP^{3-}), logrando determinar la K_i , que para este caso fue de 0,5 mM (inserto, **Figura 4.3.C**).

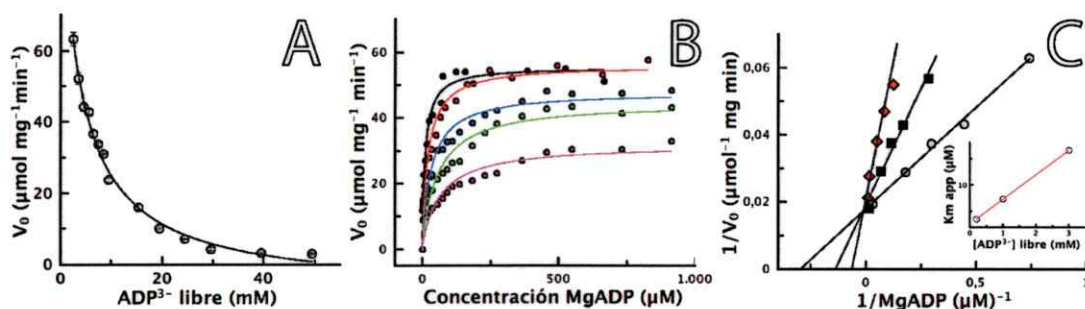


Figura 4.3. Efecto del ADP^{3-} libre sobre la reacción catalizada por la glucoquinasa ADP^{3-} -dependiente. **A**, inhibición aparente de la reacción por la presencia creciente de ADP^{3-} libre en la solución. **B**, curvas de saturación de MgADP^{2-} a diferentes concentraciones de ADP^{3-} libre. Las concentraciones del nucleótido libre empleadas fueron: 0,2 mM (círculos grises), 1 mM (círculos negros), 3 mM (círculos rojos), 7 mM (círculos azules), 10 mM (círculos verdes) y 15 mM (círculos rosados). **C**, curva de dobles recíprocos. Inserto, corresponde al gráfico secundario de K_M aparentes respecto a la concentración de ADP^{3-} (inhibidor).

Con la información disponible sobre las concentraciones necesarias a emplear de ADP^{3-} libre en la solución, se estudió el efecto del Mn^{2+} sobre el sustrato metal-nucleótido, tomando el cuidado de que la concentración del ADP^{3-} libre sea próximo a 0,2 veces la $K_{i\text{ADP}^{3-}}$, es decir, que no supere los 100 μM . La **Figura 4.4.A**, muestra gráficas de saturación para las determinaciones de parámetros cinéticos aparentes para MnADP^{2-} a diferentes concentración de Mn^{2+} libre. En ellas se puede observar que al aumentar la concentración del manganeso libre de 1 mM hasta 10 mM, la velocidad de la reacción se aumenta dramáticamente. Por otro lado, la inspección de la K_M para cada una de las curvas da cuenta de un pequeño aumento en virtud del aumento de la concentración del manganeso libre. La representación de dobles recíprocos es muy útil tanto para la identificación del tipo de inhibición que tiene un ligando determinado sobre uno de los sustratos como de permitir calcular la K_i del ligando en sí. En la **Figura 4.4.B** se pueden observar una serie de rectas que se intersectan en el segundo cuadrante, evidencias de una inhibición que afecta principalmente la velocidad de la reacción catalizada. Además la grafica secundaria que relaciona las velocidad máximas aparentes con la concentración del manganeso, nos permitió calcular la K_i del manganeso, la que resultó de 5,3 mM,

bastante grande si la comparamos con la constante de afinidad cinética de la enzima por el complejo metal-ADP (**Figura 4.4.B, inserto**).

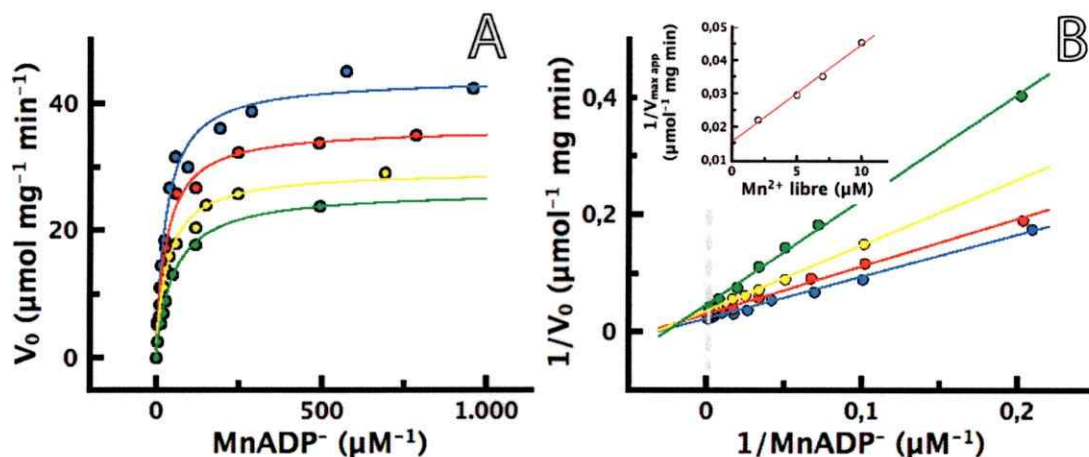
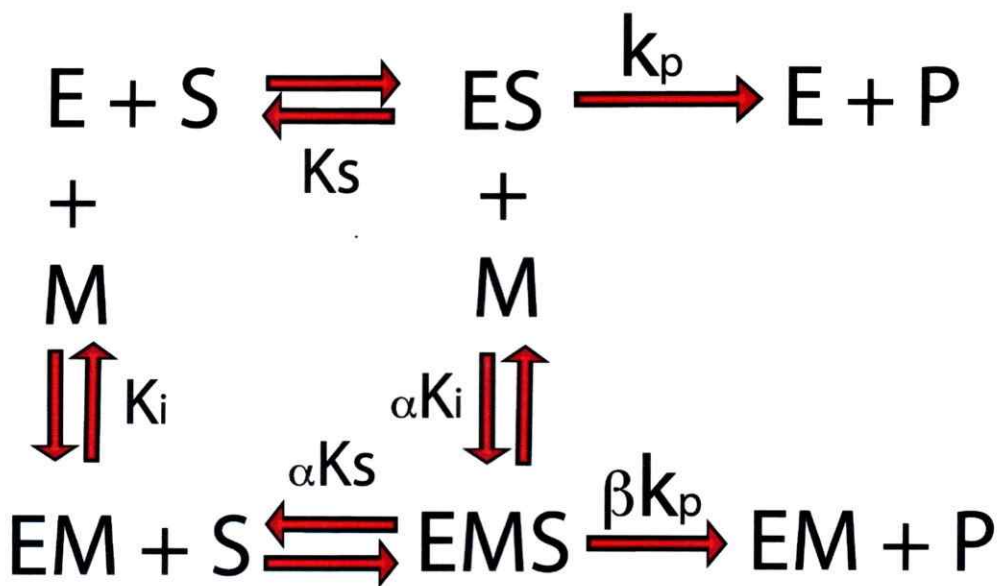


Figura 4.4. Inhibición de la glucoquinasa por metal libre. A, curvas de saturación para el sustrato complejo MnADP^- a diferentes concentraciones de manganeso libre. **B**, doble recíproco de la inhibición por manganeso libre con respecto a MnADP^- . Los experimentos fueron realizados a 1 (■), 5 (▲), 7 (◆) y 10 (●) mM de Mn^{2+} libre.

Con el objetivo de dar mayor rigurosidad al ajuste de los datos, se empleó la estrategia de ajuste globales, usando diferentes modelos de inhibición, todo ellos incluidos en el programa de análisis cinéticos DynaFit. Los resultados indican que Mn^{2+} es un inhibidor de tipo mixto parcial con respecto al complejo MnADP^- , es decir, que el Mn^{2+} libre se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, y que el complejo ternario (enzima-sustrato-inhibidor) es catalíticamente activo, pero con una velocidad de catálisis significativamente menor que la del complejo enzima-sustrato. El mecanismo de acción del Mn^{2+} libre se encuentra presentado en el **Esquema 4.1**. En la **Tabla 4.2**, se encuentran resumidas cada una de las constantes cinéticas y de equilibrio incluidas en el modelo de inhibición de tipo mixta parcial.



Esquema 4.1. Unión del metal libre inhibidor Mn^{2+} a la enzima TIGK. E, corresponde a la enzima libre, S al sustrato MnADP⁻, ES, corresponde al complejo enzima-MnADP⁻, M es el manganeso libre, EM es el complejo enzima-Mn²⁺, EMS, complejo enzima-MnADP-Mn²⁺ y P, corresponde al producto liberado. Glucosa, el cosustrato de la reacción ha sido obviado, ya que es considerado como el reactivo saturante en la reacción.

Tabla 4.2. Constantes cinéticas y de termodinámicas determinadas mediante ajustes globales.

Constantes de velocidad (s ⁻¹)		Constantes de equilibrio (μM)	
k_p	49,5 ± 2,3	K_s	20,0 ± 5,4
βk_p	22,3 ± 2,2	K_i	1732,0 ± 783,8
		αK_s	61,4 ± 7,8
		αK_i	5317 ± 2406,3

El valor de α y β , es 3,1 y 2,2, respectivamente. Las constantes fueron calculadas con el programa Dynafit, empleando el modelo mixto parcial.

Empleando el modelo propuesto luego del análisis por medio de Dynafit, se obtuvieron las constantes de disociación para los complejos metal-proteína y metal-proteína-sustrato, K_i y αK_i , respectivamente. La constante para el complejo Mn-E es de 1732 μM mientras que el valor para el complejo Mn-ES es 61,4 μM (Tabla inserta **Figura 4.4**). Estos valores pueden ser comparados con el valor de la

constante de disociación para el complejo Mn-proteína, determinada por medio de mediciones de espectroscopía paramagnética del electrón (EPR), donde la K_D obtenida para el complejo proteína- Mn^{2+} fue de $58 \mu M$, con una estequiometría 1,1, (Figura 4.5). Tomando en consideración que las mediciones se hacen en ausencia de otros ligandos, la suposición se basa en que la K_D corresponde a la unión del metal libre a la enzima, valor que podemos comparar con la K_i estimada desde los ajustes globales. Sin embargo, la diferencia que existe entre ambos valores es bastante grande; la K_i obtenida de los ajustes globales está en el orden mM, mientras que el valor para el mismo equilibrio en los experimentos de EPR esta en el orden de los μM .

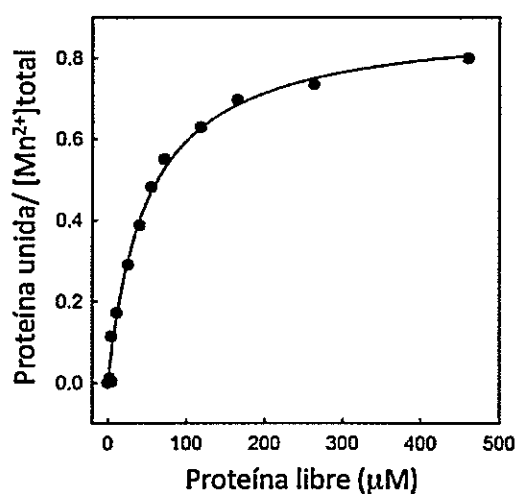
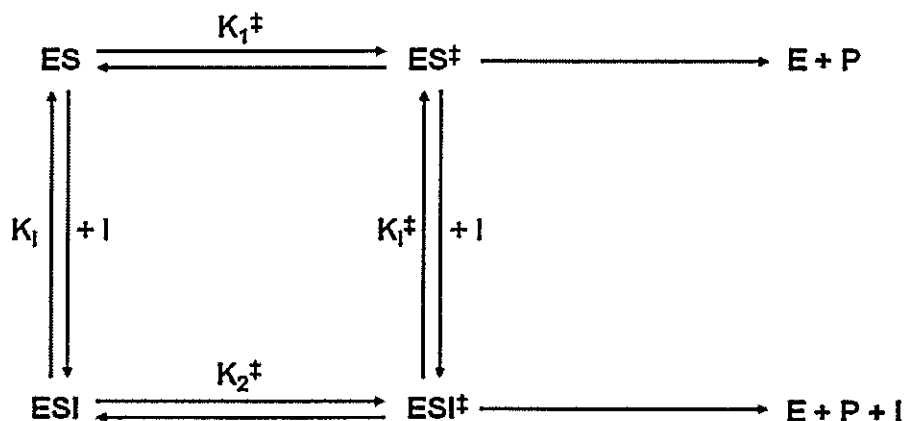


Figura 4.5. Unión de manganeso libre a glucoquinasa, determinada mediante resonancia magnética del electrón (EPR). La concentración del Mn^{2+} fue fijada en $50 \mu M$. Las mediciones se realizaron con la celda termoestabilizada a $40 \text{ }^\circ C$.

Por ello nos planteamos un nuevo modelo para explicar los datos en conjunto, basándonos en el modelo planteado por Sancho (Sancho y col., 1991), para estudiar el desplegamiento de la barnasa, pero esta vez usando en vez de el desplegamiento, el efecto de inhibición sobre la k_{cat} . El Esquema 4.2, muestra el escenario empleado para este nuevo modelo.



Esquema 4.2. Ciclo termodinámico de la unión del metal libre inhibidor Mn^{2+} . ES corresponde al complejo enzima-MnADP-glucosa, ESI, complejo enzima-MnADP-glucosa-Mn, ES^\ddagger y ESI^\ddagger corresponden a los estados de transición para los complejos ya antes mencionados. E, I y P, corresponden a las formas libre de la enzima, Mn^{2+} inhibidor y producto de la reacción.

Usando el **Esquema 4.2**, la velocidad de la reacción en presencia del metal inhibidor queda resumida como el conjunto de las velocidades:

$$V_{\text{rxn}} = V_1 + V_2 \quad \text{(Ecuación 4.1)}$$

$$V_1 = k_1 [\text{ES}] \quad \text{(Ecuación 4.2)}$$

$$V_2 = k_2 [\text{ESI}] \quad \text{(Ecuación 4.3)}$$

Suponiendo equilibrio rápido entre las especies ES y ESI, la velocidad de la reacción puede ser expresada como:

$$V = \left[\frac{k_1 K_i + k_2 [I]}{K_i + [I]} \right] [\text{ES}]_t \quad \text{(Ecuación 4.4)}$$

$$\text{Tomando en cuenta de que: } [\text{ES}]_t = [\text{ES}] + [\text{ESI}] \quad \text{(Ecuación 4.5)}$$

Usando la relación de Eyring para la velocidad de descomposición del estado de transición de los ES y ESI, la constante de velocidad puede ser relacionada a la energía de activación:

$$k = \left(\frac{k_b T}{h} \right) e^{-\Delta G^{\ddagger} / RT} \quad \text{(Ecuación 4.6)}$$

donde K_b corresponde a la constante de Boltzman, h es la constante de Planck, T es temperatura y R es la constante de los gases. Por otro lado, como la energía libre de activación en condiciones estándar puede ser expresada como:

$$\Delta G^{\ddagger} = -RT \ln |K^{\ddagger}| \quad \text{(Ecuación 4.7)}$$

Como conocemos el efecto que tiene el metal libre sobre la k_{cat} (**Figura 4.1B**), podemos ajustar nuevamente esos datos usando la **Ecuación 4.4**, para conocer el valor de las constantes k_1 , k_2 y K_i . Con los valores de las constantes de velocidad k_1 y k_2 , y usando la **Ecuación 4.6**, podemos calcular la energía libre asociada a cada una de las vías, y con la **Ecuación 4.7**, podemos calcular la constante de equilibrio K_1^{\ddagger} y K_2^{\ddagger} del ciclo termodinámico propuesto en el **Esquema 4.2**. Tomando estos tres valores de las constantes de equilibrio podemos conocer el valor de la K_i^{\ddagger} . La **Tabla 4.2**, resume cada una de las constantes comentadas en esta sección.

Tabla 4.3. Constantes cinéticas y termodinámicas determinadas mediante ajuste al modelo de ciclo termodinámico.

Constantes cinéticas (s ⁻¹)		Constantes de equilibrio (M)	
k_1	51,0	K_i^*	8.0×10^{-4}
k_2	16,6	K_1^{\ddagger}	8.2×10^{-12}
		K_2^{\ddagger}	2.7×10^{-12}
		K_i^{\ddagger}	2.4×10^{-3}

K_i^* constante determinada desde el ajuste a la **Figura 4.1.B**, para la inhibición del metal manganeso.

IV.C. Papel del residuo NXXE³⁰⁸ en la estabilización del metal.

En otras enzimas de la superfamilia Riboquinasa, se ha demostrado que el motivo NXXE, está relacionado con la unión y estabilización del metal. En el caso de la TIGK se planteó estudiar el papel del residuo Glu308, para lo cual se propuso la construcción de la mutante Glu308Gln, el cual conserva la propiedad fisicoquímica del residuo pero elimina la carga negativa. La enzima mutante se purificó hasta homogeneidad y se caracterizó estructural y funcionalmente, observando ausencia de cambios significativos respecto al contenido de estructura secundaria, evidenciado por ausencia de cambios en su señal dicróica, (curva azul **Figura 4.6**), pero con parámetros cinéticos totalmente alterados. El resumen de los parámetros cinéticos se presentan en la **Tabla 4.3**.

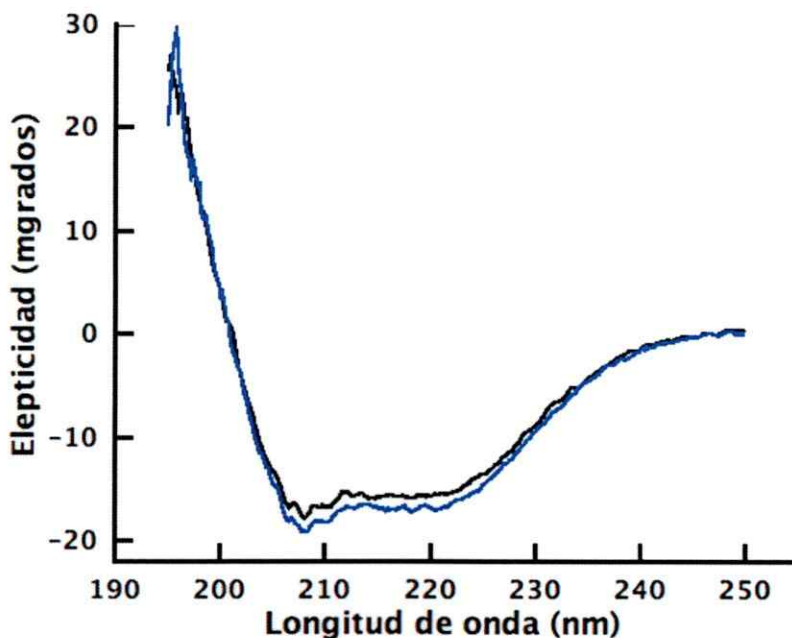


Figura 4.6. Evaluación del contenido de estructura secundaria en las enzimas silvestres y mutante Glu308Gln mediante dicroísmo circular. La curva negra corresponde a la enzima silvestre, mientras que la curva de color azul corresponde a la enzima mutante Glu308Gln. En ambos registros se empleó una concentración de proteína de 0,16 mg·mL⁻¹, con la cámara termoestabilizada a 40 °C.

Tabla 4.4. Parámetros cinéticos de la glucoquinasa silvestre y mutante Glu308Gln.

Metal	Silvestre			E308Q		
	MgADP ⁻	CoADP ⁻	MnADP ⁻	MgADP ⁻	CoADP ⁻	MnADP ⁻
K_M (mM)	23,0 ± 0,2	15,0 ± 0,2	17,0 ± 1,0	859 ± 20,2	386 ± 25,3	405 ± 30,5
k_{cat} (s ⁻¹)	35,0 ± 0,3	44 ± 1,0	21 ± 0,4	3 ± 0,1	8 ± 0,1	6 ± 0,1
k_{cat}/K_M (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	1,5 x 10 ⁶	2,9 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	3,0 x 10 ³	2,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴

Las mediciones se llevaron a cabo usando el cosustrato glucosa a una concentración fija de 3 mM y 1 mM de Me²⁺ libre. Las determinaciones se realizaron a una temperatura controlada de 40° C.

Nuestros datos apuntan a una gran pérdida de afinidad cinética del complejo metal-nucleótido en la enzima mutante, con cambios de aproximadamente 40 veces. Con el objetivo de corroborar los cambios observados cinéticamente, se propuso estudiar la unión termodinámica de uno de los complejos, en particular del MgADP⁻, para lo cual se escogió la titulación calorimétrica (ITC) como estrategia para determinar las constantes termodinámicas. Estos experimentos mostraron ausencia de cambios en la constante de unión verdadera del complejo Enzima-MgADP⁻. En el caso del complejo enzima silvestre y MgADP⁻, la constante de equilibrio calculada fue de 3,6 x 10⁴, mientras que en la enzima mutante E308Q, la constante de equilibrio fue de 2,1 x 10⁴. De esta manera estos experimentos mostraron que a pesar de los grandes cambios en la afinidad cinética de la enzima mutante, la unión termodinámica del sustrato MgADP⁻ permaneció sin alteraciones (**Figura 4.7A y 4.7B**). El total de las constantes determinadas en los ensayos de titulación se encuentran resumidas en la **Tabla 4.4**.

La incongruencia entre los datos puede ser explicada en parte si el residuo glutámico 308 no está involucrado cinéticamente solo con la unión del MgADP⁻, sino que además desempeña un papel crítico en la transferencia del fosforilo desde el ADP hasta la glucosa. Entonces, la capacidad de estabilizar el MgADP⁻ no se encuentra privada en la versión mutante Glu308Gln, pero la carencia de la carga

negativa entorpece la transferencia, razón por la cual se encuentran tan dramáticamente afectadas las constantes cinéticas para los diferentes complejos metal-ADP en la enzima mutante.

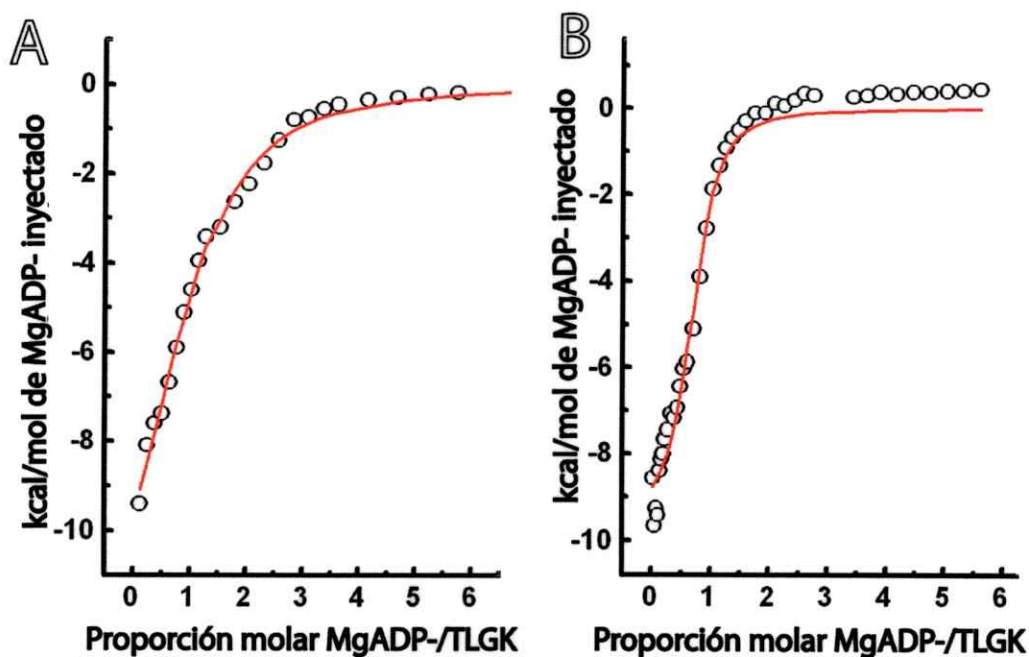


Figura 4.7. Determinación de la constante de equilibrio del complejo MgADP⁻ por medio de calorimetría isotérmica de titulación. A. Titulación de la enzima silvestre. B. Titulación de la enzima mutante E308Q.

Tabla 4.5. Constantes termodinámicas para el complejo MgADP-enzima, en la glucoquinasa silvestre y mutante Glu308Gln.

	Silvestre	E308Q
N	0,95 ± 0,04	0,71 ± 0,02
Ke	3,60 x 10 ⁴ ± 0,35 x 10 ⁴	2,10 x 10 ⁴ ± 0,42x10 ⁴
ΔH (cal·mol ⁻¹)	-1.40 x 10 ⁴ ± 0,08 x 10 ⁴	-1,0 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴
ΔS (cal·mol ⁻¹)	-24,90	-6,50

V. Desplegamiento mecánico y efecto de los sustratos

V.A. Purificación y caracterización de la poliproteína

Este objetivo se llevó a cabo por medio de manipulación de molécula individual, empleando para esto un microscopio de fuerza atómica (AFM) modificado, en el cual la palanca que tradicionalmente se usa para la construcción de imágenes, en esta ocasión se uso con la finalidad de estirar la molécula.

Tal como en trabajos previos, la manipulación de moléculas individuales por medio de esta estrategia se vuelve más robusta, al incluir la proteína en estudio en un constructo de poliproteína (proteínas repetidas en tándem), lo que facilita la manipulación y la adquisición de los registros para cada uno de los eventos de desplegamiento observados para las repeticiones presentes en el constructo. La poliproteína consiste en unidades concatenadas del dominio de titina I27, modelo de proteína para los estudios de espectroscopía de fuerza, los que fueron interrumpidos por la presencia de una copia de la enzima TIGK. En nuestro caso experimental, se escogió un tetrámero de I27 y una copia del gen la enzima TIGK, por lo que el resultado de la expresión de este constructo es una proteína quimera que contiene en su secuencia dos copias del modulo I27 seguida por una copia de la TIGK, para finalmente terminar con dos copias mas de I27.

Para la construcción de esta poliproteína se aprovechó de las herramientas de biología molecular e ingeniería de proteínas, que permiten fabricar y ubicar de manera específica diferentes sitios de restricción y empalme en la secuencia de DNA. De esta forma, usando los sitios de restricción *BglIII*, *BamHI* y *KpnI*, se fabricó el constructo (I27)-(I27)-GK-(I27)-(I27). Un resumen del esquema seguido durante la construcción se encuentra en la **Figura 5.1**.

El constructo incluido en el vector de expresión pQE80L, fue usado para transformar bacterias *E. coli* BLR plysS (DE3), permitiendo la inducción de la expresión mediante IPTG. Se buscó la condición óptima de expresión de la proteína,

variando la temperatura y el periodo de inducción. De esta forma, 0,5 mM IPTG y 4 horas de inducción fueron las escogidas para la obtención de la poliproteína soluble.

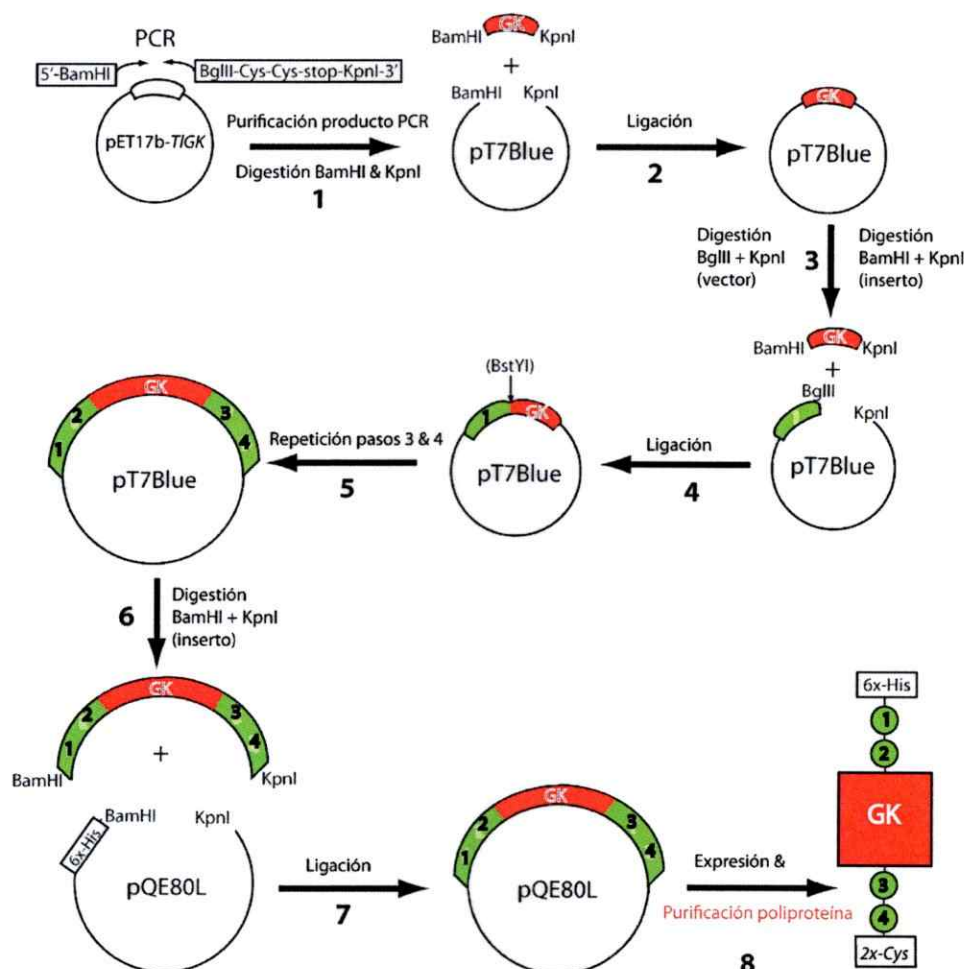


Figura 5.1. Esquema del proceso de construcción de la poliproteína quimera (I27)₂-GK-(I27)₂. Segmento en rojo corresponde al marco de lectura de la enzima glucoquinasa con los nuevos sitios de restricción. Segmento en verde, corresponde al marco de lectura para el módulo de I27.

La purificación de la poliproteína se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos y es esencialmente la misma estrategia de purificación diseñada para poliproteínas de I27 y otras quimeras. En resumen, la purificación

de la poliproteína consiste en dos pasos cromatográficos: afinidad por medio de una resina de Co^{2+} y exclusión molecular. Luego de éste último paso cromatográfico, el cual eliminó gran parte de los agregados favorecidos por la presencia de cisteínas terminales, se realizó un análisis por SDS-PAGE, el cual demostró que la poliproteína se encontraba en un porcentaje de pureza cercana al 90%. Este porcentaje de homogeneidad permite una realización adecuada del trabajo, además la presencia de otras proteínas para los experimentos de AFM no significa un gran problema, ya que al manipular una sola proteína y comprobar que se trata de la poliproteína $(i27)_2\text{-GK-(i27)}_2$, otras moléculas en la solución no deberían ejercer alguna complicación, durante el desplegamiento (**Figura 5.2.A**).

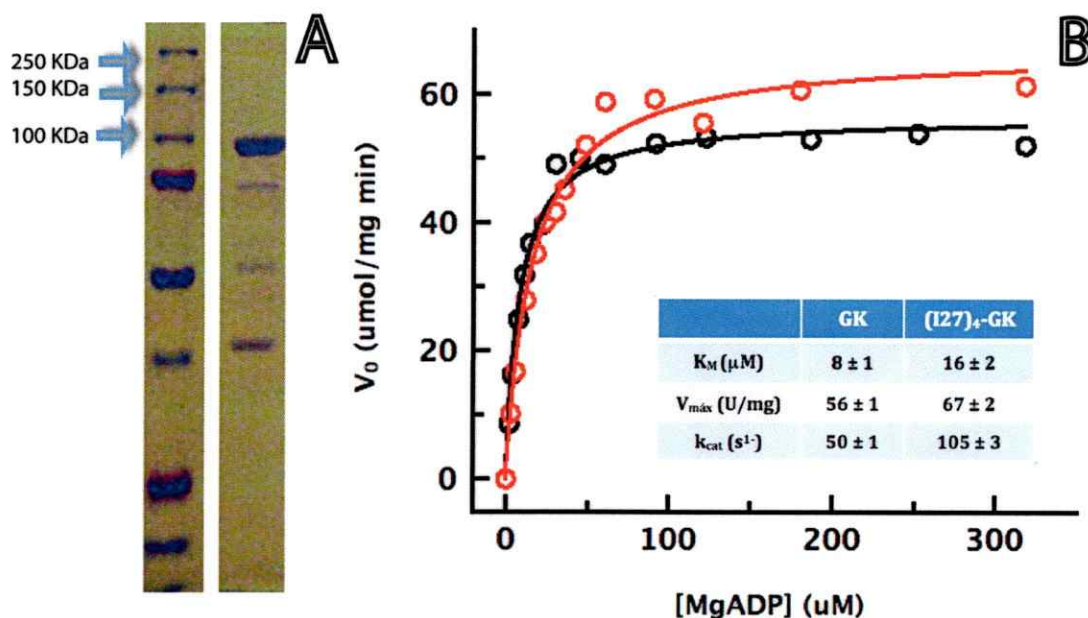


Figura 5.2. Determinación de la pureza y funcionalidad de la proteína quimera $(i27)_2\text{-TIGK-(i27)}_2$. **A**, gel de SDS-PAGE de la proteína quimera purificada. Las flechas en el carril izquierdo indican las proteínas del estándar de masa molecular, en unidades de kiloDaltons. Carril derecho muestra la migración de la poliproteína purificada, con la banda próxima a los 100 KDa. **B**, curva de saturación de MgADP^- para la proteína quimera y TIGK monoméricas. Tabla inserta en el gráfico, resume los datos cinéticos para la enzima TIGK y la versión quimera.

Con el fin de cerciorarse de que la copia de la enzima TIGK incluida en la poliproteína quimera era funcional, fue necesario controlar la actividad enzimática de este polímero, específicamente determinando los parámetros cinéticos para el complejo MgADP⁻, los que fueron luego comparados con las determinaciones de la proteína monoméricas TIGK. La **Figura 5.2.B**, muestra una curva de saturación para MgADP⁻, para la enzima TIGK y su versión quimera. Desde ella se puede concluir que no existen cambios significativos entre la enzima control y la enzima incluida en la proteína quimera, encontrando afinidades cinéticas totalmente equivalentes, 8 respecto a 16 μM , respectivamente. En cuanto a la velocidad de la reacción, se observaron pequeñas diferencias que favorecen a la proteína incluida en el polímero, encontrando velocidades de 56 vs 67 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Tabla, **Figura 5.2.B**). Estos experimentos prueban que la enzima TIGK acompañada de cuatro repeticiones de I27, es totalmente funcional, con la capacidad de unir los sustratos y lo más importante, conserva la capacidad de llevar a cabo la reacción de transferencia.

V.B. Espectroscopía de fuerza mediante AFM

Tal como se había planteado en los objetivos específicos, la finalidad de caracterizar las propiedades mecánicas de la enzima perseguía dos fines: conocer sobre la estabilidad de la enzima, problema complejo entendiendo que trabajamos con una enzima de propiedades de termoestabilidad notables y segundo, capturar los arreglos conformacionales inducidos por ligandos, estirando la proteína desde los extremos en presencia o ausencia de los sustratos.

Una representación esquemática del procedimiento experimental de selección de moléculas y aplicación de fuerza por parte de la palanca (del inglés "cantilever") sobre la poliproteína, se encuentra en la **Figura 5.3**. En la transición desde **A** hasta **C**, se puede observar que en el caso ideal de que polímero que es

seleccionado sea estirado desde el extremo N-terminal y C-terminal, los registros deberían mostrar 4 eventos de desplegamientos correspondiente a los 4 módulos de I27, y al menos un evento de desplegamiento para la TIGK.

El tipo de interacción entre el polímero y la palanca, no esta clara pero debería ser del tipo no covalente gobernada principalmente por fuerzas de absorción generadas entre la palanca y la proteína. Por otro lado, el extremo C-terminal se encuentra unido a la superficie mediante un enlace covalente, que se forma entre las cisteínas terminales y la superficie de oro, sobre el cual se deposita la poliproteína. De esta manera, bajo condiciones teóricas la manipulación debería ser vectorial, con el extremo carboxílico unido a la superficie mientras que el amino unido a la punta de la palanca.

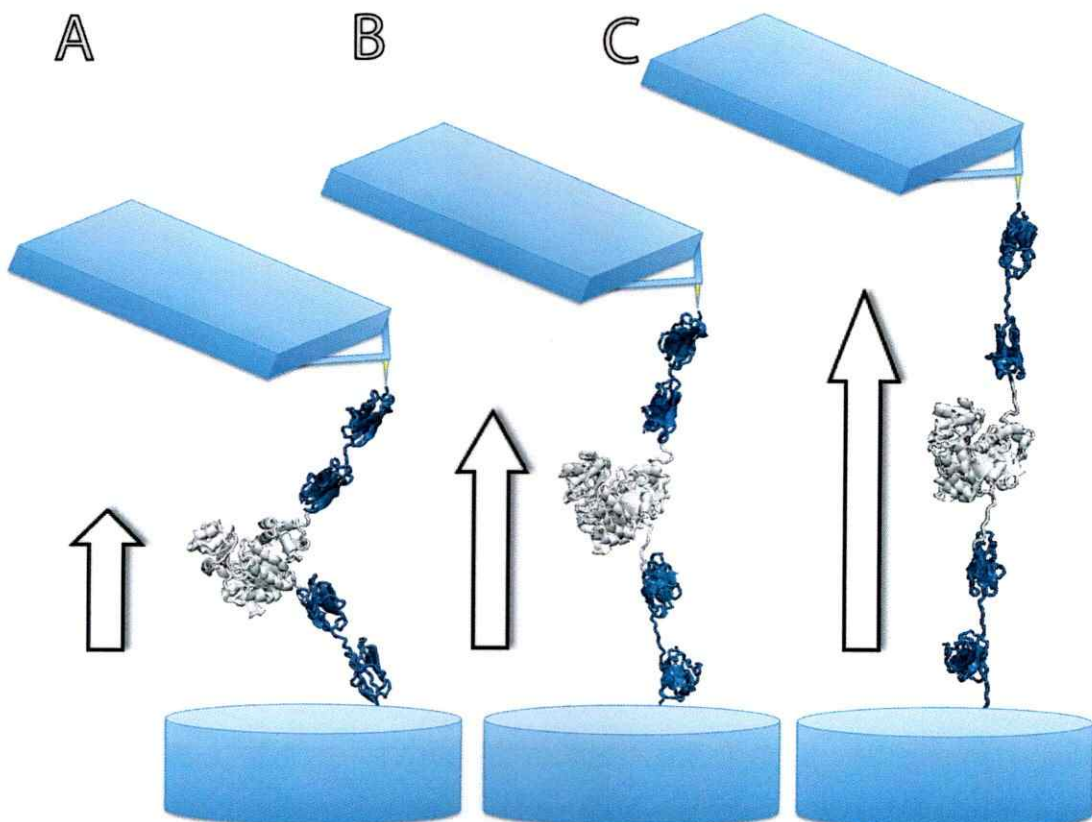


Figura 5.3. Estiramiento mecánico de la proteína quimera $(I27)_2\text{-GK-(I27)}_2$. Representación esquemática de la configuración experimental empleada para los experimentos de estiramiento. La figura en A, B y C, reflejan la trayectoria de estiramiento desde la selección de la molécula por la punta de la palanca.

Como primera tarea se realizó una caracterización del desplegamiento por fuerza, bajo el régimen de velocidad constante, es decir, la proteína es desplegada separando los extremos amino terminal y carboxilo terminal a una velocidad constante y predeterminada. Esto permite determinar la fuerza promedio a la cual la enzima se despliega y además de obtener la ubicación del intermediario mecánico, y otras extensiones importantes para la caracterización. En la **Figura 5.4**, se muestra un ejemplo del experimento de desplegamiento a velocidad constante (del inglés "*Force eXtensión*", FX), usando $400 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. En este registro se puede distinguir la ocurrencia de diferentes eventos de desplegamiento, que se evidencian como un gran cambio en fuerza durante la extensión. Cada uno de estos picos en el registro, corresponde al desplegamiento de una repetición incluida en la poliproteína, por lo que en el caso ideal de tomar a la poliproteína de cada uno de los extremos C-terminal y N-terminal se debería observar en el registro la presencia de 4 eventos (picos), uno por cada dominio I27 y al menos un evento extra correspondiente al desplegamiento de la TIGK en la poliproteína. De esta forma, al observar los registros es claro que existen dos tipos de comportamientos al manipular la poliproteína, desplegamientos que ocurren a fuerza elevada, cercana a los 200 pN y otros desplegamientos que ocurren a fuerzas más discretas, cercanas a los 50 pN (**Figura 5.4**). Para calcular de manera rigurosa la extensión obtenida en cada uno de estos eventos de desplegamientos, usamos el modelo de elasticidad de polímeros vermiforme (del inglés Worm-Like Chain, WLC):

$$\frac{F \cdot p}{K_B \cdot T} = 0.25 \cdot (1 - x/L)^{-2} - 0.25 + x/L \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

Donde F es fuerza, p es el largo de persistencia del polímero, K_B corresponde a la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, x es la extensión obtenida y L es el largo de contorno del polímero. Con este modelo podemos calcular exactamente el valor de la extensión de los eventos de desplegamiento (picos) a una fuerza determinada (en este caso infinita). De esta forma se pudo

identificar que los eventos que ocurren a baja fuerza tienen una extensión próxima a los 60 nm (traza gris, **Figura 5.4**), mientras que los eventos de alta fuerza tienen una extensión próxima a los 29 nm (traza azul, **Figura 5.4**).

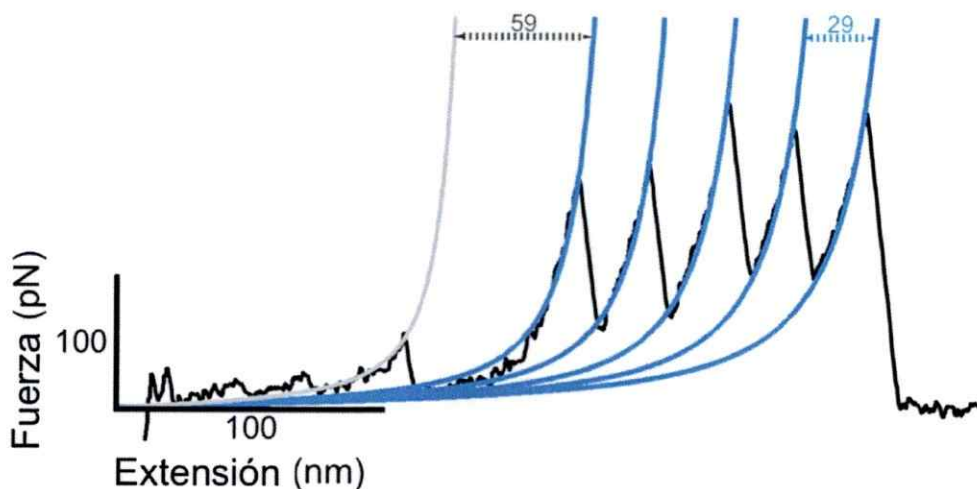


Figura 5.4. Desplegamiento mecánico de la poliproteína quimera $(i27)_2$ -GK- $(i27)_2$ por medio de espectroscopía de fuerza. El experimento se realizó a una velocidad de estiramiento de $400 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. Trazas azules y grises corresponden al ajuste usando el modelo de comportamiento de desplegamiento de polímeros vermiforme, WLC. Traza azul, eventos de desplegamiento de los módulos I27, traza gris ajuste para el evento correspondiente al desplegamiento de la TIGK.

Las características mecánicas del módulo de I27 se conocen desde la literatura, éste presenta una extensión desde el intermediario mecánico hasta el estado desplegado de 29 nm y con una fuerza que en promedio se ubica entre los 150 y 200 pN. Por esta razón, los últimos cuatro eventos de desplegamiento que se muestran en la **Figura 5.4**, corresponden al desplegamiento de cada una de las repeticiones de I27 incluidas en la proteína quimera, mientras que el evento que antecede a estos cuatro eventos debería corresponder al desplegamiento de la glucoquinasa.

Al estudiar con detalle los registros obtenidos del desplegamiento, logramos obtener una serie de valores de extensión que nos permiten caracterizar las propiedades de nuestra poliproteína. La primera de ellas, es la extensión final (L_f),

la cual corresponde a la distancia recuperada producto del estiramiento completo de la poliproteína, es decir, desde principio a fin, **Figura 5.5.B**. La segunda, es la extensión inicial (L_0), que corresponde a la distancia recorrida durante el estiramiento hasta el primer evento de desplegamiento del modulo de I27, **Figura 5.5.C** y tercero, el delta de longitud (ΔL), que consiste en la distancia entre el intermediario mecánico presente en la TIGK hasta el siguiente evento de desplegamiento, **Figura 5.5.D**.

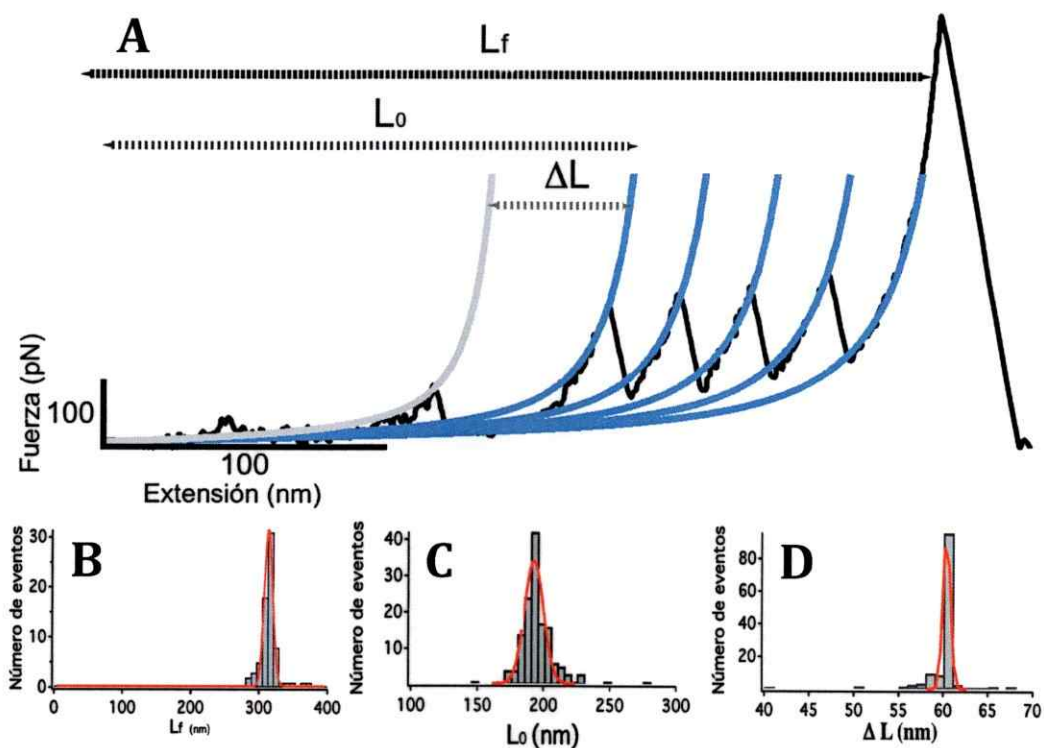


Figura 5.5. Histogramas de los delta de longitud, presentes en los registros de desplegamientos de la proteína quimera, usando 400 nm s^{-1} . A, traza de desplegamiento con las diferentes distancias medidas en los histogramas B, extensión final (L_f), con un valor para la distribución de $311,9 \pm 7,8 \text{ nm}$. C, extensión inicial (L_0), con un valor para la distribución $189,6 \pm 10,1 \text{ nm}$ y D, extensión GK (ΔL), con un valor para la distribución $59,9 \pm 0,6 \text{ nm}$. Un total de 72, 143 y 143 eventos fueron considerados para los histogramas B, C y D, respectivamente. La línea de color rojo corresponde al ajuste de los datos a una distribución gaussiana.

Al tomar en cuenta los histograma de la **Figura 5.5**, podemos decir de que la proteína se despliega a fuerzas mas bien discretas, próximas a los 50 pN, por lo que

su extensión ocurre antes que los eventos de desplegamiento de los módulos de I27. De esta forma, la extensión inicial de la poliproteína, es decir, la extensión previo al estiramiento de los I27 coincide con la extensión total de la TIGK. De hecho al considerar las uniones entre los diferentes módulos (del inglés "linkers") sumado a la distancia teórica del estiramiento completo de los 467 residuos de la TIGK, la extensión debería corresponder a 207 nm, que están bastante próximos a los 190 nm recuperados para el L_0 (**Figura 5.5.C**), considerando que en la literatura usualmente se recupera un 90% de esta extensión.

Respecto al estiramiento de la TIGK, es claro observar que el intermediario está bastante dentro de la secuencia, es decir, un gran segmento de la enzima es desplegado antes de encontrarse con el intermediario mecánico, el cual mantiene capturado un total de 60 nm (**Figura 5.5.D**), es decir, 150 residuos aminoacídicos.

Como el objetivo principal de este estudio era observar los cambios en fuerza que pueden ocurrir producto de la unión de los sustratos a la enzima, consecuencia de diferentes arreglos conformacionales de la proteína en solución, es que se exploraron diversas condiciones proteína-ligando, que precisamente retraten este escenario de cierre conformacional. Como ya se conocía de los experimentos previos que la proteína experimenta cambios en la disposición del dominio menor respecto al dominio mayor, replicamos en los experimentos de espectroscopia de fuerza condiciones que simularan los mismo escenarios que observamos por medio de SAXS, con la excepción de que el cierre total, es decir, la formación del complejo ternario E-A-B, esta vez se llevó cabo, no por medio del uso de ADP β S, sino que más bien se escogió un análogo que reúne en una sola molécula mediante un enlace covalente ambos sustratos (molécula ADP-glucosa). La **Figura 5.6** resume los histogramas para cada una de las condiciones exploradas en el estudio, apoenzima, MgADP⁻, glucosa y MgADP-Glucosa. Los resultados obtenidos para cada condición, muestran que la fuerza en que la proteína se despliega cambia desde un valor de 40 pN hasta 60 pN, en la presencia de los dos sustratos en el sitio

activo, sin modificarse la ubicación del ΔL , es decir, el intermediario mecánico de la enzima TIGK, **Figura 5.6**.

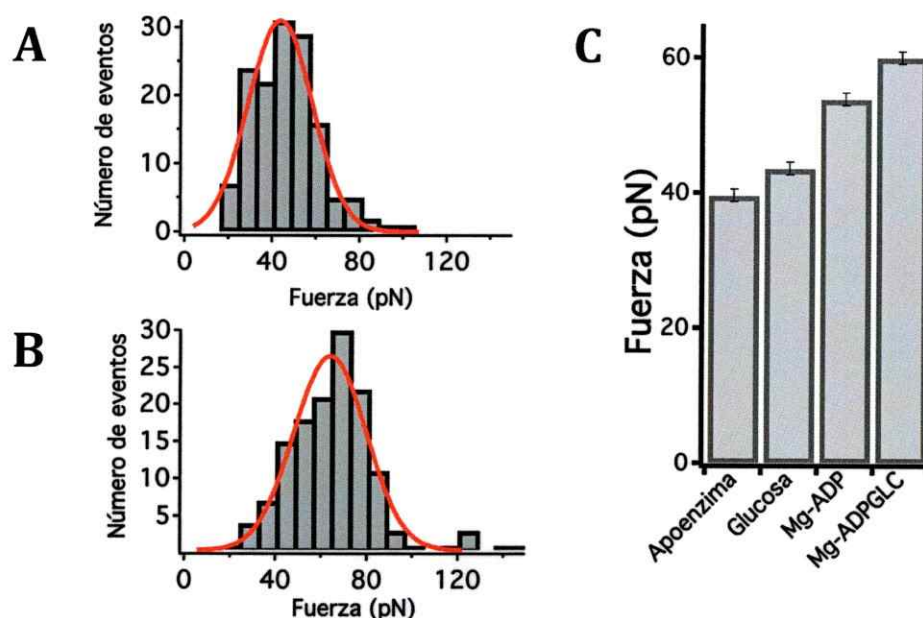


Figura 5.6. Histogramas para el ΔL bajo las diferentes condiciones proteína-ligando. A, histograma para la condición libre de ligando (apoenzima). **B,** histograma para la condición TIGK-Mg-ADPGLC. **C,** grafica de barras que resumen el valor de cada uno de los histogramas para las diferentes condiciones experimentales. Las líneas de color rojo en A y B, corresponde el ajuste a una distribución gaussiana. Barras de error en C, se han considerado como la desviación de los datos al ajuste de una población normal.

A pesar de que vemos un cambio en presencia de Mg-ADP (56 pN) y Mg-ADPGLC (60 pN), no existen cambios significativos en presencia de glucosa, donde el valor de la fuerza es de solo 41 pN, tan solo 1 pN de diferencia con el valor de la apoenzima (**Figura 5.6.C**). Sí suponemos que los resultados son consecuencia de un diferente arreglo conformacional de la enzima en solución, producto de la adición de los sustratos (una conformación más cerrada), concluimos que fue necesario aplicar más fuerza para lograr el despliegue de la enzima en esta conformación. Los histogramas apoyan la idea de un mecanismo ordenado de adición de los ligandos, es decir, la unión de MgADP⁻ en primer lugar y luego la

formación del complejo ternario Mg-ADP-glucosa, en concordancia con los experimentos ya antes presentados de mecanismo catalítico y cambio conformacional (objetivo específico 1 y 2).

V.C. Desplegamiento in silico mediante dinámica molecular dirigida (steered molecular dynamics, SMD)

En los experimentos presentados en la sección anterior de desplegamiento mecánico, se comentó sobre el intermediario mecánico de la TIGK y como éste es afectado por la unión de los diferentes sustratos. Sin embargo, la explicación de la presencia de este intermediario mecánico, su naturaleza y la extensión que éste posee, no se puede determinar simplemente desde los experimentos de manipulación. Para esto es necesario estudiar la estructura tridimensional de la proteína y acompañarla con predicciones de dinámica molecular, datos que en conjunto pueden entregar información sobre el por qué de la mecanoestabilidad presente en la enzima, la naturaleza del intermediario mecánico y probablemente lo más enriquecedor, conocer la trayectoria del desplegamiento durante el estiramiento, que entrega a secuencia de eventos que ocurren durante el desplegamiento.

Se decidió usar la aproximación de Go-model implementada en el programa Gromacs, la cual permite realizar simulaciones moleculares en la cual evalúa los contactos nativos de la proteína, permitiendo que las dinámicas moleculares se realizan en la ausencia de solvente. Específicamente, se escogió una velocidad de estiramiento lo más lento posible, pero que no demandara un tiempo de computo extremadamente alto, razón por la cual todas las dinámicas fueron realizadas a una velocidad de estiramiento de $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, que sin duda es más grande que la velocidad empleada en los experimentos de AFM, pero permite retratar en el computador la

situación experimental. La constante de resorte escogida para las dinámicas, fue la misma que la empleada en los experimentos de AFM, de $21 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$.

Estos resultados nos permitieron conocer el intermediario mecánico de la enzima durante la ruta de desplegamiento. Sin embargo, diferente a lo observado en los experimentos de AFM, las simulaciones mostraron más de un evento de transición mecánico (**Figura 5.7**). Al observar una sobre-posición de al menos 8 simulaciones, podemos ver que los eventos son mas bien conservados, descartando la posibilidad de que los eventos extras sean eventos poco frecuentes. No obstante, lo más importante desde las simulaciones, es que éstas predicen un estado de transición mecánico, que tiene un ΔL de 60 nm y que está ubicado en la trayectoria de desplegamiento en una posición equivalente a la que encontramos en los experimentos de AFM (inserto, **Figura 5.7**).

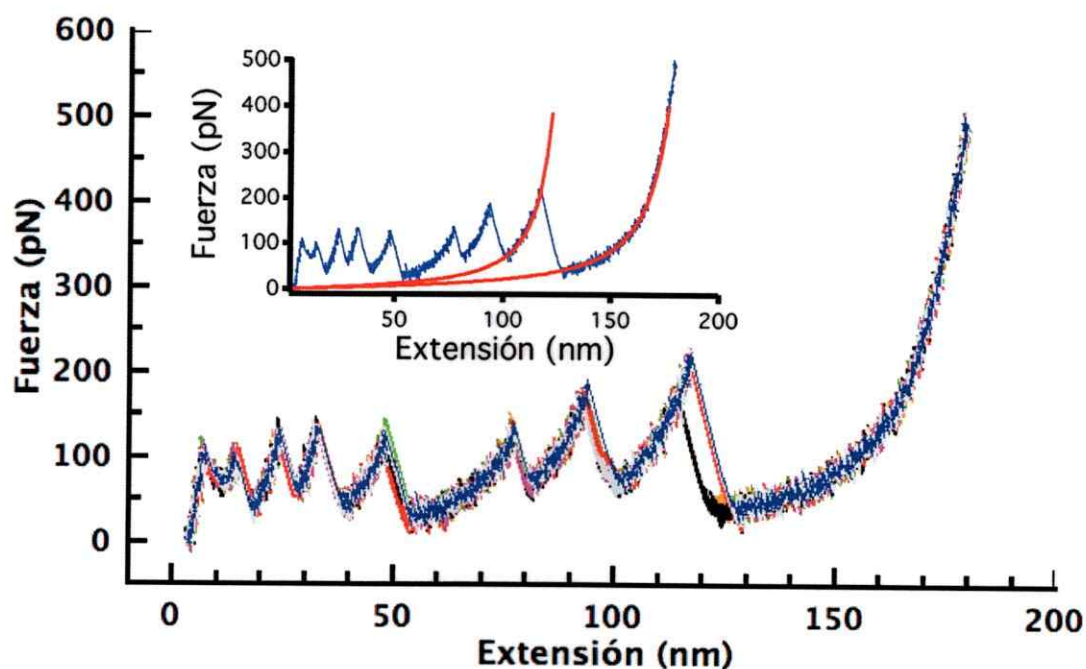


Figura 5.7. Eventos de desplegamiento observados en las dinámicas moleculares. Sobreposición de un total de 8 simulaciones, usando los aminoácidos terminales como puntos de referencia para el estiramiento. Las dinámicas se realizaron considerando una constante de resorte de $21 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$, equivalente a la encontrada en los experimentos de AFM. Inserto, corresponde a uno de los registros obtenidos en las SMD, ajustados al modelo *WLC* obteniendo un delta de longitud de 60 nm.

Entonces, las dinámicas moleculares están en concordancia con lo observado experimentalmente en los estiramientos por AFM, pero además nos entregan más información, como son la serie de eventos extras que anteceden al evento de 60 nm. Es posible que en los experimentos de manipulación en el AFM no se logran resolver, posiblemente debido a que la fuerza en la que estos ocurren, se encuentra por debajo del límite de detección instrumental bajo este régimen de estiramiento.

Al inspeccionar la trayectoria del desplegamiento, encontramos una estructura particular, que es la responsable del último de intermediario que tiene una extensión de 60 nm (**Figura 5.7**, ajuste con las líneas rojas en el inserto). Tomando en cuenta el mapa de topología de la proteína, la estructura de este intermediario de 60 nm está constituida por dos hebras beta paralelas, las hebras $\beta 2$ y $\beta 8$. Ambas hebras pertenecen al dominio menor, son hebras no consecutivas en la secuencia, pero se ubican espacialmente en yuxtaposición y lo más importante por sobre del espacio que se ubican los sustratos.

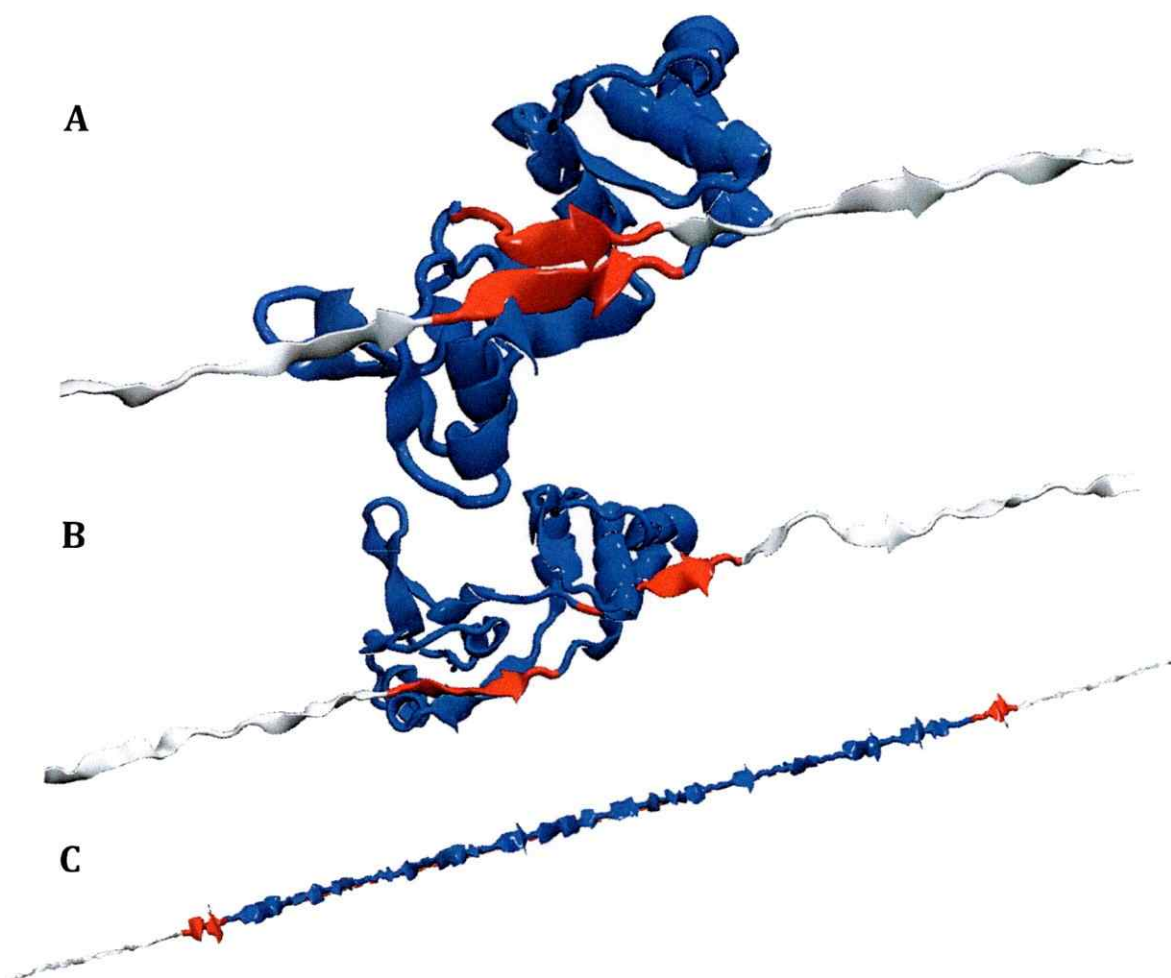


Figura 5.8. Esquemas del intermediario "mechanical clamp" ubicado en la dinámica molecular, durante diferentes tiempos de la trayectoria. A, muestra el instante previo al desplegamiento del intermediario, conformado entre las hebras paralelas $\beta 2$ y $\beta 8$, coloreadas en rojo. En azul se muestra a los residuos aminoacídicos, que aun no son sometidos a la fuerza y que están entre las hebras paralelas ya mencionadas (residuos 47 al 182). B, muestra el intermediario en el instante en que se pierden las interacciones entre las hebras. C, recuperación de la distancia capturada por las dos hebras beta que formaban el mechanical clamp. La cadena polipeptídica en blanco, corresponde a la proteína no incluida en el intermediario mecánico.

Investigando con mayor detalle las hebras $\beta 2$ y $\beta 8$ en la estructura cristalina de la enzima TIGK disponible en la base de datos (1GC5), vemos que entre ellas se forman 6 enlaces de hidrógeno. Ahora, al seguir la trayectoria de la dinámica molecular, observamos que la interacción entre las dos hebras se mantiene sin

grandes alteraciones, manteniéndose los 6 enlaces entre ellas. Es solo luego del desplegamiento de otras estructuras presente en la proteína, es que la tensión aplicada en los extremos de la cadena polipeptídica se traduce a esta región de la enzima, sometiendo a este “intermediario” transitorio a una fuerza que va en aumento debido a la resistencia que éste ofrece. En la **Figura 5.8** se muestra el comportamiento del intermediario formado por las hebras beta ya antes mencionadas, durante la aplicación de la fuerza sobre la proteína.

A pesar de que las simulaciones de desplegamiento a velocidad constante muestran más de un intermediario, solamente podemos correlacionar con certeza el último evento de desplegamiento que en los experimentos de AFM tiene una distancia hasta el estado desplegado de 60 nm, exactamente el mismo valor obtenido en las simulaciones (**Figura 5.5.D y 5.7**). En los experimentos de AFM se observaron otros pequeños picos pero se ubican apenas por sobre el ruido instrumental, por lo que es imposible asignar otro intermediario que podamos correlacionar con lo observado en las simulaciones de SMD (**Figura 5.4 y Figura 5.5.A**, al comienzo de las trazas).

En cuanto a la explicación para la ubicación del “mechanical clamp” en la enzima, es bastante sencilla. Nosotros proponemos, basados en las simulaciones, que el intermediario mecánico principal, esta constituido por las hebras beta 2 y 8. Ahora, sí se considera las evidencias desde la literatura, las estructuras más comunes encontradas como intermediarios mecánicos, consisten en hebras beta paralelas. En el caso de la enzima de TIGK, se puede encontrar la presencia de dos láminas betas principales, una en cada dominio presente en la enzima. En el caso de la lámina beta presente en el dominio mayor, esta constituida por 13 hebras, de las cuales 7 son paralelas, todas ellas ubicadas de manera consecutivas (**Tabla 5.1**), mientras que la lámina beta ubicada en el dominio menor, esta constituida por solo 5 hebras, formando 2 pares de hebras paralelas (**Tabla 5.1**). Al inspeccionar el par de hebras $\beta 2$ y $\beta 8$ en la estructura, vemos que estas forman la lámina paralela más larga presente en la enzima, con un total de 6 enlaces de hidrógeno entre ellas.

Además, los aminoácidos atrapados entre las dos hebras son en total 149, lo que se traduce en un cambio en la extensión de 57,2 nm, distancia que se recupera en la medida que el intermediario formado por las hebras 2 y 8 se rompe, desplegando la estructura capturada por estas dos hebras (**Figura 5.8** y **Tabla 5.1**).

Tabla 5.1. Hebras beta participantes de la lámina beta presente en el dominio mayor y la lamina beta presente en el dominio menor, de la enzima TIGK.

N hebra	P-aa	Ú-aa	N-H	P/A	N-aa	ΔL (nm)
DOMINIO MAYOR						
7	167	170	-	-	-	-
6	162	157	3	P	13	4,7
5	139	137	2	P	25	9,2
1	36	33	2	P	106	41,6
11	239	236	3	P	206	81,2
12	279	275	3	P	43	16,0
13	304	301	3	P	29	10,4
14	353	348	3	P	52	19,6
15	356	361	5	A	13	4,7
18	436	431	5	A	80	31,5
17	424	426	2	A	12	4,3
16	421	418	2	A	8	2,7
DOMINIO MENOR						
3	95	98	-	-	-	-
9	204	209	3	P	114	44,4
8	189	183	5	A	26	9,9
2	46	40	7	P	149	57,2
14	115	119	4	A	79	31,1
10a*	194	195	-	-	-	-
10b*	199	198	1	A	5	1,5

N hebra, se refiere al número de la hebra en la topología, **P-aa**: primer aminoácido participante de la hebra, **U-aa**: ultimo aminoácido participante de la hebra, **N-H**: número de enlaces de hidrogeno con la hebra contigua (hebra ubicada por debajo en la tabla), **P/A**: sí la hebra es paralela o antiparalela, **N-aa**: número de aminoácidos ubicados entre las hebras en interacción, **ΔL** : longitud obtenida producto del estiramiento de los aminoácidos ubicados entre las hebras en interacción. 10a* y 10b*, hebras accesorias presentes en el dominio menor, pero no relacionadas con las otras hebras betas presentes en el mismo dominio.

V.D. Intermediario mecánico sensible a la unión a la unión de ligandos

Sí es precisamente este par de hebras los que forman el llamado intermediario mecánico, ¿como es que esta estructura es capaz de captar la unión de los ligandos? (**Figura 5.6**). Para dar una explicación a este fenómeno, es necesario estudiar las estructuras cristalográficas disponibles para la TIGK. Las hebras beta 2 y 8, no son tan solo las hebras más largas presentes en la proteína, sino que además son la arquitectura principal desde donde se extiende la bisagra que conecta los dominios menor y mayor. Al realizar una comparación entre las estructuras disponibles, TIGK-ADP y TIGK-ADP β S-glucosa, se observa que el dominio menor esta desplazado, y que las hebras beta 2 y 8 se encuentran posicionadas de forma diferente. Además, tal como se comentó anteriormente en la sección de cambio conformacional/mecanismo catalítico, en la estructura resulta de la TIGK en la presencia de los dos sustratos se identificaron los residuos Asp42 y His184 como participantes críticos para la estabilización del azúcar. Estos residuos de aminoácido están ubicados en las hebras 2 y 8, respectivamente, las que hemos propuesto como parte del intermediario mecánico (**Figura 5.9**). Considerando estas evidencias, no resulta difícil de entender el hecho que estas hebras capturen un cambio en fuerza desde 40 pN hasta 60 pN, cuando la proteína cambia entre una estructura abierta hasta una cerrada, es decir, en ausencia y presencia de los dos sustratos en el sitio activo.

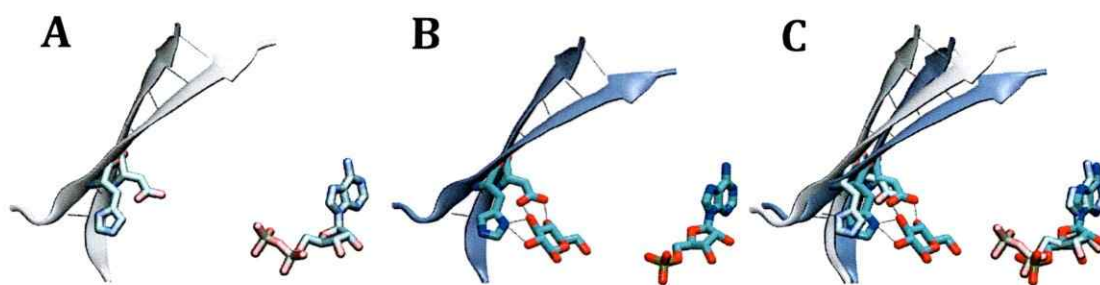


Figura 5.9. Intermediario mecánico propuesto para el desplegamiento de la TIGK. A, muestra las hebras beta 2 y 8, con los residuos Asp42 y His184, en la estructura cristalizada en presencia de ADP. B, hebras beta 2 y 8, con los residuos Asp42 y His184, en la estructura cristalizada en presencia de ADP β S y glucosa. C, superposición de las figuras A y B. Las líneas punteadas representan los enlaces de hidrógeno presente en las hebras beta y entre las cadenas laterales y la glucosa.

Estos resultados en su conjunto, apoyan a un intermediario mecánico que funciona como biosensor de la unión de ligandos, fenómeno muy interesante desde varios aspectos. El primero de ellos, consiste en que nuestros resultados constituyen uno de los pocos ejemplos de sensor mecánico hasta ahora reportados. En segundo lugar, el hecho que la sensibilidad de nuestro método se basa en capturar diferentes arreglos conformacionales en solución mediante espectroscopia de fuerza, hace que éstos sean cambios dinámicos, lo que tiene gran repercusión ya que entrega un claro ejemplo de que las proteínas fluctúan entre diferentes conformaciones, que pueden ser capturadas mediante la adición de uno u otro ligando.

V.E. Intermediarios mecánicos: mejoramiento de la resolución

Sin embargo, ¿que sucede con los otros intermediarios reportados por nuestras simulaciones?, ¿serán los pequeños eventos observados en nuestros registros experimentales evidencia de intermediarios menos estables (**Figura 5.4** y **Figura 5.5.A**, al comienzo de las trazas). Con este fin, se propuso averiguar sobre estos posibles intermediarios, para lo cual fue necesario cambiar la estrategia de desplegamiento mecánico, ya que bajo el régimen de velocidad constante los eventos de menor fuerza que se pueden capturar están cerca de los 20-25 pN, prácticamente en el límite del instrumento. Entonces, siguiendo el propósito de mejorar la resolución, es que cambiamos el protocolo de desplegamiento hasta el régimen de rampa, que consiste en un cambio gradual de la fuerza de estiramiento siguiendo una tasa prefijada con anterioridad, de esta manera se puede hacer un barrido de fuerza de 0 a 200 pN en unos pocos segundos. Estos experimentos no permiten determinar la cinética de desplegamiento a una fuerza dada, pero permiten extraer información sobre la distancia recuperada luego del desplegamiento y la fuerza en que los eventos ocurren. La **Figura 5.10**, es un registro del desplegamiento de la proteína quimera en una rampa de $60 \text{ pN}\cdot\text{s}^{-1}$. En

ella podemos observar que en el comienzo de la traza existen una serie de eventos de diferente extensión (asignados con la nomenclatura L1, L2, L3 y L4), lo que se ubican precediendo a los eventos de 25 nm, ubicados al final de la traza. Son estos últimos eventos, que ocurren a altas fuerzas, los “pasos” correspondientes a los desplegamientos individuales de cada uno de los módulos de I27 presentes en la proteína quimera. En este caso la extensión obtenida luego del desplegamiento de cada I27 es menor a la observada anteriormente en los experimentos de velocidad constante (**Figura 5.5**) debido a que en el caso de las rampa, la estimación de la longitud es realizada a una fuerza finita, próxima a los 150 pN y no usando el modelo WLC como anteriormente se usó para los experimentos de velocidad constante (**Figura 5.10**).

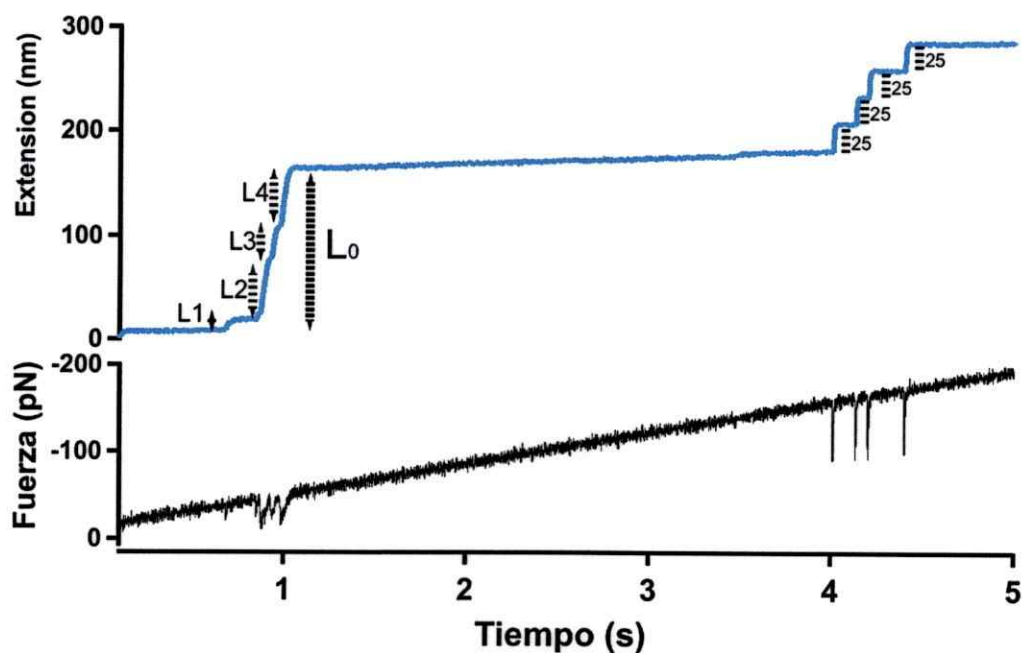


Figura 5.10. Intermedios mecánicos presentes en el desplegamiento de la proteína quimera detectados por medio de rampa de fuerza. En el panel superior se representa la extensión de la poliproteína extendida. Los I27 son detectados a fuerzas superiores a 150 pN como pasos de 25 nm. Un conjunto de eventos son observados en el principio de la traza. En panel inferior se muestra el registro de fuerza en el tiempo.

Con la finalidad de comprender el comportamiento de los eventos del comienzo de cada uno de los registros, es que se consideró la extensión completa

de este conjunto de “pasos” y se construyó un histograma de extensión, el cual nos arrojó un valor de 148,5 nm (inserto **Figura 5.11**). Ahora si consideramos la fuerza en que ocurren estos eventos, es decir, entre los 20 y 100 pN, la extensión recuperada según el modelo WLC debería ser cercana a 80% de la extensión total de un polipéptido cualquiera (cuociente entre x/L), debido a que teóricamente la extensión total de cualquier polímero es total solo a fuerzas infinitas (**Ecuación 5.1**). De esta forma, si 148,5 nm son el 80% de la extensión total de la proteína, el estiramiento a fuerza infinita debería ser cercana a los 186 nm, que corresponde exactamente a 467 residuos aminoacídicos, lo que coincide con el número de aminoácidos presentes en la TIGK.

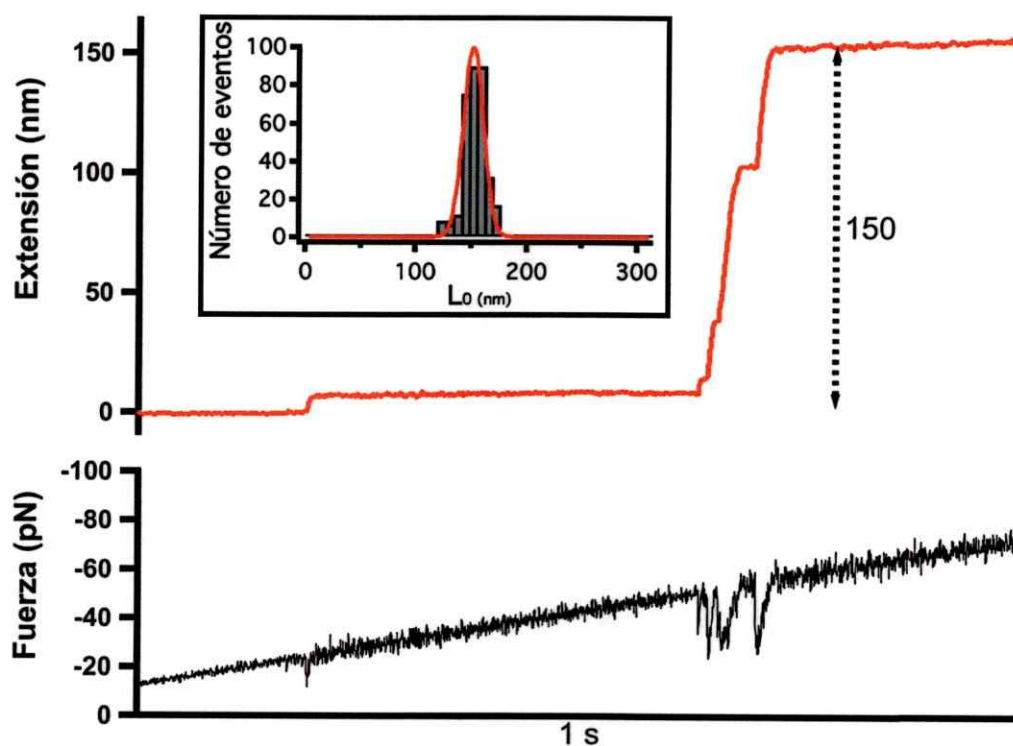


Figura 5.11. Intermediarios presentes en la ruta de desplegamiento de la TIGK. En el trazo en color rojo se pueden observar diferentes “pasos”, cada uno de los atribuibles a intermediarios en la ruta de desplegamiento. **Inserto**, corresponde a un histograma de distancia, extensión inicial (L_0). El valor del ajuste a una distribución gaussiana fue de $148,48 \pm 0,31$ nm.

Por tanto los eventos observados en el comienzo de los registros de las rampa, son atribuibles al desplegamiento de diferentes intermediarios mecánicos presentes en la enzima TIGK. De esta manera, el uso de la estrategia de rampa de desplegamiento enriqueció la información sobre el desplegamiento de la enzima, otorgando mayor resolución y con ello el detalle de los eventos presentes. Para cuantificar el comportamiento de estos eventos de manera más detallada, se construyeron histogramas de la frecuencia de eventos, extensiones y fuerza de los eventos que estaban incluidos en L_0 . Esto lo realizamos para la condición libre de ligandos y para la condición antes ya explorada, ADP-GLC. La **Figura 5.12**, resume el total de datos obtenidos para las condiciones experimentales planteadas.

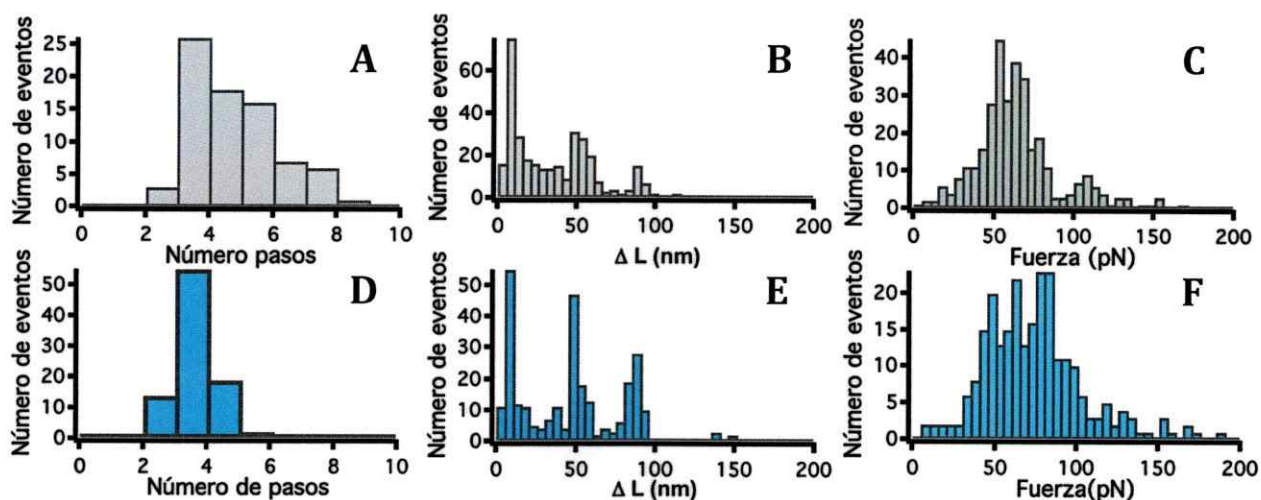


Figura 5.12. Histogramas de los intermediarios presentes en el desplegamiento de la TIGK. A y D, corresponden al número de eventos observados en el desplegamiento de la enzima. B y E, son el total de extensiones individuales del total de eventos observados en las trazas. C y F, total de fuerzas observadas para eventos individuales en las trazas. A, B y C, histogramas para la condición libre de ligandos. D, E y F, histogramas para la condición ADP-GLC.

Los histogramas presentados en la **Figura 5.12**, son bastante claros para demostrar que en la presencia de ADPGLC, el número de eventos disminuye hasta 3 (**Figura 5.12, A** respecto **D**). Sin embargo, la población de los eventos de extensión, se mantiene sin alteración, pudiendo detectar las tres poblaciones principales que se enriquecen por la ausencia de eventos antes presentes en la condición de

apoenzima pero ausente en la condición de ADPGLC (**Figura 5.12, B** respecto **E**). No obstante, el cambio más significativo de este grupo de histogramas, lo vemos en la fuerza. En ausencia de ligandos podemos ver claramente dos poblaciones, una principal centrada en los ~ 70 pN y una más pequeña ubicada sobre los 100 pN. Ahora, en la presencia del análogo ADPGLC vemos que la distribución de fuerza se vuelve más ancha modificando el centro de la distribución hasta los 80 pN (**Figura 5.12, C** respecto **F**).

Sin embargo, extraer conclusiones certeras sobre el comportamiento de la enzima en presencia y en ausencia del ligando usando estos histogramas es difícil. Por esto y con el objetivo de poder separar cada uno de los eventos presentes en el desplegamiento de la enzima, es que tomamos cada uno de los eventos de manera individual y tomamos la información de extensión y fuerza para cada una de ellas. Así, observamos que los eventos L1 se podían separar fácilmente del resto de los eventos. Lo mismo para el L4. Sin embargo, los eventos L2 y L3 se encontraban compuestos por pasos intermedios, de difícil resolución. Por este motivo, es que decidimos analizar solo los eventos L1 y L4, los que corresponden al primer y último evento observado en la ruta de desplegamiento de la TIGK. La **Figura 5.13**, muestra el total de histogramas construidos para este propósito.

Interesantemente, los histogramas muestran que el evento L1 conserva su extensión en ambas situaciones. El ajuste a una distribución gaussiana nos entregó como resultado una media y ancho de la distribución de 4 ± 2 nm, para la condición de apoenzima y 4 ± 3 nm, en presencia del ADPGLC (**Figura 5.13, A** y **B**). Los histogramas de fuerza muestran que este mismo evento es totalmente insensible a la unión de los sustratos, con valores de 45 ± 34 y 47 ± 25 pN, en la ausencia y presencia de los ligandos, respectivamente (**Figura 5.13, C** y **D**). No obstante, el evento L4, no experimenta cambios en su extensión en la presencia o ausencia de los ligandos (49 ± 8 nm y 47 ± 3 nm, **Figura 5.13, E** y **F**), pero la fuerza a la cual ocurren los eventos se ve modificada, desde 56 ± 15 pN en la apoenzima, hasta 71 ± 29 pN en la presencia de ADP-GLC (**Figura 5.13, G** y **H**).

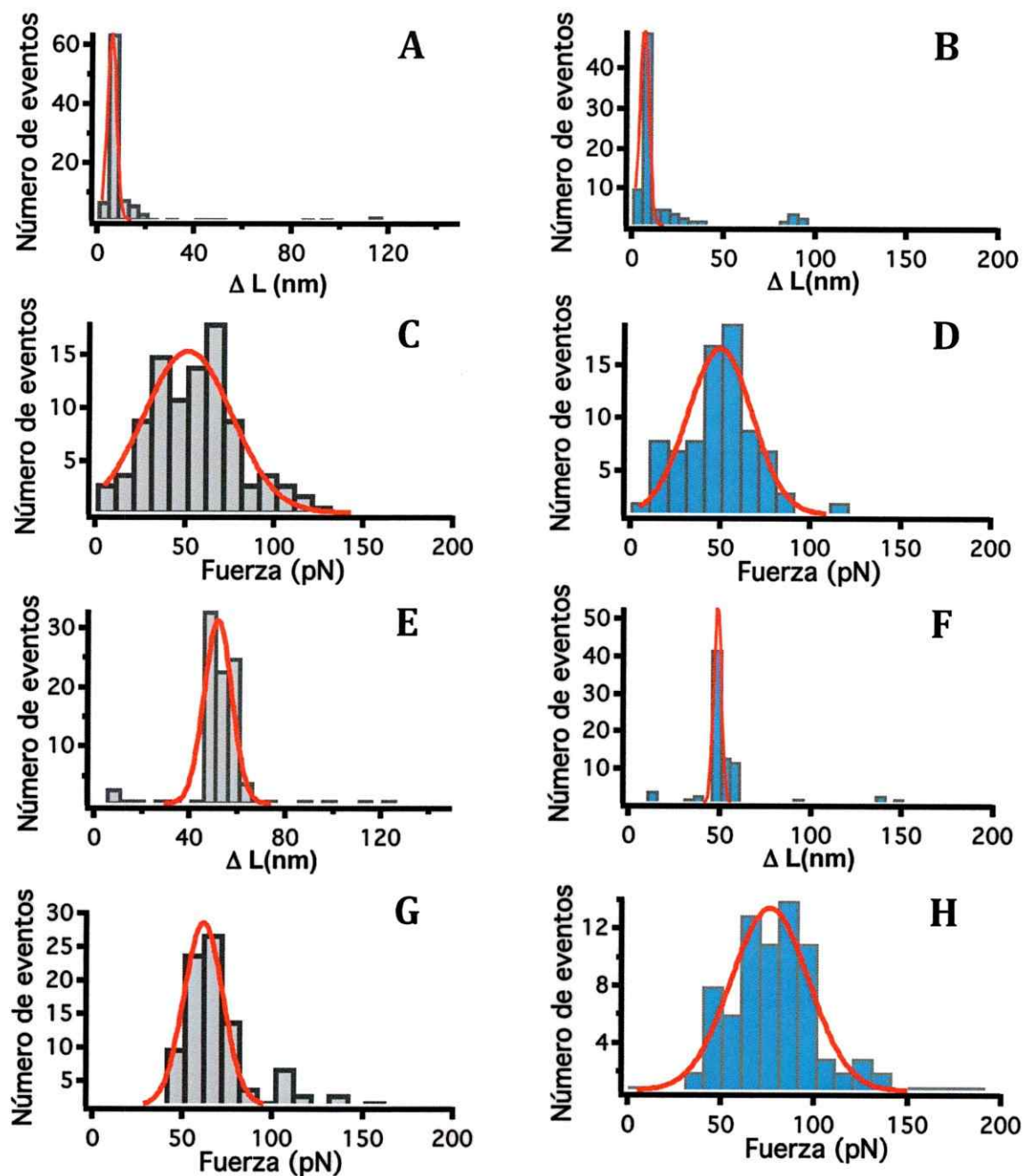


Figura 5.13. Eventos L1 y L4, en la ruta de desplegamiento de la TIGK. A y B, histogramas de extensión del evento L1. C y D, histogramas de fuerza para el evento L1. E y F, histogramas de extensión del evento L4. G y H, histogramas de fuerza para el evento L4. A, C, E y G, histogramas para la condición libre de ligandos. B, D, F y H histogramas para la condición ADP-GLC.

Estas evidencias muestran que claramente, el comportamiento de los intermediarios L1 y L4, es totalmente diferente. Así, el intermediario L4 es capaz de

captar la unión de los sustratos, mientras que L1 es del todo insensible. La explicación para esto, es que L1 se encuentra fuera de la ruta de desplegamiento sobre la cual los ligandos ejercen su acción, estabilizando el intermediario. No así, el L4, el que debe precisamente estar relacionado de alguna manera con la unión de los ligandos.

Al tomar desde nuestros experimentos de rampa, el valor de la extensión de 49 nm para el intermediario L4 y lo ubicamos en el contexto en que ocurren los desplegamientos, es decir, fuerzas entre 40 y 100 pN, podemos calcular aproximadamente la extensión total del polímero, conociendo que el valor de x/L es 0,8 (Ecuación 5.1). Por tanto, considerando una extensión a fuerza infinita, el valor estimado de 49 nm se convierten en 60 nm. Entonces el evento L4, puede ser relacionado con el evento de desplegamiento observado en nuestros experimentos de velocidad constante (Figura 5.4), es decir, el intermediario observado en los experimentos de velocidad constante es el mismo intermediario L4 observados mediante la estrategia de rampa de fuerza. El motivo por el cual L4 responde a la unión de los ligandos, es el mismo que antes se argumentó para los experimentos de velocidad constante (Figura 5.6), hebras beta que modifican su posición respecto al sitio activo, con los residuos Asp42 y His184 involucrados en la unión de la glucosa.

En resumen, se ha logrado caracterizar a nivel de molécula individual el comportamiento de la TLGK, observar cambios estructurales por la unión de los ligandos y finalmente detectar diversos intermediarios mecánicos en la enzima. En concreto, nuestros resultados apuntan a una proteína que no es especialmente estable a la perturbación mecánica, lo que entraría en contradicción con toda la información previa que poseemos de esta enzima referente a su estabilidad; una enzima que trabaja a muy altas temperaturas y una notable estabilidad frente a experimentos de denaturación térmica y por agentes caotrópicos. Entonces, las evidencias presentadas en esta sección apuntan a que existe una total independencia entre la estabilidad mecánica y térmica, es decir, el proceso de

desplegamiento mecánico se enfrenta a un paisaje energético que es totalmente diferente del paisaje por denaturación química y térmica.

V.F. Estimación de energía libre en el desplegamiento

Tal como se ha comentado anteriormente, los estudios de denaturación han sido una tarea muy compleja con la enzima TIGK. Esto es porque las técnicas clásicas se basan en el uso de temperatura o químicos como agentes denaturantes, que para nuestro modelo, es muy difícil de llevar a cabo, ya que los primeros cambios se observan sobre los 80 °C, sin lograr alcanzar ni siquiera la mitad del cambio (plegado-desplegado) y ubicándose en el margen de trabajo de los instrumentos clásicos para estas tareas, espectropolarímetros (CD), fluorímetros y calorímetros. Suponemos que la transición completa debería obtenerse a temperaturas cercanas a los 120 °C. La suma de dos agentes denaturantes, como urea y temperatura podría permitir sobrellevar este fenómeno y permitir lograr obtener datos útiles para la caracterización del desplegamiento-plegamiento de la enzima. Sin embargo, al usar esta estrategia, las mediciones al equilibrio tardan tiempo excesivamente prolongados, en ocasiones toman semanas para obtener solo una determinación de la isoterma.

El uso de la espectroscopia de fuerza, como estrategia de desplegamiento abre la posibilidad de lograr información sobre el proceso de plegamiento y desplegamiento de esta enzima hipertermófilas. Mas aún, tomando en cuenta de que ya exitosamente logramos desplegarla mediante perturbación mecánica usando la estrategia de velocidad constante (FX) y rampa de fuerza, es que da pie para iniciar los estudios de fuerzas constante (del inglés *Force Clamp*, FC), que nos entregan información certera sobre la constante cinética de desplegamiento (k_0) y la distancia del estado de transición involucrado en el proceso de desplegamiento mecánico de la enzima (x).

Con este propósito, nos abordamos a una de las tareas más complejas en la manipulación de moléculas mediante AFM, que es la estrategia de estiramiento de las moléculas bajo el régimen de fuerza constante. La complejidad de estos experimentos se basa en que la selección de la macromolécula debe ser muy limpia, sin artefactos y evitar hasta donde sea posible las interacciones entre las mismas macromoléculas depositada sobre la superficie ya que influyen los datos con "pasos" que en realidad no corresponden a eventos de desplegamiento de la proteína. Al igual que en los experimentos de FX (**Figura 5.4**) y F-rampa (**Figura 5.10**), las trazas fueron seleccionadas cuando al menos 3 eventos de desplegamiento de I27 se encontraban presentes en el registro.

Para poder caracterizar a la TIGK usamos el protocolo de doble pulso, mediante la estrategia de FC. El primer pulso de baja fuerza tiene como objeto, lograr desplegar a la enzima TIGK, mientras que el segundo pulso a 150 pN permite observar los eventos de desplegamiento para cada uno de los módulos de I27. De esta forma podemos capturar en una sola traza los eventos de desplegamientos para todos los módulos incluidos en la proteína químera. La **Figura 5.14** es un ejemplo del desplegamiento usando el protocolo de fuerza constante. En ella podemos observar el mismo comportamiento de multieventos presentes en el desplegamiento de la enzima tal como lo observamos en los experimentos de rampa (inserto **Figura 5.14** respecto **Figura 5.11**). En las trazas observamos que cada uno de los eventos del desplegamiento de la TIGK parecen estar conectados, es decir, en la medida en que uno de los eventos ocurre, rápidamente desencadena los otros eventos que lo acompañan.

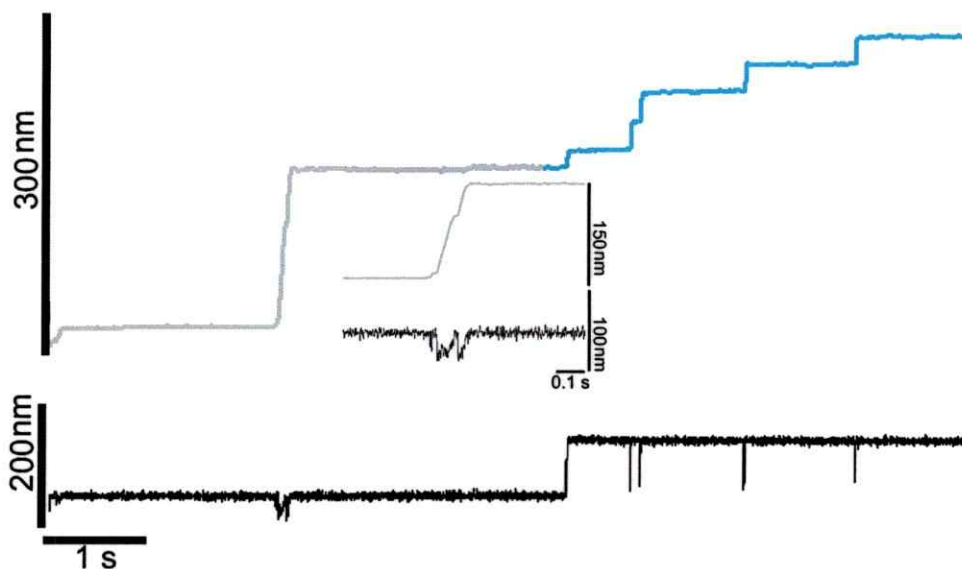


Figura 5.14. Despliegamiento mecánico del constructo $(I27)_2$ -TIGK- $(I27)_2$. Traza del despliegamiento bajo el régimen de FC del constructo usando una fuerza en el primer pulso de 50 pN y 150 pN en el segundo. El cambio de fuerza entre el primer y segundo pulso, se identifica en la inferior de la gráfica, como un cambio inmediato en la fuerza. La traza se coloreó en gris para identificar la extensión recuperada gracias al despliegamiento de la TIGK y en azul para los I27. Inserto muestra un aumento al evento de despliegamiento encontrado en la sección coloreado en gris.

Entonces aunque el despliegamiento de la enzima involucra más de un proceso, podemos asumir que cada uno de los intermediarios de despliegamiento se encuentran íntimamente relacionados entre sí, por lo que en medida de que ocurre el primer evento, se desencadena la ocurrencia de los siguientes. Aunque no representa con total fidelidad nuestros resultados, podemos suponer un proceso simple de despliegamiento constituido por el equilibrio $F \rightleftharpoons U$ (F , es la forma plegada de la enzima y U es la forma desplegada) y así usar un ajuste para el despliegamiento que involucre un proceso. Entonces, los eventos de despliegamiento observados de manera individual, pueden ser promediados en una única traza que resume el comportamiento de la población. Esta curva puede ser ajustada a un modelo simple de despliegamiento, logrando obtener la constante de velocidad del

proceso de desplegamiento a la fuerza en que se realizó el experimento. Si se emplea el modelo sugerido por Arrhenius, al explorar el desplegamiento a diferentes fuerzas, podemos calcular la distancia que tiene del estado de transición del proceso (Δx) y la constante de desplegamiento a fuerza cero (k_0):

$$k = k_0 - e \cdot (\Delta x / KT) \quad \text{(Ecuación 5.3)}$$

Donde k es la constante de velocidad a la fuerza F , k_0 la constante de velocidad a fuerza 0, Δx es la distancia del estado de transición, K corresponde a la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. Con el propósito de conocer sobre la k_0 , es que se realizó el desplegamiento de la proteína quimera variando el primer pulso de fuerza, explorando una gama de fuerzas que partieron en los 20 pN hasta los 80 pN. De cada una de ellas se extrajo la información de la constante de desplegamiento para la fuerza explorada. En el gráfico de fuerza respecto a la constante observada, se calculó la k_0 y Δx (**Figura 5.15.B**).

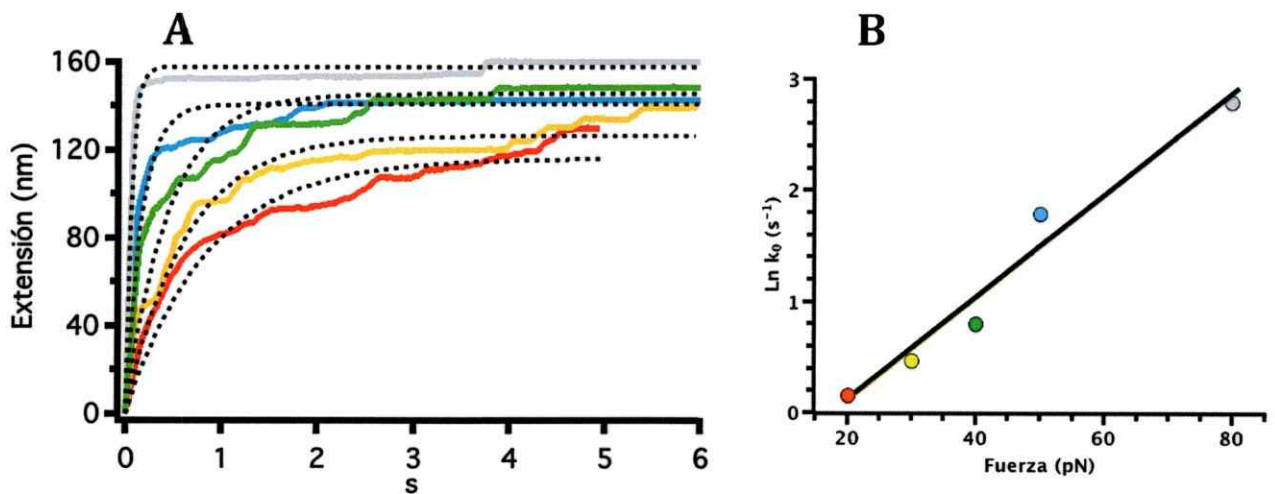


Figura 5.15. Cinéticas de desplegamiento de la TIGK bajo fuerza constante. A, promedio de trazas medidas a diferentes fuerzas de desplegamiento. Trazas de color rojo corresponde a 20 pN de fuerza de estiramiento, amarilla 30 pN, verde 40 pN, azul 50 pN y gris 80 pN. La línea entrecortada corresponde el ajuste de nuestros datos experimentales a exponencial simple. B, gráfico similogarítmico para la relación fuerza y k_0 . Para cada una de las fuerzas se conservó los colores empleados en A.

Para el desplegamiento de la enzima obtuvimos un k_0 de $0,44 \text{ s}^{-1}$, es decir, que bajo una situación de ausencia de fuerza la proteína experimenta 0,44 eventos de desplegamientos por segundos. En cuanto al Δx , obtuvimos un valor de $0,19 \text{ nm}$, muy próximo al valor obtenido para otras proteínas desplegadas mecánicamente. En rigor, la literatura ha apoyado la idea de que el valor de este estado de transición, corresponde a una molécula de solvente que se incorpora en la hebra beta constituyente del intermediario mecánico. De hecho la dimensión de $0,19 \text{ nm}$ corresponde al tamaño de una molécula de agua. El modelo propuesto es que esta molécula de agua rompe los enlaces de hidrógenos entre las hebras, evento favorecido por la fuerza aplicada sobre la macromolécula. Esta incorporación favorece a su vez la incorporación de otras moléculas de agua que continúan con la ruptura de los otros enlaces de hidrógenos restantes entre las hebras, que finalmente tienen como consecuencia la ruptura total del intermediario, escenario equivalente al que describimos en la **Figura 5.8**.

Conociendo el valor de la k_0 , es posible determinar la energética involucrada en el proceso de desplegamiento de la enzima. Usando la **Ecuación 5.3**, podemos relacionar la constante de velocidad con la energía libre involucrada:

$$k_0 = A \cdot e^{\left(\frac{-\Delta G^{\ddagger}}{k_B \cdot T}\right)} \quad \text{(Ecuación 5.3)}$$

Donde k_0 es la constante de velocidad para el desplegamiento, ΔG^{\ddagger} es la energía involucrada en el proceso de desplegamiento, K_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. A pesar de que el factor preexponencial no se ha determinado específicamente para este tipo de procesos, se sabe que el valor puede oscilar entre 10^3 y 10^{13} s^{-1} . Usando éste último valor para A (usado en otros estudios para la determinación del ΔG), y reemplazando el valor de $K_B T$ por $0,593 \text{ Kcal/mol}$ y de la constante de velocidad k_0 , podemos determinar el valor de la energía libre para el proceso. Para el desplegamiento de la enzima en ausencia de otros ligandos, se determinó que existen $18,22 \text{ Kcal/mol}$ comprometidas en la

diferencia entre el estado plegado y el estado de transición para el desplegamiento. Este valor, no está lejos del estimado para otras proteínas caracterizadas mediante esta estrategia de perturbación mecánica.

En conclusión, logramos caracterizar estructuralmente a la TIGK, mediante el desplegamiento mecánico en molécula individual, sobrellevando los problemas de agregación y estimando la constante de velocidad para el proceso de desplegamiento de la enzima.

DISCUSIÓN

1. Determinación del mecanismo cinético

Con la enzima purificada hasta homogeneidad, se realizaron los estudios para la determinación del mecanismo cinético de la enzima. En conjunto de todos los resultados obtenidos desde los ensayos de velocidad inicial y de inhibición por producto indicaron la entrada ordenada de los sustratos con la adición del complejo MgADP⁻ en primer lugar, seguido por la entrada de la glucosa. Por lo tanto, la enzima TlGK tiene un mecanismo cinético de tipo en secuencia ordenado tal como se propone en el **Esquema 1.1**, donde la entrada del nucleótido-metal es seguido por la unión del azúcar, formando el complejo ternario Enzima-MgADP-glucosa, para continuar con la salida de los productos la que es iniciada por la glucosa-6-fosfato para que finalmente ocurra la salida del MgAMP desde el sitio activo.

El mecanismo cinético de tipo en secuencia ordenado ya ha sido reportado para otros miembros de la superfamilia, tal como la Pfk-2 (Campos y col., 1984). En este caso la entrada de los sustratos se inicia con el azúcar aceptor del fosforilo, la fructosa-6-fosfato y luego de la formación del complejo enzima-F6P, ocurre la entrada del MgATP²⁻ para completar el complejo ternario Pfk-2-MgATP²⁻-F6P.

La implicancia que puede tener un mecanismo en secuencia se encuentra en concordancia con la idea propuesta por Daniel E. Koshland (Koshland, 1958), en la cual la conformación de la enzima libre en solución es diferente a la que tiene en presencia de los ligandos. Este modelo, conocido como "ajuste inducido", propone que la enzima debe modificar su conformación para favorecer la unión de los sustratos y alcanzar el estado de transición. La presencia de un mecanismo cinético ordenado, bajo el supuesto de ajuste inducido, necesariamente requiere que la proteína modifique su conformación tanto en la presencia del primer sustrato A, como en el complejo ternario E-A-B. De esta forma, la TlGK cambia su conformación

desde el estado de apoenzima hasta la forma unida al MgADP⁻, favoreciendo la unión de este sustrato. A continuación, el complejo E-A nuevamente debe modificar su forma para favorecer la unión de la glucosa, con el MgADP⁻ ya unido en el sitio activo. Sin embargo, teóricamente la unión de la glucosa puede ocurrir en la ausencia del MgADP⁻, pero como la enzima no ha experimentado el arreglo conformacional adecuado, la afinidad del complejo enzima-glucosa debe ser notablemente menor que la afinidad que tiene el complejo enzima-MgADP⁻-glucosa. Es éste precisamente el escenario para la enzima TIGK, donde se puede observar que al aumentar la concentración de glucosa de manera importante en las curvas de saturación para la glucosa a una concentración constante de MgADP⁻ (**Figura 1.2**), la reacción es inhibida, lo cual puede ser explicado por la unión de la glucosa a la enzima libre generando el complejo E-glucosa, lo que conduce hasta una forma de la enzima que no es catalítica o que no es capaz de unir MgADP⁻, por lo que la velocidad de la reacción disminuye por el secuestro de la enzima libre. Este fenómeno ocurre a concentraciones muy elevadas de glucosa, de hecho el ajuste de la inhibición por sustrato entregó un valor de K_i 7,5 mM para la glucosa. Si consideramos el valor de esta constante de inhibición como la K_D para el complejo E-B y se compara frente a la K_M para la glucosa calculada desde las curvas de saturación, que es de $\sim 200 \mu\text{M}$, podemos encontrar una diferencia de cerca 30 veces. Entonces, es posible entender que la diferencia en la afinidad al comparar estas dos constantes, sea debido a que la glucosa se une a diferentes formas de enzima, comprendiendo que es necesario que la enzima modifique su forma para poder acomodar debidamente a la glucosa. En el caso de la TIGK, ese cambio se logra sólo luego de la unión del nucleótido al sitio activo.

2. Cambios conformacionales inducidos por ligandos

Los resultados obtenidos desde los experimentos de SAXS diseñados para determinar el radio de giro de la enzima en solución, en presencia de los diferentes ligandos, indicaron que la enzima experimenta un cambio en su conformación. El radio de giro cambió desde un valor de 2,90 nm en el estado libre de ligando, a un valor de 2,59 nm en la presencia de MgADP⁻. Finalmente, el cambio se completa en la presencia de los dos sustratos, MgADP⁻ y glucosa, presentes en el sitio activo, entregando un valor de radio de giro de 2,40 nm (**Figura 2.2**). Esta secuencia de arreglos conformacionales es resultado de una adición ordenada de los sustratos, que coinciden con el mecanismo cinético de la enzima, proceso que se inicia con la entrada del complejo MgADP⁻, evento que tiene un cambio en el radio de giro de 0,31 nm, es decir, que la entrada del complejo metal-nucleótido o sustrato A según el mecanismo cinético, se traduce como un cambio en el diámetro de la enzima de 0,62 nm. Luego, la entrada del segundo ligando, la glucosa o sustrato B, tiene un cambio más bien discreto sobre la enzima, modificando el radio de giro en 0,19 nm, lo que tiene como consecuencia un cambio en el diámetro de la enzima de 0,38 nm. De esta forma, al reunir los experimentos de evaluación del radio de giro vemos que la enzima experimenta un cambio en su empaquetamiento de 0,50 nm, lo que significa que al comparar la enzima al inicio del ciclo catalítico, es decir, la enzima libre y el estado ternario enzima-MgADP-glucosa, el cambio en el diámetro es de 1,0 nm. Cambios equivalentes, para arreglos de dominios producto de la adición de sustrato ha sido también observado en la riboquinasa (RK) de *E. coli* (Sigrell y col., 1999). Aquí, mediante la comparación de las estructuras cristalográficas resueltas en ausencia y en presencia de los dos sustratos, la enzima RK experimenta un cambio en la disposición de los dominios mayores de cada monómero (la RK es un dímero) de 1,4 nm, al comparar el estado libre y unido a los dos sustratos.

Entonces, nuestros resultados sugieren que los cambios conformacionales están de acuerdo con el mecanismo cinético de la enzima, donde la formación del

complejo ternario, enzima-MgADP-glucosa, se encuentra en un estado cerrado. Las funciones de este cierre de dominios, pueden ser varias. La explicación más común consiste en que este arreglo conformacional es un mecanismo por el cual la enzima protege el estado de transición del ataque de moléculas de aguas del medio donde ocurre la reacción de transferencia, previniendo el aborto de la catálisis, por la hidrólisis del ADP hasta AMP y fosfato. Al tomar en cuenta la procedencia de la enzima glucoquinasa de *Thermococcus litoralis*, debemos considerar que este tipo de microorganismo habita en lugares bastante extremos donde la temperatura es próxima a los 85 °C. Entonces, las enzimas de rutas metabólicas claves, como la glicólisis, deben contar con estrategias para ser lo más eficiente posible. De esta forma, la estrategia de proteger el estado de transición del ataque de moléculas de aguas que puedan desfavorecer la reacción de sustitución, iniciado por el ataque nucleofílico del oxidrilo 6 de la glucosa hasta el fosfato β del ADP, puede ser un mecanismo muy útil para el normal flujo de precursores en la vía glicolítica en este microorganismo.

Para poder estudiar estos arreglos conformacionales fue necesario emplear análogos de los sustratos, para congelar el complejo ternario E-A-B, como fue el caso del empleo de ADP β S en los estudios de SAXS, ya que los arreglos conformacionales que experimenta la enzima a lo largo del ciclo catalítico ocurren en fracción de segundos. De hecho, si tomamos en cuenta la velocidad máxima que tiene la enzima, a la temperatura en la que fue determinado el mecanismo cinético, (40 °C), la enzima cataliza aproximadamente 54 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, lo que en términos de k_{cat} corresponden a 48 s^{-1} , lo que significa 48 eventos de catálisis por segundo. Entonces, cada ciclo catalítico, o el tiempo que tarda la enzima en unir una molécula de ADP y glucosa y convertirlos en los respectivos productos, dura aproximadamente 20 ms (deducido del inverso de la k_{cat}). Si suponemos además que para cada ciclo catalítico, la enzima cambia desde un estado abierto en ausencia de ligandos, pasa por un estado cerrado al unirse a los dos ligandos y finalmente recupera su conformación abierta al liberar los dos nuevos productos,

podemos concluir que el arreglo conformacional cerrado perdura una fracción de tiempo más pequeña aún. Incluso, si consideramos la k_{cat} en la que ocurre la reacción de transferencia *in vivo*, es decir próxima a los 85 °C, ésta es de 584 s⁻¹ (deducido por mediciones a altas temperaturas, datos no mostrados), por lo que el ciclo de catálisis tarda tan solo 1,7 ms, haciendo que los cambios conformacionales ocurran en un tiempo más breve aún.

Al considerar los datos obtenidos de la estructura cristalográfica en la presencia de ADP β S y glucosa, la idea del cambio conformacional o más bien del arreglo inducido por glucosa pudo ser comprobado, pero esta vez con detalle a nivel atómico. Sin embargo, estos hallazgos hacen cada vez más indispensable la disponibilidad de la estructura de la enzima en la condición libre de ligandos de modo de poder realizar comparaciones sobre los cambios conformacionales y conocer sobre la dinámica completa referente al cierre de dominios. Lamentablemente a la fecha, los ensayos de cristalización han sido infructuosos, sin que haya sido posible obtener buenos cristales para esta condición.

3. Papel de los residuos Glu203 y Arg205 en la unión y catálisis

Los estudios sobre el papel de estos residuos fueron parcialmente exitosos. A pesar de que para ambas posiciones se construyeron mutantes que buscaban comprobar la función de la cadena lateral, sólo en la mutante Arg205Gln fue posible obtener resultados que estuvieran de acuerdo con la proposición experimental. En la mutante propuesta para la posición 203, la sustitución Glu203Ala, no tuvo ningún efecto sobre la unión del MgADP⁻ ni tampoco sobre la catálisis es decir la mutante se comportó de manera idéntica a la enzima silvestre. La explicación para este resultado considerando la evidencia en otras enzimas homólogas, fue posible luego de la disponibilidad de la estructura cristalográfica de la TIGK en presencia de los dos sustratos. En esta estructura se puede observar que la distancia entre el

grupo carboxílico de la ácido glutámico y el N6 de la adenina ha disminuido a comparación a la estructura en la presencia de solo ADP, pero la distancia continua siendo mayor a 4 Å, por lo que la participación de este residuo en la estabilización del ADP está totalmente descartada, dado que esta distancia excede el valor máximo obtenido para enlaces de esta naturaleza que no supera los 3,5 Å.

Por otro lado, la sustitución Arg205Gln fue más informativa. De hecho la caracterización cinética fue bastante clara respecto al papel que tiene esta posición en la transferencia del fosfato desde el ADP hasta la glucosa. La sustitución genera una disminución aproximadamente 20 veces en la k_{cat} , al comparar este valor con el de la enzima silvestre. En este sentido, podemos entender lo crucial que es la presencia de la carga positiva en esta posición durante el proceso catalítico. La presencia de un aminoácido de naturaleza polar con un grupo amido en la cadena lateral, que mantiene la posibilidad de establecer interacciones no covalente con el sustrato pero carece de carga, lleva hasta una enzima con capacidad catalítica reducida.

Sin embargo, si tomamos en cuenta que esta posición debe ser crítica para que ocurra con normalidad la catálisis, la disminución de 20 veces no refleja ese escenario. De ser un residuo tan crucial, deberíamos recuperar una enzima que es del todo inactiva, con un cambio en la k_{cat} próximo a las 100 o más veces de cambio. No obstante, es necesario aclarar que además de esta posición existe otro residuo clave para la catálisis, el residuo Asp451, el cual favorece la desprotonación del grupo OH⁶ de la glucosa para el ataque nucleofílico sobre el ADP. De esta forma, la acción concertada de los residuos Asp451 y Arg205 permite que ocurra la transferencia del fosfato. Además, como la sustitución de Arg se realizó por un residuo de Gln, el estado de transición de la reacción puede ser estabilizado a través de un enlace de hidrógeno aportado desde el grupo NH₂ del amido de la glutamina, sobre los oxígenos cargados del estado de transición, fosforano o metafosfato (según el tipo de reacción de sustitución nucleofílica que ocurra en la reacción).

Todos estos hallazgos abren la posibilidad al planteamiento de nuevos estudios que persigan comprender de mejor manera el mecanismo catalítico, planteando nuevos mutantes o el empleo de análogos del estado de transición, para dilucidar el tipo de sustitución nucleofílica por la cual ocurre la reacción de transferencia, ya sea por medio de una reacción de tipo de adición-eliminación o más bien a través de una ruta disociativa, como ya se ha planteado para otras quinasas (Allen y Dunaway-Mariano, 2004).

4. Especificidad de metales y el papel del motivo conservado NXXE en la unión de éstos

Estudios referentes a la especificidad por metal demostraron que la TIGK es capaz de emplear no solo magnesio como metal divalente para la formación del complejo metal-nucleótido, sino también los complejos MnADP⁻ y CoADP⁻ son sustratos de la enzima, con parámetros cinéticos muy similares a los encontrados para el complejo MgADP⁻. Esto indica cierta promiscuidad por parte del sitio activo, para acomodar metales de transición o alcalinos térreos. Sin embargo, otros metales de transición tales como el Ni²⁺ y el Zn²⁺, que forman complejos con el ADP, no son empleados por la enzima TIGK. La explicación para esto se relaciona más bien con el tipo de coordinación que tiene el metal ya unido en el sitio activo. Magnesio, manganeso y cobalto, tiene en común, aparte de su estado de oxidación, el tipo de coordinación que éstos puede generar. Regularmente estos metales generan una coordinación de tipo octaédrica (MeL₆), constituida por 6 ligandos, mientras que los metales como el Ni²⁺ y Zn²⁺ prefieren coordinaciones de tipo trigonales, planar u octaédrica, que tienen número diferente de coordinación (Hsin y col., 2008). Entonces, esta diferencia en la disposición de los diferentes ligandos es clave para determinar el número de contactos que el metal debe establecer con el nucleótido y la proteína, ya sea directa o indirectamente, mediante moléculas de

agua. Además, la coordinación está relacionada con la disposición que debe adoptar el fosfato β del ADP. Tal como se ha observado en la estructura cristalográfica disponible en la base de datos (PDB ID 1gc5), los fosfatos del ADP se muestran en una disposición torsionada, lo que no refleja un estado conformacional de mínima energía, sino que más bien la molécula se encuentra en una disposición donde se favorece, por ejemplo, el ataque de nucleófilos sobre el fosfato β . Entonces, la disposición del metal en una coordinación de tipo octaédrica es crucial para la adecuada transferencia del fosfato hasta la glucosa y en el caso de la TIGK, solo se consigue con los complejos $MgADP^-$, $MnADP^-$ y $CoADP^-$.

Otro fenómeno interesante que se encontró, fue el efecto que se observaba cuando el metal libre supera cierta concentración. Este metal, ya sea magnesio, manganeso o cobalto, genera una inhibición de la reacción catalizada por la enzima. Usando el manganeso como herramienta para describir esta inhibición, se logró determinar que el mecanismo por el cual ésta ocurre se puede explicar a través del efecto del metal libre sobre el estado de transición de la reacción. De este modo, el metal libre se comporta en la enzima como un inhibidor de tipo mixto con respecto al $MgADP^-$, el cual podría ser un mecanismo general que tienen estas enzimas, que normalmente no son inhibidas por efectores, para regular la catálisis. Entonces, la vía glicolítica en este tipo de microorganismos, podría regularse modificando la concentración del metal libre lo cual controlaría la actividad de la primera enzima de la vía.

La mutante propuesta, la que presentaba la sustitución de Glu308Gln, mostró no tan solo que esta posición está involucrada en la estabilización del complejo metal-ADP⁻, sino que además está relacionado con la transferencia, esto reflejado en los cambios en la K_M y la k_{cat} , respectivamente. En este sentido, los resultados apuntan a una nueva función atribuible al motivo conservado NXXE, que no tan solo se limita en participar en la estabilización del metal que forma parte del complejo metal-nucleótido, sino que para el caso de la enzima TIGK, permite promover la transferencia del fosfato desde el ADP hasta la glucosa.

5. Desplegamiento mecánico

Tal como se comentó en las secciones anteriores, la enzima TIGK es una enzima termófila, razón por lo cual posee características inusuales que le permiten funcionar a temperaturas muy elevadas. Son estas mismas condiciones, las que limitan el estudio estructural de la enzima, esto porque las técnicas tradicionales se basan en el empleo de temperatura como un agente desnaturalante.

El hecho que una proteína sea termoestable nos indica que la cantidad de energía necesaria para favorecer el estado desplegado es mayor en comparación a una proteína que no tiene esta condición de termoestabilidad. Ahora, desde un punto de vista cinético para el mismo proceso de despliegamiento, la termoestabilidad puede ser explicada en el hecho de que las proteínas termoestables presentan cinéticas de despliegamiento muy lentas frente a la comparación de las proteínas mesófilas, es decir, para una misma condición dada el tiempo que toma en desplegar a una proteína termófila es mayor a comparación de una proteína mesófila. Con esta problemática, el cambio de estrategia para obtener la información estructural parece ser crucial. Por eso es que la espectroscopia de fuerza sumada al hecho de la manipulación de molécula individual, es la solución para el estudio estructural de la TIGK. A pesar de la gran estabilidad térmica y resistencia a agentes desnaturalante como urea, la enzima TIGK se despliega a fuerzas relativamente discretas al compararla a proteínas que están diseñadas para soportar la tensión, como lo son los módulos de I27 de la titina. La TIGK presenta una fuerza de desnaturalación de 40 pN para la población, cuando la proteína es desplegada a la velocidad estándar común para este tipo de tareas ($400 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$). Este valor se encuentra en un intervalo de fuerza equivalente al encontrado para otras proteínas no relacionadas con la contracción muscular o tareas de tensión. El motivo estructural armadillo o también conocido por su nombre del inglés *ankyrin*, se despliega a una fuerza de entre 40-50 pN (Li y col., 2005 y Lee y col., 2010). Talina, la proteína relacionada a funciones de señalización celular y adhesión

presenta varios intermediarios mecánicos, los cuales se despliegan a fuerzas de entre 29 y 51 pN (del Rio y col., 2009). Enzimas, como el caso de la nucleasa *staphylococcal* (SNAsa), se despliega a una fuerza de 26 pN (Wang y col., 2011). La dihidrofolato reductasa o también conocida por su abreviación DHFR, se despliega a una fuerza de 80 pN solo luego de la unión de su ligando metotrexato (Ainavarapu y col., 2005). En otras enzimas como la quinasa de titina la fuerza del desplegamiento es de 50 pN (Puchner y col., 2008). De esta forma, si bien la fuerza necesaria para desplegar a la TIGK es baja, está en el rango de otras proteínas ya descritas. Sin embargo, un aspecto importante es el hecho de que la proteína TIGK es sin duda una de las proteínas globulares más grande estudiadas a través de técnicas de molécula individual, además es la primera proteína hipertermófila donde su desplegamiento se ha estudiado mediante perturbación mecánica. Esta baja "estabilidad mecánica" no se condice con la gran termoestabilidad mostrada por la enzima, por lo que esta característica es una clara señal de la independencia que existe entre la termo y mecano-estabilidad. En ese sentido la estabilidad de una enzima, debe ponerse en el contexto de su caracterización. Usualmente se habla de estabilidad de una proteína, tomando como referencia las temperaturas o las concentraciones de agente desnaturante en la que ocurren las transiciones entre los estados plegado \leftrightarrow desplegado. De este modo hablamos de una proteína más estable que otra cuando esta transición se ubica por sobre de otra, es decir a concentraciones o temperaturas mayores respecto a la otra proteína. Así, el paisaje energético para estos estudios tradicionales describen el cambio energético desde un estado plegado \leftrightarrow desplegado, camino en el cual el total de las interacciones no covalentes presentes en la proteína, tales como enlaces de hidrógenos, puentes salinos y otras interacciones electrostáticas, son las protagonistas de la transición. Sin embargo, al considerar el fenómeno mecánico, el panorama cambia. El desplegamiento mecánico suele ser descrito por medio de la presencia de un intermediario mecánico, el cual consiste generalmente en un motivo estructural de la proteína, un par de hebras β o hélices α , que de acuerdo al tipo de geometría que

adopta durante el estiramiento y el número de enlaces de hidrógeno que se encuentran involucrados en el intermediario, varía la fuerza en la que ocurre el desplegamiento. Proteínas como la titina o ubiquitina, que se despliegan a fuerzas entre 170 y 200 pN, presentan un motivo estructural consistente en un par de hebras β paralelas, ubicadas prácticamente entre los extremos de la proteína, según la topología de cada una de las proteína. De esta forma, al aplicar fuerza una fracción muy pequeña de la proteína se ha desplegado antes de llegar hasta el punto del intermediario mecánico, siendo necesario aplicar una gran cantidad de fuerza para poder desplegar este motivo estructural, liberando todos los aminoácidos capturados entre estas dos hebras, que en concreto corresponden a prácticamente la proteína total. Entonces, al aplicar fuerza sobre estas proteínas, la transición desde el estado plegado al estado extendido desplegado, ocurre inmediatamente luego de vencer el intermediario mecánico. En el caso de proteínas como la TIGK, el intermediario mecánico no se encuentra al inicio de la trayectoria del desplegamiento, sino que más bien, se ubica luego de desplegar una gran parte de la proteína. De hecho, al calcular la distancia inicial (L_0) y restarle el valor de la distancia del intermediario mecánico hasta el desplegado (ΔL), podemos conocer la cantidad de la proteína que ha sido desplegada antes de encontrar el intermediario mecánico (**Figura 5.5**). Aproximadamente, hay un desplegamiento de 130 nm (325 residuos aminoácidos) de la proteína antes de encontrar la estructura del intermediario, donde la fuerza debe aumentar para poder continuar con el estiramiento (**Figura 5.4 y 5.5**).

Este intermediario mostró características excepcionales, tales como su respuesta a la unión de los diferentes ligandos de la enzima. Si recordamos los experimentos de SAXS, en ellos comprobamos que la proteína cambia su empaquetamiento en virtud de la unión de los ligandos, inclusive los modelos tridimensionales construidos a partir desde los mismos datos proponen un cierre de los dominios. Entonces, al ubicar los ligandos ADP y glucosa en la solución durante el proceso de desplegamiento estos deben unirse a la proteína, llevando a

la enzima hasta una conformación cerrada, la cual podría presentar propiedades mecánicas diferentes a las observadas para la proteína en ausencia de los ligandos (apoenzima). Esta es la explicación de por qué el intermedio mecánico (ΔL) experimenta un cambio en la fuerza desde 40 pN hasta 60 pN, un incremento que significa una estructura 50% más estable. Al realizar el desplegamiento en presencia de MgADP⁻, la proteína se encuentra en una conformación semi-cerrada, por lo que debió haber establecido una serie de enlaces de hidrógeno extras, los que son necesarios vencer al momento de estirar la molécula. Ahora, en el escenario con los dos ligandos la situación es bastante equivalente, la proteína aloja ambos sustratos en el sitio activo, modificando la disposición de los dominios hasta una conformación cerrada, en la cual la aplicación de fuerza desde los extremos debe nuevamente vencer un número de enlaces no covalentes diferente a los que están presente en la proteína libre de ligandos. Sin embargo, la pregunta que cabe plantear es ¿cómo es que la proteína que presenta un intermedio mecánico, que se hace evidente solo luego de desplegar cerca de 375 residuos, mantiene una conformación cerrada inducida por los ligandos y que es posible de capturar por el desplegamiento mecánico?. La respuesta para esta inquietud no es sencilla. El hecho experimental es que este intermedio responde a la unión de los ligandos, pero la proposición por si sola del cambio conformacional, no es suficiente.

La dinámica molecular entregó información sobre la ubicación de este intermedio. En las trayectorias exploradas se encontró un evento de la misma longitud de 60 nm, (**Figura 5.7**), el que está formado por las hebras $\beta 2$ y $\beta 8$ de la enzima, es decir, el intermedio mecánico está constituido desde el residuo 39, primer aminoácido de la hebra $\beta 2$, hasta el residuo 190, último residuo de la hebra $\beta 8$. Estas hebras β constituyen la bisagra que comunica ambos dominios, menor y mayor, por lo que son estas hebras las que experimenta las transiciones entre los estados abierto y cerrado (**Figura 5.8**). Entonces, ellas deben adoptar diferentes disposiciones en la medida que los ligandos se unen al sitio activo. De hecho, estas hebras participan en el ajuste de la glucosa en el sitio activo, ofreciendo dos

potenciales enlaces de hidrógeno desde el Asp42 (hebra β 1) y los hidroxilos 3' y 4' de la glucosa, sumado a otros dos más entre la His184 (hebra β 2) y los hidroxilos 2' de la glucosa (**Figura 5.9**). En la comparación de las estructuras disponibles para la TIGK en presencia de ADP y la estructura con ADP β S y glucosa, se puede observar un cambio en la disposición de las hebras. En esta comparación se logra distinguir cómo estas hebras se aproximan hasta el sitio activo en el momento que la glucosa está presente. La considerar estas dos estructuras para la TIGK y compararlas con una nueva estructura hipotética de la enzima, pero esta vez resuelta en la ausencia de ligandos completaría la secuencia de eventos de cambios conformacionales que experimenta la proteína, entregándonos más información. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, no ha sido posible obtener una condición adecuada para obtener cristales de calidad para poder difractar.

En resumen, el cambio de posición de la bisagra explica su relación con la unión de los sustratos. Sin embargo, es posible que el cambio no sea tan solo geométrico sino que posiblemente esté asociado al cambio en el número de enlaces de hidrógeno que se establecen entre ambas hebras, las que se modifican entre el estado abierto y cerrado de la enzima, lo que puede explicar el aumento significativo en fuerza entre los 40 pN hasta los 56 en la presencia de MgADP⁻ y 60 pN en la presencia de MgADP⁻ y glucosa. En la enzima homóloga PhGK (*P. horikoshii*), cristalizada en ausencia de ligandos y que se encuentra en la conformación abierta, se puede observar que las hebras equivalentes a las mencionadas anteriormente para la TIGK, se encuentran formando un número menor de enlaces de hidrógeno, solo 3 en vez de los 6 enlaces observados en la conformación semi-cerrada y cerrada de la TIGK. Por lo tanto, la sugerencia estructural sería que en la proteína en el estado abierto, la bisagra se encuentra constituida por dos hebras β que comprometen sólo 3 enlaces de hidrógeno entre ellas, mientras que cuando se cierra, estas mismas dos hebras se prolongan aumentando el número de enlaces de hidrógeno hasta 6. No obstante, existen algunos problemas al proponer esta idea. El primero es que esta proposición

proviene de una observación basada en la estructura de una enzima GK homóloga y no la misma enzima TIGK y segundo, es que previo a la hebra $\beta 8$ en la enzima PhGK existen 4 residuos comprendidos entre las posiciones 171-174 que no se encuentran resueltos, lo que hace sospechar una gran flexibilidad de este segmento que puede tener repercusiones importantes en la interpretación para la asignación de la extensión de las hebras beta.

Independiente de la idea del cambio en el número de enlaces de hidrógeno y del cambio de orientación que tienen la bisagra luego de la unión de los sustratos, lograr conciliar el problema de la falta de arquitectura necesaria para poder alojar los sustratos durante el desplegamiento, sigue en pie. La explicación para esto puede provenir del tiempo que es necesario para que la proteína cambie desde un estado a otro, es decir, para que cambie su estructura cerrada hasta la estructura abierta puede tomar más del tiempo que el necesario para que ocurra el desplegamiento mecánico. De hecho, el estiramiento completo de la poliproteína, considerando una velocidad de estiramiento de $400 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$, que consiste en aproximadamente 860 residuos aminoacídicos ($\sim 340 \text{ nm}$), tarda menos de 1 segundo. El desplegamiento de los 467 aminoácidos de la TIGK por lo tanto demora menos de 500 ms. Si suponemos que la transición está en el mismo orden, entonces es probable que cada vez que se manipule una proteína que tiene alojado en su interior los sustratos, se estará estirando la bisagra en la misma orientación y los mismos enlaces de hidrógeno que tiene en la conformación cerrada.

En concreto, nuestro trabajo logró proponer que la bisagra es el intermediario mecánico que funciona como un verdadero biosensor mecánico para la unión de los sustratos y que esto lo hace de manera muy sensible, pudiendo distinguir el arreglo estructural para la unión del primer sustrato, el MgADP^- y para la unión de los dos sustratos MgADP -glucosa.

Al cambiar la estrategia de desplegamiento de velocidad constante por una que utiliza una rampa de fuerza se logró obtener mejor resolución e información. De hecho, ahora se pueden correlacionar un número de eventos observados

experimentalmente con los propuestos por la dinámica molecular. El mismo escenario de aumento en la estabilidad mecánica puede ser retratado por estos experimentos, mostrando la misma secuencia de eventos, aumento con MgADP⁻ y un aumento mayor aún en la presencia de los dos sustratos. Sin embargo, lo más significativo fue el hecho de poder resolver eventos que eran independientes a la unión de los ligandos (L1 en **Figura 5.10** y **5.13**) de otros eventos que experimentaban cambios producto de la unión de los ligandos (evento L4 en **Figura 5.10** y **5.13**). Esto entregó consistencia a los resultados, eliminando la posibilidad de que el cambio en fuerza fuese un efecto inespecífico de la unión de los ligandos sobre la estructura de la proteína. Específicamente, el evento denominado como L4, equivalente al intermediario, mecánico de los experimentos de velocidad constante (ΔL), se moviliza hasta fuerza de desplegamiento mayores en la presencia de ADP y glucosa (**Figura 5.13**).

Desde un punto de vista energético, la caracterización mediante la estrategia de fuerza constante fue crítica. Con este tipo de perturbación se lograron resolver los intermediarios mecánicos presentes en la TIGK pero además, como las perturbaciones fueron realizadas a diferentes fuerzas constantes, fue posible determinar la constante para el proceso de desplegamiento en la ausencia fuerza. Si consideramos el valor de esta constante y lo comparamos con el obtenido para el desplegamiento de otras proteínas por estrategias clásicas como temperatura o agentes caotrópicos, el valor de la constante es bastante grande. Por ejemplo, para el caso de la Pfk-2, el proceso de desplegamiento está constituido por dos fases, una lenta con una constante de velocidad de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y una rápida de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Baez y col., 2011), lo que implica que en el caso de la constante más rápida la Pfk-2 se despliega 1 vez por cada 20.000 segundos, muy lejano de lo calculado para el caso de la TIGK, la cual debería experimentar al menos una transición entre el estado plegado y desplegado cada 2 segundos aproximadamente.

Ya ha sido descrito que la aplicación de fuerza modifica el paisaje energético de las proteínas, generando nuevos pozos mínimos energéticos desde donde se

estiman las constantes de velocidad y la energía libre comprometida en el proceso de desplegamiento. Por lo tanto, las coordenadas de reacción no son las mismas entre la perturbación química y la perturbación mecánica, lo cual queda claro al entender que para el caso de la desnaturación química, el resultado es una proteína que ha aumentado su radio de giro y se encuentra en un estado hinchado respecto a la estructura nativa, mientras que en la aplicación de fuerza, el estado desplegado corresponde a una proteína extendida, que es totalmente diferente de lo obtenido por la adición de temperatura o agentes químicos (Schlierf y col., 2004). De ese modo, la estimación de la constante de velocidad de la TIGK no puede ser comparada directamente con los valores obtenidos por medio de otras estrategias para otras enzimas, incluso en enzimas homólogas como la Pfk-2. Sin embargo, es posible comparar el valor de la constante de velocidad a fuerza cero con el valor obtenido para otras proteínas ya caracterizadas, como el módulo I27 de la titina o la ubiquitina. Para estas dos últimas, los valores son de $k_0=0,0007s^{-1}$ para el caso de la titina (Oberhauser y col., 2001 y Garcia-Manyes y col., 2007) y de $k_0=0,015s^{-1}$ para ubiquitina (Schlierf y col., 2004). Si bien estos son valores estimados bajo la misma perturbación y suposiciones del paisaje energético que las aplicadas sobre la TIGK, los valores son bastante inferiores, consecuencia de la alta estabilidad que tiene estas proteínas respecto a la enzima TIGK, frente al mismo desplegamiento mecánico.

El estado transición para el proceso de desplegamiento mecánico ha sido relacionado en la literatura con la extensión que tiene una molécula de solvente, la cual se incorpora en el intermediario mecánico. La base de la estabilidad del intermediario mecánico radica en que la fuerza es aplicada sobre los enlaces de hidrógeno que componen el intermediario, los que para el caso de un par de hebras β , implica que todos los enlaces son estirados de manera simultánea. La introducción de una molécula de agua, que establece nuevos enlaces de hidrógeno con los grupos amidos de los residuos de las hebras que componen el intermediario mecánico, lleva a la formación transitoria del estado transición de la reacción de

desplegamiento mecánico. En la TIGK, el valor de este estado de transición está muy próximo al valor de 0,2 nm, largo de una molécula de agua.

CONCLUSIONES

La enzima TIGK tiene un mecanismo cinético en secuencia ordenado el que es avalado por experimentos independientes de unión de los sustratos. La unión de los ligandos induce un cambio en el arreglo conformacional de la proteína.

En la TIGK la catálisis se inicia con la entrada del complejo MgADP⁻, lo que genera el mayor cambio estructural en la enzima modificando el arreglo de los dominios y provocando la primera parte del cierre de los mismos. A continuación ocurre la entrada del segundo sustrato, glucosa, el que induce el cierre completo de la proteína, modificando su radio de giro hasta el valor más bajo obtenido para la macromolécula.

A pesar que en el caso de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* se demostró la importancia de un residuo de ácido glutámico para la estabilización del ADP (Ito y col., 2003), en el caso de la TIGK el residuo de Glu203 no participa directamente en la estabilización de este ligando. De hecho, en la estructura cerrada las interacciones entre el ADP y la proteína no cambian luego de la unión de la glucosa (estructura obtenida por nuestro laboratorio). Sin embargo, la distancia entre la cadena lateral del residuo 203 y el grupo N⁶ de la adenina disminuye pero sin ser suficiente para el establecimiento de un enlace de hidrógeno.

Por otro lado, se demostró que el residuo Arg205, cuyo papel ha sido poco explorado en miembros de la superfamilia riboquinasa, participa directamente en la transferencia del fosfato, lo que abre la puerta a próximos experimentos relacionados a detallar mecanismo catalítico de la enzima, y que relacionen a este residuo de arginina con el estado de transición de la reacción.

Los resultados obtenidos respecto al motivo conservado NXXE en la TIGK, indicaron que no participa únicamente en la unión del Mg²⁺ que forma parte del sustrato metal-nucleótido, sino que además está involucrado en la transferencia del fosforilo. En este sentido, el motivo NXXE, estaría involucrado junto a otros

residuos de la enzima; aspártico Asp451 y Arg205, con el proceso de transferencia del fosforilo hasta la glucosa.

Finalmente, la caracterización mecánica de la enzima entregó pruebas claras sobre la independencia entre el fenómeno de termo y mecano-estabilidad. Esto apunta a que en el caso de la termoestabilidad se compromete la globalidad de la macromolécula, independiente de la arquitectura o plegamiento de la proteína, mientras que la estabilidad mecánica se relaciona con un motivo estructural puntual, que generalmente consiste en hebras β paralelas, la estructura más resistente a la tensión, según el sentido del vector de aplicación de fuerza. En el caso de la TIGK, este intermediario experimenta modificaciones en su disposición espacial luego de la unión de los sustratos, los que inducen un aumento en la estabilidad mecánica.

REFERENCIAS

1. Ainavarapu, K.S.R., Li, L., Badilla, C.L., Fernández, J.M. 2005. Ligand binding modulates the mechanical stability of dihydrofolate reductase. *Biophys. J.*, 89, 3337-3344.
2. Allen, K.N. y Dunaway-Mariano, D. 2004. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *Trends Biochem. Sci.*, 29, 495-503.
3. Baez, M., Wilson, C.A.M. y Babul, J. 2011. Folding kinetic pathway of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*: a homodimeric enzyme with a complex domain organization. *FEBS Lett.* 585, 2158-2164.
4. Bergmeyer, H.U. 1974. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
5. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-252.
6. Bustamante, C. 2008. *In singulo* biochemistry: When less is more. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 45-50.
7. Cabrera, R., Fischer, H., Trapani, S., Craievich, A.F., Garrat, R.C., Guixé, V. y Babul, J. 2003. Domain motions and quaternary packing of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli* studied by small angle x-ray scattering and homology modelling. *J. Biol. Chem.*, 278, 12913-12919.
8. Campos, G., Guixé, V. y Babul, J. 1984. Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme with a different mechanism. *J. Biol. Chem.* 259, 6147-6152.
9. Cao P., Gong Y., Tang L., Leung Y.C., Jiang T. 2006. Crystal structure of human pyridoxal kinase. *J. Struct. Biol.* 154, 327-332.
10. Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Fowler, S.B., Marszalek, P.E., Broedel, S.E., Clarke, J. y Fernández, J.M. 1999. Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 3694-3699.

11. Carrion-Vazquez, M., Li, H., Lu, H. Marszalek, P., Oberhauser, A.F. y Fernández, J.M. 2003. The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 10, 738-743.
12. Cecconi, C., Shank, E.A., Dahlquist, F.W., Marqusee, S. y Bustamante, C. 2008. Protein-DNA chimeras for single molecule mechanical folding studies with the optical tweezers. *Eur. Biophys. J.*, 37, 729-738.
13. Churchich, J.E. y Wu, C. 1981. Brain pyridoxal kinase. Mechanism of substrate addition, binding of ATP, and rotational mobility of the inhibitor pyridoxaloxime. *J. Biol. Chem.* 256, 780-784.
14. Cleland, W. W. 1970. Steady State kinetics. *The enzymes*. Volumen II, 3a edición, Academic Press, New York y London.
15. Cole, J.L., Carrol, S.S., Blue, E.S., Viscount, T. y Kuo, L.C. 1997. Activation of RNase L by 2'-5'-Oligoadenylates. *J. Biol. Chem.*, 272, 19187-19192.
16. Fisher, M.N. y Newsholme, E.A. 1984. Properties of rat heart adenosine kinase. *Biochem. J.*, 221, 521-528.
17. Fernández, J. y Li, H. 2004. Force-clamp spectroscopy monitors the holding trajectory of a single protein. *Science*, 303, 1674-1678.
18. Fersht, A. 1998. Structure and mechanism in protein science. Capítulo 6, pp. 207. W. H. Freeman and Company, New York.
19. Friend, T. (2007). *The third domain*. Joseph Henry Press. capítulos 1 y 2.
20. Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S. y Woese, C. R. 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4537-4541.
21. Garcia-Manyes, S., Brujic, J., Badilla, C. L. Y Fernández, J. M. 2007. Force-clamp spectroscopy of single-protein monomers reveals the individual unfolding and holding pathways of I27 and ubiquitin. *Biophys. J.*, 93, 2436-2446.
22. Gribaldo, S. y Brochier-Armanet, C. 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Phil. Trans. R. Soc.*, 361, 1007-1022.

23. Hsin, K., Sheng, Y., Harding, M. M., Taylor, P. y Walkinshaw, M. D. 2008. MESPEUS: a database of the geometry of metal sites in proteins. *J. Appl. Crystallogr.*, 41, 963-968.
24. Ito, S., Fushinobu, S., Yoshioka, I., Koga, S., Matsuzawa, H., Wakagi, T. 2001. Structural basis for the ADP-specificity of a novel glucokinase from a hyperthermophilic archaeon. *Structure*, 9, 205-214.
25. Ito, S., Fushinobu, S., Jeong, J.J., Yoshioka, I., Koga, S., Shoun, H. y Wakagi, T. 2003. Crystal Structure of an ADP-dependent Glucokinase from *Pyrococcus furiosus*: Implications for a sugar induced conformational change in ADP dependent kinase. *J. Mol. Biol.*, 331, 871-883.
26. Kengen, S.W.M., Tuininga, J.E., Bok, F.A.M., Stams, A.J.M. y de Vos, W.M. 1995. Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, 270, 30453-30457.
27. Koga, S., Yoshioka, I., Sakuraba, H., Takahashi, M. 2000. Biochemical characterization, cloning, and sequence of ADP dependent (AMP forming) glucokinase from two hyperthermophilic Archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *J. Biochem.*, 128, 1079-1085.
28. Koshland, D. E. Jr. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44, 98-104.
29. Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
30. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, 26, 283-291.
31. Lee, W., Zeng, X., Zhou, H-X., Bennett, V., Yang, W. y Marszalek, P.E. 2010. Full reconstruction of a vectorial protein folding pathway by atomic force microscopy and molecular dynamics simulations. *J. Biol. Chem.*, 285, 38167-38172.

32. Li, L., Wetzel, S., Pluckthun, A. y Fernandez, J. M. 2005. Stepwise unfolding of ankyrin repeats in a single protein revealed by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 90, L30-32.
33. Li, M.H., Kwok, F., Chang, W.R., Lau, C.K., Zhang, J.P., Lo, S.C.L., Jiang, T. y Liang, D.C. 2002. Crystal structure of brain pyridoxal kinase, a novel member of the ribokinase superfamily. *J. Biol. Chem.*, 277, 46385-46390.
34. Luthy, R., Bowie, J.U. y Eisenberg, D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356, 83-85.
35. Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 2003. Brock biology of microorganisms, 10ª edición, capítulo 12, pp 446-8, 458-9 y 468-71. Prentice Hall.
36. Maj, M.C., Singh, B. y Gupta, R.S. 2002. Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry*, 41, 4059-4069.
37. Makund S. y Adams M.W.W. 1990. Characterization of a tungsten-iron-sulfur protein exhibiting novel spectroscopic and redox properties from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, 265, 11508-11516.
38. Marszalek, P.E., Lu, H., Li, H., Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Schulten, K. y Fernández, J.M. 1999. Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature*, 402, 100-103.
39. Merino, F. y Guixé, V. 2008. Specificity evolution of the ADP-dependent sugar kinase family: *in silico* studies of the glucokinase/phosphofructokinase bifuncional enzyme from *Methanocaldococcus jannaschii*. *FEBS J.*, 16, 4033-4044.
40. Morrison, J.F. y Heyde, E. 1972. Enzymic phosphoryl group transfer. *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 29-54.

41. Neuman, K. C. y Nagy, A. 2008. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods*, 5, 491-505.
42. Neuner, A., Jannasch, H.W., Belkin, S. y Stetter, K.O. 1990. *Thermococcus litoralis* sp. nov.: a new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria. *Arch. Microbiol.*, 153, 205-207.
43. Noel, J.K., Whitford, P.C., Sanbonmatsu, K.Y. y Onuchic, J.N. 2010. SMOG@ctbp: simplified deployment of structure-based models in GROMACS. *Nucl. Acids Res.*, 38, W657-661.
44. Oberhauser, A.F., Hansma, P.K., Carrion-Vazquez, M. y Fernández, J.M. 2001. Stepwise unfolding of titin under force-clamp atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 468-472.
45. Parducci, R.E., Cabrera, R., Baez, M. y Guixe, V. 2006. Evidence for a catalytic Mg^{2+} ion and effect of phosphate on the activity of *Escherichia coli* Phosphofructokinase-2: Regulatory properties of a Ribokinase family member. *Biochemistry*, 45, 9291-9299.
46. Perez-Jimenez, R. Garcia-Manyes, S., Ainaravapu, S.R.K. y Fernández, J.M. 2006. Mechanical unfolding of the enhanced yellow fluorescent protein revealed by single molecule force spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 281, 40010-40014.
47. Petoukovich, M.V., Konarev, P.V., Kikhney, A.G. y Svergun, D.I. 2007. ATSAS 2.1 - towards automated and web supported small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.*, 40, 223-228.
48. Puchner, E.M., Alexandrovich, A., Kho, A.L., Hensen, U., Schafer, L.V., Brandmeier, B., Gräter, F., Grubmüller, H., Gaub, H.E. y Gautel, M. 2008. Mechanoenzymatic of titin kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 36, 13385-13390.

49. del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M. y Sheetz, M.P. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*, 323, 638- 641.
50. Sali, A. y Blundell, T.L. 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 234, 779-815.
51. Sambrook J. y Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^{ra} edición, editorial Cold Spring Habor Laboratory Press.
52. Sakuraba, H., Goda, S. y Ohshima, T. 2004. Unique sugar metabolism and novel enzymes of hyperthermophilic archaea. *Chem. Rec.*, 3, 281-287.
53. Sancho, J., Meiering, E. M. y Fersht, A. R. 1991. Mapping transition states of protein unfolding by protein engineering of ligand-binding sites. *J. Mol. Biol.*, 221, 1007-1014.
54. Schlierf, M, Li, H. y Fernández, J. M. 2004. The unfolding kinetics of ubiquitina captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 7299-7304.
55. Segel, I. H. 1975. *Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state systems*. Capítulos 3 y 9. John Wiley and Sons.
56. Sigrell, J.A., Cameron, A.D. y Mowbray, S. L. 1999. Induced fit on sugar binding activates ribokinase. *J. Mol. Biol.* 290, 1009-1018.
57. Stryer, L. 1995. *Bioquímica*. 4^{ta} edición. Capítulo 17. Editorial Reverte S.A.
58. Svergun D.I. 1992. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* 25, 495-503.
59. D. I. Svergun. 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.*, 76, 2879-2886.
60. Svergun, D.I., Petoukhov, M.V. y Koch, M.H.J. 2001. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.*, 80, 2946-2953.

61. Verhees, C.H., Kengen, S.W., Tuininga, J.E., Scout, G.J., Adams, M.W., de Vos, W.M., y Van Der Oost, J. 2003. The unique features of glycolytic pathways in archaea. *Biochem. J.*, 375, 231-246.
62. Wang, C.-C., Tsong, T.-Y., Hsu, Y.-H. y Marszalek P. E. 2011. Inhibitor binding increases the mechanical stability of staphylococcal nuclease. *Biophys. J.*, 100, 1094-1099.
63. Whitford, P.C., Noel, J.K., Gosavi, S., Schug, A., Sanbonmatsu, K.Y. y Onuchic, J.N. 2009. An all-atom structure-based potential for proteins: bridging minimal models with all-atom empirical forcefields. *Proteins*, 75, 430-441.
64. Wilson, C.A.M. 2011. Single molecule studies by optical tweezers: folding and unfolding of glucokinase from *Thermococcus litoralis*. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
65. Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4576-4579.
66. Xavier, K.B., Martins, L.O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W. y Santos, H. 1996. High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.*, 178, 4773-4777.
67. Xavier, K.B., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W. y Santos H. 1999. Maltose Metabolism in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Purification and Characterization of Key Enzymes. *J. Bacteriol.*, 181, 3358-3367.
68. Zhang, Y., Dougherty, M., Downs, D. M. y Ealick S. E. 2004. Crystal structure of an aminoimidazole riboside kinase from *Salmonella enterica*: implications for the evolution of ribokinase superfamily. *Structure*, 12, 1809-1821.
69. Zhang, X., Zhang, S., Yamane, H., Wahl, R., Ali, A., Lofgren, J. A. y Kendall, R. L. 2006. Kinetic mechanism of AKT/PKB enzyme family. *J. Biol. Chem.*, 281, 13949-13956.

Programas

1. *Martel, A. E., Smith, R. M. 1998. NIST critically selected stability constant of metal complexes. NIST standard references database 46, version 5.0.*
2. *Cornish-Bowden, A. 1986. Programa para el cálculo de complejos COMPLEX versión 6.*