



Universidad Austral de Chile

Escuela de Bioquímica

Profesor Patrocinante
Dra. Victoria Guixé L.
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Profesor Co-Patrocinante
Dr. Juan Carlos Slebe
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile

**“IMPORTANCIA DE LAS CISTEÍNAS 238 Y 295 EN LAS
INTERACCIONES ENTRE LAS SUBUNIDADES EN EL DÍMERO Y EN
EL TETRÁMERO DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli*”**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
grado de *Licenciado en Bioquímica*
y título profesional de *Bioquímico*.

ANDRES NILSON CANIUGUIR ORTEGA

**SANTIAGO, CHILE
2005**

Esta tesis fue desarrollada en el
Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular,
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias
de la Universidad de Chile.

A Emilia
A María
A mi padre
A mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a las siguientes personas:

A la Dra. Victoria Guixé, por su valiosa enseñanza, dirección y el constante estímulo durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Jorge Babul, por su confianza y contribución en mi formación científica.

Al Dr. Ricardo Cabrera, por su dedicación y creatividad, como también su inteligencia y amistad.

A Mauricio Báez, por sus enseñanzas, y su constante estímulo en mi formación profesional.

A Marcela Mancilla, por su amistad y la contribución en el desarrollo de cada uno de mis experimentos.

A Rafael Parducci, por su amistad y sus sorprendentes e inigualables anécdotas de su vida.

Al Dr. Claudio Vásquez por su colaboración en la obtención de la mutante Cys-238-Ala.

Al Dr. Victor Vargas e integrantes del Laboratorio de Luminiscencia y Estructura Molecular de la Universidad de Chile.

Por la amistad y hospitalidad de los miembros que compartieron mi estadía en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile como el Dr. Tito Ureta, Dra. Ana Preller, Erika Lang, Diana Rojas, Luis Pouchuqc, Rodrigo Guerrero, Diego Quiroga y Mauricio Arriagada.

A Manuel Arturo Acuña, por su amistad de toda una vida, y su fundamental apoyo en el proceso de mis estudios universitarios.

A Raúl Espinoza, Juan Carlos Ríos, Carola Tapia, Leonardo Gana, Mauricio Valdés, Gerardo Garnica, Ricardo Manzo y Jorge Mora quienes gracias a su confianza, sus alegrías y enseñanzas han iluminado el proceso de mi crecimiento personal.

Y en especial a mis tíos y abuelos, los arquitectos de mi vida, y a las mujeres más importantes de mi vida, Emilia, María y Millaray sin cuyo amor nada hubiera sido posible.

Y finalmente al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) por su participación en el financiamiento de la investigación.

Índice de Materias

Índice de Materias	i
Lista de Tablas	iv
Lista de Figuras	v
Abreviaturas	viii
1. RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 MATERIALES	10
3.1.1 Vectores	10
3.1.2 Partidores mutagénicos	10
3.1.3 Cepas bacterianas	11
3.1.4 Reactivos	12
3.2 MÉTODOS	13
3.2.1 Mutagénesis sitio dirigida	13
3.2.2 Preparación del DNA plasmidial	14
3.2.3 Secuenciación de las mutantes	14
3.2.4 Transformación de <i>E. coli</i> con CaCl ₂	14
3.2.4.1 Preparación de células competentes	14
3.2.4.2 Transformación por <i>shock</i> térmico	15
3.2.5 Crecimiento de cepas de <i>E. coli</i>	15
3.2.6 Control de expresión	16

3.2.7	Purificación de la fosfofructoquinasa	16
3.2.8	Determinación de la actividad enzimática	18
3.2.8.1	Análisis de los resultados	19
3.2.9	Determinación de la concentración de proteína	19
3.2.10	Cromatografía de exclusión molecular	19
3.2.11	Fluorescencia intrínseca	20
3.2.11.1	Análisis de los resultados	20
3.2.12	Dicroísmo circular	21
3.2.13	Determinación de grupos tioles con DTNB	22
3.2.14	Estudios de estabilidad frente a la desnaturación por GdnHCl	22
3.2.15	Dispersión dinámica de luz	22
3.2.16	Efecto de la concentración de proteína en la actividad específica de Pfk-2	23
4.	RESULTADOS	24
4.1	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS MUTANTES DE Pfk-2	24
4.1.1	Purificación de las enzimas mutantes	26
4.2	CHARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS MUTANTES DE Pfk-2	33
4.3	IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN MONÓMERO-MONÓMERO PARA LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE Pfk-2 SILVESTRE Y MUTANTES	37
4.4	EFECTOS ESTRUCTURALES DE LAS MUTACIONES DE Cys-238	42
4.4.1	Estado de agregación y regulación alostérica de las mutantes de Cys-238	42
4.4.2	Efecto de las mutaciones de Cys-238 sobre la estabilidad de la Pfk-2	45
4.4.3	Efecto de las mutaciones de Cys-238 sobre la unión de ligandos a la Pfk-2 ...	47
4.4.3.1	Unión de fructosa-6-P a la Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238	47

4.4.3.2 Unión de MgATP a la Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238	49
4.5 EFECTOS ESTRUCTURALES DE LAS MUTACIONES DE Cys-295	49
4.5.1 Estado de agregación y regulación alostérica de las mutantes de Cys-295	49
4.5.2 Efecto de las mutaciones de Cys-295 sobre la unión de ligandos a la Pfk-2 ...	55
4.5.2.1 Unión de fructosa-6-P a la Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-295	55
4.5.2.2 Unión de MgATP a la Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-295	55
4.5.3 Efecto de las mutaciones de Cys-295 sobre la estabilidad de la Pfk-2	61
5. DISCUSION	65
5.1 EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA Y EN LA INTERACCIÓN DE SUBUNIDADES	65
5.2 IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN MONÓMERO-MONÓMERO PARA LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA Y LA ESTABILIDAD DE Pfk-2	67
5.3 IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN DÍMERO-DÍMERO Y LA REGULACIÓN ALOSTÉRICA	68
6. REFERENCIAS	77

Lista de Tablas

Tabla I	Parámetros cinéticos de Pfk-2 silvestre y de las mutantes de Cys-238 y Cys-295.....	36
Tabla II	Constantes de disociación y coeficientes de Hill de Pfk-2 silvestre y mutantes Cys-238 y Cys-295 determinados por fluorescencia intrínseca ...	59

Lista de Figuras

Figura 1	Estructura moleculares de las sondas químicas EM y PM	9
Figura 2	Estructuras moleculares de los aminoácidos Cys, Ala y Phe	9
Figura 3	Control de expresión de Pfk-2 Cys-238-Ala después de inducir con IPTG...	25
Figura 4	Control de expresión de Pfk-2 silvestre y de las mutantes Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe	27
Figura 5	Purificación de Pfk-2 silvestre	28
Figura 6	Purificación de Pfk-2 Cys-238-Ala	29
Figura 7	Purificación de Pfk-2 Cys-238-Phe	30
Figura 8	Purificación de Pfk-2 Cys-295-Ala	31
Figura 9	Purificación de Pfk-2 Cys-295-Phe	32
Figura 10	Curvas de saturación para las mutantes de Cys-238	34
Figura 11	Curvas de saturación para las mutantes de Cys-295	35
Figura 12	Espectro de dicroísmo circular de Pfk-2 silvestre y de la mutante Cys- 295-Phe	38
Figura 13	Correlación entre la actividad enzimática y el estado de agregación de Pfk-2 silvestre en función de la concentración de GdnHCl	40
Figura 14	Efecto de la dilución de Pfk-2 silvestre y mutantes sobre la actividad específica	41
Figura 15	Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la reversión de la inhibición por MgATP de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-238	43

Figura 16	Filtración molecular de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-238 en ausencia de ligandos y en presencia de MgATP	44
Figura 17	Estabilidad del dímero de Pfk-2 silvestre y de las mutantes de Cys-238 en función de la concentración de GdnHCl	46
Figura 18	Efecto de la concentración de fructosa-6-fosfato sobre la fluorescencia intrínseca de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238	48
Figura 19	Efecto de la concentración de MgATP sobre la fluorescencia intrínseca de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238	50
Figura 20	Filtración molecular de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-295 en ausencia de ligandos y en presencia de MgATP	52
Figura 21	Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la reversión de la inhibición por MgATP de las mutantes de Cys-295	53
Figura 22	Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la actividad enzimática en presencia de concentraciones inhibitorias de MgATP	54
Figura 23	Efecto de la concentración de fructosa-6-fosfato sobre la fluorescencia intrínseca de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-295	56
Figura 24	Efecto de la concentración de MgATP sobre la fluorescencia intrínseca de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-295	58
Figura 25	Efecto de la concentración de MgATP sobre el estado de agregación de la mutante Cys-295-Phe	60
Figura 26	Estabilidad del dímero de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-295 en función de la concentración de GdnHCl	62

Figura 27	Estabilidad del tetramero de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-295 en función de la concentración de GdnHCl	64
Figura 28	Modelo por homología del dímero de Pfk-2 de <i>E.coli</i>	66
Figura 29	Modelo del tetramero de Pfk-2 de <i>E.coli</i>	70
Figura 30	Rol del estado oligomérico en la actividad enzimática y el comportamiento alostérico de Pfk-2	75

Abreviaturas

DTT	ditiotreitól
DEAE - celulosa	dietilaminoetil-celulosa
CD	dicroísmo circular
DLS	dispersión dinámica de luz
DTNB	5,5'-ditiobis (2-acido nitrobenzoico)
Fru-6-P	fructosa-6-fosfato
Fru-1,6-P₂	fructosa-1,6-bisfosfato
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	isopropiltiogalactósido
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
PM	pireno N- (1-pirenil) maleimida
EM	eosina maleimida
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
SACS	dispersión de rayos-X en ángulo pequeño
K_{0.5}	concentración de ligando que produce la mitad del efecto observado

1. RESUMEN

La unión de MgATP a un sitio alostérico en la enzima homodimérica fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *E. coli*, conduce a la inhibición de la actividad enzimática y a la formación de tetrámeros. La modificación química con pireno maleimida del residuo Cys-238 produce una enzima monomérica que es activa pero se comporta como dímero en presencia de los sustratos. Por otra parte, la modificación de Cys-295 con eosina maleimida genera una enzima dimérica, inactiva e incapaz de tetramerizar. Estos resultados sugieren que Cys-238 es un determinante de la estructura dimérica y que Cys-295, tiene un rol catalítico y en la formación de tetrámeros. Con el objetivo de evaluar la importancia de estos aminoácidos en la estructura y la función de Pfk-2 se estudiaron los efectos del cambio de estas cisteínas por alanina (Ala) y fenilalanina (Phe) sobre los parámetros cinéticos, la unión de ligandos, la estabilidad del dímero y la estabilidad del tetrámero de Pfk-2. Además, se correlacionaron estos efectos con la localización de estas cisteínas en el modelo molecular del dímero y del tetrámero de la enzima.

Los parámetros cinéticos de las enzimas mutantes de Cys-238 no fueron significativamente diferentes a los de la enzima silvestre, mientras que la mutación de Cys-295 por Ala o Phe produjo una disminución de 2 a 7 veces en la k_{cat} y un incremento de entre 3 y 6 veces en las K_m para ambos sustratos. Experimentos de desnaturación por cloruro de guanidinio y del efecto de la concentración de proteína sobre la actividad enzimática muestran una estrecha correlación entre la pérdida de la actividad y la disociación del dímero en Pfk-2 silvestre. Las mutantes de Cys-238 (por Ala y Phe) presentan un comportamiento similar al de la enzima nativa, en tanto que la mutante de Cys-295-Phe es menos estable a la desnaturación y más sensible a la dilución de la proteína. Estos resultados sugieren que la mantención de la estructura dimérica es esencial para la actividad enzimática y que el residuo Cys-238 no contribuye ni a la interacción monómero-

monómero, ni a la estabilidad del dímero. Todas las mutantes de Cys-238 y Cys-295 son inhibidas alostéricamente por MgATP como la enzima nativa, pero sólo la mutante Cys-295-Phe requiere concentraciones mayores que 5 mM de fructosa-6-P para revertir la inhibición. Este efecto está correlacionado con un incremento en la estabilidad del tetrámero de esta mutante, ya que la concentración de cloruro de guanidinio necesaria para desplegar la enzima en presencia de 1 mM MgATP es mayor que para el resto de las mutantes y la enzima silvestre. Además, ambas mutantes de Cys-295 presentan un leve incremento en la K_d para la unión de fructosa-6-P, en concordancia con el incremento observado en la K_m para el azúcar-fosfato.

Los resultados obtenidos son consistentes con la ubicación del residuo de Cys-295 en el modelo por homología del tetrámero de Pfk-2, el que se ubica en una región muy cercana del sitio activo y de la interface dímero-dímero. Por lo tanto, es probable que su modificación afecte las propiedades del sitio activo y la interacción entre dímeros para la formación del tetrámero de Pfk-2. Por su parte, el residuo Cys-238 está localizado en una región alejada del sitio activo, de la interface del dímero y de la del tetrámero.

Considerando estos resultados en conjunto, se desprenden las siguientes proposiciones: (1) el estado dimérico de Pfk-2 es esencial para estabilidad y la actividad catalítica de la enzima, (2) el residuo Cys-238 no participa en la interacción monómero-monómero de la enzima, como se había sugerido por los estudios de modificación diferencial con sondas químicas y, (3) el residuo Cys-295 afecta las propiedades del sitio activo, la estabilidad del dímero y aumenta la fuerza de interacción entre dímeros en el tetrámero de la Pfk-2.

1.1 ABSTRACT

The binding of MgATP to an allosteric site in the homodimeric phosphofructokinase-2 (Pfk-2) from *E. coli* drives to the inhibition of enzymatic activity and the association of dimers into tetramers. Chemical modification of Cys-238 in Pfk-2 with pyrene maleimide resulted in an active monomeric enzyme which converts into dimers in the presence of the substrates. On the other hand, eosine maleimide-modified Pfk-2 on Cys-295 resulted in an inactive dimeric enzyme which is unable to form tetramers in the presence of MgATP. These data suggested a role for Cys-238 on the maintenance of the dimeric structure and a role for Cys-295 on catalysis and tetramer formation of Pfk-2. In order to evaluate the proposed roles for Cys-238 and Cys-295 in the structure and function of Pfk-2, these residues were mutated to alanine and phenylalanine (Ala and Phe, respectively) and the effects over kinetics, ligand binding, and stability of Pfk-2 were determined. Also, we establish a correlation between these effects and the location of both residues on the dimeric and tetrameric models of Pfk-2.

Mutations on Cys-238 result in no effects over kinetic parameters with respect to wild type enzyme. However, changing Cys-295 for Ala or Phe produced a 2 to 7 fold decrease in the k_{cat} and 3 to 6 fold increment in the K_m for both substrates. There is a correlation between the properties of the loss of enzymatic activity and dimer dissociation in guanidinium chloride-induced unfolding and protein dilution experiments. Although no differences can be observed between the properties of Cys-238 mutants and wild type enzyme, a less stable and more sensitive dimer to protein dilution is seen when Cys-295 is replaced by Phe. These results suggest that the dimeric state is required for enzymatic activity and that Cys-238 residue is not affecting the monomer-monomer interactions that contribute to dimer stability, as is seen with the Cys-295 residue. All the Cys-238 and Cys-295 mutants were inhibited by MgATP as the wild type

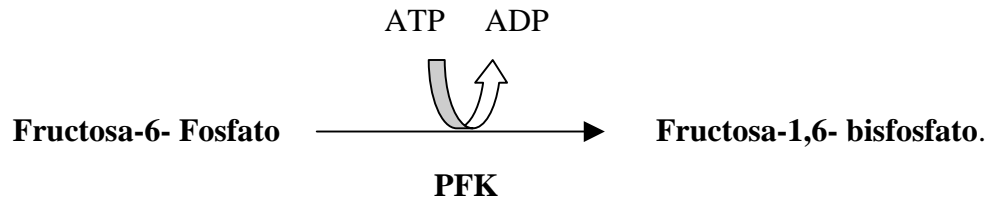
enzyme. However, only the Cys-295-Phe mutant requires unusually high fructose-6-P concentrations (up to 5 mM) to relieve the MgATP-induced inhibition. This effect is probably due to the fact that the tetrameric (MgATP-bound) form of Cys-295-Phe is more stable to denaturation than the wild type or the other mutant enzymes, as demonstrated by guanidinium chloride-induced unfolding experiments carried out in the presence of 1 mM MgATP. Also, a slight increment in the K_d for fructose-6-P is observed as a consequence of mutations on Cys-295, in agreement with the increment observed for the K_m of the sugar-phosphate in this mutant.

These observations agree with the location of Cys-238 and Cys-295 in the molecular model of the Pfk-2 tetramer obtained using homology modelling and X-ray scattering. In the model, the Cys-295 residue is located near to both, the active site and dimer-dimer interface. Therefore, modification of this residue are expected to change the active site properties and subunit interactions. Since Cys-238 is far from the active site and monomer-monomer and dimer-dimer interfaces, mutants on this residue are not expected to affect enzymatic activity or dimer dissociation.

Taken together, three conclusions can be drawn from the results obtained: (1) the dimeric state is essential for the stability and function of Pfk-2, (2) the Cys-238 residue is not a structural determinant of the dimeric state, as suggested by previous chemical modification experiments, and (3) the Cys-295 residue affects the active site properties, dimer stability and subunit interactions in the tetramer form of Pfk-2.

2. INTRODUCCIÓN

La fosfofructoquinasa (PFK) cataliza la transferencia del fosfato γ del ATP al hidroxilo 1 de la fructosa-6-P para originar fructosa-1,6-bisP y ADP y está sujeta a múltiples mecanismos de regulación en bacterias, arqueas y eucariontes.



En *Escherichia coli* (*E. coli*) existen dos isoenzimas que catalizan esta reacción (Fraenkel y col., 1973): Pfk-1 (34 kDa), codificada por el gen *pfkA* (Thomsom, 1977) y Pfk-2 (33 kDa), codificada por el gen *pfkB* (Daldal y Fraenkel, 1981; 1983; Babul, 1978).

Pfk-1 ha sido extensamente estudiada, es una enzima homotetramérica cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Shirakihara y Evans, 1998). Pfk-1 exhibe una cinética sigmoidea con respecto a fructosa-6-P e hiperbólica con respecto a ATP, presenta inhibición por la unión alostérica de fosfoenolpiruvato y activación alostérica por ADP o GDP. Ambos ligandos compiten por la unión al mismo sitio alostérico localizado en la interface de las subunidades, al que contribuyen aminoácidos de cadenas polipeptídicas diferentes. La unión de estos efectores alostéricos no modifica el estado de agregación de la enzima (Babul, 1978; Blangy y col., 1968). La importancia de las interacciones a nivel de las interfaces de Pfk-1 ha sido ampliamente estudiada. (Auzat y col., 1995; Le Bras y col., 1995). Los sustratos, MgATP y fructosa-6-P, se unen al sitio activo con un mecanismo cinético al azar y presentan antagonismo entre ellos, es decir la unión del primer sustrato disminuye la afinidad de la enzima por el segundo sustrato (Deville-Bonne y col., 1991; Johnson y Reinhart, 1992; Zheng y

Kemp, 1992), lo que lleva a que Pfk-1 presente inhibición por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P.

Por su parte, Pfk-2 presenta cinética hiperbólica con respecto a fructosa-6-P e inhibición por MgATP cuando el ensayo enzimático se realiza a bajas concentraciones de fructosa-6-P. En estas condiciones, a diferencia de Pfk-1, la Pfk-2 cambia su estado de agregación de un dímero a un tetrámero. Se ha demostrado, a través de estudios de fluorescencia intrínseca, la presencia de un sitio alostérico para MgATP en Pfk-2, el cual sería responsable de la inhibición de la actividad de la enzima y de su tetramerización (Guixé y col., 1998). Por lo tanto, el cambio conformacional provocado por la unión del efector alostérico MgATP, hace posible la formación de la interface dímero-dímero en el tetrámero de Pfk-2. Sin embargo, aún no se conoce la manera por la cuál las propiedades de esta nueva interface en la enzima se relacionan con la inhibición de la actividad enzimática provocada por la unión de MgATP. Pfk-2 presenta un mecanismo cinético en secuencia ordenado, en el que fructosa-6-P es el primer sustrato que se une a la enzima y fructosa-1,6-bisfosfato es el último producto en liberarse (Campos y col., 1984).

La estructura primaria de Pfk-2, deducida a partir de la secuencia nucleotídica, no presenta relación con la familia de la Pfk-1, sugiriendo que estas familias no están filogenéticamente relacionadas (Daldal, 1984), o que la relación evolutiva entre ellas es demasiado distante como para reflejarse a nivel de secuencia. Pfk-1 pertenece a la familia de enzimas PFKA, que incluyen a la mayoría de las fosfofructoquinasas dependientes de ATP y pirofosfato que se encuentran en los dominios *bacteria* y *eucarya* (Ronimus y col., 2001). Por su parte, Pfk-2 pertenece a la familia PFKB que incluye a algunas quinasas tales como fructosa-1-fosfato quinasa, adenosina quinasa, ribosa quinasa, inosina quinasa y la Pfk de la arquea *Aeropyrum*

pernix (Bork y col., 1993; Spsychala y col., 1996; Ronimus y col., 2001; Hansen y Schönheit, 2001).

Se dispone de varias estructuras cristalográficas para proteínas de la familia PFKB: la adenosina quinasa humana, la adenosina quinasa de *Toxoplasma gondii* (Mathews y col., 1998; Schumacher y col., 2000), la riboquinasa de *E. coli* (Sigrell y col., 1998) y la 2-ceto-3-deoxigluconato quinasa de *Thermus thermophilus* (Ohshima y col., 2004). Además se encuentra disponible en el PDB una quinasa de azúcares putativa (TM0828, PDBid: 1o14) de *Thermotoga marítima*. Dado que no se conoce la estructura tridimensional para Pfk-2, se ha construido un modelo tridimensional generado en base a algunas de las estructuras conocidas de proteínas homólogas (riboquinasa y adenosina quinasa, Cabrera y col., 2003).

La secuencia de aminoácidos de Pfk-2, deducida a partir de la secuencia de DNA, muestra la presencia de cuatro residuos de cisteína (Daldal, 1983; 1984). Se ha descrito la modificación química de Pfk-2 con un reactivo modificador de grupos SH, pireno N- (1-pirenil) maleimida (PM), (Figura 1A). La reacción de modificación ocurre con una estequiometría de 2 moles de PM por mol de subunidad y resulta en una rápida inactivación de la enzima y la disociación de ésta de dímero a monómero, indicando que los grupos SH son críticos para la interacción entre subunidades en Pfk-2 (Guixé, 2000). La secuenciación de los péptidos modificados estableció que la modificación ocurre en los residuos de cisteína 238 y 295. Cuando la reacción se realiza en presencia del efector alostérico MgATP, solamente el residuo Cys-238 es modificado, lo que resulta en una enzima totalmente activa, que es un monómero en ausencia de ligandos y que, al igual que la enzima nativa, es inhibida por MgATP y forma tetrámeros en presencia del nucleótido. Sin embargo, en presencia de fructosa-6-P y ATP⁻⁴, ligandos que se unen al sitio activo, la enzima se comporta como un dímero, sugiriendo que los monómeros llevan a cabo

una reasociación en presencia de los sustratos y que la especie activa es el dímero. La modificación de Pfk-2 con eosina-5-maleimida (Figura 1B) resulta en la modificación del residuo de cisteína 295 (Báez y col., 2003). La enzima modificada es inactiva, es un dímero, es incapaz de unir MgATP y por lo tanto no tetrameriza. Estos estudios de modificación química, en los que se modificó diferencialmente una u otra cisteína, mostraron que la Cys-238 es un determinante importante para la oligomerización de Pfk-2, en tanto que la modificación de la Cys-295 elimina completamente la actividad enzimática sin alterar la estructura dimérica (Báez y col., 2003). Con el fin de evaluar más claramente el papel de estos residuos en la estructura y función de la enzima, en esta tesis se realizó la mutagénesis sitio-dirigida de los residuos Cys 238 y Cys 295 por alanina y fenilalanina (Figura 2A-C). Con las mutantes obtenidas se realizó una caracterización cinética y estructural para establecer la importancia de estos grupos en la interacción entre subunidades en el dímero y tetramero y en la actividad catalítica de Pfk-2 de *E. coli*. Esto resulta particularmente interesante, ya que hasta el momento se carece de información acerca de residuos específicos que participen en determinadas funciones, como actividad catalítica o interacción entre subunidades en esta enzima.

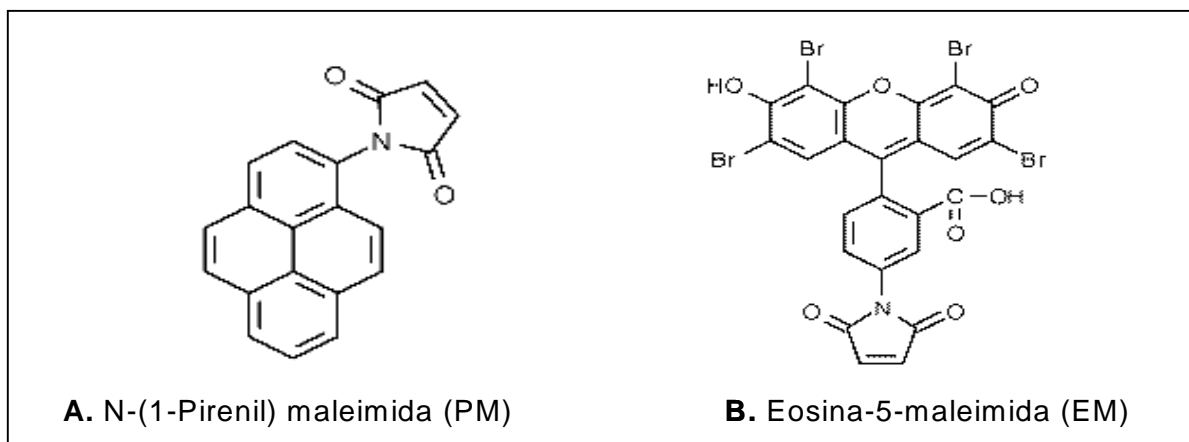


Figura 1. Estructuras moleculares de las sondas químicas: **A.** Pireno maleimida (PM) y **B.** Eosina maleimida (EM).

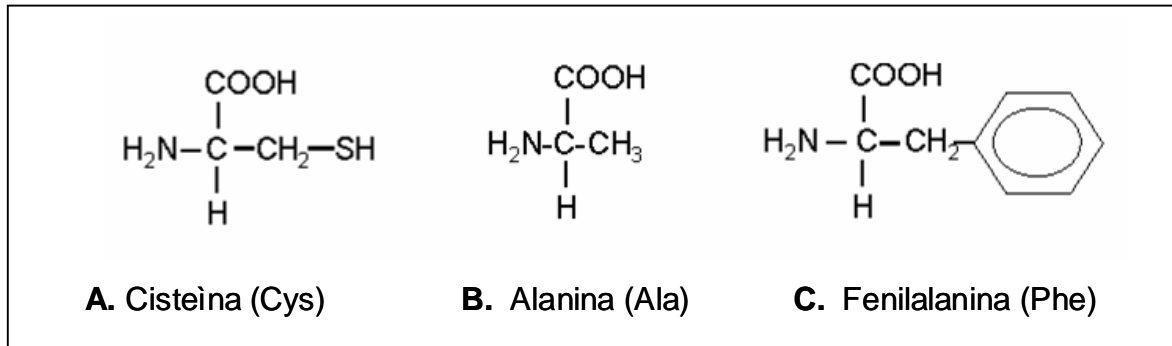


Figura 2. Estructuras moleculares de los aminoácidos: **A.** Cisteína (Cys), **B.** Alanina (Ala) y **C.** Fenilalanina (Phe).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Vectores

El fragmento correspondiente al gen de Pfk-2 (927 pb) se subclonó en el vector pET 21-d (Novagen, Inc.). El gen clonado se encuentra bajo el control del promotor T7 con sitios de corte para las endonucleasas NcoI (extremo 5', que conserva el codón de inicio, ATG) y XhoI (extremo 3', que conserva el codón de término original del gen). Este vector posee un tamaño aproximado de 5.400 pares de bases y un gen que confiere resistencia a ampicilina. Esta construcción se usa para expresar la proteína mutante Cys-238-Ala en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) por inducción con IPTG durante 4-5 h.

El plasmidio pGP1-2 (Tabor y Richardson, 1992) que contiene el gen de la RNA polimerasa T7 se utilizó para la sobreexpresión de las enzimas mutantes Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe en la cepa DF1020 que no produce Pfk's endogenamente. El gen de la RNA polimerasa T7 se encuentra bajo el control del promotor λ pL y su expresión puede ser inducida por temperatura (usualmente 42° C por 20 minutos). Este vector posee un tamaño de 7.200 pares de bases y contiene un gen cuyo producto confiere resistencia a kanamicina y es compatible con el vector pET 21-d.

3.1.2 Partidores mutagénicos

Se usaron dos oligonucleótidos mutagénicos para introducir cada mutación, ambos complementarios con hebras opuestas del DNA templado. La letra en negrita indica las bases reemplazadas, mientras que las bases subrayadas corresponden al triplete del codón del residuo sustituido (solo se muestran las hebras "codificantes").

- Secuencia del gen de la Pfk-2 alrededor de Cys-238

5' - (233)GTT GAT AGT GAA AAC TGT ATT CAG GTG GTG CCA - 3'

- Secuencia del gen de la Pfk-2 alrededor de Cys-295

5'-(290)CAG GGA ACA CGT CTG TGC TCC CAT GAC GAT ACG - 3'

- Oligonucleótido mutagénico Cys-238-Ala:

5' - GTT GAT AGT GAA AAC GCT ATT CAG GTG GTG CCA - 3'

- Oligonucleótido mutagénico Cys-238-Phe:

5' - GGT GTT GAT AGT GAA AAC TTT ATT CAG GTG GTG CCA CCA - 3'

- Oligonucleótido mutagénico Cys-295-Ala:

5' - CAG GGA ACA CGT CTG GCC TCC CAT GAC GAT ACG - 3'

- Oligonucleótido mutagénico Cys-295-Phe:

5' - CAG GGA ACA CGT CTG TTC TCC CAT GAC GAT ACG - 3'

Los oligonucleótidos Cys-238-Ala y Cys-295-Ala fueron sintetizados por Keystone Labs (Camarillo, CA, USA) a través de Biosonda (Chile) y los partidores de Cys-238-Phe y Cys-295-Phe fueron sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) a través de Bios Chile (Chile).

3.1.3 Cepas bacterianas

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) (F^- *ompT hsdSB* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3)) que posee en su genoma una copia del gen de la RNA polimerasa T7 inducible por IPTG, fue transformada con el vector de expresión pET 21-d para la sobreexpresión de la Pfk-2 nativa y Pfk-2 Cys-238-Ala.

La cepa DF1020 (*pro82*, Δ *pfkB201*, *recA56*, Δ -(*rha-pfkA*), *endA1*, *hsdR17*, *supE44*) que presenta deleciones para ambos genes de fosfofructoquinasas, *pfk-1* y *pfk-2* (Daldal, 1983), fue doblemente transformada con el vector pGP1-2 que posee el gen de la RNA polimerasa del fago

T7 (inducible por temperatura) y el vector pET 21-d que contiene el gen mutante de Pfk-2 (Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe). Esta cepa se utilizó para la expresión de las proteínas mutantes en ausencia de PFK endógena.

3.1.4 Reactivos

D- fructosa-6- fosfato, adenosina 5'-trifosfato (ATP), α - glicerofosfato deshidrogenasa triosa fosfato isomerasa (músculo de conejo), aldolasa (músculo de conejo), β - nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH), albúmina (bovino), dodecil sulfato de sodio (SDS), bromuro de etidio, persulfato de amonio, hidróxido fosfato de calcio (Hidroxiapatita), Sepharose 4B, Cibacron Blue 3GA, cloruro de guanidinio (GdnHCl), y los estándares de peso molecular, fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. EE.UU); fosfato de potasio, fosfato dipotásico, cloruro de potasio, cloruro de sodio y etanol absoluto, fueron adquiridos en Merck A.G. (Darmstad, Alemania); ditioneitol (DTT), Tris y ácido libre HEPES fueron adquiridos en Winkler (U.S.A); Temed, agar, extracto de levadura, acrilamida, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y N, N'- metilen-bisacrilamida, fueron adquiridos en GibcoBRL (N.Y.,EE.UU); 5,5'- ditio-bis 2- ácido nitrobenzoico (DTNB), fue adquirido en Molecular Probes, Inc (Eugene, EE.UU); celulosa CF1 y dietilaminoetil celulosa DE52 (DEAE-cel), fueron adquiridos en Whatman Inc (Maidstone, Inglaterra); y kanamicina fue adquirida en US Biological (Swampscott, Massachussets).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Mutagénesis sitio dirigida

Los residuos Cys-238 y Cys-295 fueron reemplazados por alanina y fenilalanina, generándose las mutantes Cys-238-Ala, Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe. Se dispone del gen *pfkB*⁺, que especifica la secuencia de la Pfk-2 (927 pb), subclonado en el vector pET21-d bajo el control del promotor T7 a partir del plasmidio pFD 102 (Daldal, 1983, Tesis Doctoral de Ricardo Cabrera, 2004).

Para realizar las mutaciones se usó el kit de mutagénesis sitio-específica QuickChange[®] de Stratagene (La Jolla, CA, USA). El procedimiento básico utiliza como templado el plasmidio usado para expresar la Pfk-2 silvestre y dos oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación deseada. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50 μ l en una mezcla de reacción que contenía 5 μ l de amortiguador 10X, 10 ng de plasmidio templado, 125 ng de cada oligonucleótido mutagénico, 1 μ l de la mezcla de deoxinucleótidos (dNTP) y 1 μ l de la enzima *Pfu Turbo*[®] DNA polimerasa (2,5 U/ml). Las reacciones se realizaron en un termociclador Tgradient de Biometra[®]. Para la amplificación de los plasmidios mutantes se usó un protocolo de 30 ciclos de 1 min de desnaturación a 95° C, 1 min de apareamiento o “annealing” de los oligonucleótidos mutagénicos a 56° C y 14 min de extensión de las cadenas a 68° C. Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El producto amplificado se trató con 10 U/ μ l de la endonucleasa *Dpn I* y la reacción se incubó a 37° C por 1 h. *Dpn I* degrada específicamente el DNA metilado y hemimetilado del plasmidio parental no mutado.

Se utilizó 1 μ l del DNA tratado con *Dpn I* para transformar 50 μ l de bacterias XL1-Blue *supercompetent cells* (suministrada por el kit) que reparan los cortes. La mezcla se incubó por 30

min en hielo, se sometió a un pulso de calor de 42° C por 45 seg y se dejó en hielo nuevamente por 2 min. Se agregó 0,5 ml de medio NZY⁺ precalentado a 42° C y se incubó a 37° C por 1 h con agitación a 250 rpm, para recuperar las células. Finalmente, se sembraron 100 µl de la reacción de transformación sobre placas de agar que contenían el antibiótico apropiado para el vector plasmidial (LB-ampicilina) y fueron incubadas por toda la noche a 37° C.

3.2.2 Preparación del DNA plasmidial

Para la secuenciación de las mutantes, el DNA plasmidial de los clones recombinantes se purificó mediante el uso del kit E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I.

3.2.3 Secuenciación de las mutantes

Las enzimas mutantes fueron secuenciadas en el laboratorio del Dr. Víctor Cifuentes de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (Santiago, Chile).

3.2.4 Transformación de *E. coli* con CaCl₂

3.2.4.1 Preparación de células competentes

Un pequeño volumen de bacterias se dejó crecer durante toda la noche en 1 ml de medio LB (Luria Broth), que contiene 10 g de peptona, 5g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro, a 37° C. Al día siguiente se inocularon 500 µl de estas bacterias en 50 ml de medio LB fresco (50 ml producirán 1 ml de células competentes aproximadamente) a una dilución 1: 100. El medio se incubó a 37° C con agitación vigorosa en un matraz adecuado para facilitar la ventilación hasta alcanzar una absorbancia de 0,4 a 550 nm y luego se colocó en hielo por 10 min. Las células se centrifugaron en tubos estériles a 5.000 rpm por 10 min a 4° C en un rotor SS-34 en centrífuga

Sorvall. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 25 ml de una solución CaCl_2 100 mM estéril, fría y en hielo y se dejó incubando por 3 h antes de la transformación.

3.2.4.2 Transformación por *shock* térmico

Para la transformación de las bacterias se mezclaron 2 μl de la solución de DNA plasmidial con 100 μl de células competentes en tubos Eppendorf (en hielo), con agitación suave para evitar que las células cayeran al fondo del tubo. Esta mezcla se incubó por 40 min para permitir que el DNA penetre en las células. Seguidamente la mezcla se sometió a un *shock* térmico a 42° C por 45 a 60 seg y se retornó al hielo por 1 min. Después se agregaron al tubo 400 μl de medio LB y se dejó agitando a 30° C por 1 h para permitir la recuperación de las bacterias. Finalmente, 100 μl de las células transformadas se sembraron en placas con el antibiótico apropiado (medio selectivo), dependiendo del plasmidio utilizado para la transformación. Las placas se dejaron toda la noche a 37° C, hasta la aparición de las colonias transformadas.

3.2.5 Crecimiento de las cepas de *E. coli*

Para la purificación de Pfk-2 silvestre y Pfk-2 Cys-238-Ala se creció un inóculo a partir de una colonia de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plasmidio pET21-d (con el gen silvestre o mutante) en 20 ml de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el que se dejó durante toda la noche a 37° C. Luego se inoculó al 1% en un volumen final de 2 l de medio LB más ampicilina, y se dejaron crecer hasta una absorbancia aproximada de 0,6 a 0,7 a 580 nm. Los cultivos se indujeron con IPTG 119 mg/ml y luego el cultivo se dejó crecer por otras 4 h a 37° C.

Para las mutantes Pfk-2 Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe se creció un inóculo de las colonias de *E. coli* DF1020 transformadas con pET21-d en 20 ml de medio LB agregando ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y kanamicina 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el que se dejó crecer durante toda la noche a 30° C.

Luego se inoculó al 1% en 2 l de medio LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 75 µg/ml, y se dejó crecer hasta una absorbancia de 0,4 a 580 nm a 30° C (4 h aproximadamente).

Se indujo por 20 min a 42° C y se dejó crecer por 6 h a 37° C.

3.2.6 Control de expresión

Para evaluar el tiempo óptimo de inducción para la expresión de las proteínas silvestre y mutantes, se colectaron volúmenes de 15 ml de cultivo a distintos tiempos a partir del momento de la inducción (tiempo cero). Las muestras se centrifugaron por 15 min a 5.000 rpm en una centrífuga Sorvall RC-5 usando un rotor SS-34 y se resuspendieron en 1,0 ml de amortiguador Tris- HCl 20 mM (pH 7,6 a 4° C), MgCl₂ 5 mM, 2-mercaptoetanol 14 mM, EDTA 1 mM y glicerol 5% (amortiguador B). Las células fueron lisadas por sonicación (Biosonik III Sonicator, Brownwill Scientific Co.) y los desechos celulares fueron precipitados por centrifugación a 14.000 rpm por 20 min en una centrífuga Eppendorf 5415-C. En el líquido sobrenadante se determinó la actividad específica de cada proteína y se obtuvo una muestra para electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.

3.2.7 Purificación de fosfofructoquinasa

Las enzimas silvestre y mutantes se purificaron como sigue. El medio LB que contenía las células en crecimiento se centrifugó por 15 min a 5.000 rpm en una centrífuga Sorvall RC-5 usando un rotor GSA. Se obtuvieron aproximadamente 20 g de células de *E. coli* (peso húmedo), los que se resuspendieron en 100 ml de amortiguador fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0), MgCl₂ 5 mM, β- mercaptoetanol 14 mM, EDTA 0,1 mM, y glicerol 5% (Buffer A). Las células fueron lisadas por sonicación (Biosonik III Sonicator, Brownwill Scientific Co.) y centrifugadas por 35

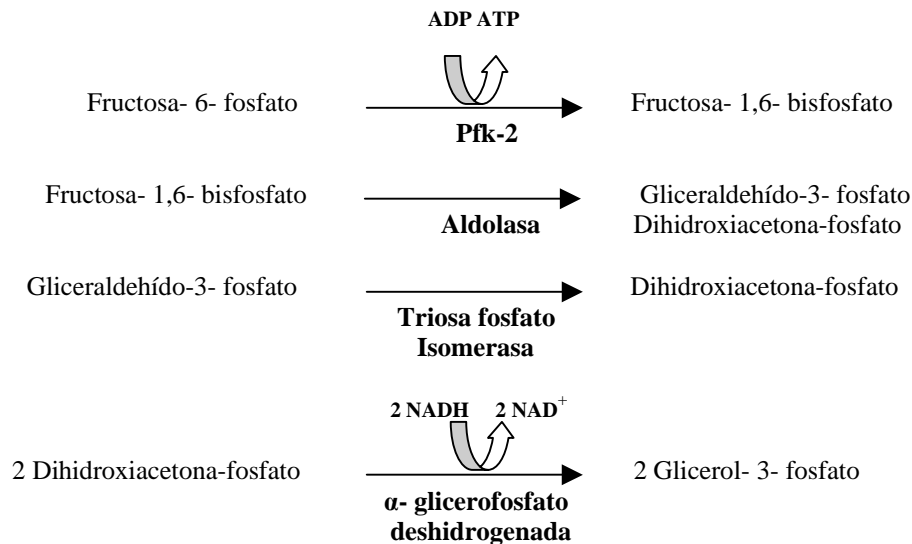
min a 35.000 rpm en una centrífuga Beckman modelo L5-50B usando un rotor Ti50.2 a 4° C. El sobrenadante se aplicó a una columna de hidroxilapatita (3,0 x 20 cm) equilibrada previamente con buffer A, la que se lavó con 400 ml del mismo buffer. La enzima se eluyó con 600 ml de fosfato de potasio en un gradiente lineal de concentración desde 0,01 a 0,3 M en amortiguador A. Las fracciones que poseían 5 o más U/ml, se juntaron y concentraron hasta aproximadamente 40 ml usando una membrana de ultrafiltración (Amicon ultrafiltration cell PM 30). La solución concentrada se dializó por 4 h contra 2 x 2 l de amortiguador B a una temperatura de 4° C. La enzima se aplicó a una columna de Azul de Cibacron-Sepharose (3,0 x 20 cm) equilibrada con amortiguador B. La columna se lavó con 150 ml de amortiguador B, y después se realizó un segundo lavado con 300 ml que contenía 50 mM KCl en amortiguador B. La actividad fosfofructoquinasa se eluyó con 150 ml del mismo amortiguador que contenía ATP 1 mM y KCl 50 mM. Se mezclaron las fracciones que poseían aproximadamente 5 o más U/ml, y se concentraron hasta aproximadamente 40 ml usando una membrana de ultrafiltración (Amicon ultrafiltration cell PM 30). La solución concentrada fue dializada por 4 h en 2 x 2 litros de amortiguador B. Finalmente la muestra se recromatografió en la columna de Azul de Cibacron-Sepharose (3,0 x 20 cm) equilibrada con buffer B, siguiendo los pasos indicados anteriormente. La muestra se concentró por ultrafiltración a un volumen final de 2 ml. La enzima fue diluida 1:2 con glicerol y guardada a - 20° C. La actividad específica de la enzima pura fue de aproximadamente 100 U/mg de proteína, excepto para la mutante Cys-295-Phe que presentó una actividad específica de 68 U/mg de proteína.

Para el caso de la mutante Pfk-2 Cys-238-Ala el protocolo de purificación fue idéntico al de la enzima nativa, excepto que al final del procedimiento se agregó una cromatografía en una columna de DEAE-celulosa. La columna se lavó con 150 ml de amortiguador B, y luego se

realizó un segundo lavado con 150 ml de amortiguador B que contenía NaCl 0,1 M. La actividad fosfofructoquinasa se eluyó con 300 ml de un gradiente lineal de NaCl desde 0,1 a 0,6 M en amortiguador B. La pureza de las enzimas silvestre y mutantes fue determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS- PAGE).

3.2.8 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de Pfk-2 fue determinada espectrofotométricamente acoplando la formación de fru-1,6-bisP a la oxidación de NADH en presencia de aldolasa, triosa fosfato isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa (Guixé y Babul. 1985), según el esquema de reacciones que se indica a continuación:



La cuantificación del producto formado en la reacción fosfofructoquinásica se hizo midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH y calculando el número de micromoles de NADH desaparecido. Para esto se utilizó un coeficiente de extinción de $6.220 \text{ (M cm)}^{-1}$.

La actividad enzimática se determinó utilizando una mezcla de reacción que contenía el amortiguador Tris- HCl 0,1M pH 8,2, NADH 0,2 mM, MgCl₂ 5 mM, NH₄Cl 2 mM, fructosa-6-P 1 mM, ATP 1 mM, y una mezcla de 40 µg de aldolasa, 3 µg de triosa fosfato isomerasa, y 30 µg de α-glicerofosfato deshidrogenasa en un volumen final de 0,5 ml ó 0,7 ml. En los experimentos cinéticos, la concentración de ATP y de fructosa-6-fosfato se varió según se indica. La reacción se inició con la adición de la enzima, y se midió en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 a 25° C.

3.2.8.1 Análisis de los resultados.

Las gráficas de las curvas de saturación para fructosa-6-P y MgATP fueron analizadas utilizando el programa “Sigma Plot 8.0” (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA), donde cada valor experimental se ajustó a una ecuación hiperbólica representada por: $Y = (aX)/(b+X)$, donde “a” corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental (V_{max}), y “b” que corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima (K_m).

3.2.9 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976), usando seroalbúmina bovina como estándar (Bio Rad *protein assay*).

3.2.10 Cromatografía de exclusión molecular

Los experimentos de exclusión molecular se desarrollaron utilizando un equipo de HPLC (Waters 1525 Binary Pump System), con una columna Bio- Sil SEC-250 (7,8 mm x 30 cm) equilibrada en amortiguador Tris-HCl 40 mM pH 7,6, MgCl₂ 5 mM, KCl 200 mM y la

concentración indicada de MgATP, a un flujo de 0,8 ml/min. La columna fue equilibrada con los siguientes estándares de peso molecular: vitamina B₁₂ (1.350), mioglobina (17.000), ovalbumina (44.000), γ - globulina (158.000) y tiroglobulina (670.000). La elución de las proteínas se registró con el uso de un detector en línea (Waters 2487 UV dual detector), donde se midió simultáneamente las absorbancia a 220 y 280 nm.

3.2.11 Fluorescencia intrínseca

Los experimentos de fluorescencia se desarrollaron con un equipo PC1 Photon Counting Spectrofluorometer (ISS, Inc., Illinois, U.S.A.). La longitud de onda de excitación fue de 295 nm para limitar la emisión de fluorescencia a los residuos de triptofano. Pfk-2 presenta un sólo triptofano en la posición 88. El espectro de emisión se registró entre 300 y 480 nm a 25° C. Las aperturas de las ranuras de excitación y emisión fueron de 5 nm. Los espectros fueron analizados utilizando el Programa “Spectra Calc Program” (Galáctica Corporation, USA). Los experimentos de unión de ligandos se realizaron agregando pequeñas alícuotas de una solución madre de sustrato o del efector a una solución que contenía la enzima. Se hicieron las correcciones necesarias para compensar la dilución de la enzima. Los experimentos se desarrollaron en amortiguador HEPES 25 mM, pH 8,0 y DTT 5 mM. Cuando los experimentos se hicieron en presencia de Mg²⁺, la concentración del catión fue de 5 mM. En cada caso, la concentración de enzima utilizada para desarrollar el experimento fue de 200 μ g/ml (silvestre y mutantes).

3.2.11.1 Análisis de los resultados.

La fracción de saturación para la unión de ligandos se determinó a partir de la variación de la intensidad de fluorescencia aplicando la relación $(F^0 - F)/(F^0 - F^\infty)$, donde F^0 representa la intensidad de emisión en la ausencia de ligandos, F^∞ es la intensidad de emisión a concentración

saturante de ligandos, y F es la intensidad después de la adición de una concentración dada de ligando.

Las gráficas de las curvas de fracción de saturación para fructosa-6-P y MgATP fueron analizadas utilizando el programa “Sigma Plot 8.0” (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Para el caso de fructosa-6-P, el valor experimental se ajustó a una ecuación hiperbólica representada por: $Y = (aX)/(b+X)$, donde “a” corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental (Fracción de saturación $_{m\acute{a}x}$), y “b” corresponde a la concentración de sustrato con la cual se obtiene la mitad de la fracción de saturación máxima ($K_{0,5}$). Para el caso de MgATP, el valor experimental se ajustó a una ecuación sigmoidea representada por: $Y = (aX^b)/(c^b+X^b)$, donde “a” corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental (Fracción de saturación $_{m\acute{a}x}$), “b”, corresponde al coeficiente de Hill (grado de cooperatividad) y “c” corresponde a la concentración de sustrato con la cual se obtiene la mitad de la fracción de saturación máxima ($K_{0,5}$).

3.2.12 Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron recogidos en un espectropolarímetro Jasco J-715, equipado con un baño de refrigeración circular para mantener la temperatura constante en el compartimiento de medida. La enzima (0,2 mg/ml) preparada en buffer Tris 50 mM, pH 8,2, $MgCl_2$ 5 mM y DTT 2 mM, fue colocada en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 mm, y los espectros fueron recogidos entre 190 y 250 nm, a intervalos de 1 nm. Se hizo un blanco con el amortiguador apropiado para cada espectro con el fin de obtener el espectro corregido. El espectro mostrado corresponde a 16 determinaciones. Los datos son representados en terminos de la elipticidad observada, en unidades miligrados.

3.2.13 Determinación de grupos tioles con DTNB

La titulación total de grupos tioles de la enzima silvestre y mutantes se realizó utilizando el reactivo de Ellman (DTNB), (Ellman, 1959). Los experimentos se desarrollaron en amortiguador fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5 y la concentración de la Pfk-2 silvestre y mutantes en cada determinación fue de 200 $\mu\text{g/ml}$. Cada muestra fue monitoreada espectrofotométricamente a 412 y 418 nm cada 5 min (tiempo total 25 min). Se hizo un blanco que contenía todos los componentes en la mezcla de la reacción, excepto la enzima. Los cálculos fueron hechos usando un coeficiente de extinción molar de $13.600 (\text{M cm})^{-1}$.

3.2.14 Estudios de estabilidad frente a la desnaturación por GdnHCl

La desnaturación de Pfk-2 silvestre y mutantes se llevó a cabo mediante la incubación de 90 $\mu\text{g/ml}$ de proteína en amortiguador Tris 25 mM pH 8,0, MgCl_2 5 mM y DTT 5 mM, a diferentes concentraciones de GdnHCl (entre 0 y 2 M), en ausencia y en presencia de MgATP 1 mM. La actividad enzimática de las muestras se midió según se describe en “Determinación de la actividad enzimática” después de incubar a 20° C por 3, 24, y 48 h. La concentración de la solución stock de GdnHCl fue determinada por refractometría.

3.2.15 Dispersión dinámica de luz

Para los estudios de DLS se utilizó de equipo DynaPro MSTC014 (Protein Solutions Inc., Bucks, England) equipado con un generador de rayos láser (774,7 nm) y un auto-correlacionador de 248 canales con esquema *multi-tau*, con un tiempo mínimo de retraso de 0,48 μseg . El aparato utiliza una cubeta de cuarzo de 12 μl para la muestra con un sistema de control de temperatura.

La luz dispersada por la muestra a un ángulo de 90° es guiada por fibra óptica hacia un detector de fotón único tipo foto-diodo de “avalancha” (*avalanche photo diode*, APD).

Se prepararon soluciones de las enzimas mutantes (0,4 – 0,5 mg/ml) con una solución filtrada de amortiguador Tris 50 mM, pH 8, MgCl₂ 5mM y DTT 2 mM, en presencia de diferentes concentraciones de ATP. Un volumen de entre 50 y 100 µl de muestra se centrifugó por 30 min a 14.000 x g previo a cada medición. Todas las mediciones fueron realizadas a 25 ± 0,1° C. En los experimentos de dispersión dinámica de luz, el radio de giro hidrodinámico de la partícula (R_H) se calcula a partir del coeficiente de difusión de la partícula en solución (D , determinado experimentalmente) mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

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

donde, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta en grados Kelvin y η es la viscosidad del solvente. La intensidad dispersada por la proteína se determinó a partir del Histograma de Regularización, el cual se usa para encontrar el porcentaje de contribución de las especies individuales a la dispersión total de la muestra, usando el programa DYNAMICS™ v. 5.26.39 (Protein Solutions Inc.). Estos experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Cristalografía, Instituto de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brazil.

3.2.16 Efecto de la concentración de proteína en la actividad específica de Pfk-2

Las enzimas silvestre y mutantes se incubaron a diferentes concentraciones de proteína (entre 0,0003 y 1,0 µg/µl) por 3 h en amortiguador Tris 25 mM pH 8,2, MgCl₂ 5 mM y DTT 10 mM y en cada caso la actividad enzimática se midió con 3 picomoles de proteína proveniente de estas distintas diluciones.

4. RESULTADOS

Estudios de modificación química de Pfk-2 con las sondas PM y EM (Báez y col., 2003) sugieren que la Cys- 238 es un determinante estructural del estado dimérico de Pfk-2, en tanto que la Cys-295 estaría involucrada en la actividad catalítica de la enzima y en la formación de tetrameros. Para obtener información más detallada acerca del papel de estos residuos en la estructura oligomérica y en la actividad catalítica de Pfk-2 realizamos mutagénesis sitio-específica de estos residuos, los que fueron reemplazados por alanina o fenilalanina. La sustitución por alanina se realizó para evaluar la importancia de la presencia del grupo tiol de la cadena lateral. La sustitución por fenilalanina tiene por objeto usar un aminoácido que emule las características de tamaño e hidrofobicidad de las sondas PM y EM.

4.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS MUTANTES DE Pfk-2

Para este estudio se construyeron las mutantes Cys-238-Ala, Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe utilizando el protocolo Quickchange (Stratagene) para mutagénesis sitio-específica y las mutaciones fueron corroboradas por secuenciación directa del DNA plasmidial (ver MATERIALES Y MÉTODOS).

Las condiciones para la inducción de la expresión de las enzimas silvestre y mutantes se describe en Métodos. Se determinó el tiempo óptimo para colectar las células después de la inducción, analizando la expresión de la proteína por electroforesis en SDS-PAGE y la actividad específica de un extracto de células lisadas a diferentes tiempos. En la Figura 3 se observa el curso temporal de la inducción de la expresión de la mutante Cys-238-Ala (banda de 33 kDa), cuyo máximo se alcanza a las 3 h después de adicionar IPTG al cultivo, al igual que lo que ocurre con la actividad específica de la proteína en el extracto. La mutante Cys-238-Ala fue expresada a

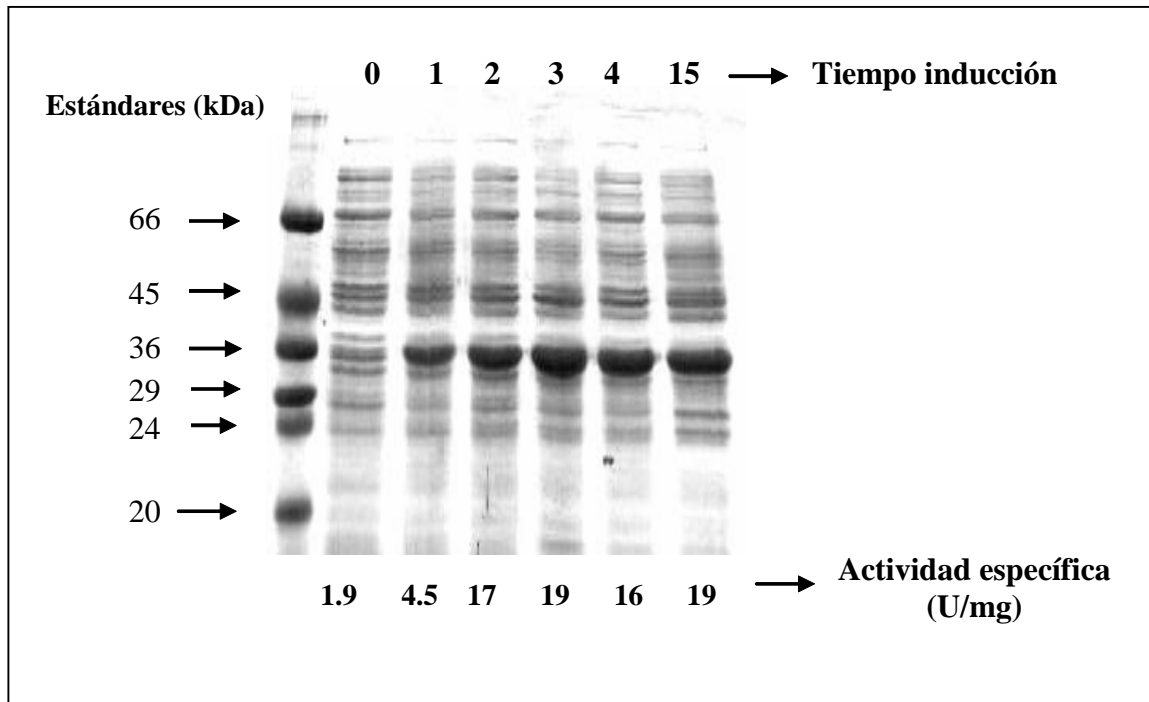


Figura 3. Control de expresión de Pfk-2 Cys-238-Ala después de inducir con IPTG. Las células BL21 (DE3) de *E. coli* se transformaron con el vector de expresión pET 21-d que contiene la Pfk-2 mutante Cys-238-Ala. La inducción con 0,1 mM IPTG se inició cuando el cultivo presentaba una absorbancia de 0,6 a 580 nm. La expresión de la proteína se monitoreó por SDS-PAGE. Los números sobre cada carril corresponden al tiempo de inducción con IPTG en horas. Los números en la parte inferior corresponden a la actividad específica a la hora de inducción indicada. La cantidad de proteína cargada en cada carril fue de 15 µg.

partir de células BL21 (DE3), las cuales producen Pfk-1 y Pfk-2 endógenamente aunque en niveles poco significativos respecto de lo obtenidos por el sistema de expresión pET 21-d. Sin embargo, debido a que la actividad específica de las mutantes en Cys-295 fue significativamente menor que la de la enzima silvestre, la contaminación con unidades de enzima endógena se evitó mediante la co-transformación con el plasmidio pGP 1-2 (Tabor y Richardson, 1992, ver Materiales y Métodos) de la cepa DF 1020, que presenta delecciones en los genes *pfkA* y *pfkB* (Daldal, 1983). En la Figura 4 se observan los niveles de expresión y la actividad específica de las mutantes Cys-295-Ala, Cys-295-Phe y Cys-238-Phe en el extracto, comparados con la enzima silvestre en las mismas condiciones.

4.1.1 Purificación de las enzimas mutantes

La purificación de las mutantes Cys-238-Ala, Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe se realizó utilizando el protocolo empleado para la Pfk-2 silvestre (Babul, 1978). En las figuras 5 a la 9 se resumen las etapas de purificación de las enzimas. Se obtuvo entre 11-84 mg de proteína a partir de un volumen inicial de 2 l de medio de cultivo. Las mutantes Cys-238 presentaron una actividad específica de aproximadamente 100 U/mg, y un rendimiento de un 49% para la enzima mutante Cys-238-Ala y de un 68% para la enzima Cys-238-Phe. Por otra parte, la mutante Cys-295-Ala presentó una actividad específica de 59 U/mg con un rendimiento de 52%, en tanto que la mutante Cys-295-Phe presentó una actividad específica de 29 U/mg, con un rendimiento de un 20% de la actividad total inicial. Cada etapa del proceso de purificación se monitoreó mediante SDS-PAGE (Figuras 5 a la 9).

Posteriormente, se procedió a la titulación de los grupos SH de las enzimas silvestre y mutantes mediante el uso del reactivo de Ellman. Los resultados mostraron que la enzima nativa

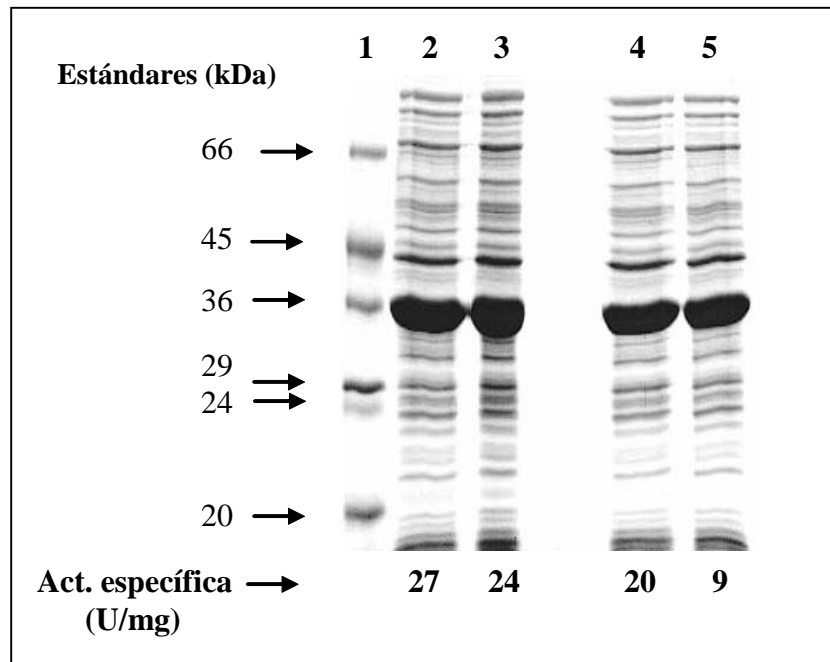


Figura 4. Control de expresión de Pfk-2 silvestre y de las mutantes Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe. Las proteínas se expresaron en células DF1020/T7 de *E. coli* transformadas con el vector de expresión pET21d. La inducción de las proteínas se realizó por *shock* térmico a 42° C por 20 min y se inició cuando el cultivo presentaba una absorbancia de 0,4 a 580 nm. Electroforesis SDS-PAGE, carriles: (1) Estándares de peso molecular; (2) Pfk-2 silvestre; (3) Pfk-2 Cys-238-Phe; (4) Cys-295-Ala; y (5) Cys-295-Phe. Los números en la parte inferior corresponden a la actividad específica de cada proteína. La cantidad de proteína cargada en cada carril fue de 15 µg. La actividad enzimática se determinó según se describe en MÉTODOS.

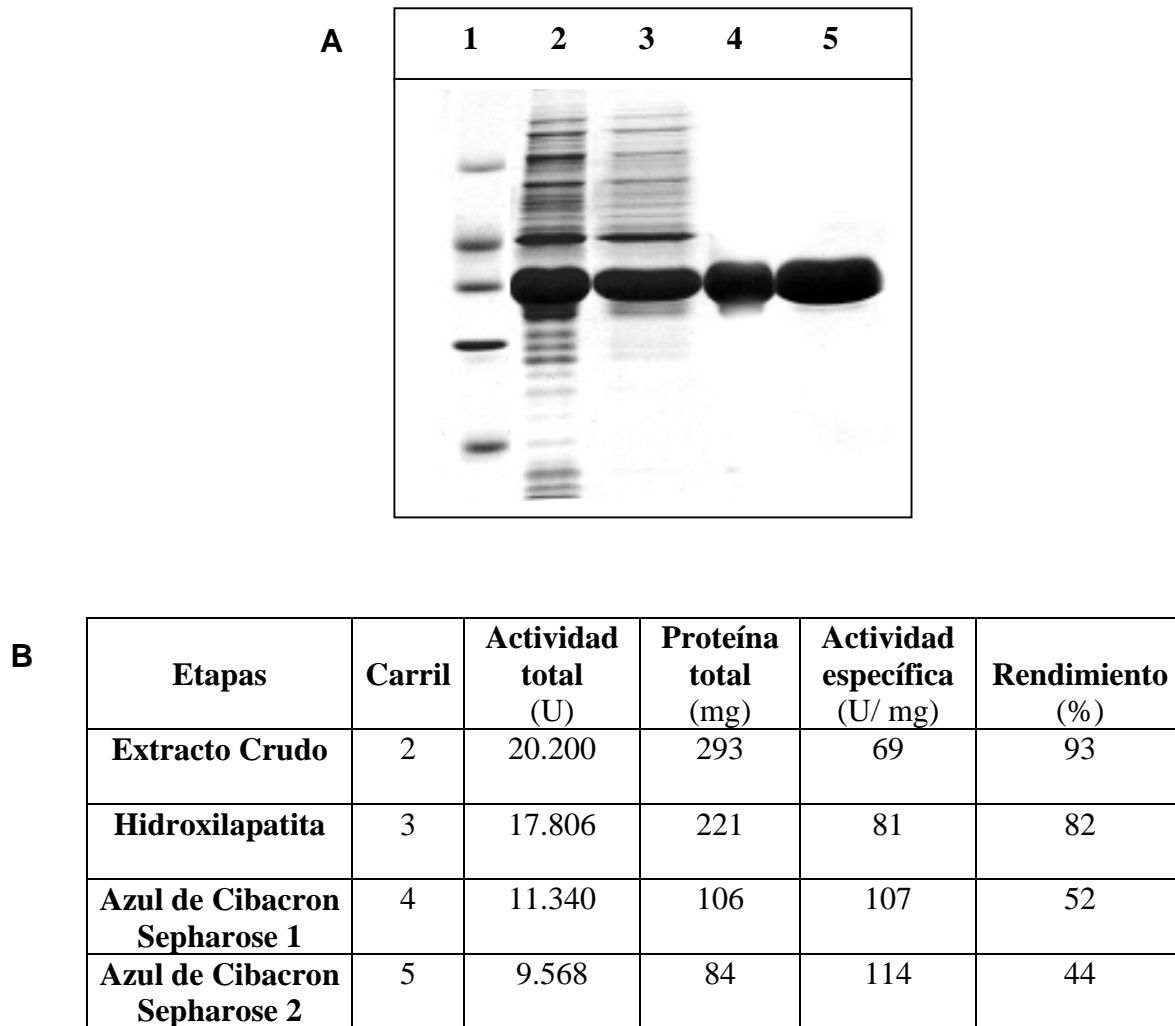


Figura 5. Purificación de Pfk-2 silvestre. **A.** Electroforesis en SDS-PAGE, carriles: (1) Estándares de peso molecular (ver Figura 4); (2) Extracto crudo; (3) Hidroxilapatita; (4) Cibacron Blue-Sepharose 1; (5) Cibacron Blue-Sepharose 2. La cantidad de proteína cargada en cada carril fue de 15 µg. **B.** Tabla de las etapas de la purificación.

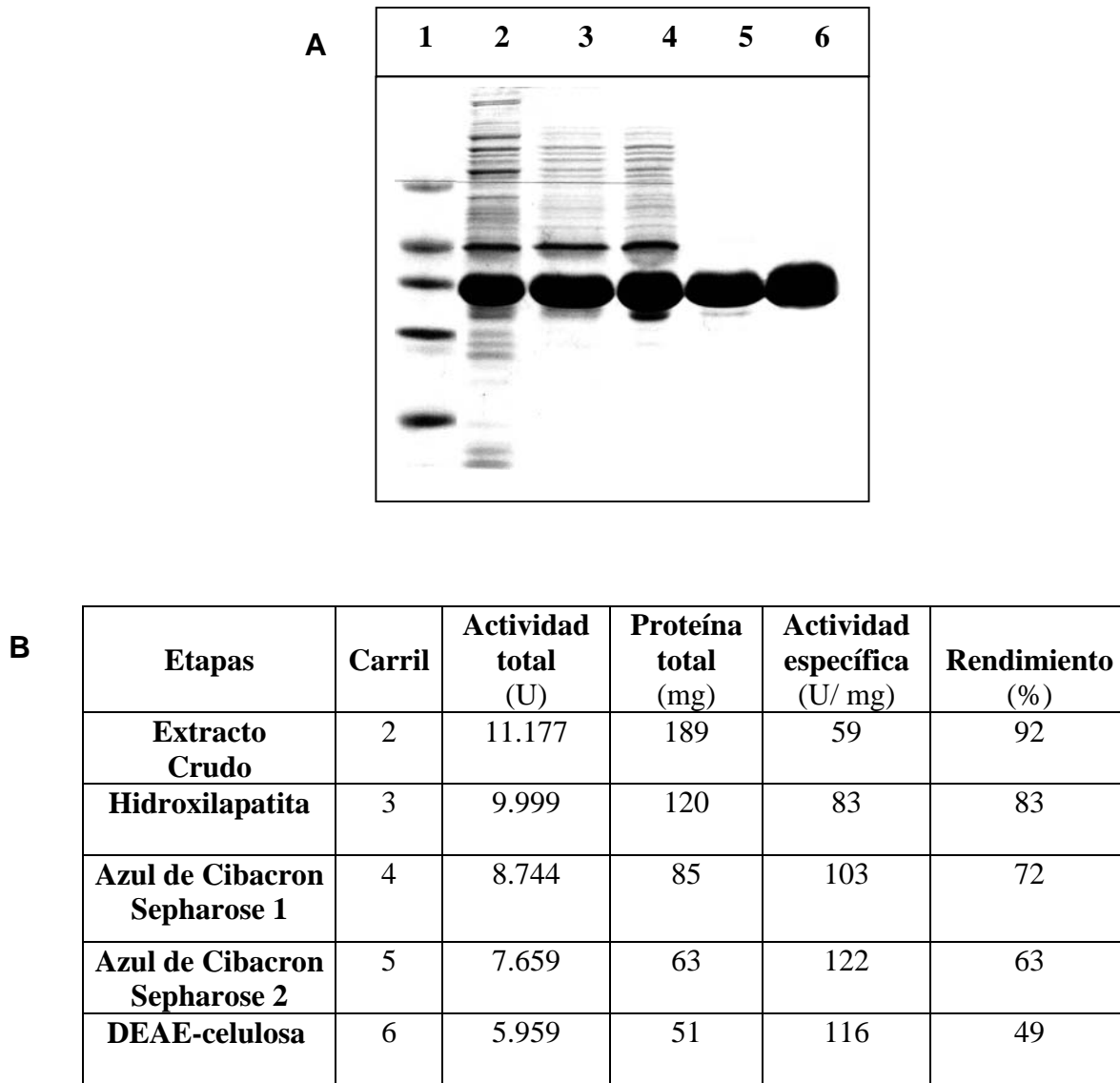


Figura 6. Purificación de Pfk-2 Cys-238-Ala. **A.** Electroforesis en SDS-PAGE, carriles: (1) Estándares de peso molecular (ver Figura 2); (2) Extracto crudo; (3) Hidroxilapatita; (4) Cibacron Blue-Sepharose 1; (5) Cibacron Blue-Sepharose 2; (6) DEAE-celulosa. La cantidad de proteína cargada en cada carril fue de 15 μ g. **B.** Tabla de las etapas de la purificación.

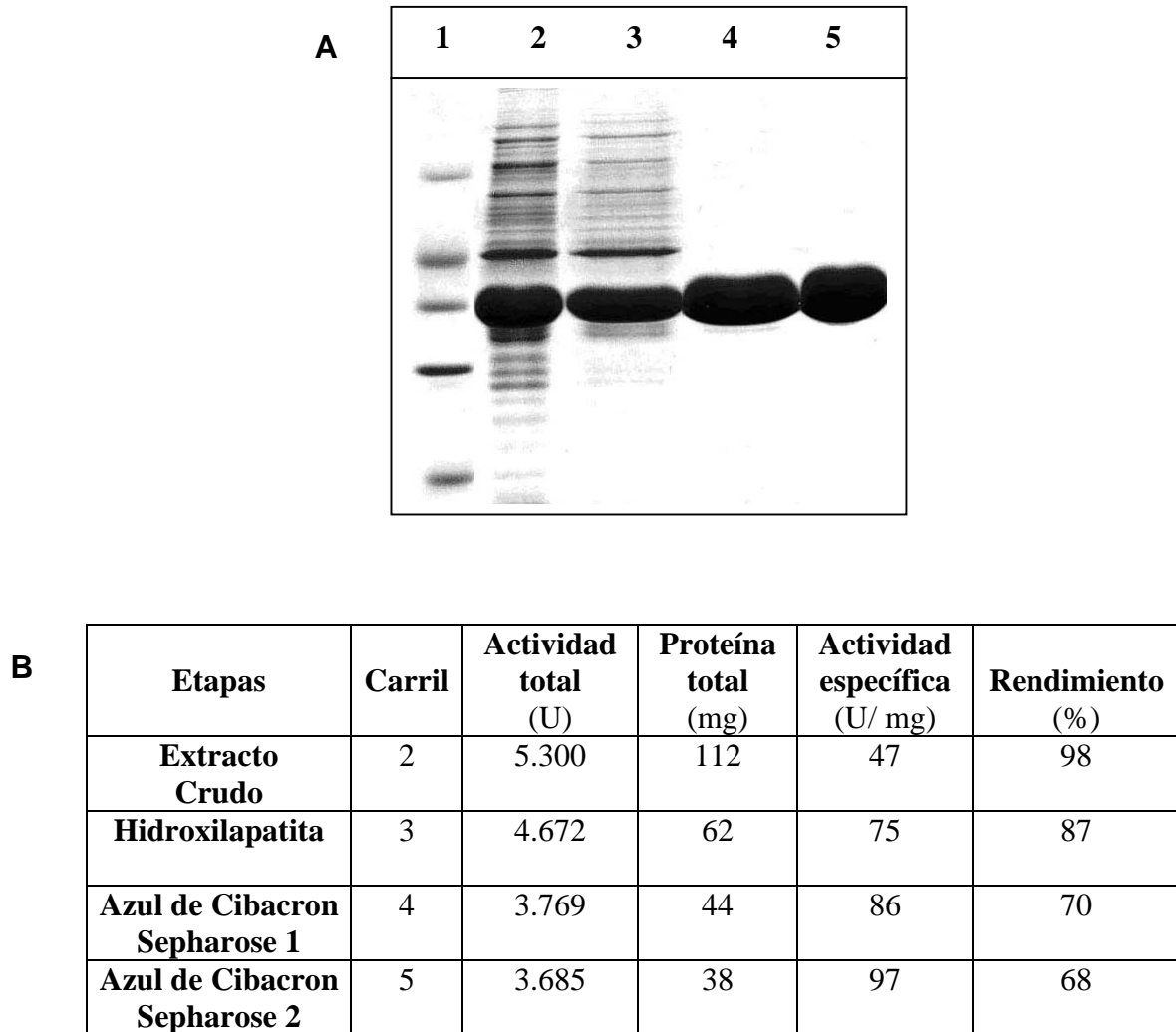


Figura 7. Purificación de Pfk-2 Cys-238-Phe. **A.** Electroforesis en SDS-PAGE, carriles: (1) Estándares de peso molecular (ver Figura 2); (2) Extracto crudo; (3) Hidroxilapatita; (4) Cibacron Blue-Sepharose 1; (5) Cibacron Blue-Sepharose 2. La cantidad de proteína cargada en cada carril fue de 15 μ g. **B.** Tabla de las etapas de la purificación.

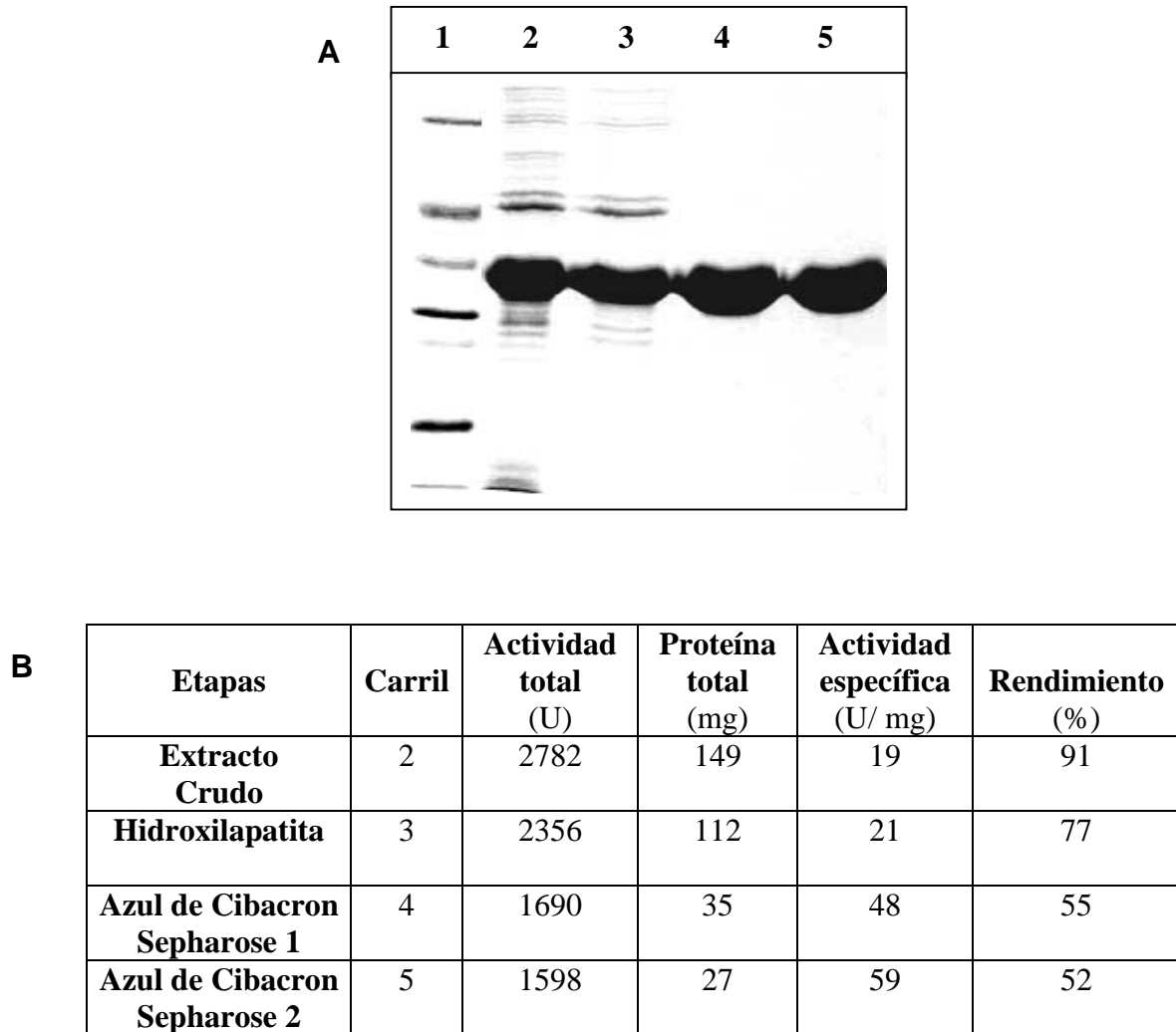


Figura 8. Purificación de Pfk-2 Cys-295-Ala. **A.** Electroforesis en SDS-PAGE, carriles: (1) Estándares de peso molecular (ver Figura 2); (2) Extracto crudo; (3) Hidroxilapatita; (4) Cibacron Blue-Sepharose 1; (5) Cibacron Blue-Sepharose 2. La cantidad de proteína cargada en cada carril fue de 15 μ g. **B.** Tabla de las etapas de la purificación.

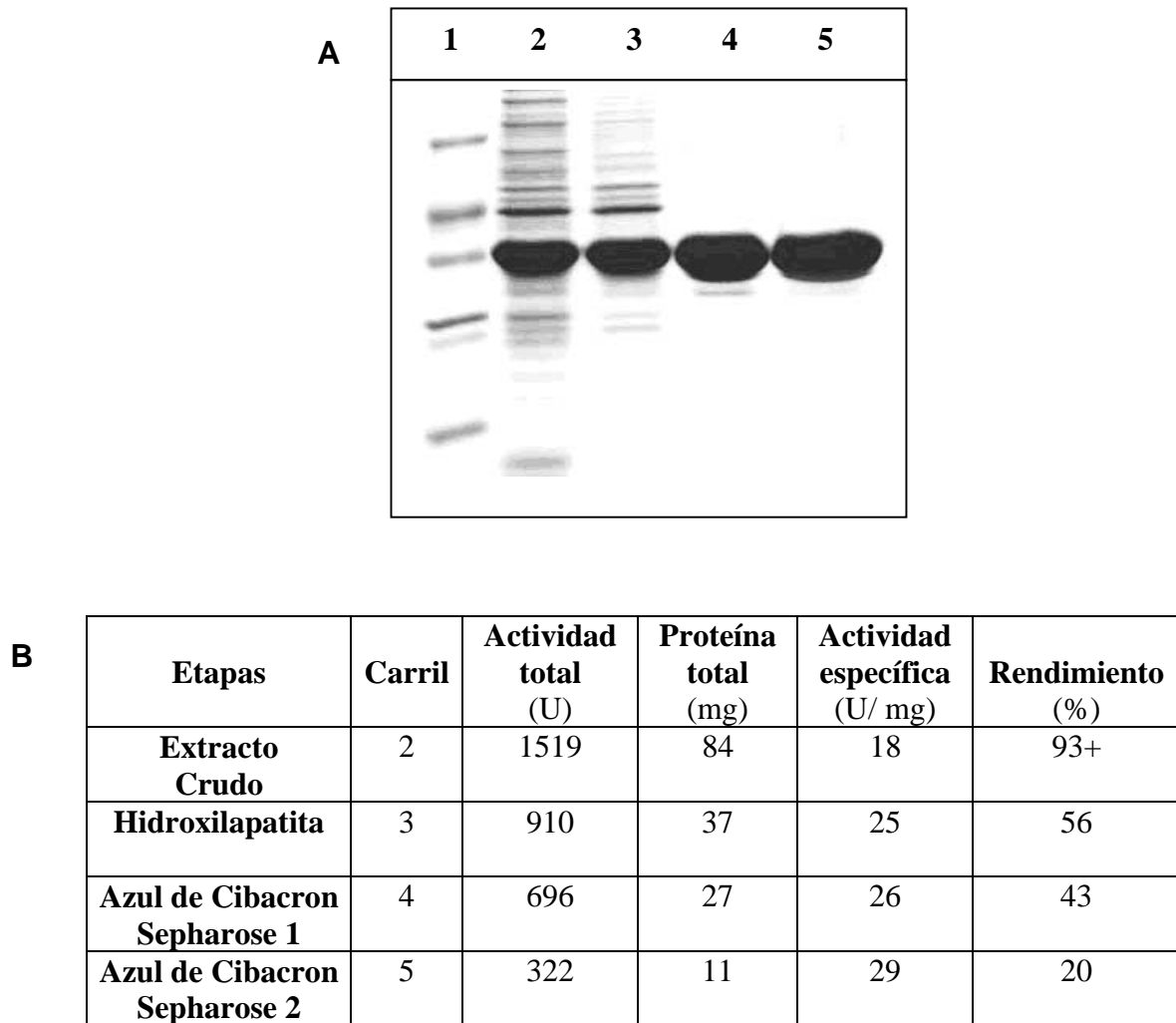


Figura 9. Purificación de Pfk-2 Cys-295-Phe. **A.** Electroforesis en SDS-PAGE, carriles: (1) Estándares de peso molecular (ver Figura 2); (2) Extracto crudo; (3) Hidroxilapatita; (4) Cibacron Blue-Sepharose 1; (5) Cibacron Blue-Sepharose 2. La cantidad de proteína cargada en cada carril fue de 15 µg. **B.** Tabla de las etapas de la purificación.

reacciona con 4 moles de DTNB, indicando la existencia de cuatro grupos SH libres por subunidad, en acuerdo con el número de residuos de cisteínas deducidos a partir de la secuencia de su DNA. En tanto que, en las enzimas mutantes Cys-238-Ala, Cys-238-Phe, Cys-295-Ala y Cys-295-Phe reaccionan con 2,91, 2,95, 2,88, 2,97 moles de DTNB por subunidad, respectivamente, indicando la existencia de 3 grupos SH, lo que confirma la mutación de uno de estos residuos.

4.2 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS MUTANTES DE Pfk-2

Para evaluar el efecto de las sustituciones Cys-238 y Cys-295 de Pfk-2 sobre la actividad enzimática se determinaron los parámetros cinéticos para MgATP y fructosa-6-P a concentraciones saturantes (1 mM) de los co-sustratos (Figuras 10 y 11). Todas las mutantes mostraron curvas de saturación hiperbólicas para MgATP y fructosa-6-P, cuyos parámetros cinéticos se resumen en la Tabla I. Las mutantes de Cys-238 presentaron parámetros cinéticos similares a los de la enzima silvestre, lo que sugiere que este residuo no está involucrado en la unión de sustratos, en la catálisis de la enzima, o en ambos a la vez, en concordancia con los estudios de modificación química (Báez y col., 2003). Por otra parte, al analizar los parámetros cinéticos de las mutantes de Cys-295 (Cys-295-Ala y Cys-295-Phe), podemos ver que hay un incremento en la K_m para ambos ligandos (fructosa-6-P y MgATP) y una disminución significativa en la k_{cat} . La mutante Cys-295-Ala tiene un aumento de cuatro veces en la K_m para MgATP y de tres veces para la de fructosa-6-fosfato y una disminución de 2 veces en la k_{cat} , con respecto a la enzima silvestre. En tanto, la mutante Cys-295-Phe presentó un aumento de seis veces en la K_m para MgATP, de tres veces en la K_m para fructosa-6-fosfato y una disminución

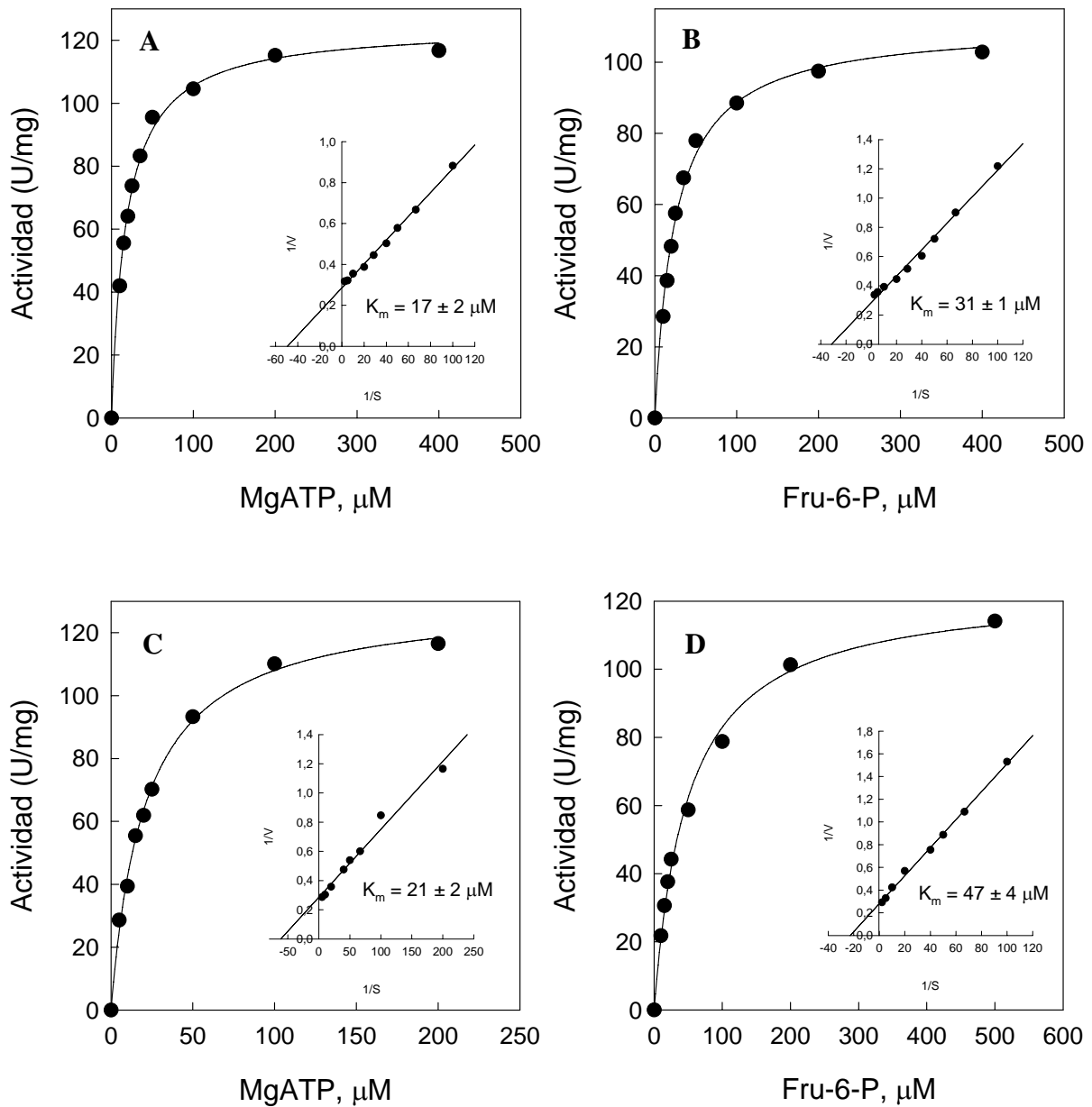


Figura 10. Curvas de saturación para las mutantes de Cys-238. Para Cys-238-Ala, **A.** MgATP y **B.** Fructosa-6-P. Para Cys-238-Phe, **C.** MgATP y **D.** Fructosa-6-P. En el inserto de cada cuadro se presentan las gráficas de dobles recíprocos correspondientes a cada sustrato.

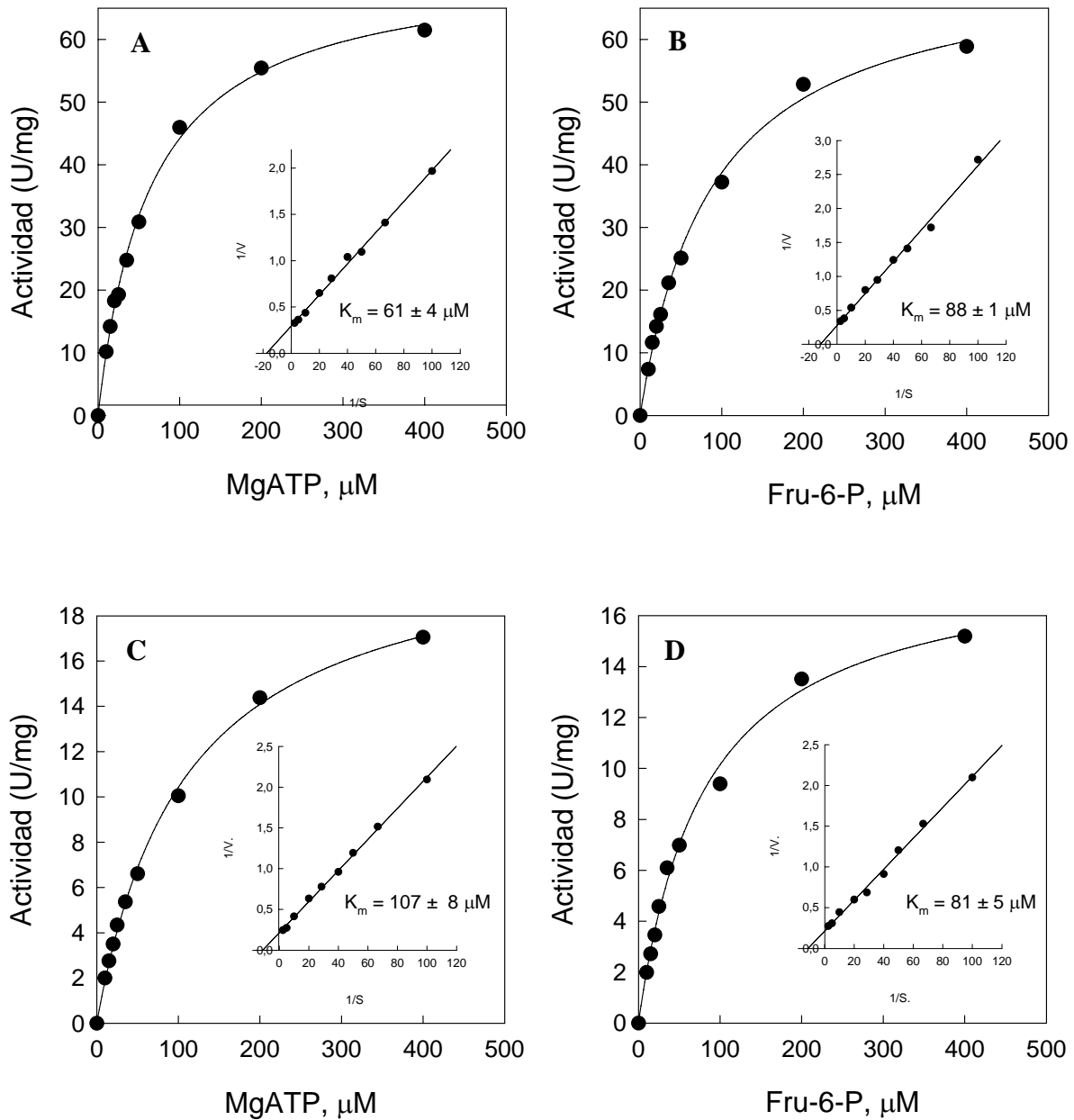


Figura 11. Curvas de saturación para las mutantes de Cys-295. Para Cys-295-Ala, A. MgATP y B. Fructosa-6-P. Para Cys-295-Phe, C. MgATP y D. Fructosa-6-P. En el inserto de cada cuadro se presentan las gráficas de dobles recíprocos correspondientes a cada sustrato.

TABLA I

Parámetros cinéticos de Pfk-2 silvestre y de las mutantes de Cys-238 y Cys-295

	Silvestre	Cys-238		Cys-295	
		Ala	Phe	Ala	Phe
k_{cat}, s^{-1}	84 ± 10	75 ± 6	70 ± 3	39 ± 2	13 ± 2
K_m Fru-6-P (μM)	31 ± 1	31 ± 1	47 ± 4	88 ± 1	81 ± 5
K_m MgATP (μM)	17 ± 2	17 ± 2	21 ± 2	61 ± 4	107 ± 8

Los valores de las constantes cinéticas corresponden al promedio de tres determinaciones independientes y su cálculo fue desarrollado como se describe en MÉTODOS.

de 7 veces en la k_{cat} . El efecto de las mutaciones sobre los parámetros cinéticos tiene concordancia con la ubicación de estos residuos en el modelo por homología generado para el dímero de Pfk-2 (Cabrera y col., 2003), donde la Cys-238 está localizada en el dominio mayor de la subunidad monomérica, alejada del sitio activo. El residuo de Cys-295 también está localizado en el dominio mayor del monómero pero muy cerca del sitio activo, por lo que podría afectar la unión de los sustratos, la catálisis enzimática o ambos. Dado que la mutación Cys-295-Phe afecta los parámetros cinéticos de la enzima, se determinó el efecto de la mutación sobre la estructura secundaria de la enzima. Para ello se obtuvo el espectro de dicroísmo circular de la mutante (Figura 12), donde se observan valores negativos de elipticidad a 222 y a 208 nm, lo que indica un alto contenido de α -hélices, similar a lo encontrado en la enzima silvestre. Dado que la mutación no produce alteraciones importantes a nivel de la estructura secundaria de la proteína, se concluye que afecta específicamente la estructura del sitio activo.

4.3 IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN MONÓMERO-MONÓMERO PARA LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE Pfk-2 SILVESTRE Y MUTANTES

La modificación química de Cys-238 con pireno maleimida produce una enzima activa con un volumen de elución, en experimentos de exclusión molecular, similar al esperado para la forma monomérica (globular) de Pfk-2. Esto indica que la sonda química estaría afectando de algún modo las interacciones intermoleculares entre las subunidades del dímero. Sin embargo, la enzima modificada eluye como un dímero en presencia de fructosa-6-P y ATP⁻⁴, lo cual sugiere que el efecto de la sonda no es lo suficientemente fuerte como para evitar la formación de dímeros y por ende no puede ser usada para evaluar la capacidad catalítica de la forma monomérica.

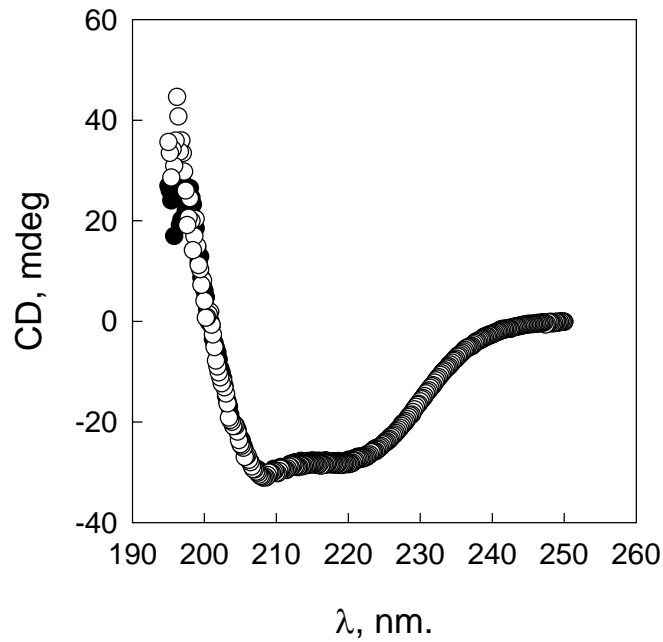


Figura 12. Espectro de dicroísmo circular de Pfk-2 silvestre (○) y de la mutante Cys-295-Phe (●). Se utilizó una concentración de 0,2 mg/ml de cada enzima en amortiguador Tris 50 mM, pH 8,2, MgCl₂ 5 mM y DTT 2 mM, la que fue colocada en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 mm. Los espectros fueron registrados 250 a 190 nm, a intervalos de 1 nm en un equipo de espectropolarimetría Jasco J-715.

Para evaluar la importancia de la interacción monómero-monómero para la actividad y estabilidad de Pfk-2, observamos la pérdida de actividad y el estado de asociación de la enzima silvestre en función de la concentración de GdnHCl. El cambio en el estado de asociación se observó siguiendo la intensidad de dispersión de luz de la proteína en solución. De acuerdo con la teoría de la dispersión luminosa, la intensidad (I) varía proporcionalmente con el producto de la masa molecular (m) y la concentración de proteína (C) ($I \propto m \times C$). En estos ensayos la concentración de proteína se mantuvo constante, de modo que las variaciones en la intensidad son atribuibles a cambios en la masa molecular de la enzima. En la Figura 13 se observa la pérdida de actividad y la disminución de la intensidad de fotones, que corresponde a la disociación del dímero a monómero. La estrecha correlación entre ambos parámetros sugiere que el dímero es la especie activa de la enzima.

Si esto es cierto, entonces, a bajas concentraciones de proteína, el equilibrio de asociación debería estar desplazado hacia la formación de monómeros y, por lo tanto, debería esperarse una disminución en la actividad específica de la proteína. Esta hipótesis fue evaluada midiendo la actividad específica de Pfk-2 silvestre y de las mutantes Cys-238-Phe y Cys-295-Phe incubadas a diferentes concentraciones de proteína previo al ensayo enzimático. La actividad enzimática se midió con una cantidad constante de proteína de 3 pmoles y por lo tanto, dado que estos 3 pmoles provienen de diluciones distintas, se tomaron diferentes volúmenes de muestra para cada ensayo (Figura 14a). Se determinó el tiempo de incubación necesario para completar la reacción de disociación a partir del curso temporal de la pérdida de actividad, como se observa en la Figura 14b. De acuerdo con la Figura 14c, la actividad específica de la proteína silvestre y de las mutantes disminuye a medida que la concentración de proteína decrece. También se puede observar que la mutante Cys-295-Phe es más sensible a la dilución, en acuerdo con los estudios

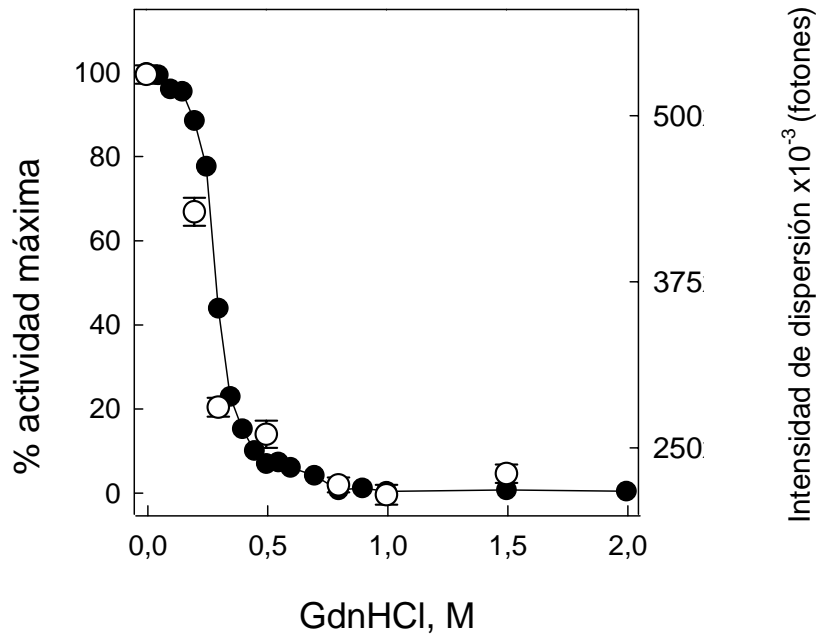


Figura 13. Correlación entre la actividad enzimática y el estado de agregación de Pfk-2 silvestre en función de la concentración de GdnHCl. El estado de agregación (○) de la proteína (dímero o monómero) se evaluó mediante medidas de intensidad de dispersión de fotones de una muestra en solución. En estas condiciones, la intensidad es proporcional a la masa molecular y a la concentración de la proteína, $I \propto m.C$. Los cambios relativos en la actividad enzimática (●) se determinaron espectrofotométricamente según se describe en MÉTODOS. La actividad máxima corresponde a ~ 100 (U/mg).

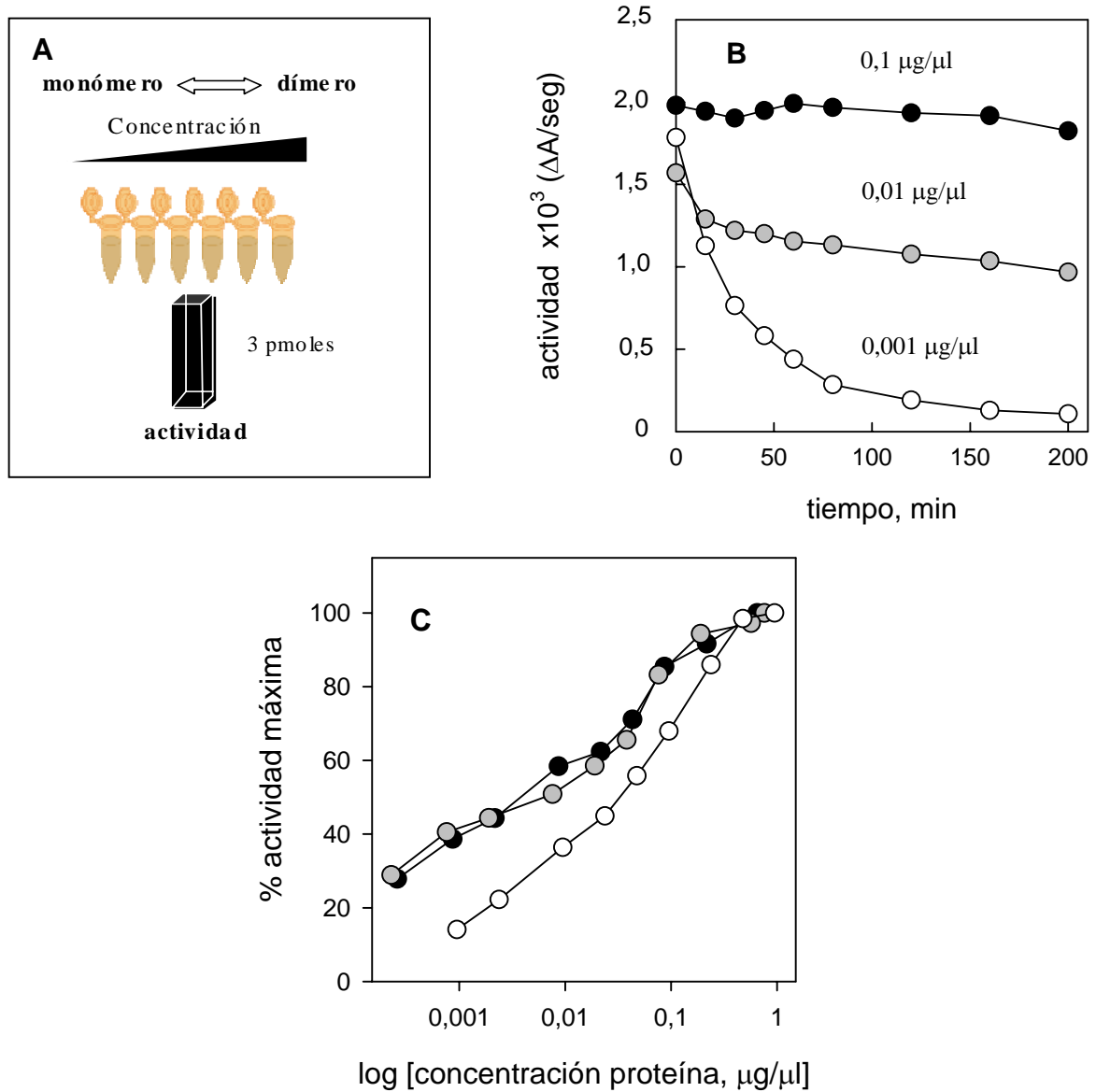


Figura 14. Efecto de la dilución de Pfk-2 silvestre y mutantes sobre la actividad específica.

A. Diagrama del experimento. **B.** Curso temporal de la pérdida de actividad a diferentes tiempos de pre-incubación para tres diluciones de proteína; **C.** Cambios relativos en la actividad específica para la enzima silvestre (●), y mutantes Cys-238-Phe (◐) y Cys-295-Phe (○) en función de la concentración de proteína utilizada en la pre-incubación (200 min), previo a la medición de actividad enzimática. La actividad máxima para la enzima silvestre corresponde a ~100 (U/mg), para la mutante Cys-238-Phe a ~100 (U/mg) y para la mutante Cys-295-Phe a 29 (U/mg).

de desplegamiento del dímero de la mutante Cys-295-Phe frente a GdnHCl (ver más adelante), donde esta mutante se despliega a una menor concentración del agente caotrópico, y por tanto su forma dimérica es menos estable. Estos resultados indican que el estado dimérico de Pfk-2 es crucial para la mantención de la actividad catalítica y que el residuo de Cys-238 no contribuye a la interacción monómero-monómero en la estabilidad del dímero, en tanto que Cys-295 sí afecta esta interacción.

4.4 EFECTOS ESTRUCTURALES DE LAS MUTACIONES DE Cys-238

4.4.1 Estado de agregación y regulación alostérica de las mutantes de Cys 238

En Pfk-2 la unión de MgATP al sitio alostérico está relacionada con la inhibición de la actividad enzimática, observada a bajas concentraciones de fructosa-6-P, y con cambios en el estado de agregación de la enzima desde un dímero a un tetrámero. Para determinar si las mutaciones en Cys-238 afectan al sitio alostérico de la enzima, examinamos la inhibición por MgATP en el intervalo milimolar (0,5 a 6 mM) en las mutantes en las que este residuo se reemplazó por Ala o Phe (Figura 15). Para ambas mutantes se observa inhibición por MgATP cuando el ensayo se realiza a una concentración de fructosa 0,1 mM, la que es revertida casi totalmente a 1 mM del sustrato azúcar, al igual que lo observado para la enzima silvestre.

A través de experimentos de filtración molecular, examinamos el estado de agregación de las mutantes Cys-238 en ausencia de ligandos y su capacidad para formar tetrámeros en presencia de MgATP. Los resultados muestran que ambas mutantes eluyen como dímeros en ausencia de ligandos y tetramerizan en presencia de 0,5 mM de MgATP (Figura 16). Estos resultados sugieren que el residuo de Cys-238 no afecta las propiedades del sitio alostérico ni tiene un papel significativo a nivel de las interacciones entre dímeros en Pfk-2. Sin embargo, es posible, que la

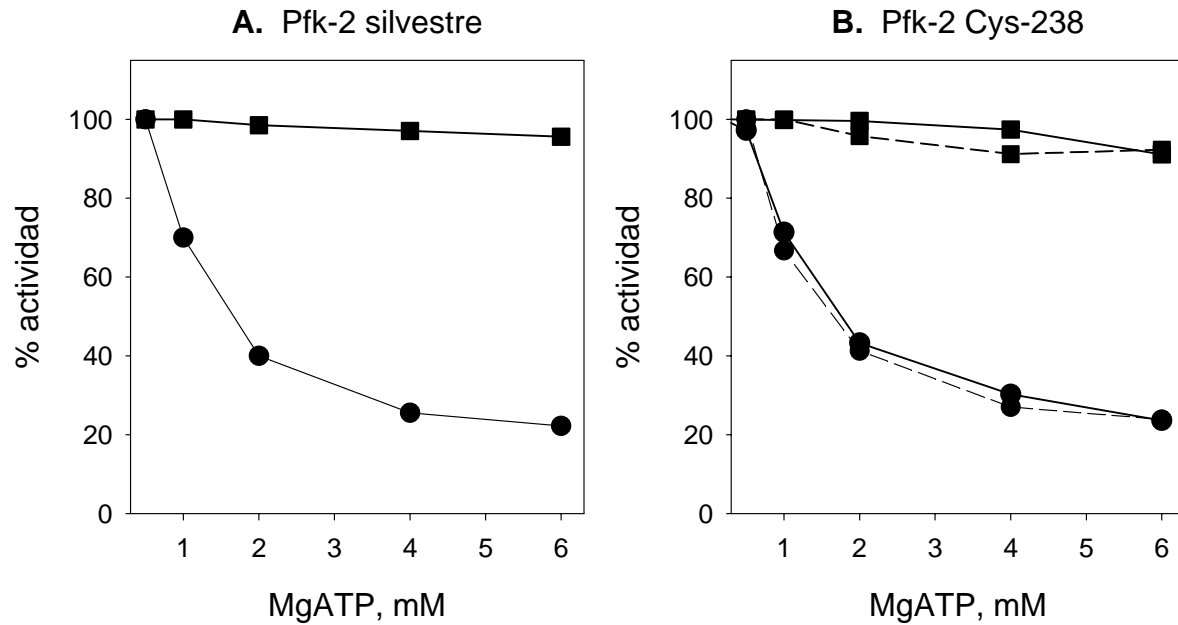


Figura 15. Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la reversión de la inhibición por MgATP de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-238. A. Actividad de la enzima silvestre (—) B. mutantes Cys-238-Ala (—) y Cys-238-Phe (---) en función de la concentración de MgATP. Ambas enzimas fueron ensayadas a dos concentraciones de fructosa-6-P de 0,1 mM (●) y 1,0 mM (■). Todos los ensayos se desarrollaron utilizando un exceso constante de Mg^{2+} de 1 mM por sobre la concentración de ATP.

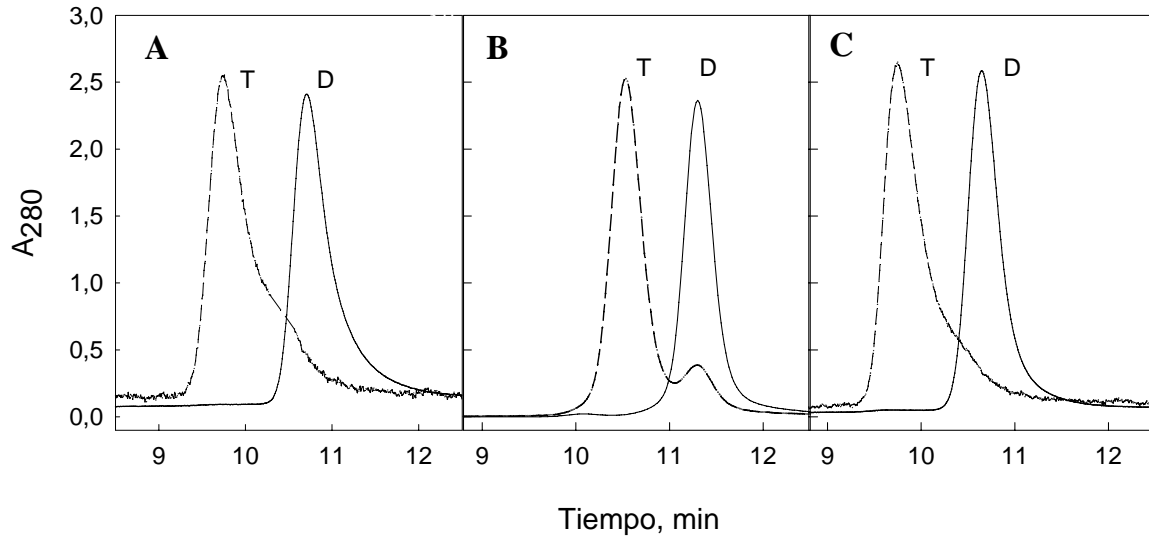


Figura 16. Filtración molecular de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-238 en ausencia de ligandos y en presencia de MgATP. Las determinaciones se desarrollaron en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Waters, utilizando una columna Bio Rad Bio Sil SEC-250 (300 x 7,8 mm). A. Pfk-2 silvestre. B. Cys-238-Ala. C. Cys-238-Phe. La cromatografía se realizó en ausencia de ligandos (—) y en presencia de MgATP (---). Para evaluar el efecto de MgATP sobre el estado de agregación de las enzimas, la columna se equilibró con 0,5 mM de MgATP y la enzima fue preincubada en las mismas condiciones. La absorbancia a 280 nm del eluido de la columna se monitoreó continuamente con un detector en línea Beckman UV. D y T denotan dímero y tetramero, respectivamente.

mutación produzca modificaciones que afecten la estabilidad del dímero sin cambios aparentes en el estado de agregación en las condiciones experimentales observadas. Esta posibilidad fue evaluada midiendo la pérdida de actividad enzimática en función de la concentración de cloruro de guanidinio.

4.4.2 Efecto de las mutaciones de Cys-238 sobre la estabilidad de la Pfk-2

Para determinar los cambios de estabilidad inducidos por las mutaciones en Cys-238 respecto de la proteína silvestre, realizamos estudios de desplegamiento frente a GdnHCl. Este agente favorece la solubilidad de compuestos apolares y provoca la desorganización de la estructura de la proteína por exposición de sus cadenas laterales hidrofóbicas. Las muestras de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238 fueron incubadas a 20° C por diferentes tiempos en presencia de GdnHCl y luego se determinó la actividad residual mediante medidas de actividad enzimática. De allí se determinó el valor $C_{m1/2}$, que es el valor que corresponde a la concentración de GdnHCl con la cual se pierde el 50% de la actividad enzimática, respecto del valor observado en ausencia del agente caotrópico.

En el caso de la enzima silvestre, a las 48 h de incubación (Figura 17c) se observa una sola transición, en un intervalo de concentración de GdnHCl de 0 a 1,0 M ($C_{m1/2}$ de 0,26 M). Sin embargo a las 3 y las 24 h de incubación la curva presenta dos transiciones, lo que indica la presencia de un intermediario en la vía de desplegamiento de la enzima (Figuras 17 a-b). La enzima Cys-238-Ala no presenta diferencias significativas con respecto a la enzima silvestre a las 48 h de incubación, tiempo en el que el sistema alcanza el equilibrio, con un valor de $C_{m1/2}$ de 0,29 M de GdnHCl. Por otro lado, la mutante Cys-238-Phe presenta una menor estabilidad a las 3

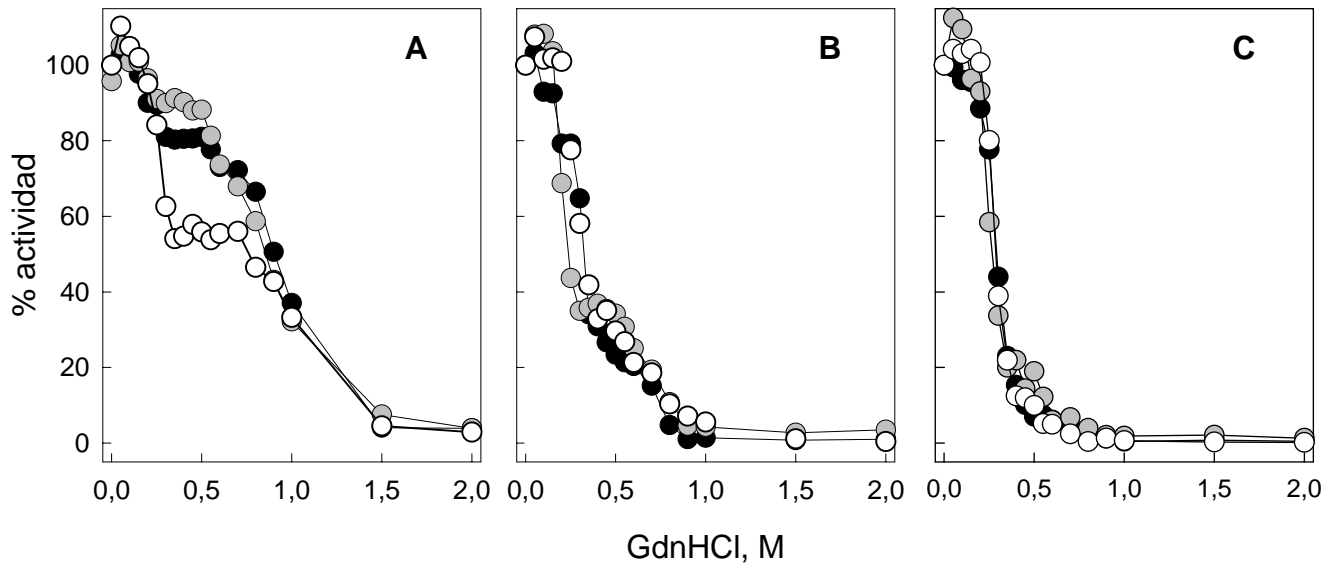


Figura 17. Estabilidad del dímero de Pfk-2 silvestre y de las mutantes de Cys-238 en función de la concentración de GdnHCl. Las muestras de Pfk-2 silvestre (●), Cys-238-Ala (◐) y Cys-238-Phe (○) fueron incubadas a distintas concentraciones de GdnHCl a 20° C durante diferentes tiempos. A. 3 h. B. 24 h. C. 48 h. El porcentaje de actividad enzimática se expresa con respecto a la enzima incubada en ausencia del agente desnaturalante.

h de incubación (Figura 17a), aún cuando la curva al equilibrio (48 h) es igual a la de la enzima silvestre, con un valor de $C_{m1/2}$ de aproximadamente 0,29 M de GdnHCl.

Los experimentos de desplegamiento al equilibrio frente a GdnHCl mostraron que no hay diferencias significativas en la estabilidad del dímero de la enzima silvestre y de las mutantes Cys-238, lo cual indica que este residuo no participa en las interacciones de la interfase dimérica de la Pfk-2.

4.4.3 Efecto de las mutaciones de Cys-238 sobre la unión de ligandos a la Pfk-2

Para determinar si las formas mutadas de Cys-238 presentaban alguna alteración en las constantes de disociación de los ligandos (fructosa-6-P al sitio activo y MgATP al sitio alostérico), realizamos estudios de fluorescencia intrínseca. Pfk-2 de *E. coli* posee un único residuo de triptofano en la posición 88 de la cadena polipeptídica. Las características fluorescentes de este residuo de triptófano de Pfk-2 constituyen una sonda sensible para estudiar el estado conformacional de la proteína en respuesta a la unión de ligandos.

4.4.3.1 Unión de fructosa-6-P a la Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238. En ausencia de ligandos, Pfk-2 silvestre presenta un máximo de emisión de fluorescencia a 350 nm, el cual refleja un alto grado de exposición del residuo de triptofano al solvente. Pfk-2 silvestre presentó un incremento hiperbólico de la fluorescencia con la concentración de fructosa-6-P con una K_d de 8 μ M (Figura 18a) y un aumento en la fluorescencia intrínseca de un 13% sin cambio en el máximo de emisión (Figuras 18b). En ausencia de ligandos, las mutantes de Cys 238 presentaron una emisión máxima a 350 nm, al igual que la enzima silvestre. La unión de fructosa-6-P a las mutantes Cys-238-Ala y Cys-238-Phe, muestra un comportamiento hiperbólico con constantes de disociación de 6 μ M y 10 μ M, respectivamente (Figura 18a). A concentraciones saturantes de

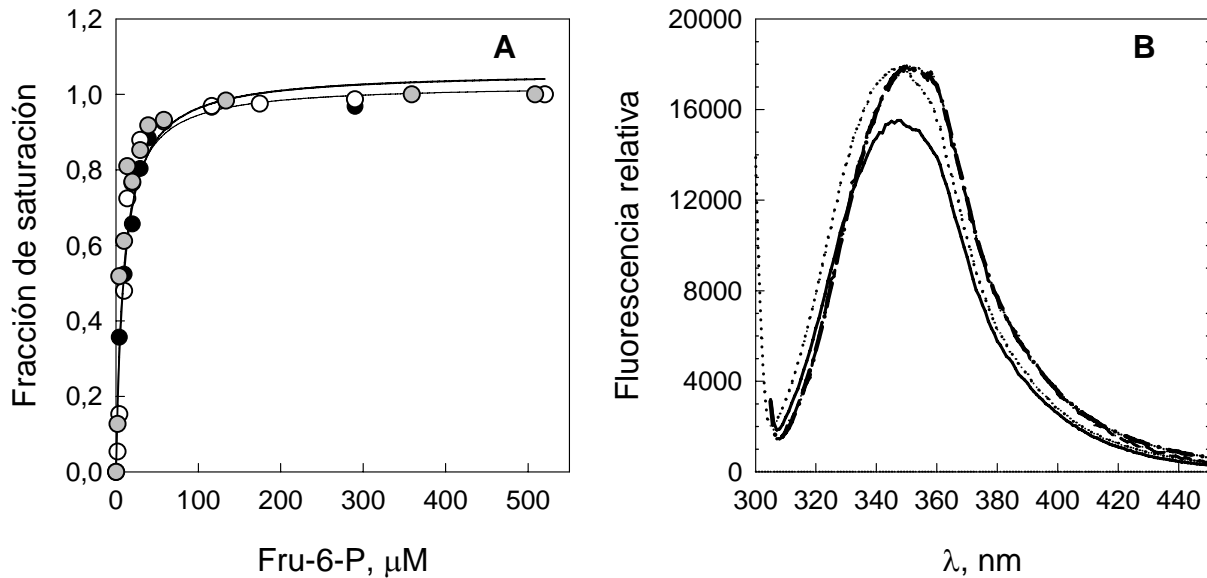


Figura 18. Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la fluorescencia intrínseca de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238. A. Unión de fructosa-6-P a las enzimas silvestre (●), Cys-238-Ala (◐) y Cys-238-Phe (○). B. Espectro de emisión de fluorescencia de las enzimas silvestre (---), Cys-238-Ala (— · — ·), Cys-238-Phe (·····) en presencia de 0,5 mM de fructosa-6-P y el espectro de emisión de la enzima silvestre en ausencia de ligandos (—). La longitud de onda de excitación fue de 295 nm. En todos los casos la concentración de proteína fue de 200 $\mu\text{g/ml}$.

este ligando (0,5 mM) las mutantes Cys-238-Ala y Cys-238-Phe presentan un incremento de la fluorescencia intrínseca de un 18 % y de un 14%, respectivamente. (Figura 18b).

4.4.3.2 Unión de MgATP a la Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238. La fluorescencia de Pfk-2 silvestre a diferentes concentraciones de MgATP presentó una curva sigmoidea con una K_d de 52 μM y un coeficiente de Hill de aproximadamente 1,5 (Figura 19a). A concentraciones saturantes de este ligando (0,3 mM) se produce un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la enzima de un 35 % y el máximo de emisión cambia a 342 nm, lo cual indica una menor exposición del triptofano al solvente en el complejo enzima- ligando (Figura 19b). En ausencia de ligandos, las mutantes presentaron una emisión máxima a 350 nm. La unión de MgATP a las mutantes Cys-238-Ala y Cys-238-Phe presentó curvas de saturación sigmoideas, con constantes de disociación de 46 μM y 57 μM , y coeficientes de Hill de 1,7 y 1,4, respectivamente (Figura 19a). A concentraciones saturantes de este ligando (0,3 mM) se produce un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de un 42 % y un 37% respectivamente, en relación al valor inicial, y en ambos casos el máximo de emisión se corre a 345 nm (Figura 19b).

4.5 EFECTOS ESTRUCTURALES DE LAS MUTACIONES DE Cys-295

4.5.1 Estado de agregación y regulación alostérica de las mutantes de Cys 295

La modificación química de la Cys-295 con EM produce la inactivación de la enzima e impide la unión de MgATP al sitio alostérico, previniendo así la tetramerización inducida por este ligando (Báez y col., 2003). Por lo tanto, se estudió el efecto de las mutaciones en Cys-295 en la oligomerización de la proteína y la inhibición por MgATP. Los estudios de filtración molecular muestran que el volumen de elución para las mutantes Cys-295-Ala y Cys-295-Phe, en

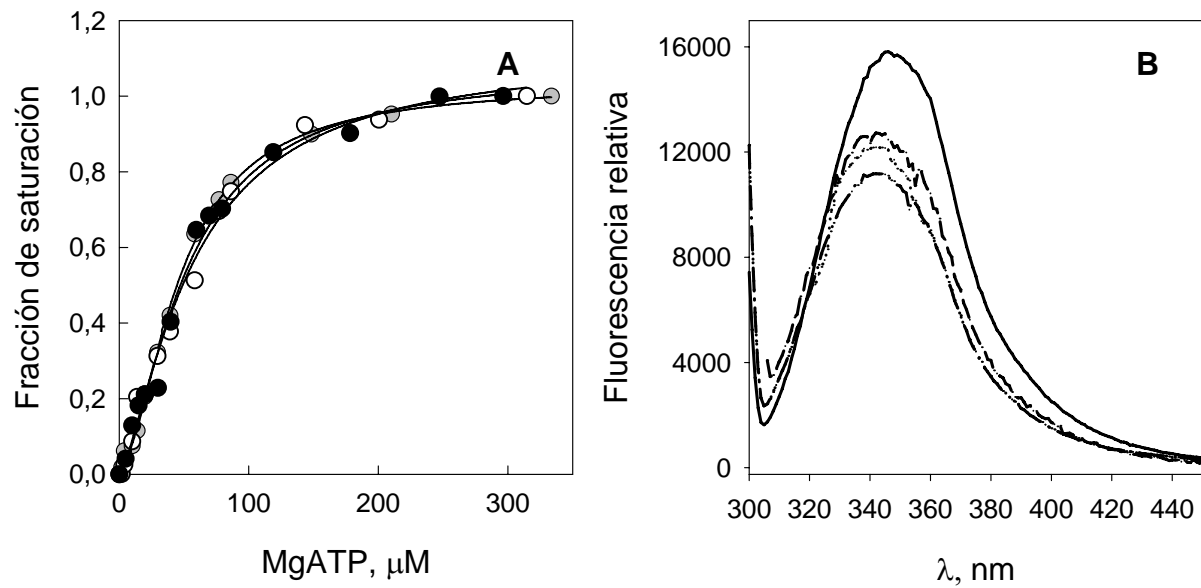


Figura 19. Efecto de la concentración de MgATP sobre la fluorescencia intrínseca de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238. **A.** Unión de MgATP a las enzimas silvestre (●), Cys-238-Ala (◐) y Cys-238-Phe (○). **B.** Espectro de emisión de fluorescencia de las enzimas silvestre (---), Cys-238-Ala (— · — · —), Cys-238-Phe (·····) en presencia de 0,3 mM de MgATP y el espectro de emisión de la enzima silvestre en ausencia de ligandos (—). La longitud de onda de excitación fue de 295 nm. En ambos casos la concentración de proteína utilizada fue de 200 μg/ml.

ausencia de MgATP, corresponden a un dímero. Por otra parte, en presencia de MgATP 0,5 mM, ambas mutantes presentaron volúmenes de elución correspondiente a las formas tetraméricas, comportándose de igual manera que la enzima silvestre (Figura 20). Estos resultados sugieren que las mutaciones del residuo de cisteína 295 no tienen efecto en la oligomerización de la enzima.

Por otra parte, para verificar si las mutaciones en el residuo de Cys-295 afectan la unión de MgATP al sitio alostérico, se estudió la inhibición producida por este ligando y la reversión de la inhibición por el incremento en la concentración de fructosa-6-P. Para ello, se estudió el efecto de la concentración de MgATP en el intervalo milimolar (0,5 a 6 mM), sobre la velocidad de reacción de Pfk-2 silvestre y mutantes Cys-295 a dos concentraciones de fructosa-6-P (0,1 y 1 mM), manteniendo un exceso constante de Mg^{2+} de 1 mM por sobre la concentración de ATP con el fin de evitar la presencia de ATP^{4-} libre, que se comporta como inhibidor de la enzima. La mutante Cys-295-Ala presenta inhibición por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P (0,1 mM), la que se revierte totalmente cuando el ensayo se desarrolla a una concentración de fructosa-6-P de 1 mM, al igual que la enzima silvestre (Figura 15A). Por otra parte, la mutante Cys-295-Phe es inhibida por MgATP cuando en el ensayo enzimático se lleva a cabo a una concentración del sustrato-azúcar de 0,1 mM, pero una concentración de fructosa-6-P de 1 mM no recupera completamente su actividad, necesitándose una concentración mayor del sustrato-azúcar (por sobre 5 mM) para poder revertir la inhibición (Figura 21). Por lo tanto, se realizó un estudio de la reversión de la inhibición por MgATP a distintas concentraciones de fructosa-6-P para la enzima silvestre y para las mutantes Cys 295. En la Figura 22 se observa que tanto la enzima silvestre como la mutante Cys-295 Ala recuperan su actividad en aproximadamente un

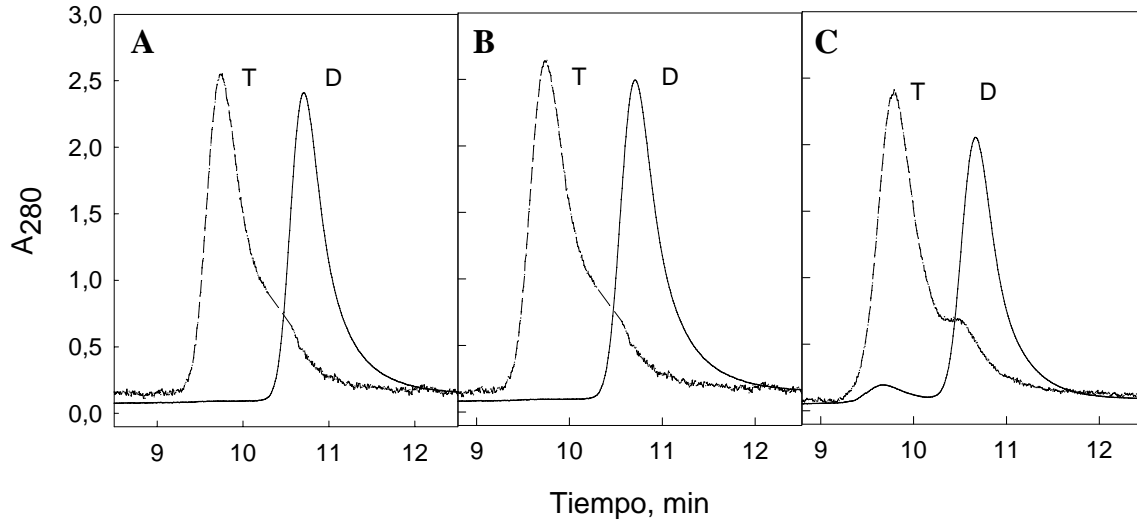


Figura 20. Filtración molecular de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-295 en ausencia de ligandos y en presencia de MgATP. Las determinaciones se desarrollaron en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Waters, utilizando una columna Bio Rad Bio Sil SEC-250 (300 x 7,8 mm). **A.** Pfk-2 silvestre. **B.** Cys-295-Ala. **C.** Cys-295-Phe. Las proteínas fueron incubadas en ausencia de ligandos (—) y en presencia de 0,5 mM MgATP (---). Para evaluar el efecto de MgATP sobre el estado de agregación de las enzimas, la columna se equilibró a la concentración indicada de MgATP y la enzima fue preincubada también en las mismas condiciones. La absorbancia a 280 nm del eluido de la columna se monitoreó continuamente con un detector en línea Beckman UV. D y T denotan dímero y tetramero, respectivamente.

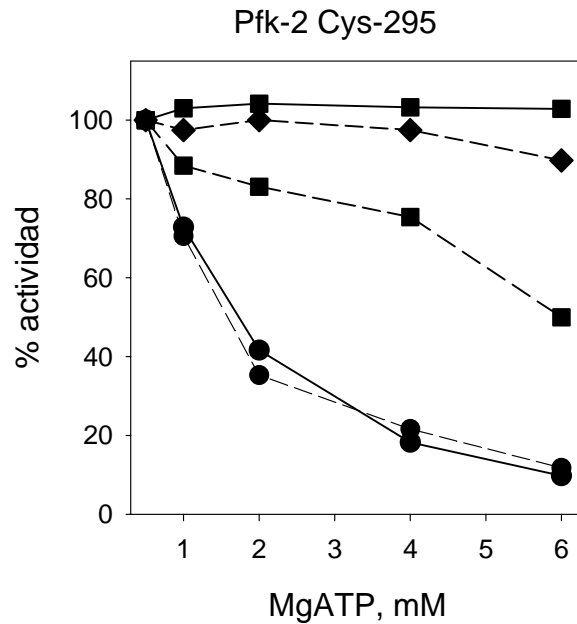


Figura 21. Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la reversión de la inhibición por MgATP de las mutantes de Cys-295. Actividad de las enzimas mutantes Cys-295-Ala (—) y Cys-295-Phe (---) en función de la concentración de MgATP. Ambas enzimas fueron ensayadas a distintas concentraciones de fructosa-6-P de 0,1 mM (●), 1,0 mM (■) y 5,0 mM (◆), respectivamente. La actividad de la enzima silvestre en función de la concentración de MgATP es presentada en la figura 15. Todos los ensayos se desarrollaron utilizando un exceso constante de Mg^{2+} de 1 mM por sobre la concentración de ATP.

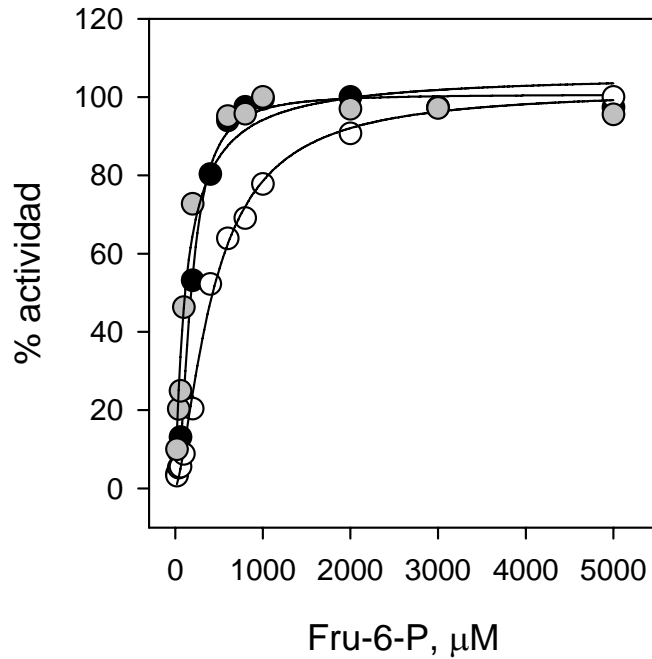


Figura 22. Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre actividad enzimática en presencia de concentraciones inhibitorias de MgATP. Actividad de la enzima silvestre (●), y mutantes Cys-238-Phe (◐) y Cys-295-Phe (○) en función de la concentración de fructosa-6-P ensayada a una concentración constante de MgATP de 4 mM, manteniendo un exceso constante de Mg^{2+} de 1 mM por sobre la concentración de ATP.

100% a una concentración de fructosa-6-P 1 mM, en tanto que la mutante Cys-295-Phe necesita una concentración mayor de fructosa-6-P, por sobre 5 mM, para recuperar el total de su actividad.

Para explicar el comportamiento anterior, se proponen dos posibilidades. La primera es que la mutación de Cys-295-Phe haya modificado la afinidad del sitio activo por fructosa-6-P, de manera que se requieren mayores concentraciones del azúcar fosfato para disociar el tetrámero (forma inhibida) hacia dímeros activos. La segunda posibilidad, es que la mutación aumente la estabilidad y la fuerza de interacción de las subunidades en el tetrámero, de modo que sea más difícil disociarlo.

Para evaluar la primera posibilidad, se desarrollaron estudios de fluorescencia intrínseca para medir la unión de fructosa-6-P en el sitio activo y la unión de MgATP al sitio alostérico.

4.5.2 Efecto de las mutaciones de Cys-295 sobre la unión de ligandos a la Pfk-2

4.5.2.1 Unión de fructosa-6-P a la Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-295. En ausencia de ligandos, las mutantes presentaron un máximo de emisión a 350 nm, con un incremento hiperbólico de la fluorescencia con respecto a la concentración de fructosa-6-P, y con constantes de disociación levemente superiores a las obtenidas para la enzima silvestre. La constante de disociación para la mutante Cys-295-Ala fue de 21 μ M y para la mutante Cys-295-Phe de 19 μ M (Figura 23a). Por otra parte, a concentraciones saturantes de este ligando (0,5 mM) no se observan cambios en los espectros de emisión de fluorescencia, pero presentaron un incremento de la fluorescencia de un 18 % y de un 21 %, para Cys-295-Ala y Cys-295-Phe, respectivamente (Figura 23b).

4.5.2.2 Unión de MgATP a la Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-295. La respuesta de la fluorescencia de Cys-295-Ala a diferentes concentraciones de MgATP presentó una curva

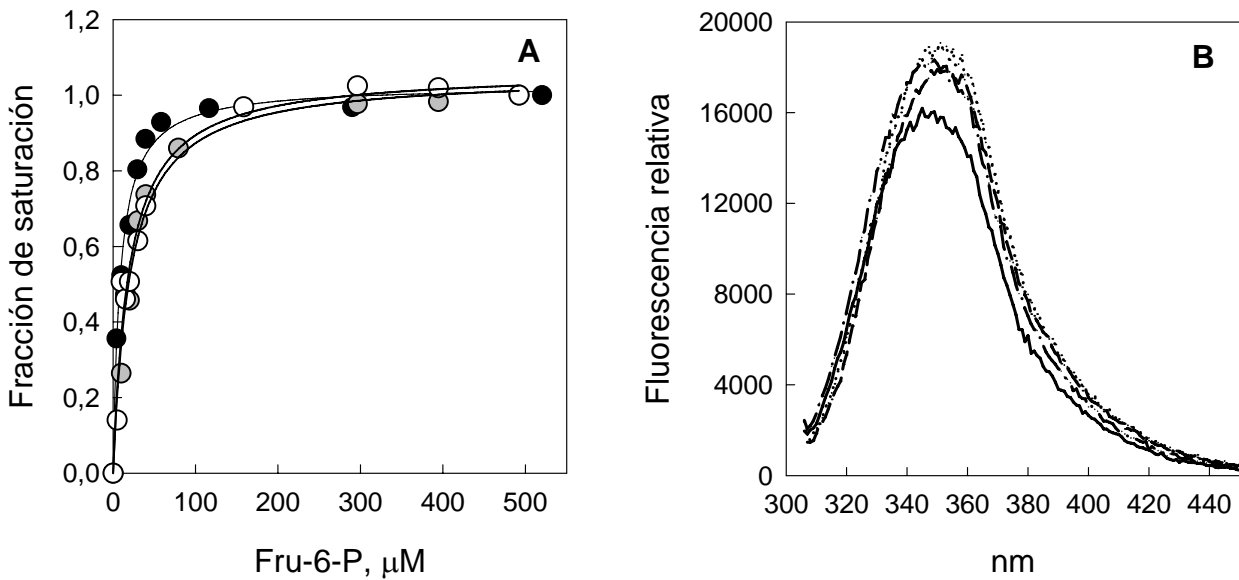


Figura 23. Efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la fluorescencia intrínseca de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-295. A. Unión de fructosa-6-P a la enzima silvestre (●), Cys-295-Ala (◐) y Cys-295-Phe (○). B. Espectro de emisión de fluorescencia de la enzima silvestre (---), Cys-295-Ala (- · - ·) y Cys-295-Phe (.....) en presencia de 0,5 mM de fructosa-6-P y el espectro de emisión de la enzima silvestre en ausencia de ligandos (—). La longitud de onda de excitación fue de 295 nm. En ambos casos la concentración de proteína utilizada fue de 200 μg/ml.

sigmoidea con un K_d de 90 μM , y un coeficiente de Hill de 1,4 (Figura 24a). A concentraciones saturantes de este ligando (0,3 mM) se produce un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la enzima en un 38 % del valor inicial, y la emisión máxima cambia a 341 nm (Figura 24b). La mutante Cys-295-Ala presenta un incremento de casi dos veces en la constante de disociación para la unión de MgATP, es decir una disminución en la afinidad por este ligando por el sitio alostérico (Tabla II). Esto sugiere que la mutación Cys-295-Ala está afectando levemente las propiedades de unión al sitio alostérico. Sin embargo, aunque la constante de disociación aumenta, ésta no modifica la capacidad de este ligando para promover la tetramerización de la enzima (ver estudios de exclusión molecular). Por otra parte, los estudios de fluorescencia intrínseca para la mutante Cys-295-Phe para medir la unión de MgATP al sitio alostérico presentaron curvas de difícil análisis y que difieren de la respuesta sigmoidea que presentó el resto de las enzimas silvestre y mutantes. Por ello, el comportamiento de la mutante respecto de la unión de MgATP se evaluó observando el proceso de tetramerización mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS).

En DLS se analiza el curso temporal de la adquisición de fotones dispersados por una muestra de proteína en solución. Dicho curso temporal contiene información acerca del movimiento browniano de las proteínas en la muestra. A partir de estos datos es posible obtener, mediante un análisis estadístico, el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico de la proteína. Utilizando DLS es posible estudiar las propiedades hidrodinámicas de las proteínas en condiciones “reales de solución”, sin recurrir a procesos forzados de separación, como en los experimentos de filtración molecular. La mutante Cys-295-Phe (Figura 25) presentó un incremento sigmoideal del radio hidrodinámico desde 71.300 (cuentas/seg) en ausencia de MgATP a 146.200 (cuentas/seg) en la presencia de 0,5 mM de MgATP. La transición es

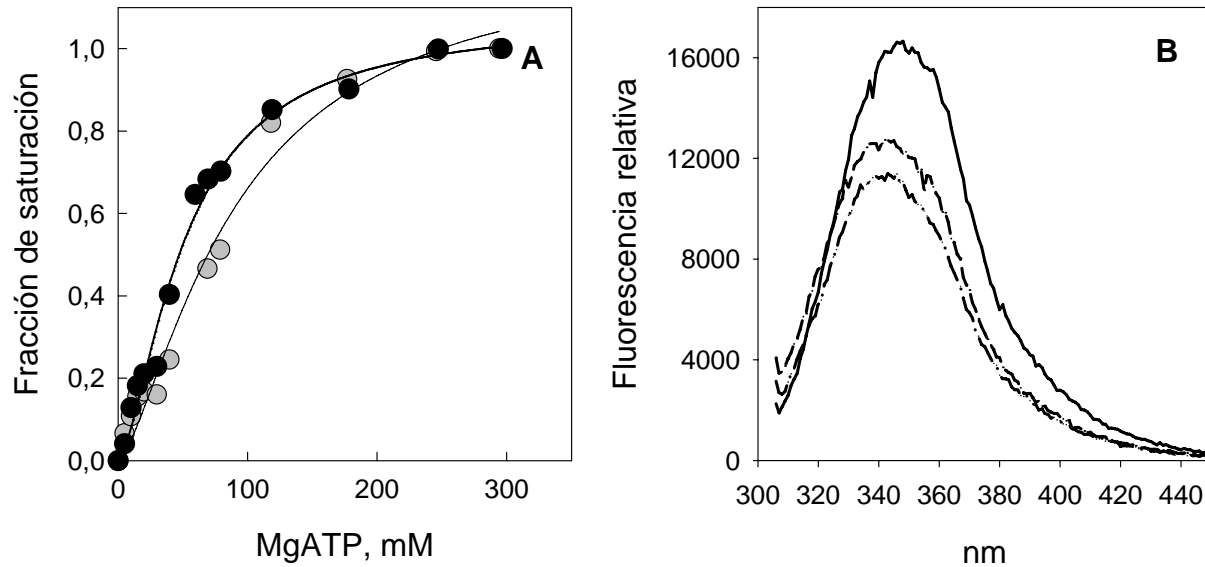


Figura 24. Efecto de la concentración de MgATP sobre la fluorescencia intrínseca de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-295. A. Unión de MgATP a Pfk-2 silvestre (●) y Cys-295-Ala (○). B. Espectro de emisión de fluorescencia de la enzima silvestre (---) y Cys-295-Ala (— · — ·) en presencia de 0,3 mM de MgATP y el espectro de emisión de la enzima silvestre en ausencia de ligandos (—). La longitud de onda de excitación fue de 295 nm. En todos los casos la concentración de proteína fue de 200 $\mu\text{g/ml}$.

TABLA II

Constantes de disociación y coeficientes de Hill de Pfk-2 silvestre y mutantes de Cys-238 y Cys-295 determinados por fluorescencia intrínseca

	Silvestre	Cys-238		Cys-295	
		Ala	Phe	Ala	Phe
K_d Fru-6-P (μ M)	$8,4 \pm 0,4$	$6,0 \pm 1$	10 ± 1	21 ± 2	19 ± 1
K_d MgATP (μ M)	52 ± 5	46 ± 2	57 ± 2	91 ± 1	---
n_h	$1,5 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	---

Los valores de las constantes de disociación y el coeficiente de Hill (n_h) corresponden a el promedio de tres determinaciones independientes. La determinación de “ n_h ” corresponde a la unión de MgATP a las enzimas y su cálculo fue desarrollado como se describe en MÉTODOS. La indicación “---” representa que la constante de disociación no fue determinada.

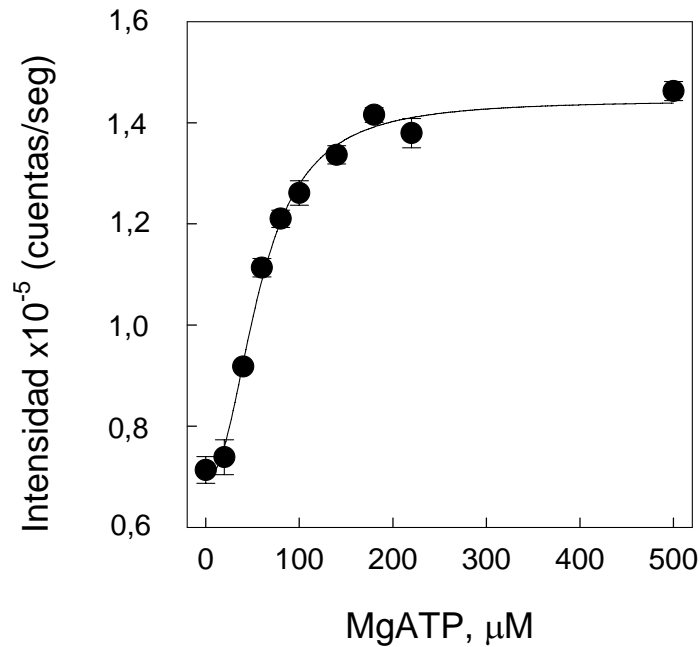


Figura 25. Efecto de la concentración de MgATP sobre el estado de agregación de la mutante Cys-295-Phe. Estudios de dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering) para estudiar el efecto de MgATP sobre el estado de agregación de Pfk-2 Cys-295-Phe. La proteína (0,4 mg/ml) fue preparada en una solución filtrada de amortiguador Tris 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 5 mM y DTT 2 mM, y la concentración indicada de MgATP. Todas las mediciones fueron realizadas a 25° C. El experimento fue desarrollado como se describe en MÉTODOS. La curva representa el ajuste a la ecuación de Hill, para el cual se obtuvo una $K_{0,5}$ de 57 μ M y un n_h de 2, 2.

cooperativa, con un valor de saturación media para MgATP de 57 μM y un coeficiente de Hill de 2,2, similar a lo encontrado a la enzima silvestre (no mostrada) y la intensidad se duplica, lo cual es consistente con el incremento en la masa molecular de dímero a tetramero. El valor de saturación media es bastante similar a la K_d de 52 μM obtenido a través de estudios de fluorescencia intrínseca para la unión de MgATP al sitio alostérico de la enzima silvestre.

Aunque estos resultados indican que hay un leve incremento en la constante de disociación para la unión de fructosa-6-P en ambas mutantes de Cys-295 con relación a la enzima silvestre, no dan cuenta del efecto de la concentración de este ligando sobre la reversión de la inhibición por MgATP, puesto que sólo la mutante Cys-295-Phe necesita una mayor concentración de fructosa-6-P para revertir esa inhibición. Entonces, la segunda posibilidad a analizar fue determinar si el efecto de la concentración de fructosa-6-P sobre la reversión de la inhibición en la mutante Cys-295-Phe se debe a un aumento en la estabilidad del tetramero (fuerza de interacción entre las subunidades). Para ello, se desarrollaron estudios de desplegamiento del dímero y tetramero de las mutantes Cys-295 frente a concentraciones crecientes de GdnHCl.

4.5.3 Efecto de las mutaciones de Cys-295 sobre la estabilidad de la Pfk-2

Para determinar las diferencias en la estabilidad de las mutantes respecto de la proteína silvestre, se realizaron estudios de desplegamiento con GdnHCl. Las muestras de Pfk-2 silvestre y las mutantes Cys-295 fueron incubadas a 20° C a diferentes tiempos (3, 24 y 48 h), y se determinó el valor de $C_{m1/2}$ para la pérdida de la actividad enzimática.

La Figura 26 muestra que la mutante Cys-295-Ala presenta una menor estabilidad frente al agente desnaturante luego de 3 h de incubación. Sin embargo, a las 48 h de incubación la enzima no presenta diferencias significativas en su estabilidad con respecto a la enzima silvestre,

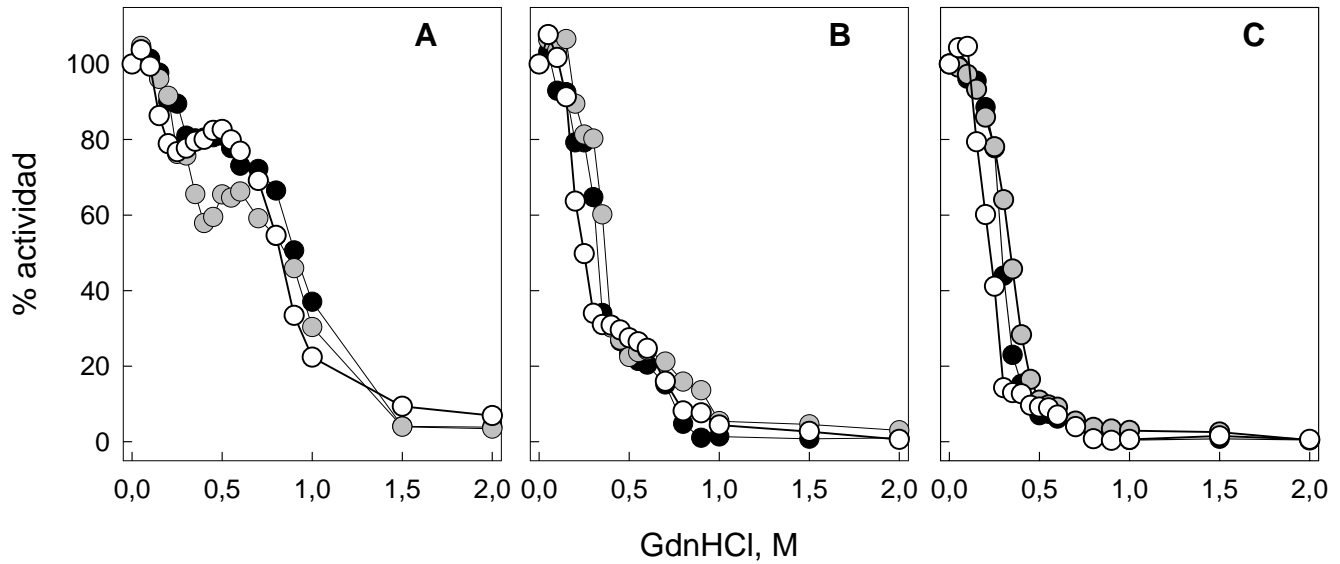


Figura 26. Estabilidad del dímero de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-295 en función de la concentración de GdnHCl. Las muestras de Pfk-2 silvestre (●), Cys-295-Ala (◐) y Cys-295-Phe (○) fueron incubadas a distintas concentraciones de GdnHCl a 20° C durante diferentes tiempos. A. 3 h; B. 24 h y C. 48 h. El porcentaje de actividad enzimática se expresa con respecto a la enzima incubada en ausencia del agente desnaturante.

presentando valores de $C_{m_{1/2}}$ de 0,33 M y de 0,30 M de GdnHCl, respectivamente. En tanto, la mutante Cys-295-Phe, presenta diferencias significativas en su estabilidad frente a GdnHCl a las 48 h de incubación, con respecto a la enzima silvestre, con valores de $C_{m_{1/2}}$ de 0,21 M y de 0,30 M de GdnHCl, respectivamente. Es decir, la mutante Cys-295-Phe requiere una menor concentración de GdnHCl para desplegar el dímero y por lo tanto esta enzima resulta ser menos estable.

MgATP es capaz de unirse a la mutante Cys-295-Phe e inhibir la actividad enzimática aún a altas concentraciones de fructosa-6-P. Una posibilidad para explicar este fenómeno, es que la inserción de un residuo hidrofóbico como Phe, aumente la fuerza de interacción a nivel de la interfase entre las subunidades en el tetrámero formado en presencia de MgATP, y que por lo tanto fructosa-6-P no puede promover la disociación del tetrámero inhibido hacia el dímero activo. Esta posibilidad fue estudiada por incubación de la mutante Cys-295-Phe con diferentes concentraciones de GdnHCl en presencia de MgATP 1 mM por 48 h.

La Figura 27 muestra las curvas de desnaturación por GdnHCl de la enzima silvestre y de las mutantes de Cys-295 en presencia de MgATP. Los valores de $C_{m_{1/2}}$ para la enzima silvestre, la mutante Cys-295-Ala y la mutante Cys-295-Phe son de 0,42, 0,40 y 0,63 M, respectivamente. Este desplazamiento en la curva de la mutante Cys-295-Phe hacia concentraciones mayores de GdnHCl indica que la enzima requiere una mayor concentración del agente caotrópico para desplegarse (un incremento de aproximadamente 0,2 M con relación a la enzima silvestre) y por lo tanto el tetrámero presenta una mayor estabilidad que la enzima silvestre. Estos resultados son consistentes con la ubicación del residuo de Cys-295 en el modelo por homología del tetrámero de Pfk-2 (Cabrera y col., 2003), el que se localiza en una región muy cercana a la interfase dímero-dímero.

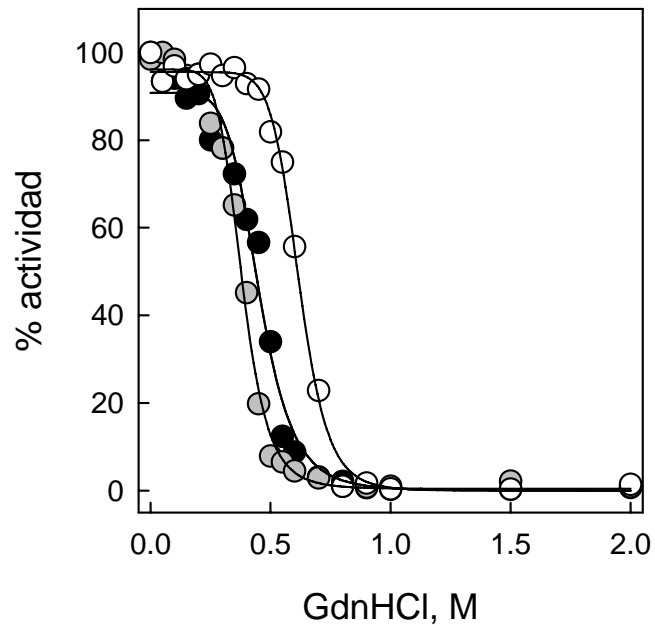


Figura 27. Estabilidad del tetrámero de Pfk-2 silvestre y las mutantes de Cys-295 en función de la concentración de GdnHCl. Las muestras de Pfk-2 silvestre (●), Cys-295-Ala (◐) y Cys-295-Phe (○) fueron incubadas en distintas concentraciones de GdnHCl por 48 h a 20° C en presencia de MgATP 1 mM. La concentración de proteína fue de 90 µg/ml. El porcentaje de actividad se expresa con respecto a la enzima incubada en ausencia del agente desnaturalante.

5. DISCUSION

5.1 EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA Y EN LA INTERACCIÓN DE SUBUNIDADES

En acuerdo con los experimentos de modificación química, los parámetros cinéticos de las mutantes sobre el residuo de Cys-238 fueron similares a aquellos encontrados para la enzima silvestre (Tabla I). Esto descarta la posibilidad de que este residuo tenga alguna participación en la unión de sustratos y/o catálisis de la enzima, en acuerdo con los estudios reportados por Báez y col. (2003). Por otra parte, se observó que las mutaciones del residuo Cys-295 afectan la actividad (Tabla I), presentando una disminución de 2 y 6 veces en los valores de k_{cat} , y un aumento de 3 a 7 veces en los valores de K_m para ambos sustratos, más acentuadamente en el caso de la sustitución por fenilalanina. Estos resultados indican que este residuo afecta las propiedades del sitio activo, lo que también ocurrió en los experimentos de modificación química, aunque en este caso la modificación con la sonda causaba una completa pérdida de la actividad enzimática. Los resultados del efecto de las mutaciones de estos residuos sobre los parámetros cinéticos son consistentes con la ubicación de estos aminoácidos en el modelo molecular dimérico de Pfk-2, donde Cys-238 está localizado en una cadena hebra β del dominio mayor, bastante alejado del sitio activo y de la interfase monómero-monómero, sugiriendo que este residuo no tiene participación en la mantención de la forma dimérica de la enzima. En tanto, el residuo Cys-295 está localizado en el dominio mayor muy cercano al sitio activo y su sustitución por un residuo de alanina u otro residuo voluminoso como fenilalanina afecta las propiedades de unión de los sustratos y la catálisis (Figura 28).

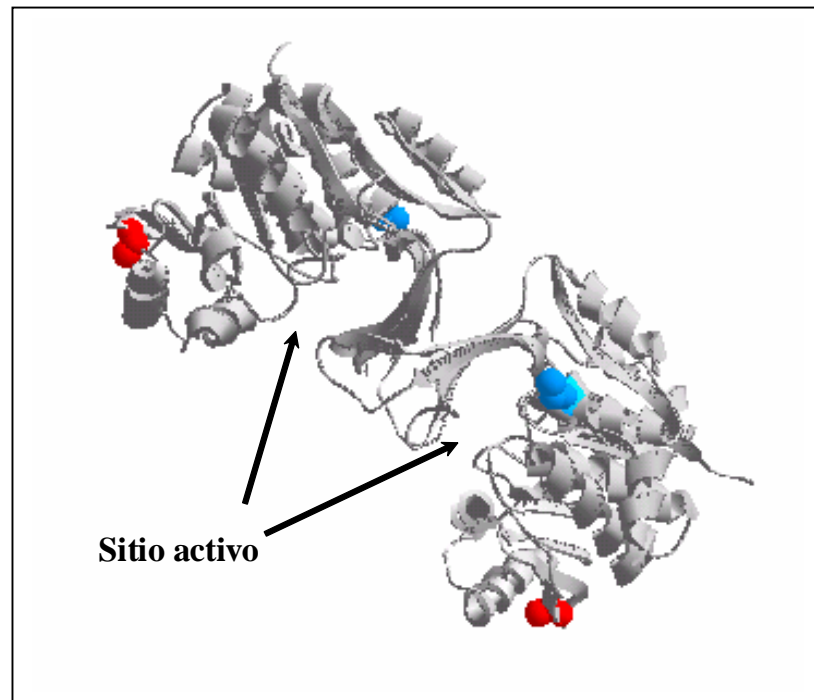


Figura 28. Modelo por homología del dímero de Pfk-2 de *E. coli*. Los elementos de estructura secundaria aparecen como cintas. Las hélices- α y las hebras- β se muestran en gris. La ubicación espacial del aminoácido Cys-238 se muestra en rojo y la de Cys-295 se muestra en azul. Las flechas indican la localización del sitio activo de la enzima (Cabrera y col., 2003).

5.2 IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN MONÓMERO-MONÓMERO PARA LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA Y LA ESTABILIDAD DE Pfk-2

Estudios previos habían presentado que la modificación química del residuo Cys-238 con la sonda PM, provocaba la disociación de la forma dimérica de Pfk-2 en monómeros, los cuales se re-asocian en presencia de fructosa-6-P y ATP⁴ y son activos. Esto indica que la sonda química estaría afectando de algún modo las interacciones intermoleculares entre las subunidades del dímero. Sin embargo, su efecto no es lo suficientemente fuerte como para evitar la formación de dímeros y por ende no puede ser usada para evaluar la capacidad catalítica de la forma monomérica.

Se evaluó la importancia de la interacción monómero-monómero de la enzima correlacionando la pérdida de actividad y el estado de asociación en función de la concentración de GdnHCl. Los resultados muestran que existe una estrecha correlación entre la pérdida de actividad y la disociación del dímero, lo que permitió comparar la estabilidad del dímero de la enzima silvestre y de las mutantes, en función de la concentración de GdnHCl. Las mutantes de Cys-238 no presentaron diferencias en su estabilidad respecto de la enzima silvestre, pero el dímero de la mutante Cys-295-Phe resultó ser menos estable debido a que la concentración de GdnHCl que se requiere para desplegar la enzima es menor. Por otra parte, se encontró que a bajas concentraciones de proteína, cuando el equilibrio de asociación debiera estar desplazado hacia la formación de monómeros, ocurre una disminución de la actividad específica, notándose una mayor sensibilidad en el caso de la mutante Cys-295-Phe. Por lo tanto, estos estudios indican que el estado dimérico de Pfk-2 es crucial para la mantención de la actividad, que el residuo Cys-238 no contribuye a la interacción monómero-monómero o a la estabilidad del dímero, y que el residuo de Cys-295 si afecta su estabilidad. Uno de los casos mejor caracterizados acerca de la importancia del estado de agregación para la actividad enzimática es el de la proteasa del

citomegalovirus humano, donde se observa que la actividad específica disminuye por efecto de la disociación inducida por dilución (Darke y col., 1996).

En el modelo molecular del dímero de Pfk-2, mostró el residuo Cys-238 tiene una localización distante de la interfase dimérica y por lo tanto no se espera que contribuya en la interacción monómero-monómero de la enzima. Esta observación pudo ser avalada por los estudios de exclusión molecular donde las mutantes Cys-238 eluyen como dímeros y son capaces de tetramerizar en presencia de MgATP, y por los estudios de estabilidad frente a GdnHCl, descartando la importancia de este residuo en la interacción de subunidades de la enzima.

La momomerización de Pfk-2 al modificar el residuo de Cys-238 sugiere que la sonda PM puede inducir un cambio conformacional que afecta la interfase dimérica. Una situación análoga ha sido descrita para la enzima luciferasa de *Vibrio harveyi* donde mutaciones en la interfase entre las subunidades del dímero alteran la estabilidad de una región en una de las subunidades que está distante de la interface (Inlow y Baldwin, 2002).

5.3 IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN DÍMERO-DÍMERO Y LA REGULACIÓN ALOSTÉRICA

La modificación química de Cys-295 con EM produce una enzima inactiva, que no presenta unión de MgATP al sitio alostérico, y no forma tetrámeros. Sin embargo, los estudios de exclusión molecular de las mutantes Cys-295-Ala y Cys-295-Phe mostraron que ambas son capaces de tetramerizar en presencia del nucleótido, comportándose de la misma forma que la enzima silvestre.

También se determinó si las mutaciones afectaban la unión del MgATP al sitio alostérico mediante el monitoreo de la inhibición inducida por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P. En ambas mutantes se produce inhibición a bajas concentraciones del azúcar-fosfato. Sin

embargo, sólo en la mutante Cys-295-Ala, fructosa-6-P 1 mM es capaz de revertir la inhibición, mientras que la mutante Cys-295-Phe requiere un incremento en la concentración de fructosa-6-P por sobre 5 mM para lograr la reversión de la inhibición. En un comienzo se sugirió que el efecto observado en la reversión de la inhibición en la mutante Cys-295-Phe, podía ser explicado por alteraciones en la afinidad de unión de fructosa-6-P en el sitio activo. Entonces, se determinaron las diferencias entre la enzima silvestre y las mutantes respecto de la sensibilidad de la fluorescencia intrínseca frente a la concentración del azúcar-fosfato. Se determinó que existe un leve incremento en la constante de disociación para la unión de fructosa-6-P para ambas mutantes y aunque el valor es más alto que el valor obtenido para la enzima silvestre, esto no explica el efecto observado, puesto que sólo la mutante Cys-295-Phe requiere una mayor concentración de fructosa-6-P para revertir la inhibición por MgATP.

Por lo tanto, se decidió evaluar la posibilidad de que la inserción de un residuo hidrofóbico como fenilalanina esté incrementando la fuerza de interacción en la interfase de las subunidades en el tetrámero cuando la proteína se encuentra en presencia de MgATP. Si este fuera el caso, fructosa-6-P no podría promover la disociación del tetrámero hacia el dímero activo. Para ello se observó el desplegamiento de los tetrámeros de las enzimas silvestre y mutantes por el incremento en la concentración de GdnHCl en presencia de MgATP. Se encontró que Cys-295-Phe necesitaba una mayor concentración del agente desnaturante para poder desplegar la proteína. Esto nos indica que la mutación Cys-295-Phe causa un aumento en la estabilidad de la enzima específicamente a nivel del tetrámero, ya que la estabilidad del dímero es levemente menor que la del dímero de la enzima silvestre (Figura 29).

El hecho de que Cys-295 esté ubicado cerca de la interface dímero-dímero, podría favorecer un aumento en la fuerza de interacción entre las subunidades cuando es reemplazado por Phe, y/o

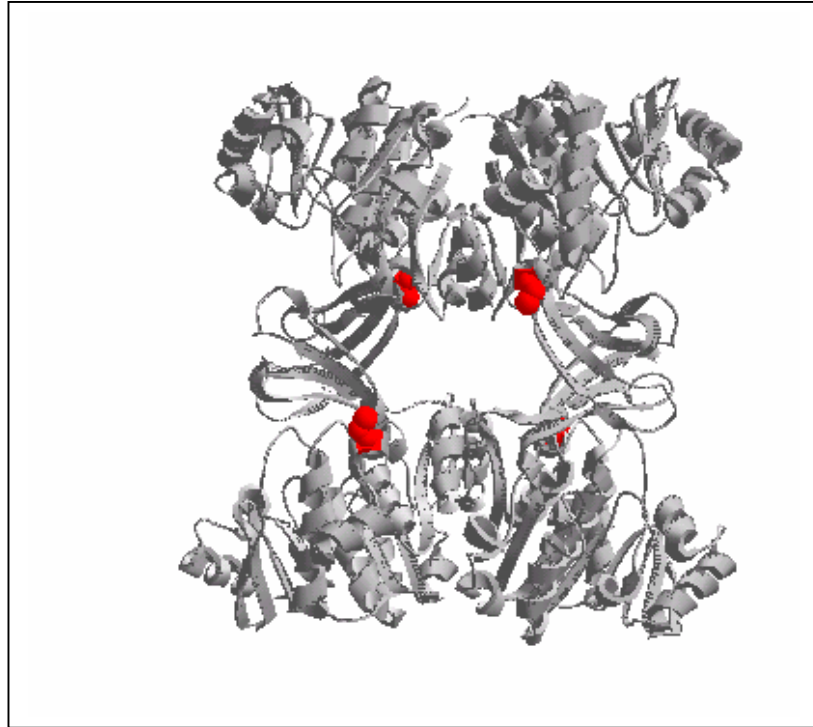


Figura 29. Modelo del tetrámero de Pfk-2 de *E. coli*. Los elementos de estructura secundaria aparecen como cintas. Las hélices- α y las hebras- β se muestran en gris. En color rojo se muestra la ubicación espacial del aminoácido Cys-295. (Cabrera y col., 2003).

que la característica hidrofóbica de fenilalanina promueva en la enzima un cambio conformacional en el que el tetrámero es más estable. Por otra parte, el reemplazo por Phe de Cys-295 podría afectar el equilibrio dinámico entre los estados abierto y cerrado de la Pfk-2. Estos estados fueron descritos por Cabrera y col. (2003) para Pfk-2 silvestre de *E. coli* como resultado de medidas de SAXS (small angle X-ray scattering) en condiciones de equilibrio. En ausencia de ligandos, el equilibrio es desplazado hacia una conformación abierta, mientras que la unión de fructosa-6-P al sitio activo, desplaza el equilibrio hacia una conformación cerrada, ayudando a la subsiguiente unión de MgATP al sitio activo, el primer paso hacia la catálisis. Sin embargo, la unión de MgATP al sitio alostérico promueve la tetramerización, teniendo como consecuencia, un cierre de dominios que obstruye la entrada de fructosa-6-P al sitio activo, produciéndose la inhibición de la actividad enzimática.

Los factores que determinan el papel específico de los aminoácidos en la interface de las subunidades no son fáciles de establecer. Con el fin de establecer los factores que afectan la estabilidad la luciferasa bacteriana, Inlow y Balwin, (2002) estudiaron el papel de la interface entre las subunidades de la proteína, recogiendo datos de experimentos de desplegamiento al equilibrio de diferentes mutantes. Aunque ciertamente debería esperarse que la amplia superficie hidrofóbica en la interface de las proteínas confiriera una significativa estabilidad, ninguna de las mutantes de la interface afectó la disociación de los dímeros de la luciferasa bajo condiciones no-desnaturantes. Sin embargo, cuando se eliminó un “loop” que no afecta la porción hidrofóbica en la interface de la proteína se observó un gran efecto sobre la disociación, demostrando que la afinidad de unión entre las subunidades no es debida solamente a las interacciones directas entre las subunidades. También, cuando un residuo de Phe en la interface de la glutatión S-transferasa fue mutado por un residuo aromático más grande y voluminoso, tal como Tyr, el peso promedio

de la masa molecular encontrada fue característico a la masa de un dímero. Sin embargo, cuando Phe fue cambiado por un residuo más pequeño tal como Ala, el peso promedio de la masa molecular se redujo y el equilibrio cambió hacia la formación del monómero (Vargo y col., 2004). Por otro lado, Bjorkbacka y col. (1997), demostraron que dos residuos de cisteína están involucrados en la interacción entre subunidades y cumplen un papel crítico en el estado oligomérico de la anhidrasa carbónica de cloroplasto de *Pisum sativum*. Estudios desarrollados por Brinda y col. (2003), aplicando métodos de “graph-spectral analysis” identificaron que tanto residuos de aminoácidos hidrofóbicos como residuos cargados contribuyen de manera importante en la estabilidad de la interface de las proteínas homodiméricas, además de que estos aminoácidos se encuentran altamente conservados. La identificación de estas agrupaciones de aminoácidos que participan en la interacción entre las subunidades fue analizada en términos de propiedades tales como su composición aminoácidica, accesibilidad al solvente y la conservación de estos residuos. Estos resultados arrojan la frecuente participación de residuos como fenilalanina entre otros, en la formación de interfaces.

El modelo tridimensional de la forma dimérica de Pfk-2 de *E. coli*, construido usando el modelamiento por homología, presentó que Cys-238 se encuentra lejos de la interface monómero-monómero. En total acuerdo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la mutación de este residuo por Ala o Phe no afecta la estabilidad del dímero de Pfk-2 ni los parámetros cinéticos. Por otra parte, en el modelo del tetrámero generado por combinación de modelamiento por homología y dispersión de rayos-X de proteínas en solución, el residuo Cys-295 no está localizado en la interface, pero ocupa una posición muy cercana y por lo tanto es posible que afecte las propiedades del sitio activo y la interacción entre dímeros para la formación del tetrámero de Pfk-2. Así, en el presente estudio, se observan efectos sobre los

parámetros cinéticos, y esto probablemente ocurre a través de un cambio conformacional que afecta el sitio activo en lugar de una directa participación de este aminoácido en el mecanismo catalítico. Por otra parte, se requieren concentraciones de fructosa-6-P inusualmente altas para revertir la inhibición inducida por MgATP en la mutante Cys-295-Phe respecto de la enzima silvestre. De acuerdo con los resultados obtenidos, este efecto se debe a un incremento en la estabilidad de la forma tetramérica, es decir en la interacción dímero-dímero.

Al igual que Pfk-2, la Pfk-1 de *E. coli*, presenta inhibición por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P (Johnson y Reinhart, 1992). Estudios de cinética enzimática en Pfk-1 indican que ambos sustratos, MgATP y Fru-6-P, afectan negativamente la unión del otro (Deville-Bonne y col., 1991; Zheng y Kemp, 1992). Dado que Pfk-1 presenta un mecanismo al azar para la unión de sustratos al sitio activo, Fenton y Reinhart (2003) proponen que el antagonismo en Pfk-1 posee carácter alostérico, ya que la presencia de uno de los sustratos en un sitio activo disminuye la afinidad de unión del otro sustrato en otro sitio activo del tetrámero. De esta manera, la inhibición por MgATP en Pfk-1 se explicaría porque al saturarse los sitios activos con el incremento de la concentración del nucleótido, la afinidad por fructosa-6-P decae drásticamente. Es decir, la unión de MgATP a un sitio activo produce una enzima cuya afinidad por fructosa-6-P es mucho menor que la afinidad de la enzima libre. Este efecto es similar a lo que ocurre en la inhibición competitiva parcial. En experimentos con tetrámeros híbridos, que poseen solamente un sitio activo funcional para MgATP, se ha observado que estos no presentan inhibición, lo cual señala que es necesaria la interacción entre sitios activos en diferentes subunidades para dar cuenta de la inhibición por MgATP (Fenton y Reinhart, 2003).

Una posible explicación para la inhibición de la actividad enzimática por MgATP en Pfk-2 podría ser análoga a la descrita por Fenton y Reinhart (2003) para la Pfk-1 de *E. coli*. Esto

significaría que la unión de MgATP al sitio alostérico produce una enzima cuya afinidad por fructosa-6-P en el sitio activo es menor. Sin embargo, una explicación alternativa es que la unión de MgATP al sitio alostérico y la fructosa-6-P al sitio activo sean mutuamente excluyentes (inhibición competitiva clásica). Estudios realizados por Cabrera (Tesis Doctoral, 2004), sugirieron que el mecanismo de la inhibición por MgATP en Pfk-2 corresponde a una inhibición competitiva clásica. En este caso, la unión de MgATP al sitio alostérico causa un cambio conformacional que distorsiona o enmascara el sitio de unión para fructosa-6-P en el sitio activo (y *vice-versa*). La figura 30, muestra por una parte la inhibición y la formación del tetrámero mediada por la unión de MgATP al sitio alostérico (K_1), y por otra, la unión de fructosa-6-P al sitio activo y la concomitante formación del complejo ternario con la unión del MgATP al sitio activo (proceso catalítico controlado por K_2). Por lo tanto, el balance entre K_1 y K_2 determinará la modulación de la inhibición de Pfk-2. La mutación Cys-295-Phe produciría cambios estructurales que favorecen la inhibición alostérica por el incremento en la estabilidad del tetrámero.

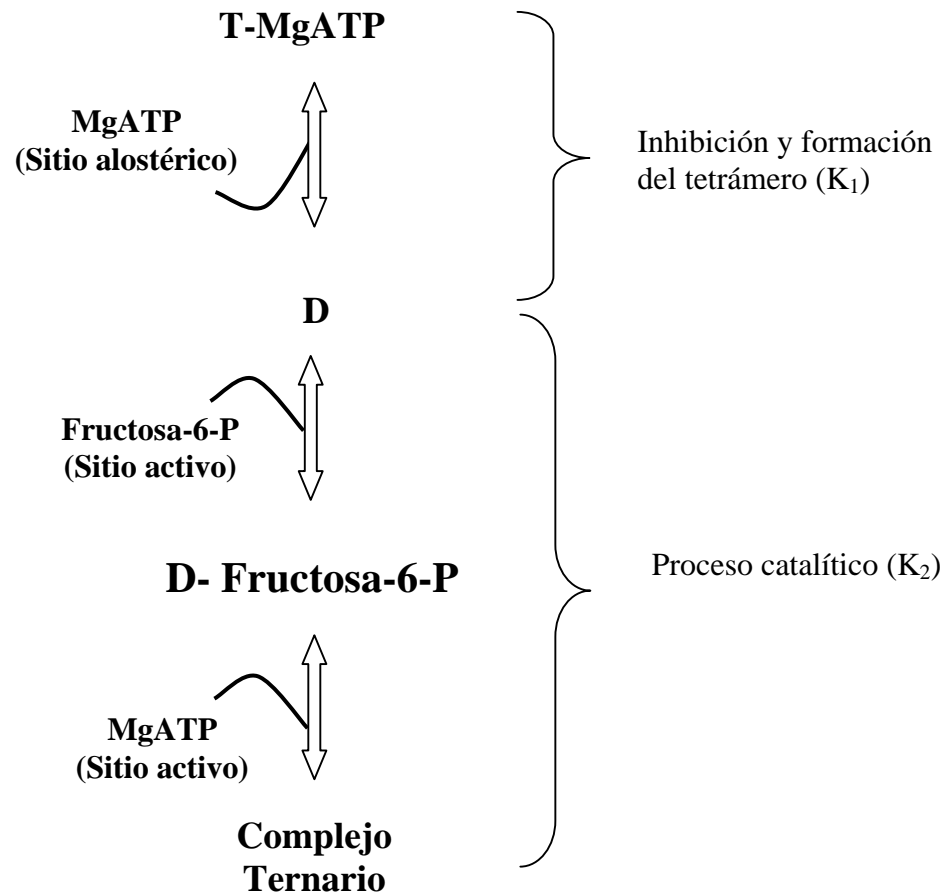


Figura 30. Rol del estado oligomérico en la actividad enzimática y el comportamiento alostérico de Pfk-2. Hacia arriba el esquema presenta la formación del tetrámero controlado por K_1 . Hacia abajo se presenta el proceso catalítico controlado por K_2 . “D” y “T” representan al dímero y al tetrámero, respectivamente. La unión de MgATP a D corresponde al sitio alostérico, mientras que la unión de MgATP al complejo D-Fructosa-6-P se refiere al sitio activo.

Este estudio presenta tres conclusiones fundamentales: (1) el estado dimérico de Pfk-2 es esencial para la estabilidad y la actividad catalítica de la enzima, (2) el residuo Cys-238 no tiene una participación en la interacción monómero-monómero de la enzima, en acuerdo con el modelamiento por homología pero contrariamente a lo sugerido por los estudios de modificación química con PM y, (3) el residuo Cys-295 afecta las propiedades del sitio activo y las interacciones monómero-monómero y dímero-dímero de Pfk-2.

6. REFERENCIAS

1. Auzat, I., Gawlita, E., y Garel, J. R. (1995). Slow ligand-induced transitions in the allosteric phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **249**, 478-492.
2. Babul, J. (1978) Phosphofructokinases from *E. coli*: Purification and characterization of the non-allosteric isozyme. *J. Biol. Chem.* **253**, 4350-4355.
3. Báez, M., Rodríguez, P. H., Babul, J., y Guixé, V. (2003). Structural and functional roles of Cys-238 and Cys-295 in *E. coli* phosphofructokinase-2. *Biochem. J.* **376**, 277-283.
4. Björkbacka, H., Johansson, I., Skärfstad, E. y Forsman, C. (1997). The sulfhydryl groups of Cys-269 and Cys-272 are critical for the oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*. *Biochemistry.* **36**(14), 4287-4294.
5. Blangy, D., Buc, H., y Monod, J. (1968) Kinetics of allosteric interactions of phosphofructokinase from *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **31**, 13-35.
6. Bork, P., Sander, C., y Valencia, A. (1993). Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein. Sci.* **2**, 31-40.
7. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
8. Brinda, K. V., Kannan, N. y Vishveshwara, S. (2002). Análisis of homodimeric protein interfaces by graph-spectral methods. *Protein Engineering.* **15**, 265-277.
9. Cabrera, R., Fischer, H., Trapani, S., Craievich, A. F., Garratt, R. C., Guixé, V., y Babul, J. (2003). Domain motions and quaternary packing of phosphofructokinase-2 from *Escherichia*

- coli* studied by small angle X-ray scattering and homology modeling. *J. Biol. Chem.* **278**, 12913-12919.
10. Cabrera, R. M. (2004). Control alostérico de la oligomerización y la inhibición de la actividad catalítica en la fosfofructoquinasa-2 de *E. coli*. Consecuencias estructurales de la unión de ligandos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
 11. Campos, G., Guixé, V., y Babul, J. (1984). Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **259**, 6147-6152.
 12. Daldal, F. y Fraenkel, D.G. (1981). Tn10 insertions encoding the minor phosphofructokinase of *E.coli*. *J. Bacteriol.* **147**, 935-943.
 13. Daldal, F. y Fraenkel, D.G. (1983). Assessment of a futile cycle involving reconversión of fructose- 6- phosphate to fructose- 1,6- bisphosphate during gluconeogenic growth of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **153**, 390-394.
 14. Daldal, F. (1983). Molecular cloning of the gene for phosphofructokinase-2 of *E. coli* and the nature of a mutation, *pfkB1*, causing a high level of the enzyme. *J. Mol. Biol.* **168**, 285-305.
 15. Daldal, F. (1984). Nucleotide sequence of gene *pfkB* encoding the minor phosphofructokinase of *E. coli* K-12. *Gene.* **28**, 337-342.
 16. Darke, P. L., Cole, J. L., Waxman, L., Hall, D. L., Sardana, M. K., y Kuo, L. C. (1996). Active human cytomegalovirus protease is a dimer. *J. Biol. Chem.* **271**(13), 7445-7449.
 17. Deville-Bonne, D., Laine, R., y Garel, J-R. (1991). Substrate antagonism in the kinetic mechanism of the *E. coli* phosphofructokinase-1. *FEBS Lett.* **290**, 173-176.
 18. Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
 19. Fenton, A. W. Y Reinhart, G. D. (2003). Mechanism of substrate inhibition in *Escherichia coli* phosphofructokinase. *Biochemistry.* **42**, 12676-12681.

20. Fraenkel, D. G., Kotlarz, D., y Buc, H. (1973). Two fructose- 6- phosphate kinase activities in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **248**,4865-4866.
21. Guixé, V. y Babul, J. (1988). Influence of ligands on the aggregation of the normal and mutant forms of phosphofructoquinase-2 of *E. coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 519-524.
22. Guixé, V., Rodríguez, P. H. y Babul, J. (1998). Ligand-induced conformational transitions in *E. coli* phosphofructokinase-2: evidence for an allosteric site for MgATP. *Biochemistry.* **37**, 13269-13275.
23. Guixé, V. (2000). Chemical modifications of SH group of *E. coli* phosphofructokinase-2 induces subunit dissociation: monomers are inactive but preserve ligand-binding properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 313-319.
24. Hansen, T. y Schönheit, P. (2001) Sequence, expression, and characterization of the first archaeal ATP-dependent 6-phosphofructokinase, a non-allosteric enzyme related to the phosphofructokinase-B sugar kinase family, from the hyperthermophilic crenarchaeote *Aeropyrum pernix*. *Arch. Microbiol.* **177**, 62-69.
25. Inlow, J. K., y Baldwin, T. O. (2002). Mutational analysis of the subunit interface of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase. *Biochemistry.* **14**, 3906-3915.
26. Johnson, J. L., y Reinhart, G. D. (1992). MgATP and fructose-6-phosphate interactions with phosphofructokinase from *E. coli*. *Biochemistry.* **31**, 11510-11518.
27. Le Bras, G., Auzat, I. y Garel, J. R. (1995). Tetramer-dimer equilibrium of phosphofructokinase and formation of hybrid tetramers. *Biochemistry.* **34**, 13203-13210.
28. Mathews, I. I., Erion, M. D., Ealick, S. E. (1998). Structure of human adenosine kinase at 1,5 Å resolution. *Biochemistry.* **37**, 15607-15620.

29. Ohshima, N., Inagaki, E., Yasuike, K., Takio, K y Tahirov, T. H. (2004). Structure of *Thermus thermophilus* 2-keto-3-deoxygluconate kinase: evidence for recognition of an open chain substrate. *J. Mol. Biol.* **340**, 477-89.
30. Ronimus, R. S., y Morgan, H. W. (2001). The biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinase from extremophiles. *Extremophiles.* **5**, 357-373.
31. Ronimus, R. S., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H. y Morgan, H. W. (2001) Cloning, expression and characterisation of a Family B ATP-dependent phosphofructokinase activity from the hyperthermophilic crenaracheon *Aeropyrum pernix*. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 85-90.
32. Schumacher, M. A., Scott, D. M., Mathews, I. I., Ealick, S. E., Roos, D. S., Ullman, B., Brennan, R. G. (2000). Crystal structures of the *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic and prodrug. *J. Mol. Biol.* **296**, 549-567.
33. Shirakihara, Y., Evans, P. R. (1988). Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* **204**, 973-994.
34. Sigrell, J. A., Cameron, A. D., Jones, T. A., Mowbray, S. L. (1998). Structure of the *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1,8 Angstrom resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure.* **6**, 183-193.
35. Sychala, J., Datta, N., Takabayashi, K., Datta, M., fox, I., Gribbin, T. y Mitchell, B. (1996). Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1232-1237.
36. Tabor, S., y Richarson, C. C. (1992). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. 1985. *Biotechnology.* **24**, 280-284.
37. Thomsom, J. (1977). *E. coli* phosphofructokinase synthesized *in vitro* from a colE1 hybrid plasmid.. *Gene* **1**, 347-356.

38. Vargo, M. A., Nguyen L., y Colman, R., F. (2004). Subunit interface residues of glutathione S-transferase A1-1 that are important in the monomer-dimer equilibrium. *Biochemistry*. **43**, 3327-3335.
39. Zheng, R. L., y Kemp, R. G. (1992). The mechanism of ATP inhibition of wild type and mutant phosphofructo-1-kinase from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 23640-23645.