



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
ESCUELA DE BIOQUÍMICA

Profesor Patrocinante
DR. ALEJANDRO J. YÁÑEZ C.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante
DR. JUAN C. SLEBE T.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MUTANTE
SITIO ESPECIFICA Phe16Trp DE LA
FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE RIÑÓN DE CERDO**

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

MARCO ANTONIO MAUREIRA NAVARRETE
VALDIVIA – CHILE

2005

INDICE DE CONTENIDOS

		Pag.
	INDICE DE CONTENIDOS	i
	INDICE DE FIGURAS	iii
	INDICE DE TABLAS	v
	LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1.	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
2.1.	Generalidades	3
2.2.	Propiedades de la fructosa-1,6-bisfosfatasa	4
2.3.	Estructura de la fructosa-1,6-bisfosfatasa	4
2.4.	Estudio de las propiedades de la fructosa-1,6-bisfosfatasa mediante el uso de sondas fluorescentes	10
3.	MATERIALES Y METODOS	13
3.1.	MATERIALES	13
3.1.1.	Reactivos	13
3.1.2.	Equipos	14
3.2.	MÉTODOS	14
3.2.1.	Elaboración de medios de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar	14
3.2.2.	Transformación de bacterias <i>E.coli</i> cepa JM 109 y BL21(DE3)	15

3.2.3.	Purificación de DNA plasmidial por un Kit comercial	15
3.2.4.	Análisis electroforético de DNA en geles de agarosa	16
3.2.5.	Cuantificación de DNA plasmidial	17
3.2.6.	Mutagénesis sitio dirigida	17
3.2.7.	Digestión con endonucleasas de restricción	18
3.2.8.	Expresión y purificación de la enzima FBPasa Phe16Trp	19
3.2.9.	Determinación de la concentración de proteínas	21
3.2.10.	Análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	21
3.2.11.	Ensayo espectrofotométrico de determinación de actividad enzimática	22
3.2.12.	Determinación del espectro de fluorescencia de la FBPasa-Phe16Trp	23
3.2.13.	Titulación de la FBPasa-Phe16Trp con diferentes ligandos	23
4.	RESULTADOS	24
4.1.	Obtención de la mutante Phe16Trp de la fructosa-1,6-bisfosfatasa	24
4.2.	Expresión y purificación de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp	25
4.3.	Sensibilidad térmica de las FBPasas silvestre y mutante	29
4.4.	Propiedades cinéticas de las FBPasas silvestre y mutante	29
4.5.	Características fluorescentes de la FBPasa mutante Phe16Trp	39
5.	DISCUSIÓN	49
6.	AGRADECIMIENTOS	56
7.	BIBLIOGRAFIA	57

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1	Diagrama de cintas de la estructura cuaternaria del homotetrámero de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. 6
Figura 2	Representación esquemática de los estados conformacionales R y T de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. 7
Figura 3	Análisis de restricción del Vector de expresión <i>pET 15b</i> , que contiene el fragmento codificante, proveniente de la reacción de mutagénesis. 26
Figura 4	Análisis electroforético por SDS-PAGE de las muestras de las distintas etapas de la purificación de la FBPasa-Phe16Trp. 28
Figura 5	Sensibilidad a la temperatura de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. 31
Figura 6	Curva de saturación por sustrato de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. 34
Figura 7	Efecto de magnesio sobre la actividad de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. 36
Figura 8	Inhibición por fructosa-2,6-bisfosfato de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. 37
Figura 9	Curva de Inhibición por AMP de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. 38
Figura 10	Espectros de emisión de fluorescencia de la FBPasa Silvestre y mutante Phe16Trp. 40
Figura 11	Efecto de Mg ²⁺ sobre la intensidad de emisión de fluorescencia de la 43

enzima mutante Phe16Trp.

- Figura 12 Efecto del inhibidor fructosa-2,6-bisfosfato sobre la intensidad de emisión de fluorescencia de la enzima mutante Phe16Trp. 45
- Figura 13 Efecto del inhibidor alosterico AMP sobre la intensidad de emisión de fluorescencia de la enzima mutante Phe16Trp. 46
- Figura 14 Efecto de AMP sobre la intensidad de emisión de fluorescencia de la mutante Phe16Trp en presencia de Mg^{2+} 15mM. 47

INDICE DE TABLAS

		Pag.
Tabla I	Purificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa mutante Phe16Trp.	30
Tabla II	Parámetros cinéticos de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp.	32
Tabla III	Parámetros de la unión de los ligandos a la mutante FBPasa Phe16Trp.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

amp	Ampicilina
D.O.	Densidad óptica
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
G6Pdh	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil β -D-tiogalacto-piran
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
n_H	Coefficiente de Hill
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
Pi	Fosfato inorgánico
TBE	Solución tampón tris-borato-EDTA
U	Unidad enzimática

1. RESUMEN

La enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) de riñón de cerdo cataliza una reacción esencial para la gluconeogénesis, la hidrólisis de fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-P₂) a fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) más fosfato inorgánico. Es un homotetrámero cuya actividad catalítica es regulada por el inhibidor alostérico AMP y por el inhibidor competitivo fructosa-2,6-bisfosfato. La enzima requiere de la presencia de cationes metálicos divalentes (Mg²⁺ o Mn²⁺) para su actividad. Estudios de difracción de rayos-X de los cristales de la FBPasa de riñón de cerdo han determinado la existencia de dos interfases diferentes, en las cuales los sitios de unión alostérico para el inhibidor AMP se encuentran ubicados en la interfase C1-C4 y C2-C3. Para estudiar los cambios conformacionales producidos por la unión de AMP y la transmisión cooperativa entre la subunidad C1-C4, se introdujo por mutagénesis sitio dirigida una sonda fluorescente de triptófano en el residuo fenilalanina en posición 16 en esta interfase. La mutante que posee un único residuo de triptófano Phe16Trp fue expresada en *E. Coli*, utilizando el sistema de expresión *pET 15b*, y purificada a homogeneidad. Estudios cinéticos demuestran que la enzima mostró tener parámetros similares a la FBPasa silvestre. El mutante no mostró cambios en la afinidad por el nucleótido. Sin embargo, se determinó que la FBPasa mutante Phe16Trp perdió completamente la cooperatividad para la unión del inhibidor alostérico AMP. Además, se observa una curva bifásica en la inhibición por AMP, sugiriendo que el nucleótido se une a sitios de la enzima con diferentes afinidades. Por otra parte, la mutante exhibe un máximo de emisión de fluorescencia a 337 nm y esta emisión es perturbada, principalmente, por la adición del inhibidor alostérico AMP. Estos resultados demuestran la utilidad de esta mutante para sensor cambios conformacionales que afectan a la interfase C1-C4 o C2-C3.

1.1 SUMMARY

Pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) catalyzes an essential reaction in gluconeogenesis, the hydrolysis of fructose-1,6-bisphosphate (Fru-1,6-P₂) to fructose-6-phosphate (Fru-6-P) and inorganic phosphate. FBPase is a homotetramer which is regulated by the allosteric inhibitor AMP and by the competitive inhibitor fructose-2,6-bisphosphate. The enzyme requires the presence of divalent metal ions (Mg^{2+} or Mn^{2+}) for its activity. X-ray diffraction studies of the pig kidney FBPase have determined the existence of two different interfaces, where the binding site for the inhibitor AMP is located in the interface C1-C4 and C2-C3. In order to study the conformational changes yielded for the binding of AMP and the cooperative transmission between the subunit C1-C4 or C2-C3, a fluorescent probe of tryptophan was introduced by site-directed mutagenesis replacing the residue phenylalanine in position 16 at this interface. The mutant enzyme Phe16Trp was expressed in *E. Coli* using the expression system pET 15b and purified to homogeneity. Kinetic studies shown that the Phe16Trp mutant have similar kinetic parameters than the wild type FBPase. This mutant didn't have changes in the affinity for the nucleotide. However, the mutant Phe16Trp also shown the complete lost of the cooperativity for the binding of the allosteric inhibitor AMP. Also, a two-phase curve is observed in the inhibition by AMP, that which can be interpreted by the binding from the nucleotide to class of binding sites in the enzyme with different affinity. On the other hand, the enzyme mutant exhibits a maximum of emission of fluorescence to 337 nm and this emission is perturbed mainly by the addition of the inhibitor allosteric AMP. These results demonstrate the utility of this mutant for sensor conformational changes that affect to the interface C1-C4 or C2-C3.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades

La glucosa es el principal carbohidrato utilizado en la generación de energía por las células de mamíferos. Un gran número de vías metabólicas son necesarias en la producción de energía, a través de glucosa, dentro de las cuales la glicólisis es esencial en su transformación en piruvato con formación concomitante de energía en forma de ATP (Strayer L, 1995). Por otra parte, cuando se requiere de este carbohidrato, la formación por medio de intermediarios no glucídicos tales como lactato, aminoácidos y glicerol es principalmente realizada en hígado y riñón, por la gluconeogénesis (Marcus F, 1981). Este proceso de generación de glucosa requiere de reacciones que permitan revertir las reacciones esenciales irreversibles en la glicólisis con el consiguiente requerimiento de energía. Una de estas etapas irreversibles, en condiciones fisiológicas, es la reacción que cataliza la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa en la gluconeogénesis. Por el contrario, la reacción inversa realizada en la glicólisis es catalizada por la enzima fosfofructoquinasa. La actividad catalítica de la fructosa-1,6-bisfosfatasa es inhibida por AMP y fructosa-2,6-bisfosfato, mientras que la actividad catalítica de la fosfofructoquinasa es activada en presencia de fructosa-2,6-bisfosfato y AMP, es decir, cuando la carga energética es alta. Además, existe un potente efecto sinérgico entre las inhibiciones por AMP y fructosa-2,6-bisfosfato, con respecto al sustrato, efecto que se considera como el mecanismo responsable del control de flujo en la vía gluconeogénica en mamíferos (Hers y Hue, 1983; Van Schaftingen, 1987).

2.2. Propiedades de la fructosa-1,6-bisfosfatasa

La enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (D-fructosa-1,6-bisfosfato-1-fosfohidrolasa; E.C 3.1.3.11; FBPasa) cataliza una reacción esencial para la gluconeogénesis, la hidrólisis de fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-P₂) a fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) más fosfato inorgánico. Para que la FBPasa realice sus funciones catalíticas es esencial la presencia de metales bivalentes, tales como Mg²⁺ o Mn²⁺. La activación por magnesio es cooperativa, presentando un coeficiente de Hill igual a 2,0 (Taketa & Pogell, 1965). El AMP es un inhibidor de la FBPasa en condiciones fisiológicas. La regulación de la actividad FBPasica por el nucleótido AMP ocurre por unión de éste a un sitio alostérico (Zhang *et al.*, 1994) y la inhibición es cooperativa con un coeficiente de Hill igual a 2,0 (Taketa & Pogell, 1965). La enzima es regulada también por inhibición a concentraciones micromolares de fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂). Este inhibidor se une próximo al sitio activo de la FBPasa y el mecanismo de inhibición es competitivo en relación con el sustrato (Van Schaftingen & Hers, 1987; Ke *et al.*, 1990). Cabe destacar, además, que la fructosa-1,6-bisfosfatasa es inhibida por altas concentraciones de sustrato (Taketa y Pogell, 1965; Pontremoli *et al.*, 1973; Slebe *et al.*, 1985) y es activada por cationes monovalentes, tales como K⁺ y NH₄⁺ (Tashima & Yoshimura, 1975; Zhang *et al.*, 1996).

2.3. Estructura de la fructosa-1,6-bisfosfatasa

Desde su descubrimiento en el año 1943 (Gomori, 1943) la fructosa-1,6-bisfosfatasa o fosfatasa alcalina, denominada inicialmente así porque su máxima actividad se obtenía a pH alcalino, debido a hidrólisis por proteasas al momento de su purificación, ha sido aislada y caracterizada desde una amplia variedad de tejidos de mamíferos, tal como riñón de cerdo (Marcus *et al.*, 1967), así como también de numerosos microorganismos y plantas.

Se ha secuenciado la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa de: riñón de cerdo (Marcus *et al.*, 1982; Williams & Cantrowitz, 1992), hígado de oveja (Fisher & Thompson, 1983), e hígado de rata (El-Maghrabi *et al.*, 1988); de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Roger *et al.*, 1988), *Schizosaccharomyces pombe* (Roger *et al.*, 1988) y *Kluyveromyces lactis* (Zaror *et al.*, 1993); y además de *Escherichia coli* (Hamilton *et al.*, 1988) y cloroplasto de trigo (Raines *et al.*, 1988). La fructosa-1,6-bisfosfatasa aislada de diferentes fuentes es un homotetrámero que tienen una masa molecular aproximadamente de 36 kDa. Por convención, en el vértice superior derecho del tetrámero se encuentra ubicada la subunidad C1, seguido por las subunidad C2, C3 y C4, siguiendo el sentido opuesto al de las manecillas del reloj (Figura 1). Se ha podido establecer que el sitio de unión del sustrato Fru-1,6-P₂ (o sitio activo) se encuentra adyacente a las interfases C1-C2 y C3-C4. Por otra parte, el sitio de unión alostérico para el inhibidor AMP se encuentra ubicado en las interfases C1-C4 y C2-C3. Estudios de difracción de rayos-X de los cristales de la FBPassa de riñón de cerdo y sus complejos con sus diferentes ligandos, han demostrado la existencia de al menos dos diferentes estados conformacionales en esta enzima, denominados estados R y T. La transición del estado R a un estado T (Figura 2), se produce por una rotación de 17° del dímero superior (subunidades C1-C2) con respecto al dímero inferior (subunidades C3-C4), y de una rotación de 1,9° del dominio de unión del sustrato en relación al dominio de unión del AMP (Ke *et al.*, 1990). En el estado conformacional R, en el cual la enzima se encuentra activa, se han obtenido cristales de complejos de la enzima renal de cerdo y el producto Fru-6-P (Ke *et al.*, 1991b), Fru-2,6-P₂ (Liang *et al.*, 1992), Fru-1,6-P₂ y sus análogos (2,5-anhidro-D-glucitol-1,6-bisfosfato y 2,5-anhidro-D-manitol-1,6-bisfosfato), en presencia de iones metálicos bivalentes (Zhang *et al.*, 1993), y Fru-6-P/ Mg²⁺/ Pi (Choe *et al.*, 2000). Por otra parte, los cristales de complejos que se encuentran en el estado T, enzima inactiva, se han obtenido

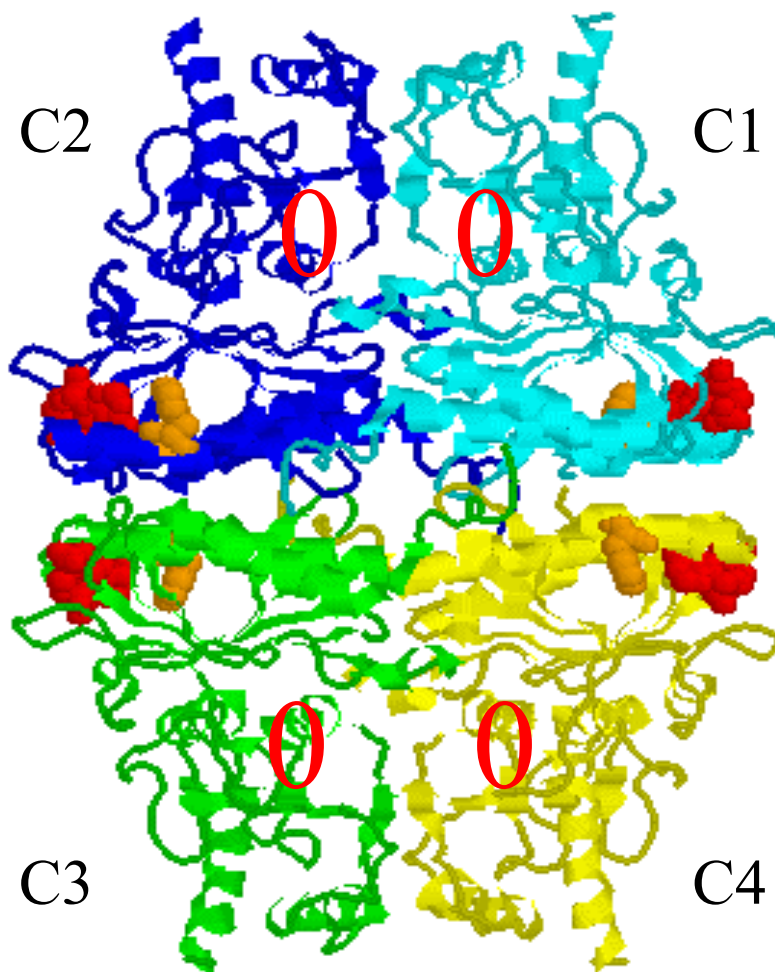


Figura 1.- Diagrama de cintas de la estructura cuaternaria del homotetrámero de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. En cada subunidad se representa el sitio de unión del AMP en modelo de esferas (rojo) y la posición relativa del sitio activo (0), además se muestra la posición de fenilalanina 16 (naranja). Tomado de Ke *et al.*, 1991a.

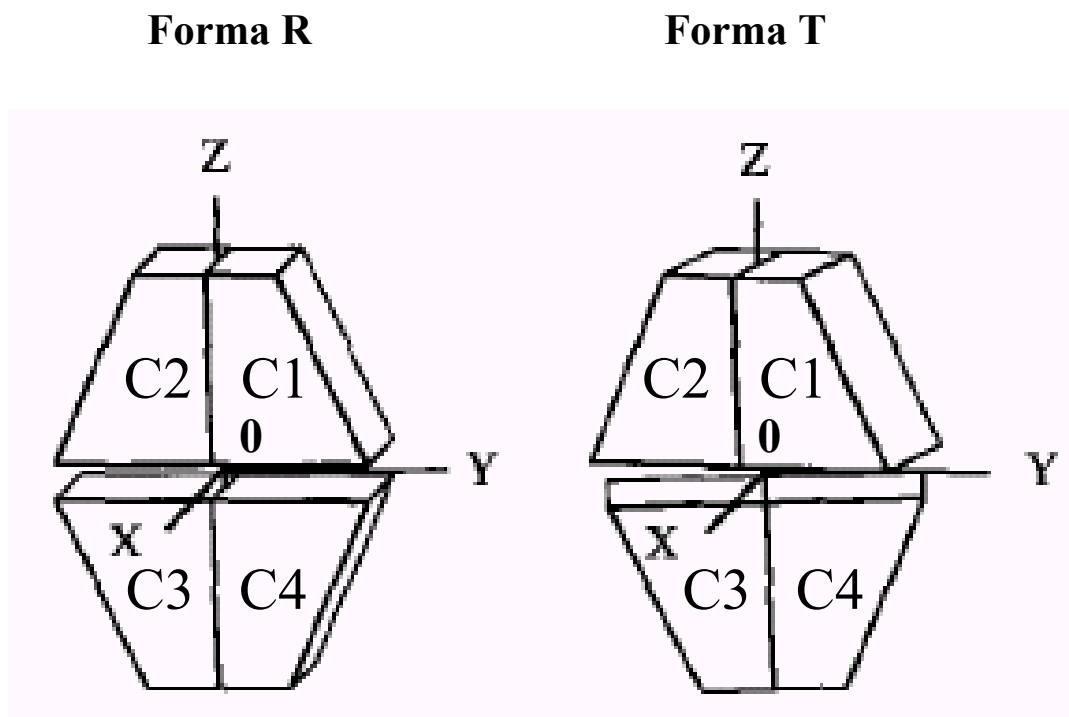


Figura 2. Representación esquemática de los estados conformacionales R y T de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Los ejes moleculares son representados por las letras X, Y, Z; (0), corresponde al centro de cada tetramero. Tomado de Liang *et al.*, 1993.

entre la FBPasa y Fru-6-P/AMP/Mg²⁺ (Ke *et al.*, 1990), AMP (Ke *et al.*, 1991a), Fru-2,6-P₂/Zn²⁺/AMP (Xue *et al.*, 1994), el sustrato análogo 2,5-anhidro-D-glucitol-1,6-bisfosfato con AMP, en presencia de iones metálicos bivalentes (Villeret *et al.*, 1995), Fru-6-P/ Mg²⁺/ AMP/ Pi y Fru-6-P/ Zn²⁺/ AMP/ Pi (Choe *et al.*, 2000). Para esta transición, se ha podido establecer un orden jerárquico, el cual comienza con la unión del AMP a su sitio alostérico dando inicio a: una expansión del sitio de unión del AMP; cambios conformacionales locales de las hélices H1 y H2; rotaciones y translaciones independientes de las hélices H1, H2 y H3 (y de los giros que las conectan); reorganización del dominio del AMP como un todo, su rotación de alrededor de 1,9° en relación con el dominio del sustrato; y cambios conformacionales en las interfaces C1-C2 y C1-C4, provocando un cambio conformacional cuaternario que lleva a una rotación de 17° entre los dímeros C1-C2 y C3-C4. La inhibición por el AMP se debe entonces al movimiento relativo entre los dominios del AMP y del sustrato, lo que resulta en una alteración del sitio activo, específicamente por una distorsión del sitio de unión del activador magnesio (Zhang *et al.*, 1994). Con respecto a la interacción cooperativa para la unión del inhibidor alostérico a la FBPasa, se postula que ésta ocurriría por transmisión, entre las distintas subunidades, del reordenamiento conformacional ejercido por la unión del AMP a la subunidad C1. De esta forma, la unión del AMP a esta subunidad provocaría una reorientación y un reposicionamiento de las estructuras secundarias (hélices H1, H2, H3), extremo amino terminal (residuos 9-12) y giros (loop 188-191) dentro de su dominio de unión (residuos 9-200 de la FBPasa), produciendo una alteración de las interacciones en las distintas interfases (C1-C2 y C1-C4), promoviendo así la transición del estado R al T, sin alterar mayormente el dominio de unión al sustrato (Zhang *et al.*, 1994).

Muchos estudios, a través de mutagénesis sitio dirigida, se han realizado con el objetivo de poder determinar la importancia relativa de cada uno de los residuos involucrados en la inhibición alostérica, y establecer las vías por las cuales se propaga la transmisión de la señal cooperativa entre las diferentes subunidades a través de las interface C1-C2 (Carcamo *et al.*, 2000) o interfase C1-C4 (Shyur *et al.*, 1996b; Lu *et al.*, 1996). Estudios recientes han podido relacionar al loop 52-72, una región de la enzima pobremente definida generalmente por difracción de rayos-X, como fundamental en la inhibición alostérica por AMP. En el estado R este loop se encuentra ubicado en forma enganchada (unida) al sitio de unión del sustrato en su propia subunidad participando directamente en la catálisis (Choe *et al.*, 1998). Así, se propuso un mecanismo para la regulación alostérica, en el cual la unión del AMP a su sitio alostérico desplaza el Loop 52-72 del sitio activo volviendo a la enzima inactiva (Choe *et al.*, 1998). Por estudios de fluorescencia a través de la introducción de un residuo de triptófano como una sonda fluorescente en el loop 52-72, se ha podido demostrar que éste se encuentra en forma dinámica alternando entre la forma enganchada, cuando la enzima se encuentra en un estado R, y la forma desenganchada del sitio activo cuando la enzima se encuentra en un estado T (Nelson *et al.*, 2000a). Mutaciones realizadas en residuos ubicados en los extremos del Loop 52-72, que actuarían como eje de rotación del Loop (bisagras), demuestran que estos residuos son esenciales en las propiedades funcionales de la FBPasa (Nelson *et al.*, 2000b). Nelson y colaboradores, por medio de deleciones y mutaciones puntuales en el extremo amino terminal de la FBPasa, específicamente de los 10 primeros residuos, pudo inferir el siguiente mecanismo para la regulación alostérica; las subunidades en los estados R y T, pueden adoptar diferentes conformaciones terciarias, de las cuales las transformaciones más significativos involucran cambios conformacionales en el Loop 52-72. En el estado T, el Loop 52-72 en la FBPasa, se

encontraría en una conformación desenganchada. El arreglo de subunidades en el estado T estabiliza la conformación desenganchada por interacciones, las cuales involucran los residuos 50-60 de la subunidad C1, con los residuos de la subunidad vecina C2; residuos 187-194 localizados en el giro T4 y parte inicial de la hebra B8, y residuos 9-11 ubicados al extremo amino terminal de la hélice H1. Es importante señalar que en el estudio descrito anteriormente, con respecto a la mutante Phe6Trp de la FBPasa, no se hace énfasis a una pérdida total de la cooperatividad con respecto al inhibidor alostérico AMP. Efecto que sí se observa en la mutante Phe6Trp de la FBPasa generada en nuestro laboratorio y descrita por Pinto, R.O. (1999).

2.4. Estudio de las propiedades de la FBPasa a través de sondas fluorescentes

La fluorescencia intrínseca de muchas proteínas es principalmente determinada por los residuos de triptófano presentes en su estructura primaria. Siendo el núcleo indol de estos residuos un fluoróforo particularmente sensible. Este grupo es altamente sensible a la polaridad del solvente, por lo que el espectro de emisión de los residuos triptófano puede reflejar la polaridad de su entorno en la proteína. La FBPasa de riñón de cerdo carece de residuos de triptófano en su estructura primaria (Marcus *et al.*, 1982; Williams & Kantrowitz, 1992). Así, la introducción de sondas fluorescentes como el triptófano en esta enzima permite sensar los cambios conformaciones que ocurren en la enzima activa (Weber *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 2000b).

Uno de los campos de mayor interés en la bioquímica es definir en detalle la relación entre estructura y función de las proteínas. Hoy en día se conocen las estructuras de muchas proteínas alostéricas gracias a la aplicación de una amplia variedad de herramientas. Estas han permitido la identificación de una gran cantidad de residuos de aminoácidos reactivos de gran

importancia estructural y funcional (Zhang *et al.*, 1994). Con el fin de aclarar la participación de cada uno de estos residuos, ellos pueden ser abordados por diferentes técnicas de laboratorio, una de las cuales es la mutagénesis sitio dirigida.

En nuestro laboratorio se ha clonado el fragmento codificante para la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo (Cárcamo *et al.*, 2000) en el vector de expresión pET15b. Este vector permite agregar una secuencia de residuos de histidina en el extremo amino terminal de cada subunidad de la FBPasa. Luego de expresar esta proteína de fusión en un sistema bacteriano, se logra en forma rápida y efectiva la purificación de la FBPasa mediante la utilización de una columna de afinidad de Sefarosa-Niquel.

En la FBPasa el residuo de fenilalanina en posición 16, se encuentra ubicado en la región amino terminal de la hélice H1. Como se ha mencionado anteriormente, la hélice H1 esta mayormente involucrada en la inhibición alostérica y en la transmisión de la señal cooperativa del AMP en la FBPasa. Esto se ve reflejado en las mutantes Arg22Lys y Arg22Met, donde se ha encontrado una gran disminución en la afinidad y la perdida total de la cooperatividad por el inhibidor alostérico AMP, respectivamente (Shyur *et al.*, 1996c). Sin embargo, una mutación realizada en un residuos próximo al residuo fenilalanina 16, específicamente el residuo arginina 15, no altera mayormente las propiedades cinéticas de la enzima FBPasa (Shyur *et al.*, 1996c). Por lo tanto, la introducción de una sonda fluorescente en la posición de fenilalanina 16, a través de mutagénesis sitio dirigida, no debiera provocar mayores alteraciones en la estructura de la FBPasa, permitiendo sensar cambios conformacionales producidos por sus diferentes ligandos, específicamente los ocasionados por el inhibidor alostérico AMP en esta hélice. El estudio de las propiedades cinéticas y fluorescentes de esta enzima mutante ayudara a comprender en mejor

forma los mecanismos de inhibición alostérica y de propagación de la señal cooperativa entre subunidades vecinas.

En base a los antecedentes expuestos se plantea la siguiente hipótesis: la sustitución del residuo de fenilalanina 16 por triptófano, ubicado en la hélice H1, permitirá sensor los cambios conformacionales producidos por la unión de AMP y la transmisión cooperativa entre la subunidad C1-C4 o C2-C3.

Objetivos generales:

- ⇒ Estudiar las propiedades cinéticas de la FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp de riñón de cerdo.
- ⇒ Estudiar las propiedades de emisión de fluorescencia de la mutante FBPasa Phe16Trp de riñón de cerdo

Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, proponemos como objetivos específicos de esta tesis:

- ❖ La obtención de la mutante Phe16Trp de la FBPasa de riñón de cerdo a través de mutagénesis sitio dirigida y su posterior purificación.
- ❖ La caracterización cinética de la mutante Phe16Trp frente a AMP y otros efectores.
- ❖ La caracterización de las propiedades fluorescentes de la mutante Phe16Trp frente a AMP y otros efectores.
- ❖ El estudio de unión de ligando a la enzima Phe16Trp utilizando las propiedades fluorescentes.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Reactivos

Agar, agarosa, ampicilina, tris[hidroximetil]aminometano (Tris-base), fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-P₂), fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂), nicotinamidadenina dinucleotido (NAD⁺), adenina monofosfato (AMP), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lauril dodecilsulfato de sodio (SDS), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), azul de bromofenol, isopropil-thio-β-D-galactosido (IPTG) y las enzimas auxiliares glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfoglucosa isomerasa fueron obtenidos de Sigma Chemical Co (USA). Los reactivos hidróxido de sodio, isopropanol, etanol, ácido acético, N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (Temed) y metanol fueron suministrados por Merck, Darmstadt, Alemania. De Invitrogen se obtuvo medio LB Broth base en polvo (Lennox L Broth base), agar en polvo, agarosa ultra pura, acrilamida, bisacrilamida (N,N'- metilenbisacrilamida) y bromuro de etidio. Las cepas de *E. coli* JM 109 y BL21 (DE3) fueron adquiridas desde Promega y Novagen, respectivamente. Endonucleasas de restricción *Bam HI*, *Nde I* y *Pst I* fueron obtenidas de Bio Labs y usadas de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Desde el proveedor Omega BIO-tek Inc se obtuvo el sistema de purificación de DNA plasmidial “E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit”. Marcadores de masa molecular de escala 1 kb y 100 kb de DNA, de proteínas y de preteñido de proteínas fueron adquiridos de W y Z. La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el sistema “Bio-Rad Protein Assay” de Bio-Rad. Otros reactivos fueron de grado analítico o su equivalente.

Los oligonucleótidos sintetizados por Invitrogen, requeridos como partidores para la mutagénesis sitio dirigida de FBPasa Phe16Thp, fueron los siguientes 5'-CGTCACCCTAACCCGCTGGGTCATGGAGGAGGGCAG-3' y 5'-CTGCCCTCCTCCATGACCCAGCGGGT TAGGGTGACG-3'.

3.1.2. Equipos

Balanza analítica Shimadzu (Libror AEX-120 G), espectrofotómetro Shimadzu (UV-150-02), espectrofotómetro Hewlett Packard (8453), espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50B, pHmetro Radiometer Copenhagen (PHM 83 autocal pH meter), estufa 37°C Bluem (dry type bacteriological incubator), balanza Shimadzu (Libror EB-3200 S), termociclador MJ Research (Mini Cycler), centrífuga Fisher Scientific (Micro V), micropipetas Gilson, horno microondas Somela (E 70 TF-7), fuente de poder Life Technologies (model 500), agitador termorregulado lab-line instruments (Lab-Line Orbit Environ-Shaker), centrífuga Eppendorf (5417 R), centrifuga Sorvall (RC 5C), baño termorregulado Kottermann y vortex Fisher (Genie2).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Elaboración de medios de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar

El medio de cultivo líquido se preparó utilizando una concentración de 20 g/l de medio LB y luego fue inmediatamente autoclavado.

El medio de cultivo LB-agar se preparó mezclando 32 g/l de medio LB-agar. Una vez autoclavado, se dejó enfriar la mezcla hasta disminuir la temperatura a menos de 50 °C y se

agregó el antibiótico Ampicilina a una concentración final de 125 µg/ml, se agitó y luego se procedió a adicionar aproximadamente 15 ml de esta solución en placas Petri estériles.

3.2.2. Transformación de bacterias *E.coli* cepa JM 109 y BL21(DE3)

Utilizando bacterias *E. Coli*. Cepa JM 109 o BL21(DE3) competentes a través del método de CaCl₂ y congeladas a -70 °C, se procedió a descongelar 100 µl en hielo, posteriormente a las bacterias se le agregó 1,0 µl del DNA plasmidial de interés, se mezcló suavemente y se dejó reposar por 45 min en hielo. Luego se incubó las muestras a 42° C por 90 s, y su contenido se aplicó a un tubo Falcon de 15 ml estéril conteniendo 0.5 ml de medio LB líquido, el cual se incubó a 37° C por 1 h con una agitación constante de 250 r.p.m. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se sembraron dos placas Petri LB-agar con Ampicilina (125µg/ml). La primera placa se sembró con 100 µl del cultivo y la segunda con 100 µl, después de centrifugar los restantes 400 µl del cultivo por 3 min a 3500 r.p.m y su resuspensión en 100 µl de medio LB. Finalmente, se incubaron las placas en estufa a 37° C por 12 h obteniéndose una gran cantidad de colonias aisladas.

3.2.3. Purificación de DNA plasmidial por un Kit comercial

Se utilizó el kit comercial miniprep Omega Bio-tek. Este kit básicamente utiliza el método de lisis alcalina. Con una colonia de *E. Coli* transformada con el DNA plasmidial de interés, obtenida desde placa de cultivo LB-agar, se inoculó 5 ml de medio LB conteniendo ampicilina a una concentración de 125 µg/ml. Luego se incubó a 37° C por 12 h con agitación constante de 250 r.p.m. Finalizada la incubación se centrifugó a temperatura ambiente por 10 min a 10.000 r.p.m. y el sedimento celular fue resuspendido con 250 µl de la solución I de homogeneización

del kit. Posteriormente, se agregaron 250 μ l de la solución II de lisis y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se agregaron 350 μ l de la solución III de neutralización, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a temperatura ambiente por 10 min a 10.000 r.p.m. El sobrenadante fue cargado en una columna del kit para la purificación del DNA plasmidial, se centrifugó a temperatura ambiente por 1 min a 10.000 r.p.m. y el eluato fue eliminado. La columna se lavó 2 veces con 500 μ l de solución de lavado, centrifugando después de cada lavado en forma similar a la anterior. Finalmente, se eluyó el DNA adicionando 50 μ l de tampón TE calentado previamente a 65 °C y centrifugando la columna a temperatura ambiente por 2 min a 10.000 r.p.m.

3.2.4. Análisis electroforético de DNA en geles de agarosa

El gel fue preparado a una concentración de 1,0% fundiendo 0,40 g de agarosa en 40 ml de tampón TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM) y se dejó enfriar hasta 60 °C a temperatura ambiente, para luego ser vertido sobre un molde (8,5 x 6,5 cm) para su gelificación. Las muestras de DNA se prepararon mezclando 10 μ l del DNA, 1 μ l de tampón de carga para DNA 10X (glicerol 50%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,5% en tampón TE) y 1 μ l de bromuro de etidio (0,5 g/ml), se mezcló por pipeteo y se cargó con micro pipeta cada muestra en un pocillo del gel. Luego, se realizó la corrida electroforética aplicando 5 V/cm por 30 min y la migración del DNA se observó en un transluminador con luz ultra-violeta por fluorescencia del bromuro de etidio unido al DNA.

3.2.5. Cuantificación de DNA plasmidial

La cuantificación de las soluciones de DNA plasmidial se realizó mediante un procedimiento espectrofotométrico, en el cual la muestra de DNA fue diluida 10 - 100 veces y la concentración aproximada de estas muestras se determinó utilizando un valor de absorbancia a 260 nm de 1,0 para una concentración de 50 µg/ml de DNA doble hebra. La concentración final de las soluciones se obtuvieron al multiplicar el resultado anterior por la dilución de la muestra.

3.2.6. Mutagénesis sitio dirigida

Este procedimiento se realizó según las indicaciones establecidas en el QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis System de Stratagene. Utilizando los partidores descritos en Materiales y Métodos. El procedimiento de mutagénesis sitio dirigida consiste de las siguientes etapas: Reacción de mutagénesis, digestión con enzima de restricción y transformación de células supercompetentes XL1-Blue.

Reacción de mutagénesis. En nuestro laboratorio se dispone del fragmento codificante para la FBPassa en el vector de expresión pET15b, el cual se utilizó como templado con los oligonucleótidos mutagénicos, los cuales contienen el cambio de bases necesario para realizar la mutación. Para la reacción se mezclaron 2 µl del vector recombinante pET15b-FBPasa (50 ng) más 3 µl de cada partidore mutagénico a una concentración de 100 pmoles/µl, 1 µl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfatado (suministrados por el kit) y 5 µl de tampón de reacción (KCl 100mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, Tris-HCl 200 mM (pH 8.8), MgSO₄ 20 mM, Triton-X-100 1%) en un volumen final de 49 µl. Posteriormente, se adicionó 1 µl de la enzima *PfuTurbo DNA polimerasa* (2.5 U/µl) y la superficie de la mezcla se recubrió con 30 µl de aceite mineral. Para finalizar se utilizó el siguiente programa en el termociclador: denaturación a 95° C por 30 s; 15

ciclos de incubación a 95° C por 30 s; 55° C por 1 min 10 s; 68° C por 12 min, y una etapa de extensión final a 68° C por 10 min. Luego se dejó reposar en hielo por 2 min para disminuir la temperatura a 37 °C.

Digestión con la enzima *Dpn I*. Se añadió 1 µl de la enzima de restricción *Dpn I* (10 U/ µl) directamente a la reacción de amplificación bajo el aceite mineral. Luego suavemente y hacia el fondo de la mezcla se succionó varias veces, se centrifugó brevemente para, posteriormente, incubar la mezcla de reacción a 37° C por 1 h, con el objetivo de digerir el DNA doble hebra parental (no mutado).

Transformación de células supercompetentes *XLI-Blue*. Se procedió a descongelar suavemente en hielo 50 µl de células supercompetentes *XLI-Blue*, luego se transfirió 2 µl del DNA tratado con *Dpn I*, se mezcló suavemente y se dejó reposando en hielo por 30 min. Posteriormente, se incubó las muestras a 42° C por 45 s y su contenido se cargó a un tubo Falcon de 15 ml estéril conteniendo 0,5 ml de medio LB precalentado a 42° C, el cual se incubó a 37° C por 1 h con una agitación constante de 225 r.p.m. Una vez terminado el tiempo de incubación se centrifugó por 2 min a 5000 r.p.m, se retiró 400 µl del sobrenadante y con los restantes 100 µl se resuspendió el sedimento celular, el cual se sembró en placa Petrí LB-agar con ampicilina (125µg/ml). Finalmente, se incubaron las placas en estufa a 37° C por 16 h obteniéndose una gran cantidad de colonias aisladas.

3.2.7. Digestión con endonucleasas de restricción

Para verificar que el plasmidio contiene el fragmento codificante de la FBPasa, se realizó un estudio de restricción del DNA mutante purificado. Para ello los análisis se realizaron utilizando 2 µg de DNA plasmidial (alrededor de 10 µl de volumen), a los cuales se añadió 0,5 µl

de enzima de restricción y 1,2 μ l de tampón apropiado para cada enzima. Luego, ésta solución se incubó a 37° C por 2 h. En el caso de digestión doble, se agregó la misma cantidad de enzima indicada anteriormente, en 20 μ l totales de reacción, pero se escogió un tampón en que la actividad de ambas enzimas fuera óptima. Las enzimas de restricción utilizadas fueron; Bam HI, NdeI y PstI. Los resultados de las digestiones fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un transluminador con lámpara U.V.

3.2.8. Expresión y purificación de la enzima FBPasa Phe16Trp

Para la expresión y purificación de la FBPasa, se siguió el protocolo establecido en pET 15b System de Promega, con algunas modificaciones. Básicamente el proceso se dividió en las siguientes etapas: Pre-cultivo de células BL21 (DE3), cultivo de células BL21 (DE3), expresión de enzima, lisis bacteriana, cromatografía de afinidad en columna His-binding resin (Sefarosaniquel) y diálisis.

Pre-cultivo de células BL21 DE3. Se tomó con asa de platino una colonia de bacterias *E.Coli* cepa BL21 (DE3) transformadas con el vector de expresión recombinante pET15b-FBPasaPhe16Trp y se inoculó 50 ml de medio LB conteniendo ampicilina (125 μ g/ml). Luego, se incubó a 37° C, por 8-12 h, con agitación constante a 250 r.p.m.

Cultivo de células BL21 DE3. Cumplido el tiempo el pre-cultivo se centrifugó a 4° C, por 10 min, a 3.500 r.p.m, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en 42 ml de medio LB fresco. Posteriormente, se inoculó con 7 ml de esta suspensión bacteriana seis matraces que contenían 700 ml de medio LB y ampicilina (125 μ g/ml). Estos fueron incubados a

37° C con agitación constante de 250 r.p.m, hasta alcanzar una densidad optica a 600 nm en el rango de 0,6 a 0,8, en aproximadamente 3,5 h.

Expresión de FBPasa Phe16Trp. Finalizada la incubación de los matraces, estos fueron retirados del agitador y puestos en hielo, para disminuir la temperatura a 20° C. Luego, para comenzar la expresión de la proteína se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0,4 mM y se incubó a 30° C, por 4 h, con una agitación constante de 250 r.p.m..

Lisis bacteriana. Las bacterias inducidas fueron colectadas por centrifugación en un rotor SLA-3000 a 4° C, por 7 min, a 7.000 r.p.m. El sedimento celular fue resuspendido en 380 ml de tampón de unión (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) el cual además contenía lizosima a una concentración de 1mg/ml y entre 20-30 µg de PMSF. La lisis celular se realizó a temperatura ambiente con agitación constante. Esta suspensión fue sonicada por 5 ciclos de 1 min con pulsos de 1 seg y con una intensidad de 60% en un Ultrasonic Homogeneizer modelo 4710 de COLE & PALMER. Finalmente, el pos-sonicado se sometió a centrifugación utilizando un rotor GSA a 4° C por 45 min, a 10.000 r.p.m.

Cromatografía de afinidad en columna Sefarosa-niquel. La purificación de la enzima fue realizada mediante una cromatografía de afinidad en columna Sefarosa-niquel. El sobrenadante obtenido en el paso anterior fue aplicado a la columna de afinidad la cual contenía 10-12 ml de resina. Esta columna fue previamente equilibrada en tampón de unión a 4° C. Posteriormente, la columna fue lavada con 5 volúmenes de solución tampón de unión y con 60 ml de la solución tampón de lavado (tampón de unión más imidazol 60 mM). Finalmente, la enzima se eluyó con 25 ml de solución tampón de elución (tampón de unión conteniendo imidazol 200 mM y Fru-1,6-P₂ 200 µM) y el eluato fue diluido en 10 ml de solución tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5; EDTA 0,1mM y Fru-1,6-P₂ 100 µM.

Diálisis. La enzima fue dializada realizando 3 cambios cada uno con 2 l de tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM en una bolsa de diálisis (Dialyzer tubing) de tamaño de poro de 4,8 Å, para eliminar las sales. Finalmente, la enzima fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 0,2 ml, 1 ml y 15 ml. De cada una de las etapas de la purificación se guardaron alícuotas representativas de cada fracción para ser analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes.

3.2.9. Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el sistema Bio-Rad Protein assay de Bio-Rad, el cual se basa en la determinación de proteínas por la unión del colorante azul de Coomasie G-250 (Bradford, 1976). El reactivo colorante fue diluido 5 veces en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, y se mezclaron 500 μl de la muestra de proteína diluida 500 veces con 125 μl del reactivo colorante, obteniéndose un volumen final de 625 μl . La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150. La curva de calibración se realizó con una muestra de la enzima FBPassa nativa, cuya concentración se determinó considerando que 1 mg/ml de proteína pura muestra una absorbancia a 280 nm de 0.755, con 1 cm de camino óptico (Hubert et al., 1986). Finalmente, la concentración de las muestras se calculó por interpolación de la absorbancia obtenida en la curva de calibración.

3.2.10. Análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

La electroforesis se realizó utilizando el sistema de Bio-Rad “Mini protean II”: El gel separador contenía poliacrilamida con un porcentaje de entrecruzamiento de un 2,6 %, en

amortiguador Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS 0,4% y se polimerizó adicionando persulfato de amonio 0,01% y TEMED 0,2% como agentes catalizadores redox. El gel concentrador contenía poliacrilamida al 5,5 %, con el mismo grado de entrecruzamiento que el gel separador, en amortiguador Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, con SDS 0,04% y se polimerizó en las mismas condiciones anteriores.

El amortiguador de electroforesis contenía Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%. En el gel se aplicó una corriente de 4 mA por cm de gel (7 cm) por 2 h. Posteriormente, los geles fueron fijados en una solución que contenía metanol 30% y ácido acético 10%, con agitación suave. Para visualizar la migración de las proteínas en el gel se colorearon con una solución de azul de Coomassie R 0,3% en metanol 50% y ácido acético 10%, durante 30 min. Posteriormente, para observar las bandas, el gel fue desteñido con una solución de metanol 10%, etanol 20% y ácido acético 10%, por 30min.

3.2.11. Ensayo espectrofotométrico de determinación de actividad enzimática

Para determinar la actividad de la FBPasa se utilizó un ensayo espectrofotométrico acoplado a las enzimas auxiliares fosfoglucoisomerasa (PGI) y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6Pdh). El medio de reacción (0,5ml) contenía tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, MgSO₄ 5 mM, Fru-1,6-P₂ 30 μM, 0,3 mM NAD⁺ y 1,0 U de cada una de las enzimas auxiliares. Los resultados de absorbancia, obtenidos en velocidad inicial, fueron registrados midiendo el aumento en el tiempo de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Los datos recolectados, utilizando un espectrofotómetro modelo Hawlett Packard 8453 acoplado a un computador, fueron analizados por medio del programa UV-visible CHEM STATION.

En todos los ensayos la enzima fue añadida al final, después de una incubación por 10 min a 30°C de cada medio de reacción. Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μmol de NAD^+ por minuto a 30°C.

3.2.12. Determinación del espectro de fluorescencia de la FBPasa Phe16Trp

Se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 conectado a un computador para obtener los datos de fluorescencia. La concentración de enzima utilizada fue de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ preparada en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM. El espectro de emisión se obtuvo al excitar específicamente los residuos de triptófano a una longitud de onda de 295nm, con ranuras de excitación y de emisión de 9 nm, y utilizando una cubeta de camino óptico de 1 cm, con agitación constante y a una temperatura de 15° C.

3.2.13. Titulación de la FBPasa Phe16Trp con diferentes ligandos

Los ensayos de titulación de la FBPasa Phe16Trp con diferentes ligandos se realizaron en condiciones similares a las descritas en la determinación del espectro de emisión. Las titulaciones se realizaron adicionando pequeños volúmenes de la solución de ligando y obteniendo el espectro de emisión después de cada adición. La intensidad de emisión se cuantificó integrando el área bajo la banda de emisión entre 310 nm y 390 nm. Los valores obtenidos se corrigieron, restando la emisión del tampón y considerando el efecto de dilución de la muestra.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de la mutante Phe16Trp de la fructosa-1,6-bisfosfatasa

Para realizar la reacción de mutagénesis se utilizó como templado el vector de expresión pET15b en el cual se encuentra clonado el fragmento codificante para la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo (Cárcamo *et al.*, 2000). Se ocuparon los partidores mutagénicos descritos en Materiales y Métodos, y el sistema QuikChange™ Site-Directed mutagénesis kit para obtener la mutante. Este sistema de mutagénesis sitio dirigida tiene la particularidad de producir mutaciones en la mayoría de los DNA doble hebra, disminuyendo las dificultades técnicas o laboriosas que se producen con otros métodos, como es la obtención de DNA simple hebra para la reacción de mutagénesis. De esta manera, el DNA templado doble hebra con el inserto de interés, se hizo reaccionar con los dos partidores oligonucleótidos sintéticos que contienen el cambio de base para realizar la mutación deseada, cada uno de ellos complementario a la región de interés sobre hebras opuestas del vector. La extensión y amplificación del DNA se realizó por el método de la reacción en cadena de la polimerasa durante un ciclo de PCR por la enzima *PfuTurbo DNA polimerasa*. La endonucleasa de restricción *Dpn I* se utilizó para eliminar el DNA templado parental no metilado, que no ha sufrido mutación, y así seleccionar el DNA sintetizado. Finalmente, con el objeto de amplificar en gran cantidad el plasmidio, se transformaron las bacterias *E.Coli supercompetentes XLI-Blue* con el vector pET15b-mutante, obteniéndose una gran cantidad de colonias aisladas. De las colonias obtenidas se procedió a purificar DNA plasmidial, a través del kit comercial miniprep Omega Bio-tek, el cual fue utilizado para transformar bacterias *E.Coli JM 109*. En ambas transformaciones las bacterias obtenidas fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico ampicilina, 125µg/ml en placas de

cultivo en medio LB-agar.

Para verificar la integridad del DNA plasmidial obtenido de la reacción de mutagénesis, se digirió con las enzimas de restricción *Bam HI*, *NdeI* y *PstI*. En la figura 3, se muestra un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, cuya corrida electroforética presenta la migración de los fragmentos resultante del análisis de restricción. La digestión con las enzimas *Bam HI* o *NdeI* provoca la linearización del plasmidio (carriles 2 y 3), y al utilizar una mezcla de ambas enzimas se producen dos fragmentos (carril 4), uno correspondiente al vector pET15B y un segundo fragmento de 1 Kb que corresponde a la liberación del segmento de DNA que codifica para la FBPasa. Finalmente, en la digestión con *Pst I* se genera una banda de alto peso molecular (carril 5), debido a la presencia de dos sitios de corte, uno de ellos ubicado en la secuencia codificante para la FBPasa y el otro en la posición 4958 del vector de expresión. El análisis de los resultados demuestra que el vector esta integro y contiene el inserto que codifica para la FBPasa.

Para comprobar que el fragmento codificante para la FBPasa contiene la secuencia necesaria para producir la mutación, se realizó una secuenciación completa del vector *pET 15b* que porta el fragmento. La secuenciación se realizó en *Invitrogen* por el método de secuenciación *Didesoxi* de Sanger, y los resultados obtenidos confirman el cambio de base esperado. En lugar del triplete TTC que codifica para fenilalanina en la enzima silvestre, se encontró el triplete TGG que codifica para triptófano en la enzima mutante Phe16Trp.

4.2. Expresión y purificación de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp

Terminada la etapa de mutagénesis sitio dirigida y la confirmación de la mutación realizada, se procedió a la sobreexpresión de la enzima en la cepa *E.coli BL21 (DE3)*. La introducción de una cola de seis residuos de histidina en el extremo amino terminal de la FBPasa

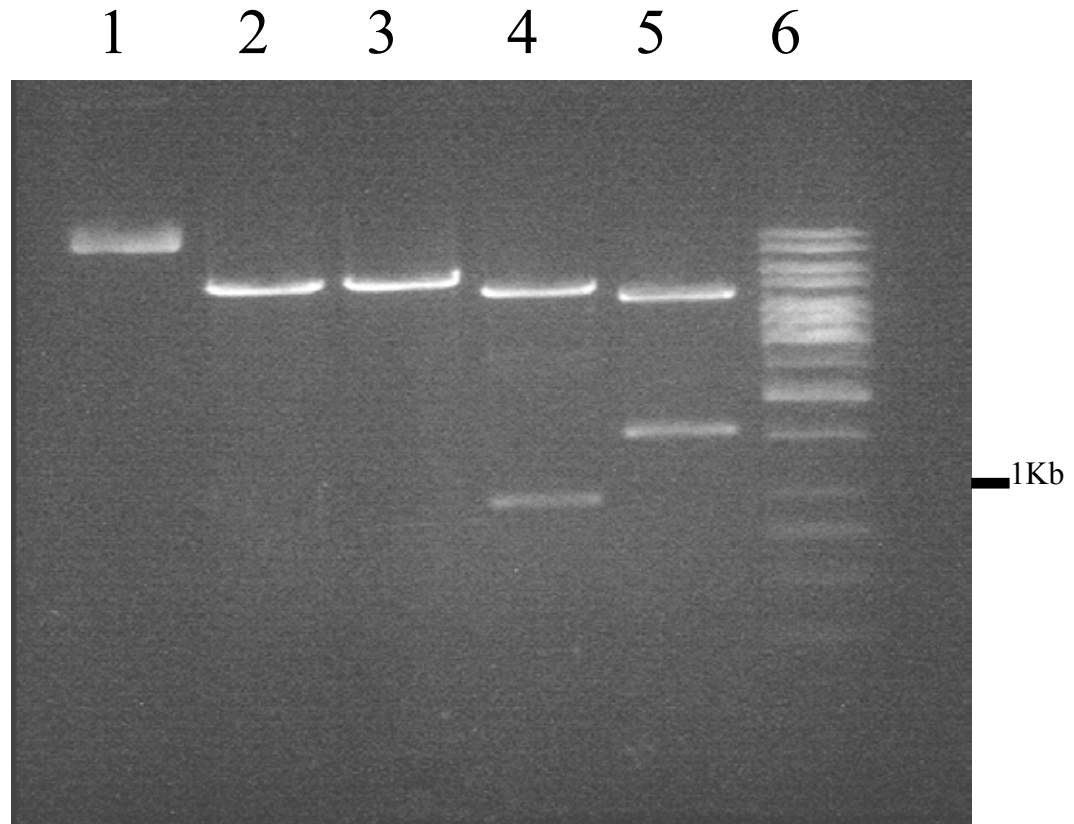


Figura 4.- Análisis de restricción del Vector de expresión *pET 15b*, que contiene el fragmento codificante, proveniente de la reacción de mutagénesis. Se observa un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Las digestiones se realizaron por 2 horas a 37°C. Carril 1, se aprecia el DNA sin digestión; carril 2, se observa el DNA sometido a digestión con *Bam HI*; carril 3, corresponde al DNA digerido con *Nde I*; carril 4, DNA sometido a digestión con ambas enzimas, *Bam HI* y *Nde I*, en el cual se observa la liberación del fragmento codificante de la FBPasa, previamente clonado entre los sitios de escisión para estas enzimas; Carril 5, digestión del DNA con *Pst I*, la cual genera un fragmento de alrededor de 1,5 Kb, producto del corte del sitio existente al interior de la enzima FBPasa y un sitio ubicado en la posición 4240 del vector de expresión; carril 6, estándares de peso molecular.

mutante, facilita su purificación pues se puede usar cromatografía de afinidad. Para este efecto se utilizó una columna de sefarosa-níquel, porque se forma un complejo de coordinación entre el níquel unido a la resina y la cadena lateral de histidina.

El proceso de expresión de la enzima FBPasa mutante Phe16Trp, implicó la inducción de un cultivo de *E.coli* BL21 (DE3), transformadas con el vector pET15b-FBPasa Phe16Trp, con el inductor IPTG a una concentración final de 0,4mM. Las bacterias fueron lisadas con lizosima a una concentración de 1 mg/ml, sonicadas, y posteriormente, el sobrenadante se cargó en una columna de cromatografía de afinidad sefarosa-níquel. La proteína retenida fue eluida en forma específica con imidazol y dializada extensivamente (Ver Materiales y Métodos). En la figura 4 se muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, en condiciones denaturantes, con tinción de Azul de Coomassie para teñir las proteínas y revelar las bandas. En el gel se muestran todas las etapas de purificación: en los carriles 2, 3 y 4, se muestra el resultado del tratamiento con lizosima 1 mg/ml, sonicación y el sobrenadante de la sedimentación de los restos celulares por centrifugación, respectivamente. Se aprecia en estos carriles una banda de aproximadamente 36,5kDa, al comparar con el estándar de FBPasa de Riñón de cerdo, la cual corresponde a la FBPasa mutante sobreexpresada. Los carriles 5 y 6 muestran las proteínas presentes en el frente de elución y el lavado de la columna con la solución tampón de unión, y en ellos no se observa la banda correspondiente a la FBPasa, lo que indica que la enzima se unió a la resina. El carril 7, muestra el lavado de la columna con tampón de unión conteniendo 60 mM de imidazol. En los carriles 8 y 9, se muestran las fracciones correspondientes a la elución con imidazol 200 mM, Fru-1,6-P₂ 100μM, y la posterior diálisis frente a tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1mM. Finalmente, en el carril 1 se muestra el estándar de FBPasa de riñón de cerdo.

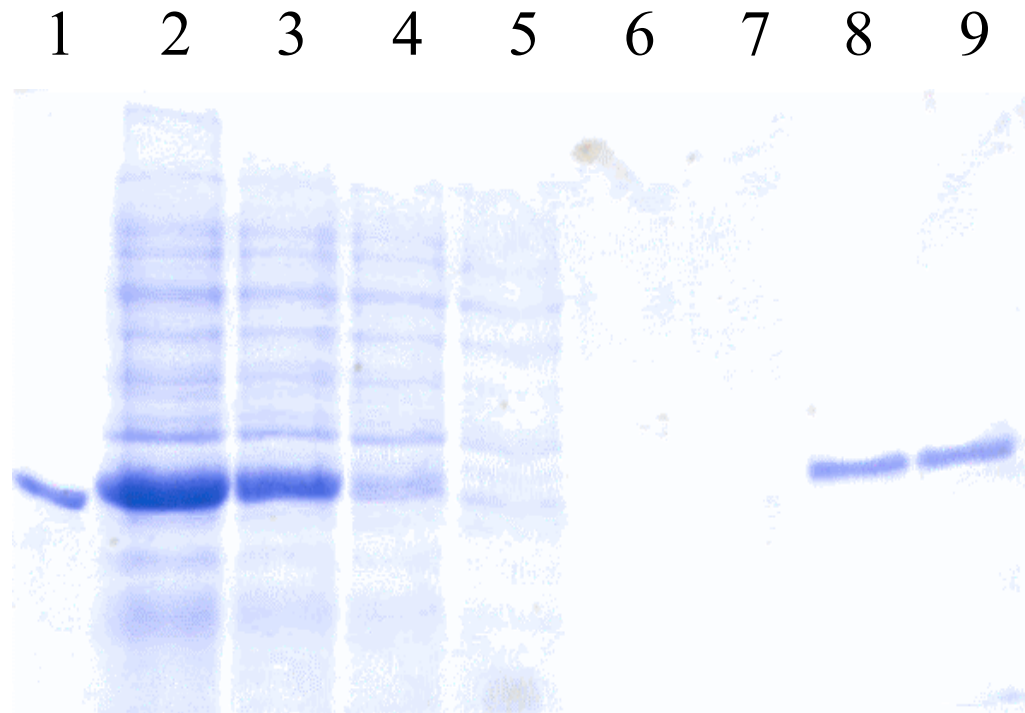


Figura 5.- Análisis electroforético por SDS-PAGE de las muestras de las distintas etapas de la purificación de la FBPasa-Phe16Trp. En un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturantes y teñido con Azul de Coomassie se muestra el patrón de proteínas que se observan en las diferentes etapas de la purificación de la mutante FBPasa-Phe16Trp expresada en *E.coli* BL 21 (DE3): carril 2, inducción del cultivo con IPTG; carril 3, lisis con lizosima 1 mg/ml; carril 4, sobrenadante de la centrifugación; carril 5, frente elución de la columna de unión Sefarosa-níquel; carril 6, lavado de la columna con tampón de unión; carril 7, lavado de la columna con tampon de unión conteniendo 60 mM de imidazol; carril 8, elución de la enzima con 200 mM de imidazol; carril 9, post-diálisis contra Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1mM; carril 1, estándar de FBPasa de riñón de cerdo.

En los carriles 8 y 9 se aprecia una única banda correspondiente a la enzima purificada.

Estos resultados demuestran que se logró sobreexpresar y purificar la FBPasa mutante en forma pura en más de un 96%. El método permite obtener una preparación homogénea, es rápido pues utiliza un solo paso cromatográfico y es eficiente, de acuerdo al rendimiento obtenido de un 89,6%. La enzima FBPasa silvestre se purificó de manera similar a la enzima FBPasa Phe16Trp, obteniéndose resultados similares en pureza y rendimiento. Tanto la enzima silvestre como la mutante muestran una razón de actividades a pH 7,5/pH 9,6 mayores a 1.9 (dato no mostrado), lo cual sugiere que la enzima no ha sido afectada por proteasas durante su purificación. En la tabla I, se muestra el rendimiento porcentual de purificación y la actividad específica obtenida para la FBPasa mutante.

4.3. Sensibilidad térmica de las FBPasas silvestre y mutante

Se evaluó la termoestabilidad de las FBPasas silvestre y mutante para sentir el efecto de la mutación en la estabilidad de la enzima. El 50% de la actividad residual se obtuvo a 69 °C y 60°C, para la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp, respectivamente (figura 5). Se puede apreciar que el cambio de fenilalanina por triptófano en la mutante redujo esta temperatura en 9 °C, lo que indica que la introducción de este residuo altera levemente la estructura de la FBPasa.

4.4. Propiedades cinéticas de las FBPasas silvestre y mutante

Para evaluar los efectos de la mutación Phe16Trp en la FBPasa se realizaron estudios cinéticos en velocidad inicial con las formas silvestre y mutante de la enzima. Los parámetros cinéticos obtenidos se resumen en la tabla II.

Tabla I.***Purificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa mutante Phe16Trp.***

Fracción	Volumen	Actividad	Proteína	Actividad Especifica	Rendimiento
	ml	U totales	mg/ml	U/mg	%
Sobrenadante del extracto	320	240	3,10	0,24	100
His-bind resin: imidazol 200mM, FBP 100µM.	30	235	0,54	14,5	97,8
Post-Diálisis.	35	215	0,46	13,4	89,6

Se utilizaron 4,2 litros de cultivo. La actividad específica fue determinada utilizando un ensayo espectrofotométrico acoplado a las enzimas auxiliares fosfoglucoisomerasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El medio de reacción (0,5ml) contenía tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, MgSO₄ 5 mM, Fru-1,6-P₂ 30 µM, 0,3mM NAD⁺ y 1,0 U de cada una de las enzimas auxiliares. En todos los ensayos la enzima fue añadida al final, después de una incubación por 10 min a 30°C de cada medio de reacción. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford. Para detalles experimentales ver Materiales y Métodos.

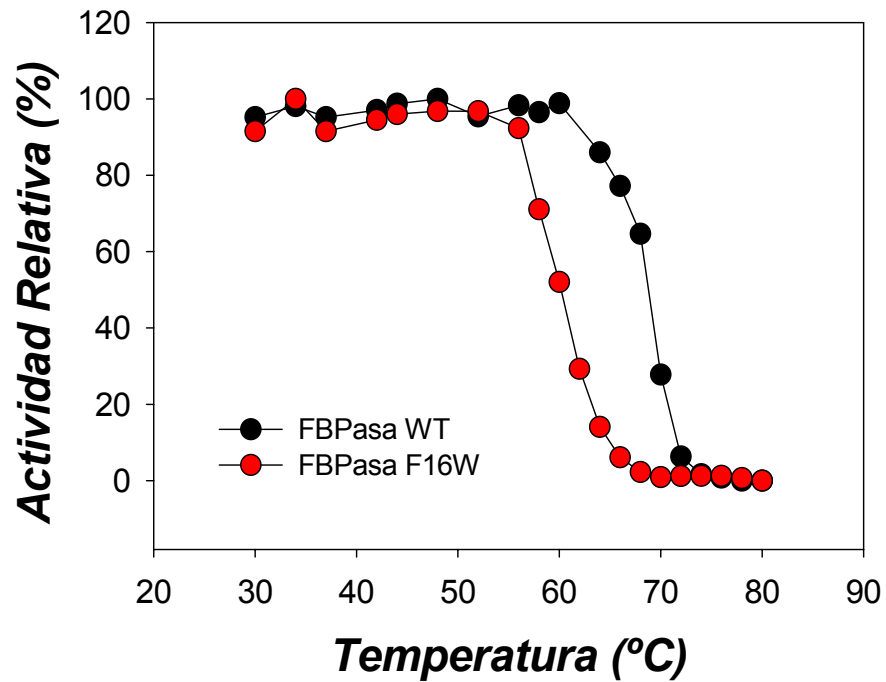


Figura 6.- Sensibilidad a la temperatura de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. Las enzimas fueron incubadas por 10 minutos a las temperaturas indicadas en el gráfico, utilizando tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM. La actividad enzimática se determinó inmediatamente después de la incubación y fue expresada como un porcentaje de la actividad medida a 30°C.

Tabla II

Parámetros cinéticos de la enzima FBPasa silvestre y mutante

Enzima	Actividad específica	Km	I ₅₀ ^b	I ₅₀ ^b	n _H	K _{0.5} ^c	n _H
		Fru-1,6-P ₂	Fru-2,6-P ₂	AMP	AMP	Mg ²⁺	Mg ²⁺
	U / mg	μ M	μ M	μ M		m M	
His-FBPasa	18.2	10.1	0.51	6.94	2.00	1.16	2.05
Phe16Trp^a	13.7	5.95	0.69	6.71	1.01	1.74	1.42

^aPhe16Trp, corresponde a la His-FBPasa Phe16Trp.

^bConcentración del inhibidor necesaria para disminuir la actividad de la enzima en un 50%.

^cConcentración de Mg²⁺ necesaria para activar a la enzima a la mitad de la actividad máxima.

Curvas de saturación por sustrato. Tanto para la enzima FBPasa silvestre y mutante, las curvas de saturación se determinaron entre 2 y 600 μM de Fru-1,6-P₂. Las curvas de saturación por sustrato presentaron una forma hiperbólica a bajas concentraciones de sustrato, con inhibición parcial a altas concentraciones de sustrato (Figura 6). La constante de Michaelis-Menten (K_m) se determinó por medio de una representación de Lineweaver-Burk de los datos de actividad, en el rango de concentraciones de sustrato no inhibitorias. Para la representación de los datos obtenidos, estos fueron ajustados a una forma modificada de la ecuación de Michaelis-Menten, a la cual se le incorpora un termino que da cuenta de la inhibición por exceso de sustrato (Segel, 1975).

$$V = \frac{V_{\max} [S] \left(1 + \frac{\beta [S]}{K_{ss}} \right)}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{ss}}}$$

Donde β , corresponde a la fracción de la actividad residual que se alcanza a una concentración infinita de sustrato y K_{ss} es la constante de disociación del sustrato al sitio de inhibición. La FBPasa silvestre, presentó un K_m de 10,1 μM mientras que para la enzima mutante Phe16Trp se obtuvo un K_m de 6,0 μM . Los valores obtenidos indican que la mutante Phe16Trp tiene una afinidad un poco mayor por el sustrato, que la enzima silvestre. Además, ambas enzimas son inhibidas por altas concentraciones de sustrato.

Curvas de saturación por el cofactor magnesio. La FBPasa requiere de metales bivalentes, como Mg^{2+} o Mn^{2+} , para su actividad catalítica. La dependencia de la actividad con respecto a la concentración de Mg^{2+} es cooperativa, con un coeficiente de Hill (n_H)

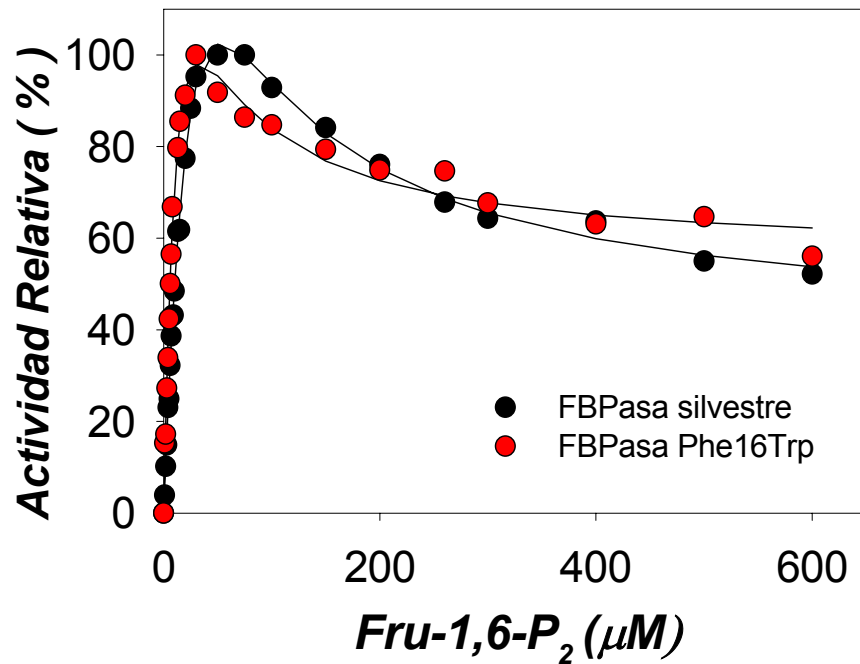


Figura 7.- Curva de saturación por sustrato de la enzima FBPasa silvestre y Mutante **Phe16Trp**. La actividad enzimática se obtuvo a concentraciones crecientes del sustrato Fru-1,6-P₂. La determinación se realizó a través de un ensayo espectrofotométrico acoplado midiendo la reducción del NAD⁺ a 340 nm. La cantidad de enzima utilizada en el ensayo fue de 0.4 μg. Las curvas fueron ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten, modificada para incluir el efecto de inhibición parcial por altas concentraciones de sustrato. Ver detalles en Materiales y métodos.

cercano a 2 (Nimmo y Tipton, 1975; Tashima y Yoshimura, 1975). En este estudio, el coeficiente de Hill y la $K_{0,5}$ de la FBPasa silvestre y la mutante fueron determinadas a una concentración fija de 30 μM sustrato. La FBPasa silvestre presentó un valor para la constante de activación igual a 1,2 mM. Para la enzima mutante Phe16Trp se obtuvo un valor de 1.7 mM, que indica una disminución de la afinidad por el activador por parte de la enzima mutante. En la figura 7, se representan las curvas de saturación para el activador, obtenidas para la enzima silvestre y mutante.

Efecto del inhibidor Fru-2,6-P₂ sobre la FBPasa silvestre y mutante. El análogo del sustrato, Fru-2,6-P₂, es un inhibidor competitivo con respecto al sustrato (Pilkis *et al.*, 1981). Los valores obtenidos de I_{50} para el azúcar fueron obtenidos a una concentración de sustrato de 30 μM y de 5 mM de MgSO_4 , para ambas enzimas. El valor de I_{50} para la enzima silvestre fue de 0,5 μM , mientras que para la enzima mutante se obtuvo un valor de 0,7 μM . Estos valores indican que no se produjo una disminución significativa en la afinidad de la FBPasa mutante Phe16Trp por este inhibidor. La figura 8 muestra las curvas hiperbólicas obtenidas para ambas FBPasas, sin indicios de una respuesta cooperativa hacia el inhibidor Fru-2,6-P₂; coeficiente de Hill igual a 1,0 (dato no mostrado).

Efecto del AMP sobre la FBPasa silvestre y mutante. El AMP es un inhibidor alostérico de la FBPasa y esta inhibición es cooperativa con un coeficiente de Hill próximo a 2,0. Como se muestra en la figura 9, la inhibición por AMP para la enzima FBPasa silvestre presentó una típica curva sigmoídea, con un coeficiente de Hill de 2,0. Por otra parte, la inhibición por AMP para la enzima FBPasa mutante Phe16Trp fue bifásica, sugiriendo la presencia en la enzima de

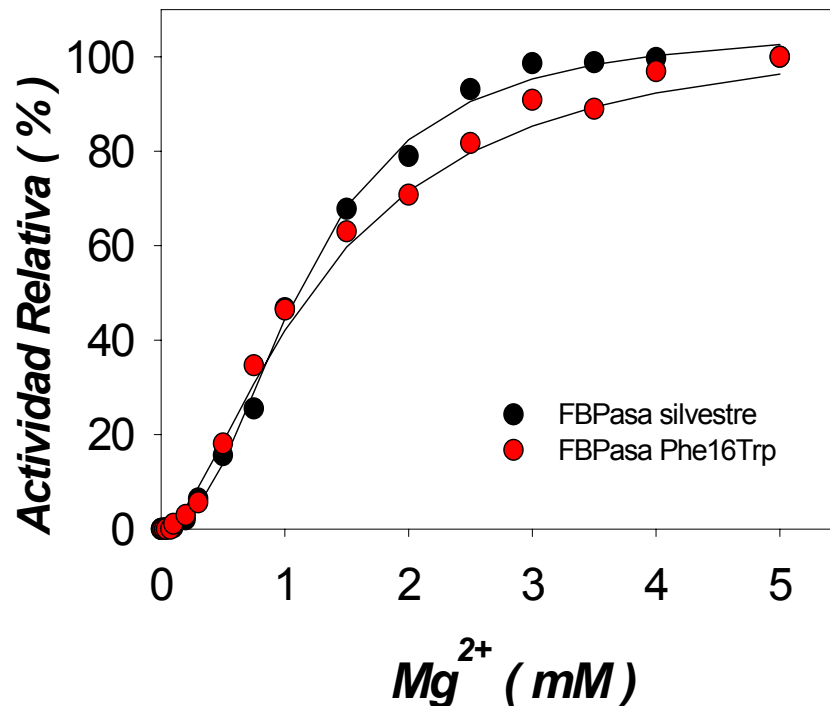


Figura 8.- Efecto de magnesio sobre la actividad de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. La actividad enzimática se obtuvo a concentraciones crecientes de magnesio a una concentración fija de sustrato de $30\mu M$. las curvas representan el ajuste de los datos de actividad a la ecuación de Hill, que considera cooperatividad en la saturación por el cofactor. Los valores obtenidos para las constantes se encuentran en la tabla III, otros detalles en materiales y métodos.

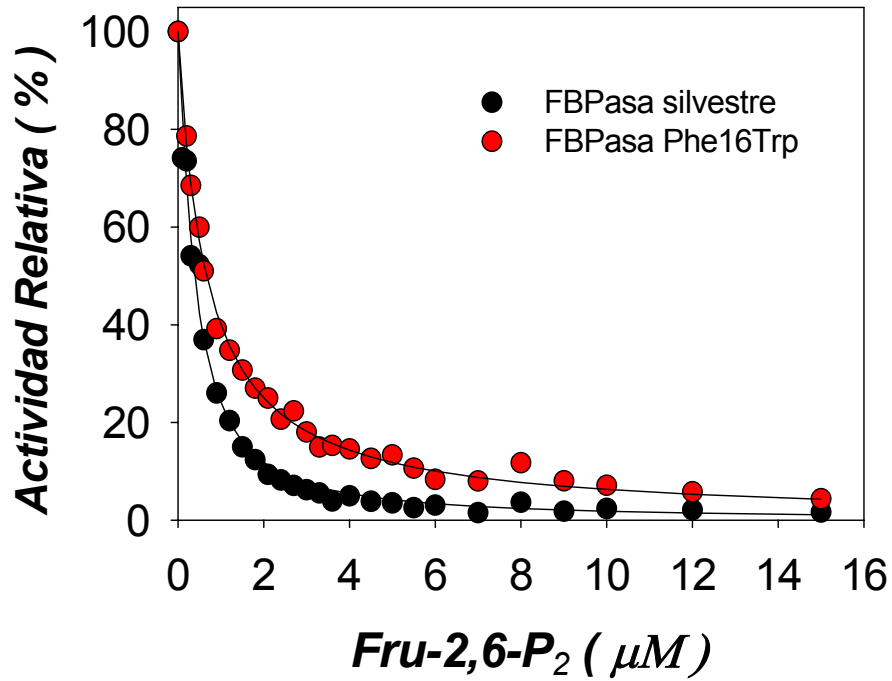


Figura 9.- Inhibición por Fructosa-2,6-bisfosfato de la enzima FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. La actividad enzimática se obtuvo a concentraciones crecientes de Fru-2,6-P₂ a una concentración de sustrato de 30 μM. La cantidad de enzima utilizada en el ensayo fue de 0,4μg. Las curvas fueron ajustadas a la ecuación de Taketa y Pogell. Para detalles ver tabla III y materiales y métodos.

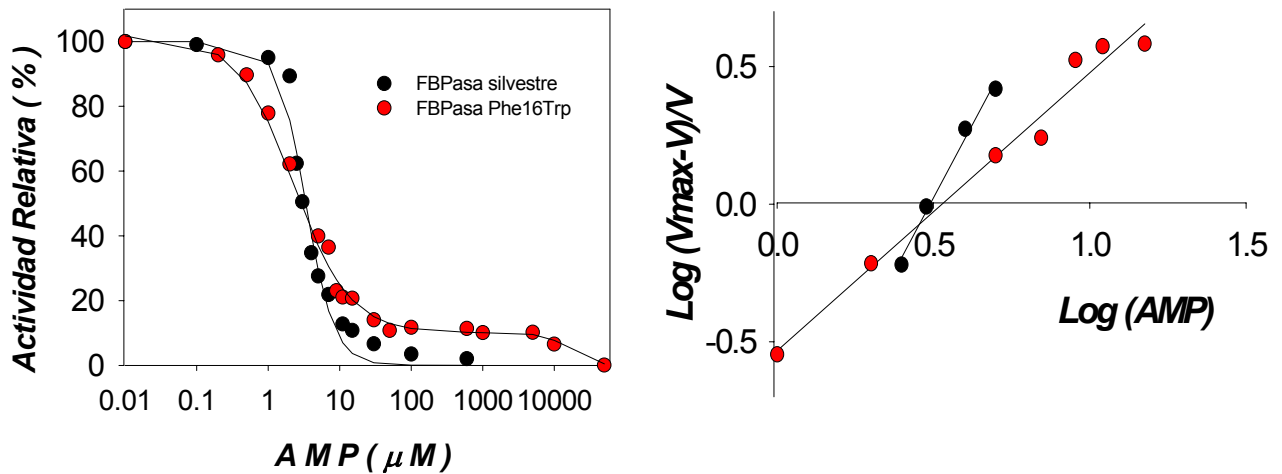


Figura 10.- Curva de Inhibición por AMP de las enzimas FBPasa silvestre y mutante Phe16Trp. La actividad enzimática se determinó usando un ensayo espectrofotométrico acoplado a la reducción de NAD^+ , utilizando una concentración de sustrato de 30 μM , como se detalla en materiales y métodos. La cantidad de FBPasa utilizada en los ensayos fue de 0.4 μg por ensayo. En la figura A, se representa el ajuste de los datos obtenidos para la FBPasa silvestre a la ecuación de Taketa y Pogell, y en el caso de la curva bifásica, a la suma de dos ecuaciones Hiperbolicas, la cual representa los valores obtenidos para la unión de AMP a sitios de alta y baja afinidad para la mutante Phe16Trp. En la figura B, se observa un gráfico de Hill que representa $\text{Log} [AMP]$ versus $\text{Log} (V_{max}-V)/V$ de los valores de inhibición obtenidos entre el 20 – 80 % de actividad para los sitios de alta afinidad.

clases de sitios de unión con afinidades significativamente diferentes para el nucleótido. En la primera fase de la inhibición, a concentraciones de AMP menores a $100\mu\text{M}$, la enzima es inhibida hasta un 88 % (Figura 9A). Solo a una concentración 100 veces mayor de AMP la enzima es inhibida completamente, cuando los sitios de alta como de baja afinidad son saturados. El coeficiente de Hill correspondiente a la primera fase de la inhibición fue de 1,0, indicando la pérdida de cooperatividad de la enzima mutante Phe16Trp con respecto al inhibidor alostérico AMP, en claro contraste a lo que sucede con la enzima FBPasa silvestre (Figura 9B).

La concentración del inhibidor necesaria para disminuir la actividad en un 50% (I_{50}) para la enzima silvestre fue de $6,9\mu\text{M}$ y para la enzima mutante de $6,7\mu\text{M}$, valores muy similares. El valor de I_{50} para el sitio de baja afinidad para la enzima mutante, es difícil de determinar debido a las bajas actividades y las elevadas concentraciones de AMP que se requieren. Se estimó un valor de aproximadamente 16mM , lo cual corresponde a una unión de AMP 2400 veces más débil que a los sitios de alta afinidad.

4.5. Características fluorescentes de la FBPasa mutante Phe16Trp

La FBPasa silvestre no posee residuos de triptófano en su estructura primaria (Marcus *et al.*, 1982), por lo que su fluorescencia intrínseca es baja. Uno de los objetivos de esta tesis, al preparar la mutante, fue la introducción de una sonda fluorescente en una región específica de la enzima, cercana al sitio de unión del inhibidor alostérico AMP. El espectro de emisión de fluorescencia de la mutante Phe16Trp al excitar específicamente a 295nm , es un típico espectro de emisión de fluorescencia del triptófano (Figura 10), que registra un máximo de emisión a 337nm . Por el contrario, la enzima FBPasa silvestre prácticamente no presenta emisión en estas condiciones.

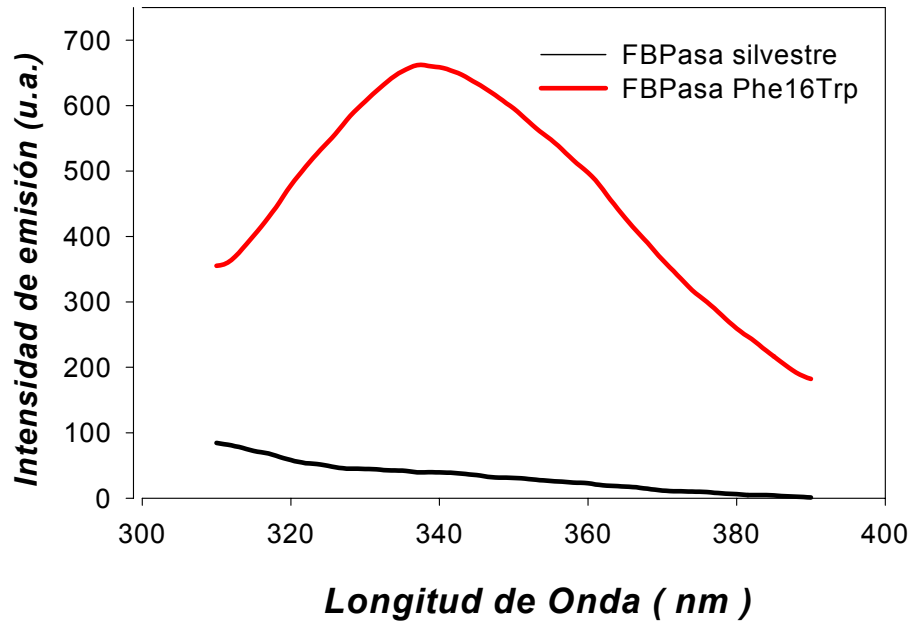


Figura 11.- Espectros de emisión de fluorescencia de la FBPasa Silvestre y mutante Phe16Trp. La línea de color negro corresponde al espectro de emisión de la enzima FBPasa silvestre y la línea en rojo al espectro de emisión de la FBPasa mutante. Los espectros se obtuvieron utilizando una concentración de enzima de 60 μ g/ml y excitando a una longitud de onda de 295nm. Más detalles en Materiales y Métodos.

La fluorescencia de la mutante fue utilizada para estudiar la interacción de la enzima con los distintos ligandos que modulan la actividad de la FBPasa. para ello, se realizaron ensayos de unión de ligando, en los cuales se midieron los cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia, en función de la concentración del ligando utilizado. Los datos de emisión obtenidos en los ensayos de unión fueron ajustados a la siguiente ecuación de Hill.

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{(\Delta F_{\max}/F_0)L^n}{K_d + L^n}$$

Donde ΔF es el cambio en la fluorescencia por la adición del ligando L, definido como la fluorescencia medida en presencia del ligando (F_m) menos la fluorescencia medida en ausencia del ligando (F_0), K_d es la constante de disociación y n es el coeficiente de Hill para la unión del ligando. La intensidad de emisión se cuantificó determinando el área bajo la curva del espectro de emisión para cada punto en la titulación. El resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de unión se presenta en la tabla III.

Efecto de Magnesio sobre la emisión de fluorescencia de la FBPasa mutante. La figura 11, muestra el cambio de emisión de fluorescencia de la enzima mutante al unir Mg^{2+} , en el rango de concentraciones que produce activación. Se observa un cambio significativo en la emisión de fluorescencia de un 4%. La constante de disociación obtenida para la unión de Mg^{2+} fue de 2,1mM con un coeficiente de Hill de 0,50, sugiriendo una cierta cooperatividad negativa.

Tabla III***Parámetros de la unión de los ligandos a la enzima FBPasa Phe16Trp***

Enzima	Fru-2,6-P₂		AMP		Mg²⁺	
	Kd	n_H	Kd	n_H	Kd	n_H
Phe16Trp^a	4,7 μ M	1,1	0,5 μ M	1,2	2,1 mM	0.5

^aPhe16Trp, corresponde a His-FBPasa Phe16Trp.

Kd, constante de disociación

n_H, coeficiente de Hill

La concentración de enzima utilizada fue de 60 μ g/ml preparada en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM. El espectro de emisión se obtuvo al excitar específicamente los residuos de triptófano a una longitud de onda de 295nm, con ranuras de excitación y de emisión de 9 nm, y utilizando una cubeta de camino óptico de 1 cm, con agitación constante y a una temperatura de 15° C. Detalles en Materiales y Métodos.

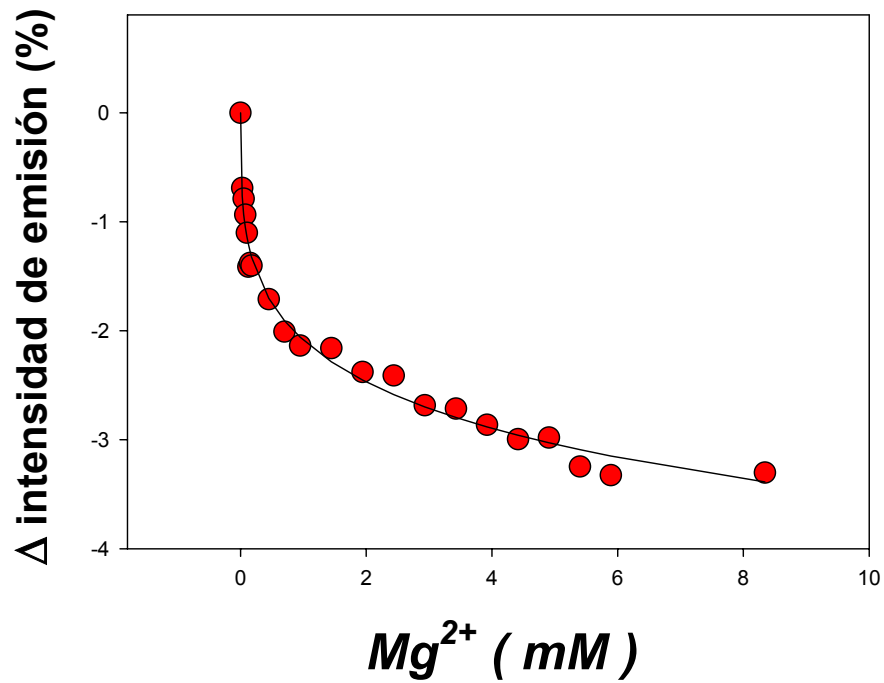


Figura 12.- Efecto del activador magnesio sobre la intensidad de emisión de fluorescencia de la enzima mutante Phe16Trp. En el gráfico se muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia con relación a la concentración de magnesio. La concentración de enzima utilizada fue de 60 μ g/ml. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Hill.

Efecto de Fru-2,6-P₂ sobre la emisión de fluorescencia de la FBPasa mutante. La figura 12 presenta el cambio de emisión de fluorescencia de la enzima mutante al unir Fru-2,6-P₂ a concentraciones inhibitorias. Se observa un cambio significativo en la emisión de fluorescencia de un 9%. La constante de disociación obtenida para la unión de Fru-2,6-P₂ fue de 4,7 μM con un coeficiente de Hill de 1,1, lo que indica una ausencia de cooperatividad.

Efecto de AMP sobre la emisión de fluorescencia de la FBPasa mutante. La figura 13 muestra el cambio de emisión de fluorescencia al unir AMP. Se observa una fuerte disminución de la emisión de la fluorescencia de la mutante Phe16Trp igual a un 34%. Por otra parte, el valor de la constante de disociación (Kd) obtenido fue de 0.5 μM y el coeficiente de Hill de 1,2 lo que sugiere ausencia de cooperatividad entre los sitios de unión del inhibidor. Este resultado concuerda perfectamente con los datos cinéticos de inhibición por AMP, en el cual no se obtuvo cooperatividad en la inhibición por el nucleótido.

Efecto de AMP sobre la emisión de fluorescencia de la FBPasa mutante en presencia de magnesio 15mM. La figura 14 muestra el cambio observado en la fluorescencia al unir AMP en presencia de magnesio. En negro se observa una curva típica de titulación de la enzima FBPasa Phe16Trp con el inhibidor alostérico AMP, a partir de la cual se obtiene un valor para la constante de disociación (Kd) de 0,6. Por otra parte, en rojo se muestra la curva de titulación de la enzima FBPasa mutante, con AMP, en presencia del activador magnesio. Claramente se aprecia un desplazamiento de la curva con una disminución en la afinidad de la enzima por el nucleótido, estimándose un valor para la constante de disociación de 5,33 μM , lo que indica que se requiere una mayor concentración de AMP para obtener el máximo de inhibición. El valor de Kd obtenido

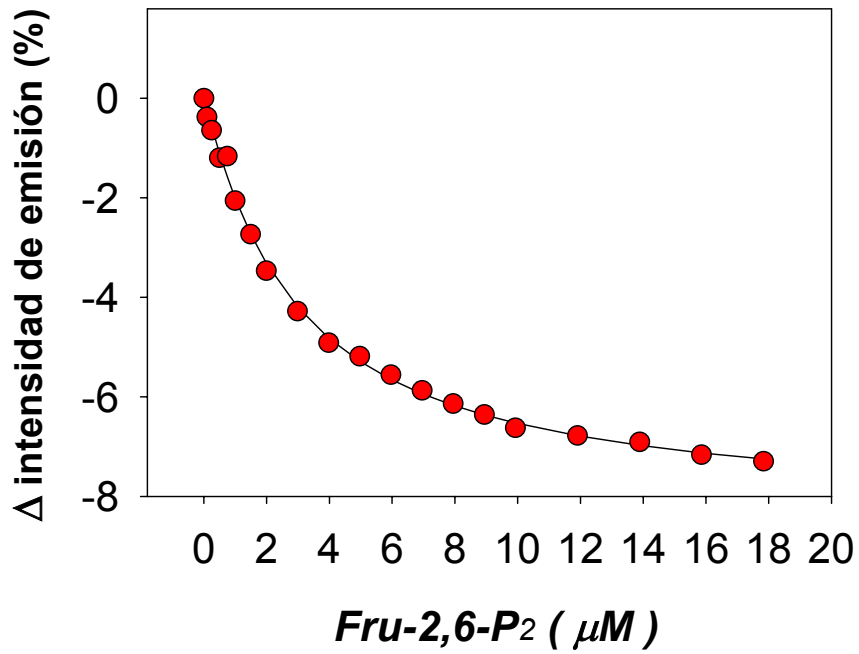


Figura 13.- Efecto del inhibidor Fructosa-2,6-bisfosfato sobre la intensidad de emisión de la enzima mutante Phe16Trp. En el gráfico se muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia con relación a la concentración de Fru-2,6-P₂. La concentración de enzima utilizada fue de 60 μg/ml. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Hill.

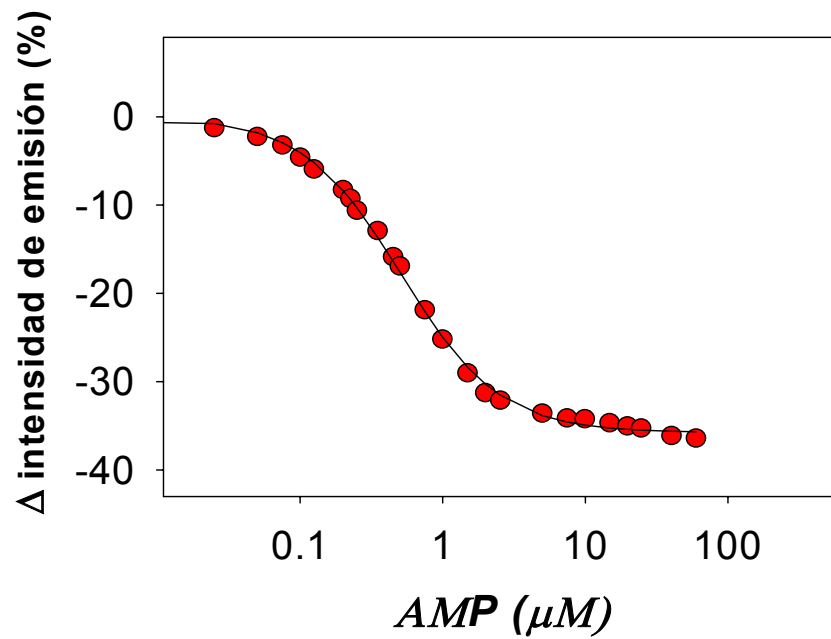


Figura 14.- Efecto del inhibidor alosterico AMP sobre la intensidad de emisión de la enzima mutante Phe16Trp. En el gráfico se muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia con relación a la concentración de AMP. La concentración de enzima utilizada fue de 60 $\mu\text{g/ml}$. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Hill. Detalles en Materiales y Métodos.

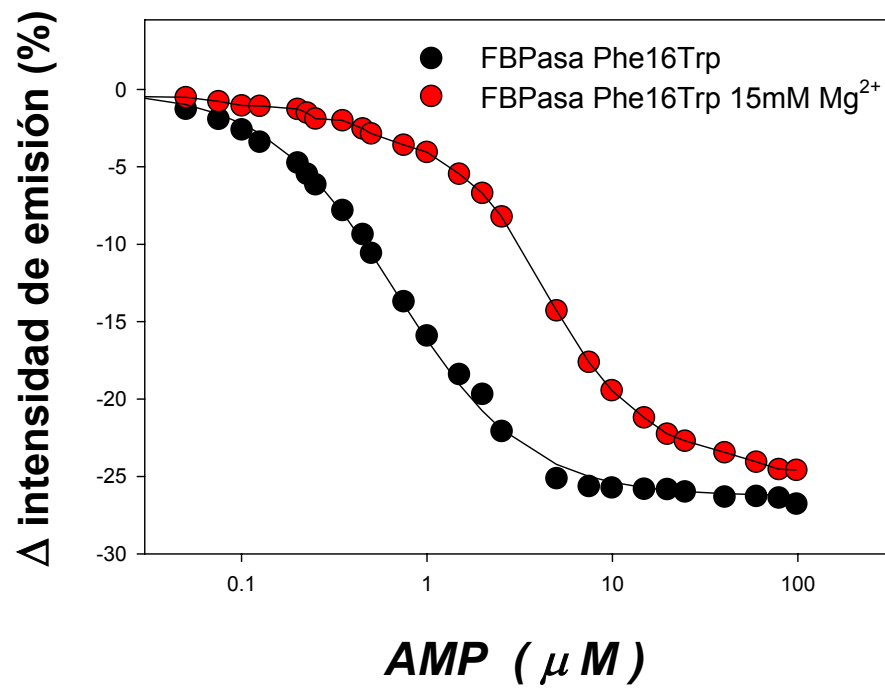


Figura 15.- Efecto de AMP sobre la intensidad de emisión de la mutante Phe16Trp en presencia de 15 mM de magnesio. En el gráfico se muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia con relación a la concentración de AMP. Se utilizó una concentración de enzima de 60 $\mu g/ml$. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Hill. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

en presencia de magnesio coincide con el valor de la constante de inhibición (I_{50}) obtenido en los ensayos de actividad para el AMP. Por otra parte, no hay cambios en el coeficiente de Hill para la curva de titulación con AMP obtenida en presencia o en ausencia de magnesio.

5. DISCUSIÓN

La fructosa-1,6-bisfosfatasa es una enzima multimodulada que cumple un papel muy importante en la vía gluconeogénica, por lo tanto ha sido blanco predilecto para el estudio de sus propiedades cinéticas, estructurales y como participa en la regulación del metabolismo. La FBPasa de riñón de cerdo presenta una baja fluorescencia intrínseca debido a que no presenta residuos de triptófano en su estructura primaria (Marcus *et al.*, 1982). Este hecho hace que sea particularmente atractivo introducir sondas fluorescentes en la enzima para sensar cambios conformacionales inducidos por ligandos o agentes desnaturantes. La perturbación de la fluorescencia de la sonda extrínseca (fluoróforo) provocada por los ligandos, permite emplear diferentes técnicas espectroscópicas para caracterizar la dinámica funcional de la enzima.

Con el objetivo de introducir sondas fluorescentes extrínsecas en la FBPasa de riñón de cerdo, se han utilizado modificadores químicos tales como 1,5-I-AEDANS y pireno-maleimida, que reaccionan específicamente con grupos sulfhidrilos, así se ha logrado introducir grupos fluorescentes específicamente en el residuo de cisteína 128 (Reyes *et al.*, 1993). El derivado de la FBPasa obtenido con 1,5-I-AEDANS, ha sido utilizado en el análisis del desplegamiento y disociación de la enzima en presencia del agente desnaturante guanidina-HCl (Reyes *et al.*, 2003). No obstante, la modificación química introducida en la FBPasa, para otorgarle propiedades fluorescentes, afecta ciertos parámetros cinéticos de la enzima.

Una aproximación reciente para introducir sondas fluorescentes extrínsecas en proteínas, es a través de mutagénesis sitio dirigida. Las ventajas de esta técnica son evidentes, pues es de esperar que la perturbación en la estructura de la proteína sea mínima, al contrario del caso de los modificadores químicos, especialmente si estos son voluminosos (Reyes *et al.*, 1993). Por otro lado, este método abre la posibilidad de introducir sondas fluorescentes naturales prácticamente

en cualquier región de la enzima, sin estar limitados a la disponibilidad de residuos reactivos o de modificadores adecuados. Por cierto, esta técnica ha sido utilizada en la FBPasa para estudiar la dinámica conformacional de la enzima (Nelson *et al.*, 2000b), o para estudiar el comportamiento de la unión de ligandos a la enzima, midiendo la emisión de fluorescencia de un residuo de triptófano incorporado (Asenjo, J.L. 2000).

En este trabajo se obtuvo una mutante de la enzima fructosa-1,6-bisfosfata, en la cual se realizó el cambio conservativo del residuo fenilalanina en posición 16 por triptófano. El método utilizado para realizar la mutagénesis mostró ser bastante eficiente y confiable en la preparación de la enzima. La mutante preparada se expresó en *E. coli*, con el sistema de expresión *pET system*, como una proteína de fusión ligada a una secuencia de 6 residuos de histidina al extremo amino terminal, que forma específicamente un complejo de coordinación con átomos de níquel unidos a una resina proporcionada por el sistema, lo que permite la purificación en un único paso cromatográfico. Se obtuvo niveles satisfactorios de rendimiento en la purificación tanto de la enzima silvestre, como de la enzima mutante, preparadas al utilizar el sistema de purificación “pET system”. De acuerdo con estudios realizados con este sistema de purificación, se tiene certeza que la cola de histidinas introducida en la enzima FBPasa silvestre no afecta las propiedades cinéticas y fluorescentes, por lo que la remoción por digestión con trombina no es esencial en la caracterización de los parámetros fluorescentes de la enzima (Asenjo, J.L. 2000; Cárcamo *et al.*, 2000).

Sobre la base de estudios de difracción de rayos-X de las estructuras cristalinas de la FBPasa de riñón de cerdo, se puede concluir que el residuo fenilalanina en posición 16 se encuentra ubicado hacia el extremo carboxilo terminal de la α -hélice H1, próximo al sitio de unión del inhibidor alostérico AMP, en la interfase dímero-dímero C1-C4 (Liang *et al.*, 1994).

Por otra parte, los datos cristalográficos de los complejos de la enzima en un estado R, muestran que la fenilalanina 16 se encontraría ubicada en un ambiente bastante apolar, con su cadena lateral dirigida hacia el interior de la proteína (Choe *et al.*, 2000).

Para determinar si la sustitución del residuo fenilalanina en posición 16 por triptófano provoca alteraciones en los parámetros normales de la FBPasa, se determinaron las propiedades cinéticas de la enzima silvestre y mutante. Los datos cinéticos encontrados en este trabajo para la FBPasa silvestre concuerdan perfectamente con aquellos descritos en la literatura (Asenjo, J.L. 2000; Cárcamo *et al.*, 2000). Es de amplio conocimiento que la FBPasa silvestre exhibe cooperatividad con respecto al AMP, presentando un coeficiente de Hill de 2 (Taketa y Pogell, 1965). El principal hallazgo de esta tesis es la completa pérdida de la cooperatividad de la enzima FBPasa mutante (Phe16Trp) para la unión del inhibidor alostérico AMP (coeficiente de Hill igual a 1), pero sin cambios en la afinidad por el nucleótido. Además, se observa una curva bifásica en la inhibición por AMP, lo cual puede ser interpretado por la existencia en la enzima de sitios de unión con diferentes afinidades para el nucleótido. Los sitios de alta afinidad corresponderían a los sitios alostéricos para AMP y aquellos de baja afinidad a los sitios activos (Lu *et al.*, 1996, 1997).

Con respecto a la interacción cooperativa para la unión del inhibidor alostérico a la FBPasa, se postula que ésta ocurriría por transmisión, entre las distintas subunidades, del reordenamiento conformacional ejercido por la unión del AMP a la subunidad C1. De esta forma, la unión del AMP a esta subunidad provocaría una reorientación y un reposicionamiento de las estructuras secundarias, que comprenden principalmente a las α -hélices H1, H2 y H3, además de los residuos 9-12 del extremo amino terminal y residuos 188-191 que pertenecen al giro 188-191, en el dominio del AMP (residuos 9-200 de la FBPasa). Este reordenamiento

involucra movimientos significativos de las cadenas laterales de aminoácidos ubicados a lo largo de la interfase C1-C4 y la formación de nuevos puentes de hidrogeno en las distintas interfases, C1-C2 y C1-C4. Este reordenamiento es por tanto putativamente responsable de la cooperatividad de la enzima en la unión de AMP y en la estabilización de un estado conformacional T en la FBPasa, sin alterar mayormente el dominio de unión al sustrato (Zhang *et al.*, 1994).

Con la finalidad de esclarecer el mecanismo de transmisión de señales entre subunidades involucrado en la inhibición cooperativa por AMP, varios estudios han sido realizados a través de mutagénesis sitio dirigida, principalmente reemplazando residuos de la interfase C1-C4 (Lu *et al.*, 1995, 1996, 1997; Shyur *et al.*, 1996b, 1996c), y en residuos ubicados en el sitio de unión del AMP adyacentes a la interfase C1-C4 (Chen *et al.*, 1994; Shyur *et al.*, 1995, 1996a; Kelley-Loughnane y Kantrowitz, 2001) o en la interfase monomérica C1-C2 (Lu *et al.*, 1997; Shyur *et al.*, 1997; Kurbanov *et al.*, 1998; Cárcamo *et al.*, 2000).

De los estudios de mutagénesis sitio dirigida realizados en residuos que involucran el sitio de unión del AMP y putativamente la interfase C1-C4, se observó una disminución de la sensibilidad junto con una pérdida de cooperatividad de la enzima hacia el inhibidor alostérico AMP. Por otra parte, en las mutaciones que afectan solamente a la interfase C1-C4, el efecto más importante encontrado fue la perdida total de la cooperatividad hacia el nucleótido, sugiriendo que la interfase C1-C4 es crítica para la propagación de la señal alostérica entre los sitios de unión al AMP de las distintas subunidades, como se esperaba de acuerdo con el modelo propuesto para la transmisión de la señal alostérica descrito anteriormente.

De los datos obtenidos de difracción de rayos-X en el estado R, se observa que la cadena lateral del residuo fenilalanina en posición 16 esta orientada hacia el interior de la proteína. En la

transición del estado R a un estado T, en la FBPasa Phe16Trp, ocurrirían importantes cambios conformacionales en la vecindad del fluoróforo introducido, en forma similar a lo que ocurre en las mutantes que afectan a la interfase C1-C4, en las cuales se pierde la cooperatividad por AMP. La sustitución de un residuo de triptófano por fenilalanina en posición 16, provocaría la pérdida de ciertas interacciones con residuos vecinos, las cuales serían responsables de la transmisión de la señal cooperativa entre subunidades. Además, la observada reducción en la constante catalítica sugiere que este residuo es esencial en la estabilidad de la enzima en el estado R, lo cual se ve corroborado por experimentos de desnaturación con guanidina-HCl, en la cual se obtiene un 50% de la actividad máxima a 0,67 M en la enzima mutante, en comparación 0,86 en la enzima silvestre (datos no mostrados).

A pesar de la perturbación ocasionada por la mutagénesis, en cuanto a la pérdida de la cooperatividad para el ligando AMP, la mutante Phe16Trp fue de gran utilidad para caracterizar la interrelación entre la unión del inhibidor alostérico AMP y el metal bivalente magnesio en la enzima.

Los espectros de emisión de fluorescencia de la FBPasa silvestre y mutante, se obtuvieron excitando específicamente los residuos de triptófano, a una longitud de onda de 295 nm. La FBPasa silvestre no contiene residuos de triptófano en su estructura primaria, por tanto no presenta emisión de fluorescencia, pero sí presenta 15 residuos de tirosina y 9 residuos de fenilalanina (Marcus et al., 1982; Williams y Kantrowitz, 1992), que emiten fluorescencia cuando son excitados a menores longitudes de onda. Se obtuvo un máximo de emisión a los 337 nm, lo que indica que este residuo se encuentra en un ambiente muy hidrofóbico, lo cual está en perfecto acuerdo con los análisis cristalográficos de la enzima por difracción de rayos-X.

El efecto del inhibidor competitivo Fru-2,6-P₂ sobre la emisión de fluorescencia de la

FBPasa mutante, resultó en una disminución en la emisión de fluorescencia de un 9% aproximadamente, con una constante de disociación de 4,70 μM . Estos datos, sugieren que la mutante Phe16Trp es capaz de sensar los cambios conformacionales inducidos por la unión del inhibidor competitivo Fru-2,6-P₂.

En ensayos de unión de AMP, se ha encontrado que las mutantes Phe6Trp y Phe89Trp, ubicadas próximas al sitio de unión de AMP y adyacentes a la interfase C1-C4, registraron un apagamiento en la emisión de fluorescencia de un 23 %, al unir AMP, presentando una constante de disociación de 1,25 y 0,65 μM , respectivamente (Yañez y col., 2000). La FBPasa mutante Phe16Trp en este trabajo, registro una disminución en la emisión de fluorescencia de un 34 %, y una constante de disociación de 0,49 μM , datos bastante similares a los descritos para las mutantes Phe6Trp y Phe89Trp. Interesantemente, el coeficiente de Hill obtenido para la mutante Phe16Trp fue de 1,18, lo cual indica una pérdida de cooperatividad por parte de la FBPasa, dato que concuerda perfectamente con el coeficiente de Hill para el AMP obtenido en ensayos cinéticos. Si bien los datos de unión revelan que el AMP a concentraciones inhibitorias se une a la enzima mutante, la constante de disociación obtenida es aproximadamente 14 veces menor que la constante de inhibición para el nucleótido, lo que indicaría que el AMP se une con gran afinidad a la FBPasa, pero en presencia del activador magnesio la afinidad por AMP disminuye. Este resultado es congruente con la inhibición competitiva de AMP con respecto al magnesio (From y col, 1990) y con el modelo propuesto para explicar el mecanismo de regulación alostérica de la FBPasa por AMP (Choe et al., 1998).

Para caracterizar la relación entre la unión del inhibidor alostérico AMP y el metal bivalente magnesio en la enzima, se realizó una titulación de la enzima mutante Phr16Trp con AMP, en presencia de 15mM de magnesio. Como se esperaba, la mutante presentó una constante

de disociación de 5,3 μM , mientras que sin el activador la constante de disociación fue de 0,6 μM . Por lo tanto, la presencia de magnesio provoca una disminución de la afinidad por el nucleótido, lo cual se ve revertido sólo a altas concentraciones del inhibidor alostérico. Este resultado es una prueba concluyente que el inhibidor alostérico AMP y el activador magnesio son mutuamente excluyentes en cuanto a su unión a la FBPasa.

La enzima mutante Phe16Trp, es capaz de sentir los cambios conformacionales inducidos por los tres ligandos utilizados, siendo más afectada por la unión de AMP. En nuestro laboratorio se han preparado las mutantes Phe16Trp (Pinto, R.O. 1999), Phe89Trp (Yañez y col. 2000), Phe219Trp y Phe232Trp (Asenjo, J.L. 2000), las que junto a la enzima preparada en esta tesis, constituyen una serie de enzimas mutantes de la FBPasa, cuyas propiedades fluorescentes, facilitan el estudio del mecanismo de modulación de la enzima y su mecanismo de desplegamiento y replegamiento bajo la acción de agentes desnaturantes, para eventualmente definir la contribución relativa de cada una de las interfases de la proteína, en la estabilidad en los procesos de plegamiento.

6. AGRADECIMIENTOS

Con mucho cariño quiero agradecer en forma muy especial a mis padres Eliana Navarrete y Marcos Maureira, quienes con su esfuerzo y dedicación me apoyaron continuamente durante todos los años de mi formación. A Francisca, Erika, y mis sobrinos; Belén, Javier y Danée, por el amor que me han entregado siempre.

Además, quiero agradecer sinceramente al Dr. Alejandro Yañez por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su estímulo y apoyo en el trabajo desarrollado. Al Dr. Juan Carlos Slebe, por compartir su experiencia profesional, por brindarme su apoyo y dedicación. A la Dr Heide Ludwig por su apoyo, preocupación y constante dedicación en esta tesis.

A mi querida Marcela Norambuena, por regalarme su amor y comprensión en estos años de estudio. A mis amigos y compañeros de labor, quienes siempre tuvieron una excelente disposición para ayudarme en el desarrollo de esta tesis, como son: Marcelo N, Marcelo S, Carlos, Rodrigo, Fredy, Mauricio, Joel, Cristian, Romina y Zahadi, entre otros, y a todos los que de alguna u otra manera participaron y colaboraron en la realización de esta tesis.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Enzimología Molecular, del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile, y fue financiado por el proyecto Fondecyt N° 1010720 y DID-UACH 200302.

7. BIBLIOGRAFIA

- Asenjo, J.L. (2000) Obtención y caracterización de las mutante 219 y 232 de fenilalanina a triptófano (Phe219Trp y Phe232Trp) de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo. Tesis. Escuela de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- Carcamo, J.G., A.J. Yanez, H.C. Ludwig, O. Leon, R.O. Pinto, A.M. Reyes, and J.C. Slebe. (2000). The C1-C2 interface residue lysine 50 of pig kidney fructose-1, 6-bisphosphatase has a crucial role in the cooperative signal transmission of the AMP inhibition. *Eur J Biochem.* 267:2242-2251.
- Chen, M., Chen, L., & Fromm, H. L. (1994) Replacement of glutamic acid 29 with glutamine leads to a loss of cooperativity for AMP with porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 269:5554-5558.
- Choe, J.Y., H.J. Fromm, and R.B. Honzatko. (2000). Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: mechanism of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes. *Biochemistry.* 39:8565-8574.
- Choe, J.Y., B.W. Poland, H.J. Fromm, and R.B. Honzatko. (1998). Role of a dynamic loop in cation activation and allosteric regulation of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry.* 37:11441-11450.
- el-Maghrabi MR, Pilkis J, Marker AJ, Colosia AD, D'Angelo G, Fraser BA and Pilkis SJ. (1988) cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:8430-8434.
- Fisher, W.K., and E.O. Thompson. (1983). Amino acid sequence studies on sheep liver fructose-bisphosphatase. II. The complete sequence. *Aust J Biol Sci.* 36:235-250.

- Fromm J. and Feng Liu (1990). Kinetic Studies on the Mechanism and Regulation of Rabbit Liver Fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 265:7401-7406.
- Hamilton W. D., Harrison D. A and Dyer T. A. (1988). Sequence of the Escherichia coli fructose-1,6-bisphosphatase gene. *Nucleic Acids Res.* 16:8707-8711.
- Hers, H.G., and L. Hue. (1983). Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem.* 52:617-653.
- Gomori, G. (1943). Hexosediphosphatase. *J. Biol. Chem.* 148:139-149.
- Ke, H.M., J.Y. Liang, Y.P. Zhang, and W.N. Lipscomb. (1991a). Conformational transition of fructose-1,6-bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose 6-phosphate complex (R form). *Biochemistry.* 30:4412-4420.
- Ke, H.M., Y.P. Zhang, J.Y. Liang, and W.N. Lipscomb. (1991b). Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the product fructose 6-phosphate at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2989-2993.
- Ke, H.M., Y.P. Zhang, and W.N. Lipscomb. (1990). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:5243-5247.
- Kurbanov, F.T., Choe, J., Honzatko, R.b. (1998) Directed mutations in the poorly defined region of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase significantly affect catalysis and the mechanism of AMP inhibition. *J. Biol. Chem.* 273:17511-17516.
- Liang, J.Y., S. Huang, Y. Zhang, H. Ke, and W.N. Lipscomb. (1992). Crystal structure of the neutral form of fructose 1,6-bisphosphatase complexed with regulatory inhibitor fructose 2,6-bisphosphate at 2.6-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:2404-2408.

- Liang, J.Y., Y. Zhang, S. Huang, and W.N. Lipscomb. (1993). Allosteric transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2132-2136.
- Lu G, Williams MK, Giroux EL, Kantrowitz ER. (1995). Fructose-1,6-bisphosphatase: arginine-22 is involved in stabilization of the T allosteric state. *Biochemistry.* 34(41):13272-13277.
- Lu, G., B. Stec, E.L. Giroux, and E.R. Kantrowitz. (1996). Evidence for an active T-state pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase: interface residue Lys-42 is important for allosteric inhibition and AMP cooperativity. *Protein Sci.* 5:2333-2342.
- Lu G, Giroux EL and Kantrowitz ER. (1997). Importance of the dimer-dimer interface for allosteric signal transduction and AMP cooperativity of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. Site-specific mutagenesis studies of Glu-192 and Asp-187 residues on the 190's loop. *J Biol Chem.* 272(8):5076-5081.
- Marcus, F. (1967). Kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Archives of biochemistry and biophysics.* 122: 393-399.
- Marcus, F. (1981). Structure and regulation of fructose-1,6-bisphosphatase. Venezia C. (ed) *The regulation of carbohydrate formation and utilization in mammals:* 269-289. Academic Pres, London.
- Marcus, F., I. Edelstein, I. Reardon, and R.L. Heinrikson. (1982). Complete amino acid sequence of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:7161-7165.
- Nelson, S.W., J.Y. Choe, R.B. Honzatko, and H.J. Fromm. (2000a). Mutations in the hinge of a dynamic loop broadly influence functional properties of fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem.* 275:29986-29992.

- Nelson, S.W., C.V. Iancu, J.Y. Choe, R.B. Honzatko, and H.J. Fromm. (2000b). Tryptophan fluorescence reveals the conformational state of a dynamic loop in recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry*. 39:11100-11106.
- Nimmo, H.G., and K.F. Tipton. (1975). The effect of pH on the kinetics of beef-liver fructose bisphosphatase. *Eur J Biochem*. 58:567-574.
- Pilkis, S.J., M.R. El-Maghrabi, J. Pilkis, and T. Claus. (1981). Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem*. 256:3619-3622.
- Pinto R.O. (1999). Obtención de la mutante fenilalanina 6 a triptófano de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo. Tesis. Escuela de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- Pontremoli, S., Melloni, E., De Flora, A and Horecher, B.L. (1973). Cooperative interactions between native and modified subunits of rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys*. 156: 255-260.
- Raines C.A, Lloyd J.C, Longstaff M, Bradley D and Dyer T. (1988). Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: the product of a mosaic gene. *Nucleic Acids Res*. 16 (16): 7931–7942
- Reyes A.M, Ludwig H.C, Yanez A.J, Rodriguez P.H and Slebe J.C. (2003). Nativelike intermediate on the unfolding pathway of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry*. 42(23):6956-6964.
- Reyes A.M, Bravo N, Ludwig H, Iriarte A and Slebe J.C. (1993). Modification of Cys-128 of pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase with different thiol reagents: size dependent effect on the substrate and fructose-2,6-bisphosphate interaction. *J Protein Chem*. 12(2):159-168.
- Rogers, D.T., E. Hiller, L. Mitsock, and E. Orr. (1988). Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*.

- Sequence, protein homology, and expression during growth on glucose. *J Biol Chem.* 263:6051-6057.
- Segel, I.H. (1975). In *Enzyme Kinetics* (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 192. Wiley-Interscience Publication, USA.
- Shyur, L.F., A.E. Aleshin, and H.J. Fromm. (1996a). A study of subunit interface residues of fructose-1,6-bisphosphatase by site-directed mutagenesis: effects on AMP and Mg²⁺ affinities. *Biochemistry.* 35:7492-7498.
- Shyur, L.F., A.E. Aleshin, R.B. Honzatko, and H.J. Fromm. (1996b). Biochemical properties of mutant and wild-type fructose-1,6-bisphosphatases are consistent with the coupling of intra- and intersubunit conformational changes in the T- and R-state transition. *J Biol Chem.* 271:33301-33307.
- Shyur, L.F., A.E. Aleshin, R.B. Honzatko, and H.J. Fromm. (1996c). Site-directed mutagenesis of residues at subunit interfaces of porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem.* 271:3005-3010.
- Slebe, J.C., A. Reyes, and E. Hubert. (1985). Activation of fructose-1,6-bisphosphatases by monovalent cations and its relationship with a fructose-2,6-bisphosphate allosteric site. *Arch Biol Med Exp* 18:309-315.
- Stryer, L., (1995). *Biochemistry.* fourth edition. Vol 2, cap 19. Universidad de Stanford.
- Taketa, K., and B.M. Pogell. (1965). Allosteric Inhibition of Rat Liver Fructose 1,6-Diphosphatase by Adenosine 5'-Monophosphate. *J Biol Chem.* 240:651-662.
- Tashima, Y., and N. Yoshimura. (1975). Control of rabbit liver fructose-1, 6-diphosphatase activity by magnesium ions. *J Biochem (Tokyo).* 78:1161-1169.
- Van Schaftingen, E (1987). Fructose-2,6-bisphosphate. *Adv. Enzimol.* 59, 315-395.

- Villeret, V., S. Huang, Y. Zhang, and W.N. Lipscomb. (1995). Structural aspects of the allosteric inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by AMP: the binding of both the substrate analogue 2,5-anhydro-D-glucitol 1,6-bisphosphate and catalytic metal ions monitored by X-ray crystallography. *Biochemistry*. 34:4307-4315.
- Weber, J., S. Wilke-Mounts, E. Grell, and A.E. Senior. (1994). Tryptophan fluorescence provides a direct probe of nucleotide binding in the noncatalytic sites of Escherichia coli F1-ATPase. *J Biol Chem*. 269:11261-11268.
- Williams, M.K., and E.R. Kantrowitz. (1992). Isolation and sequence analysis of the cDNA for pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:3080-3082.
- Yañez, A.J., Ludwig, H.C., Asenjo, J.L., Cárcamo, J.G., Droppelmann, C.A. and Slebe, J.C. (2000). Introduction of a tryptophan reporter group into different regions of the fructose-1,6-bisphosphatase for the study of ligand binding and conformational dynamics. *18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology*. pág 412, 1545.
- Xue, Y., S. Huang, J.Y. Liang, Y. Zhang, and W.N. Lipscomb. (1994). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 2,6-bisphosphate, AMP, and Zn²⁺ at 2.0-Å resolution: aspects of synergism between inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:12482-12486.
- Zaror, I., F. Marcus, D.L. Moyer, J. Tung, and J.R. Shuster. (1993). Fructose-1,6-bisphosphatase of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eur J Biochem*. 212:193-199.
- Zhang, R., V. Villeret, W.N. Lipscomb, and H.J. Fromm. (1996). Kinetics and mechanisms of activation and inhibition of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase by monovalent cations. *Biochemistry*. 35:3038-3043.

Zhang, Y., J.Y. Liang, S. Huang, H. Ke, and W.N. Lipscomb. (1993). Crystallographic studies of the catalytic mechanism of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry*. 32:1844-1857.

Zhang, Y., J.Y. Liang, S. Huang, and W.N. Lipscomb. (1994). Toward a mechanism for the allosteric transition of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *J Mol Biol*. 244:609-624.