

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

*“Caracterización estructural de la interacción de
ligandos con la ADP-glucosa pirofosforilasa”*

Autor: Bioq. María Cecilia Esper

Director: Dr. Alberto Álvaro Iglesias

Co-directora: Dra. Mabel Cristina Aleanzi

Laboratorio de Enzimología Molecular
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – UNL

-2013-

Agradecimientos

Quisiera agradecer especialmente a las siguientes instituciones:

A la Universidad Nacional del Litoral, por haberme brindado la posibilidad de realizar esta tesis a través de las Becas para docentes-investigadores.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por ofrecer esta alternativa de posgrado, por todo el apoyo institucional y por haber brindado el lugar físico para el desarrollo de esta tesis.

Son muchas las personas a las que quisiera expresar mi agradecimiento, por sus valiosos aportes a lo largo de todo este tiempo.

Al doctor Alberto A. Iglesias, por haber dirigido este proyecto, por haber facilitado los recursos para llevarlo a cabo y por su excelente predisposición para realizar las correcciones correspondientes al manuscrito de tesis.

A Mabel, mi co-directora y mi guía, siempre dispuesta a sugerir "como seguir", a discutir y compartir conocimientos. Por su gran generosidad intelectual y por su ejemplo de compromiso con el trabajo, por su permanente contención, y por esa manera única y personal de transmitir su alegría y buen ánimo, siempre hacia adelante, con fortaleza.

A todos mis compañeros de Laboratorio, porque siempre encontré en ellos el apoyo necesario para resolver las cuestiones diarias. A Ana, por sus generosos comentarios, siempre acertados, por todos esos pre-coloquios compartidos y no menos importante, porque ambas sufrimos "el embate" de los efectores de las pirofosforilasas. A Virginia, una compañera incondicional, por tantos coloquios remontados juntas, por su optimismo y por su gran apoyo en momentos difíciles. A Silvia, por esa alegría y esa fuerza que emana y contagia a su alrededor.

A Carlitos, por estar siempre dispuesto a ayudar, por las innumerables veces que generosamente acudió a "socorrerme" (textual) y por ser un excelente compañero de Trabajos Prácticos. A Belén, por su energía contagiosa y su alegría sincera. A Lucila, por esa complicidad compartida, por su mirada realista y por tantas agradables horas "mesada por medio". A Machunchus, por su ayuda generosa, por estar siempre dispuesto a dar una opinión desinteresada, y porque sus inquietudes por el futuro nos

representan a muchos. A Carolina, por brindar su alegría. A Anita, por las clases compartidas y su permanente buena disposición. A Mati H., por su chispeante buen humor.

A los demás integrantes del Laboratorio, Vanesa, Diego, Matías Damián, que siempre han sido tan amables y considerados, por haberme incorporado en sus celebraciones y en su día a día.

A todos esos "chicos" que pasaron por el Laboratorio en estos 25 años. A Marcos, mi compañero de tantos Trabajos Prácticos, a "la Vero", por tantas charlas compartidas almuerzo de por medio, a Mariela B., a Belén P, a Carolina V, por tantos dulces recuerdos...

A mis padres, que siempre apostaron a mi formación estando siempre a mi lado, apoyándome, ayudándome con mis niños y en todo lo que fuese necesario. A mi hermana, esa enorme bendición que me tocó en suerte, siempre apuntalándome, siempre a mi lado. A mi tía, mi segunda madre, por todas esas meriendas cariñosamente preparadas.

A mis niños, divinos regalos de la vida, que fueron creciendo junto a la tesis, que siempre comprendieron que su madre tenía que trabajar, jamás un reproche, al contrario, a medida que se acercaron a su adolescencia, más me alentaron a continuar. A Fabián, por todos estos años de amor, que no son pocos, por comprender mis tiempos y siempre "estar ahí" cuando lo necesito.

A mis amigas Rosita y Graciela que tantos domingos hicieron de madres sustitutas de mis hijos ya que el padre y los niños iban solos a pasear porque mami "está escribiendo la tesis". A mi amiga de toda la vida, Liliana, siempre interesada por mi bienestar y el de mi familia. A Norma, Marcela y Alicia, por los momentos compartidos y toda la contención brindada en "otros ámbitos". A Adriana, por tantas charlas sinceras y tantos años trabajando juntas y "en paz".

A Agustín, mi fiel compañero, siempre acompañándome desde la silla contigua, sentadito a mi lado mientras escribo.

A todos ellos, muchas gracias.

*“Hay dos formas de ver la vida, una es creer que no existen milagros,
la otra es creer que todo es un milagro.”*

Albert Einstein

A mis hijos, por su gran comprensión y generosidad

A mis padres y tía, por su enorme apoyo y confianza

A mi hermana, por su contención diaria y su persistente cariño

A Fabián, por su amor incondicional

Parte del trabajo realizado durante el transcurso de esta Tesis fue publicado en:

Figuerola, C.M.; Esper, M.C.; Bertolo, A.; Demonte, A.M.; Aleanzi, M.; Iglesias, A.A. y Ballicora, M.A. (2011) *Understanding the allosteric trigger for the fructose-1,6-bisphosphate regulation of the ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. *Biochimie* 93: p. 1816-23.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis fueron dados a conocer en las siguientes presentaciones y publicaciones:

Iglesias, A.A.; Esper, M.C.; Aleanzi, M.C.; Ballicora, M.A. y Preiss, J. *Studies on the divalent cation binding site in ADP-glucose pyrophosphorylase*. Presentado en la XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Misiones, Argentina. Publicado en: *Biocell* (2004) **28**, p. 75.

Esper, M.C.; Bufarini, C.; Ballicora, M.A.; Preiss, J.; Aleanzi, M. e Iglesias, A.A. *ADP-glucose pyrophosphorylase allosteric regulation. A study on the mechanism of activation*. Presentado en la XLI Reunión Anual de la SAIB. Pinamar, Argentina. Publicado en *Biocell* (2005) **29**; p. 124.

Bufarini, C.; Esper, M.C. y Aleanzi, M.C. *Efectos moduladores de la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa de E. coli por iones cloruro*. Presentado en el Encuentro de Jóvenes Investigadores. Santa Fe, Argentina, 26 al 27 de octubre de 2005.

Esper, M.C.; Aleanzi, M.C. e Iglesias A.A. *Capillary electrophoresis and intrinsic fluorescence binding studies on ADPGlucose Pyrophosphorylase*. Presentado en la XLII Reunión Anual de la SAIB. Rosario, Argentina, año 2006.

Esper, M.C.; Aleanzi, M.C.; Ballicora, M.A. e Iglesias, A.A. *Understanding allosteric regulation of ADPGlucose pyrophosphorylase from E. coli*. Presentado en la XLIII Reunión Anual de la SAIB. Mar del Plata, Argentina. Publicado en: *Biocell* (2007) **31**, p. 147.

Esper, M.C.; Aleanzi, M.C.; Siano, G. e Iglesias, A.A. *Simultaneous allosteric activation of ADP-glucose pyrophosphorylase: a simplified kinetic model*. Presentado en la XLIV Reunión Anual de la SAIB. Villa Carlos Paz, Argentina. Publicado en: *Biocell* (2008), p. 88.

INDICE

ABREVIATURAS.....	xi
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	5
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1. Hidratos de carbono	8
3.2. Polisacáridos de reserva.....	12
3.2.1. Estructura y función	12
3.2.2. Biosíntesis de α -1,4- poliglucanos.....	16
3.2.2.1. Biosíntesis de α -1,4 polisacáridos en bacterias y plantas	17
3.3. ADP-Glc PPasa.....	19
3.3.1. Clasificación según sus propiedades estructurales y regulatorias	19
3.3.2. Cinética de la reacción catalizada.....	24
3.3.3. Residuos relevantes para la unión de sustratos y para la catálisis.	25
3.3.4. Residuos importantes para la regulación por efectores	29
3.3.5. Caracterización de dominios involucrados en la regulación	31
3.3.6. Predicción de la estructura tridimensional de la enzima ADP-Glc PPasa.....	32
3.3.7. Estructura cristalina de la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa.....	33
3.3.8. Estructura tridimensional de la ADP-Glc PPasa de <i>A. tumefaciens</i>	36
3.3.9. Similitudes y diferencias entre la ADP-Glc PPasa y otras NDP-azúcar PPasas.....	37
4. OBJETIVOS.	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1. Vectores utilizados.....	40
5.2. Cepas bacterianas.....	40
5.3. Medios de cultivo.....	40
5.4. Antibióticos utilizados	40
5.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	41
5.6. Mutagénesis sitio dirigida.	41
5.7. Obtención de células competentes	41
5.7.1. Método del CaCl_2	41
5.8. Transformación de células competentes	42
5.9. Extracción de ADN plasmídico a partir de células transformadas	42
5.10. Precipitación del ADN.....	42
5.11. Ligación de los fragmentos de ADN.....	43
5.12. Obtención del gen <i>glgC</i> de <i>E. coli</i> con dos mutaciones.....	43

5.13. Expresión de las proteínas recombinantes	44
5.14. Purificación de las ADP-Glc PPasas.....	45
5.15. Ultrafiltración.....	46
5.16. Contenido proteico.....	46
5.17. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	46
5.18. Estimación de la masa molecular de las proteínas en estado nativo	47
5.19. Medida de actividad de ADP-Glc PPasa.....	47
5.19.1. Ensayo A: método colorimétrico.....	47
5.19.2. Ensayo B: método radioquímico	48
5.20. Análisis cinético.....	48
5.21. Electroforesis capilar	50
5.21.1. Determinación de la constante de disociación de ligandos por electroforesis capilar de afinidad.....	51
5.21.2. Estimación del número de moléculas de FBP y PLP unidas a la enzima	52
5.22. Modificación química de las enzimas con PLP (fosfo-piridoxilación reductiva).....	53
5.23. Medidas espectrofluorimétricas	54
5.24. Estudios de dicroísmo circular.....	54
5.25. Obtención de los polipéptidos provenientes del corte con metal y reductores	55
5.25.1. Estudio cinético de la inactivación enzimática del Cu^{2+} y de la protección ejercida por el ATP y el Mg^{2+}	56
5.26. Modelado molecular.	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
6.1. Capítulo I: Estudios realizados sobre la enzima ADP-Glc PPasa de <i>E. coli</i>	57
6.1.1. Caracterización del mecanismo de regulación alostérica que ejerce la FBP	57
6.1.1.1. Introducción	57
6.1.1.2. Resultados	59
6.1.1.3. Discusión.....	80
6.1.2. Estudio comparativo de la activación por FBP e inhibición por AMP de la enzima ADP-Glc PPasa de <i>E. coli</i> salvaje frente a enzimas con mutaciones simples o dobles: G336D, Q74A, W113A y N-Δ15.....	83
6.1.2.1. Introducción	83
6.1.2.2. Objetivos y mutantes elegidas para este estudio.	84
6.1.2.3. Estudios conformacionales realizados con las mutantes simples.....	85

6.1.2.4. Obtención, expresión y purificación de las enzimas ADP-Glc PPasa de <i>E. coli</i> dobles mutantes.....	86
6.1.2.5. Caracterización cinética de la activación ejercida por la FBP	87
6.1.2.6. Caracterización cinética de la inhibición por AMP.....	90
6.1.2.7. Discusión.....	91
6.1.3. Caracterización de la interacción de la enzima con el cofactor esencial, el ion magnesio. Importancia del residuo ácido aspártico 276	94
6.1.3.1. Introducción	94
6.1.3.2. Cortes oxidativos de la cadena peptídica mediante la utilización de metales	98
6.1.3.3. Discusión.....	108
6.2. Capítulo II: Estudios realizados sobre la enzima ADP-Glc PPasa de <i>A. tumefaciens</i> en relación a su regulación alostérica.	110
6.2.1. Activación de la enzima por sus dos activadores principales, F6P y Pyr.....	110
6.2.1.1. Modelo de mecanismo cinético y ecuaciones de velocidad.	111
6.2.1.2. Equivalencia de ecuaciones.....	114
6.2.1.3. Correlación entre los parámetros cinéticos de las ecuaciones.....	117
6.2.1.4. Estudio experimental de la activación simultánea de la enzima por la F6P y el Pyr. Cálculo de los parámetros cinéticos.	118
6.2.1.1. Discusión.....	125
6.2.2. Caracterización de la activación en base a resultados obtenidos con mutaciones sitio dirigidas.	127
6.2.2.1. Estudio de las mutantes Q67A y W106A de la enzima de <i>A. tumefaciens</i> , homólogas a las Q74A y W113A de la enzima de <i>E. coli</i>	127
6.2.2.2. Estudio de la mutantes D378A de <i>A. tumefaciens</i> y su homóloga en <i>E. coli</i> , la D385A.....	130
6.2.2.1. Discusión:.....	133
6.2.3. Regulación de la enzima ADP-Glc PPasa de <i>A. tumefaciens</i> por nuevos efectores. Inferencia de estos hallazgos sobre el metabolismo de la bacteria.....	138
6.2.3.1. Efecto activador de la R5P.	139
6.2.3.2. Efectos mutuos entre la R5P y los activadores F6P y Pyr.....	141
6.2.3.3. Inhibición por PEP y 3PGA.	144
6.2.3.4. Efectos mutuos entre los inhibidores PEP y 3PGA y el activador R5P,	145
6.2.3.5. Efectos mutuos entre los activadores F6P y Pyr y el inhibidor PEP	148
6.2.3.6. Efectos mutuos entre los activadores F6P y Pyr y el inhibidor 3PGA.....	151

6.2.3.7. Efectos cinéticos entre los inhibidores PEP y 3PGA	154
6.2.3.8. Discusión.....	155
7. CONCLUSIONES	159
8. REFERENCIAS	164

ABREVIATURAS

3PGA	3-fosfoglicerato
$(\theta)_\lambda$	elipticidad molar media
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina-5'-difosfato
ADP-Glc	ADP-glucosa
ADP-Glc PPasa	ADP-Glc pirofosforilasa
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
cpm	cuentas por minuto
Da	dalton
DC	dicroísmo circular
ECA	electroforesis capilar de afinidad
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Fru	fructosa
F6P	fructosa-6-fosfato
FBP	fructosa-1,6-bisfosfato
Ga3P	gliceraldehído-3- fosfato
Gal	galactosa
Glc	glucosa
Glc1P	glucosa-1- fosfato
Glc6P	glucosa-6- fosfato
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
Kan	kanamicina
LB	Luria-Bertani
MOPS	ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
NAD(H)	nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
NADP(H)	NAD-2'-P (reducida)
NDP	nucleósido difosfato
NDP-azúcar PPasa	NDP-azúcar pirofosforilasa
nm	nanómetro
-P	éster fosfato
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PEP	fosfo <i>enol</i> piruvato
Pi	ortofosfato inorgánico
PLP	piridoxal-5'-fosfato
PPasa	pirofosforilasa
PPi	pirofosfato inorgánico
Pyr	piruvato
(p/v)	peso en volumen
rpm	revoluciones por minuto
R5P	ribosa-5-fosfato
SDS	dodecilsulfato de sodio
UDP	uridina-5'-difosfato
UDP-Glc	UDP-glucosa
UDP-Glc PPasa	UDP-Glc pirofosforilasa
UV	ultravioleta

1. RESUMEN

Numerosas evidencias experimentales demostraron que el principal paso regulador en la síntesis de glucógeno en bacterias y de almidón en plantas corresponde a la formación de ADP-Glc, reacción catalizada por la enzima ADP-Glc PPasa. Esta enzima cataliza la formación de ADP-Glc y PPi a partir de Glc1P y ATP y requiere como cofactor esencial un ión metálico divalente, preferentemente Mg^{2+} . La mayoría de las ADP-Glc PPasas bacterianas y de plantas caracterizadas hasta el momento están reguladas alostéricamente por moduladores que comparten la característica de ser intermediarios de la ruta principal de asimilación del carbono en la célula considerada. En base a la especificidad por los reguladores alostéricos, las ADP-Glc PPasas han sido clasificadas, hasta el momento, en nueve grupos diferentes y cabe destacar que algunas de ellas muestran sensibilidad a más de un modulador positivo o negativo. El conocimiento de las interrelaciones entre los distintos efectores es necesario para comprender el control de la actividad de esta enzima y en consecuencia la derivación del carbono disponible a la síntesis de polisacáridos.

Esta tesis tiene como objetivo principal conocer el mecanismo molecular de la regulación alostérica de las ADP-Glc PPasas y de ampliar el conocimiento de las interrelaciones entre los distintos efectores. Las enzimas estudiadas fueron las de *E. coli* y *A. tumefaciens*.

En relación a los mecanismos moleculares y los residuos implicados en la activación de la enzima de *E. coli* surgió una hipótesis de trabajo a partir de resultados obtenidos con una mutante de inserción que mostraron, como cambio fundamental, la insensibilidad a la activación por FBP. La secuencia de inserción se localizó en un *loop* adyacente a otros dos *loops* que contienen los residuos conservados Gln⁷⁴ y Trp¹¹³, respectivamente. El comportamiento de las enzimas mutantes sitio dirigidas correspondientes, Q74A y W113A, fue similar ya que mostraron una falta de sensibilidad tanto a la activación por FBP como al efecto inhibitorio que ejerce el AMP en presencia de este activador. Los resultados obtenidos por electroforesis capilar de afinidad mostraron que la ausencia de activación no se debe a fallas en la unión ya que las enzimas mutantes unen FBP y PLP (análogo de la FBP y activador de la enzima). Más aún, el cálculo efectuado de las constantes de disociación aparentes para la FBP, arrojó valores sólo 3 veces superiores respecto de la enzima salvaje. Por otro lado, la determinación del número de moléculas unidas de

activador por molécula de enzima, reforzó lo postulado acerca de que la FBP y el PLP se estarían uniendo al mismo sitio, o a sitios espacialmente muy cercanos en la estructura. En base a estos resultados se construyó un modelo molecular tridimensional para la ADP-Glc PPasa de *E. coli*, en el que se muestran las conformaciones que adoptan los *loops* que contienen a los residuos Gln⁷⁴ y Trp¹¹³, en presencia y ausencia del activador. El modelo sugiere que las interacciones entre estos *loops*, fundamentalmente de tipo puente hidrógeno, juegan un papel crítico para la propagación de la activación alostérica desde el lugar de unión de la FBP al sitio activo.

Se estudiaron también las mutantes Q67A y W106A de la enzima de *A. tumefaciens*, homólogas a las Q74A y W113A de la enzima de *E. coli*. La activación por F6P se vio afectada en ambas enzimas mutantes, lo que nos permiten inferir que, de manera análoga a lo que sucede en la activación por FBP para la enzima de *E. coli*, tanto la Gln⁶⁷ como el Trp¹⁰⁶ estarían involucrados en la transmisión de la señal inducida por la F6P sobre esta enzima. La activación por Pyr también se vio afectada negativamente por esas mutaciones, pero de manera diferente según sea la Gln⁶⁷ o el Trp¹⁰⁶ el residuo mutado. Estos resultados sugieren que esta respuesta diferencial de las enzimas mutantes se debería entonces a diferencias en los mecanismos de activación entre uno y otro efector, que utilizarían diferentes vías de transmisión de la señal alostérica al sitio activo.

Para profundizar en el conocimiento del mecanismo molecular de regulación se diseñaron dobles mutantes de la enzima de *E. coli*, las que combinan en su secuencia una mutación que aisladamente les confiere preactivación, junto a una mutación que les confiere insensibilidad frente al activador. Nuevamente se evidenció la relevancia de los residuos Gln⁷⁴ y Trp¹¹³ para que se produzca, en forma importante, tanto la activación por FBP como la inhibición que ejerce el AMP en presencia de ésta. Además se puso en evidencia que los mecanismos de activación que operan en las mutantes preactivadas estudiadas, la N-Δ15 y la G336D, son diferentes.

El Mg²⁺ es un activador esencial de las ADP-Glc PPasas pero se desconocía qué residuos eran importantes para su unión. En base al modelado molecular de la enzima de *E. coli* y superposición con las estructuras tridimensionales de otras nucleotidil-transferasas co-cristalizadas con metal, se puso en evidencia que tanto el Asp¹⁴² como el Asp²⁷⁶

ocupaban posiciones homólogas a los residuos ácidos que interactuaban con el metal en las estructuras cristalinas. Para investigar este posible rol del Asp²⁷⁶ con el Mg²⁺, se practicaron cortes oxidativos con iones metálicos sobre la enzima salvaje y el análisis por SDS-PAGE mostró la aparición de dos fragmentos principales. Experiencias de modificación oxidativa realizadas sobre las enzimas mutantes D276N y D276E sumado al hecho de que tanto el agregado de Mg-ATP como de Mg²⁺ en altas concentraciones protege a la enzima del corte, confirman la importancia del residuo Asp²⁷⁶ en la coordinación del metal.

Con relación a la enzima de *A. tumefaciens*, un aspecto a dilucidar era la existencia de posibles efectos entre los dos activadores principales, la F6P y el Pyr. Al estudiarse la activación simultánea de la enzima se observó que los activadores presentaron efectos cooperativos positivos mutuos en la etapa de unión y efectos no aditivos en la etapa catalítica. Resultó interesante que a elevadas concentraciones de ambos activadores, la velocidad límite alcanzada fue la correspondiente a la obtenida sólo en presencia de Pyr; lo que sugiere un fenómeno de dominancia de la conformación y/o del camino de activación inducidos por este activador. A pesar de que el Pyr activa un número menor de veces que la F6P, nuestros resultados indican que, en presencia de ambos activadores, el Pyr es el activador principal. Se puede hipotetizar que este comportamiento observado *in vitro* ocurre también *in vivo*.

Estudios previos indicaron la relevancia de residuos ubicados en el surco comprendido entre los dominios N- y C- terminal, tanto para la activación por FBP en la enzima de *E. coli*, como por F6P en la de *A. tumefaciens*. Entre esos residuos importantes se encuentra el Asp³⁷⁸ en la enzima de *A. tumefaciens*. Con el objetivo de verificar la relevancia de este residuo y analizar el rol de su homólogo en *E. coli*, el Asp³⁸⁵, se realizó la mutagénesis sitio-dirigida en ambas enzimas, obteniéndose las mutantes D378A y D385A, respectivamente. El efecto de las mutaciones en los residuos homólogos fue distinto entre ambas enzimas y del análisis de las estructuras tridimensionales se postuló que esto se debería a diferencias en los puentes salinos que se forman entre residuos pertenecientes a cada uno de los dominios, en cada enzima.

Se encontraron nuevos efectores de la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens*, entre ellos la

R5P que produce un efecto activador importante, mientras que los compuestos PEP y 3PGA producen un efecto de inhibición sobre la enzima. Relacionando el hallazgo de estos nuevos efectores con el metabolismo de la bacteria se puede concluir que la regulación alostérica de la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens*, enzima clave en la síntesis de glucógeno, estaría gobernada por los niveles de intermediarios de la vía glucolítica de Entner-Doudoroff en conexión con la ruta de las pentosas fosfato.

2. ABSTRACT

Experimental evidence showed that the major regulatory step in the synthesis of glycogen in bacteria and starch in plants corresponds to the formation of ADP-Glc, catalyzed by the ADP-Glc PPase enzyme. This enzyme catalyzes the formation of ADP-Glc and PPi from Glc1P and ATP. The enzymatic reaction is carried out in the presence of a divalent metal ion, mainly Mg^{2+} . Bacterial and plants ADP-Glc PPases are allosterically regulated by modulators that share the characteristic of being intermediates of the main path of carbon assimilation in the cell considered. The ADP-Glc PPases are classified in nine different groups, based on the allosteric regulators specificity, and some of them show sensitivity to more than one positive or negative modulator. Deciphering the interrelationships between the effectors is necessary to understand the control of the enzyme activity and hence conditions leading to polysaccharide synthesis.

This thesis was conceived with the aim of expanding the knowledge of the interactions between the different effectors as well as to understand the molecular mechanism of allosteric regulation of ADP-Glc PPases. The studies were performed on two bacterial enzymes, the *E. coli* and *A. tumefaciens* ADP-Glc PPases.

Regarding the molecular mechanisms and the residues involved in the activation of the *E. coli* enzyme, a working hypothesis arose from the results obtained from an insertion mutant, in which the insertion relapsed in a loop adjacent to two other loops containing the conserved residues Gln⁷⁴ and Trp¹¹³, respectively. The main effect of the insertion was conferring insensitivity to FBP activation. Similarly, the corresponding site-directed mutant enzymes, Q74A and W113A, showed a lack of sensitivity to activation by FBP and to the inhibitory effect exerted by AMP in the presence of this activator. The results obtained by affinity capillary electrophoresis showed that the failure in activation was not due to lack of FBP binding. The mutant enzymes bind FBP and PLP (FBP analog and enzyme activator) with apparent dissociation constants for FBP only 3 times higher than the observed for the wild type enzyme. On the other side, the estimated number of activators bound per molecule of enzyme reinforced the idea that FBP and PLP bind to the same site or to very close sites in the enzyme structure.

Based on these results we built a tridimensional molecular model for the *E. coli* ADP-Glc PPase, showing the conformations adopted by the loops containing the residues Gln⁷⁴ and Trp¹¹³ in presence and absence of the activator. The model suggests that the interactions between the mentioned loops, mainly hydrogen bond type, play a critical role in the propagation of allosteric activation from FBP binding site to the active site.

We also studied the *A. tumefaciens* mutants of ADP-Glc PPase, Q67A and W106A respectively homologous to the *E. coli* mutants Q74A and W113A. F6P activation was affected in both enzymes which allow us to infer that, analogous to what happens in the FBP activation for *E. coli* enzyme, both residues, the Trp¹⁰⁶ and Gln⁶⁷ would be involved in the transmission of the F6P induced signal on this enzyme. Pyr activation was also negatively affected by these mutations, but in a different way depending on whether Gln⁶⁷ or Trp¹⁰⁶ was the mutated residue. Then, we propose that this differential response of the mutant enzymes can be attributed to differences in the mechanisms of activation of each effector, which probably utilize different routes for allosteric signal transmission to the active site.

To better understand the molecular mechanism of regulation, double mutants from *E. coli* enzyme were designed, combining in their sequences one mutation which induces a pre-activated state with another mutation that confers insensitivity to the activator. Once more, the results obtained after the kinetic characterization showed the relevance of residues Gln⁷⁴ and Trp¹¹³ in FBP activation and AMP inhibition in the presence of this activator. It also revealed that the activation mechanisms operating in pre-activated mutants (N-Δ15 and G336D) are different.

Mg²⁺ is an essential activator for the ADP-Glc PPases but the key residues for the metal binding were still unknown. Based on molecular modeling of *E. coli* ADP-Glc PPase and its overlap with the three-dimensional structures of other nucleotidyl-transferases co-crystallized with metal, it became clear that the Asp¹⁴² and Asp²⁷⁶ were in homologous positions to the acidic residues that interacted with the metal in the crystal structures. To investigate the possible role of Asp²⁷⁶ in Mg²⁺ binding, oxidative cleavage with metal ions was performed on the wild type enzyme and SDS-PAGE analysis showed two major fragments. High concentrations of Mg²⁺ and the addition of Mg-ATP to the preincubation

mix protected the enzyme from this cleavage. These results, along with those obtained by oxidative modification of the mutant enzymes D276N and D276E, support the importance of residue Asp²⁷⁶ in metal coordination.

Regards the *A. tumefaciens* enzyme, the existence of coupled effects between the two major activators, F6P and Pyr was an interesting issue to clarify. We studied the simultaneous activation of the enzyme and observed that activators showed mutual positive cooperative effects in the binding step and non-additive effects in the catalytic step. At high concentrations of both activators, the limiting rate reached was the corresponding to that obtained in the presence of only Pyr, suggesting a dominance phenomenon of the conformation or the activation pathway induced by Pyr. Despite Pyr activation fold is smaller than the corresponding to F6P, when both activators are present, our results indicate that Pyr is the main activator. It can be hypothesized that this behavior observed *in vitro*, also occurs *in vivo*.

Previous studies showed the relevance of residues located in the groove between the N- and the C-terminal domains in the activation of the *E. coli* enzyme by FBP as well as in the activation of the *A. tumefaciens* enzyme by F6P. One of those residues in the *A. tumefaciens* enzyme is Asp³⁷⁸. To verify the relevance of this Asp and its homologous in the *E. coli* enzyme, Asp³⁸⁵, the corresponding site-directed mutants, D378A and D385A, were obtained and characterized. The results showed that the mutations of the homologous residues affected each enzyme in a different way. From the analysis of the tridimensional structure we postulated that the different behaviour may arise from differences in the salt bridges that are possible to form between the residues belonging to each one of the domains of each of the enzymes.

A characterization of the *A. tumefaciens* ADP-Glc PPase enzyme regulation by new effectors was performed. The results showed that R5P produced a significant activating effect whereas PEP and 3PGA produced an inhibitory effect on the enzyme. Correlating the discovery of these novel effectors with the metabolism of the bacteria, we can say that the allosteric regulation of the ADP-Glc PPase from *A. tumefaciens*, the key enzyme in glycogen synthesis, would be governed by the levels of intermediates of the Entner-Doudoroff glycolytic pathway in connection with the pentose- phosphate route.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono o sacáridos son componentes esenciales de todos los organismos vivos y, de hecho, constituyen la clase más abundante de moléculas biológicas presentes en la Tierra. La palabra sacárido deriva del griego *sakcharon*, que significa azúcar. La expresión literal “hidrato de carbono” surge de su composición química que en términos generales es $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (Voet y Voet, 2006). Químicamente son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas o sustancias que al hidrolizarse liberan estos compuestos. Algunos contienen además nitrógeno, fósforo o azufre (Nelson y col., 2004). Una de las características principales de los hidratos de carbono, asociada con la funcionalidad de los mismos, es la de poder formar polímeros unidos por enlaces glucosídicos. Según su grado de complejidad, los hidratos de carbono pueden clasificarse en sacáridos simples (monosacáridos) y en sacáridos complejos (disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos) (Voet y Voet, 2006).

Los monosacáridos son unidades monoméricas de sacáridos, constituidos por cadenas lineales de 3 a 7 carbonos. Dentro los más importantes figuran la glucosa (Glc) y la fructosa (Fru). A menudo, son sus derivados fosforilados, los que intervienen en los pasos de síntesis y metabolismo. La fosforilación activa al monosacárido para una posterior transformación química y lo atrapa dentro de la célula. La glucosa-1-fosfato (Glc1P), la glucosa-6-fosfato (Glc6P), el 3-fosfoglicerato (3PGA) y la dihidroxiacetona-fosfato son ejemplos de monosacáridos esenciales en el metabolismo celular.

Los disacáridos consisten en dos monosacáridos unidos covalentemente por un enlace O-glicosídico, cuando un grupo hidroxilo de uno de ellos reacciona con el carbono anomérico del otro, o ambos carbonos anoméricos reaccionan entre sí. La oxidación del carbono anomérico del azúcar por un ion cúprico o férrico (reacción que define un azúcar reductor) se produce sólo con la forma lineal, que existe en equilibrio con la forma cíclica. Por lo tanto, un disacárido en el cual los carbonos anoméricos de ambos monómeros estén involucrados en el enlace glicosídico, será un azúcar no reductor, ya que no dispone de un grupo aldehído libre (Nelson y col., 2004). La sacarosa (Glc- α -1,2- β -Fru),

conocida como azúcar de mesa, es un disacárido de especial importancia. Se la encuentra en el mundo vegetal, siendo uno de los productos directos de la fotosíntesis que estos realizan, constituyendo la principal forma de transporte de azúcares desde las hojas hacia otras partes de la planta. Otros disacáridos de importancia son la maltosa (Glc- α -1,4-Glc), que proviene principalmente de la degradación del almidón por acción de la β -amilasa, y la lactosa (Gal- β -1,4-Glc), que se encuentra naturalmente en la leche de mamíferos (Berg y col., 2002; Nelson y col., 2004). Particular interés ha despertado el disacárido no reductor trehalosa (Glc- α -1,1- α -Glc), llamada “el azúcar de la resurrección” (Valenzuela A y Valenzuela S, 2009). Este disacárido se encuentra presente en organismos tan variados como bacterias, algas, levaduras, hongos y algunos invertebrados. Muchas de estas especies pueden sobrevivir en condiciones adversas, en particular ante la falta de agua o anhidrobiosis, y se sabe que dicha capacidad es otorgada, en gran parte, por la trehalosa. Este disacárido preserva las biomoléculas mediante la captación de moléculas de agua en la superficie de las mismas. Cuando el medio experimenta deshidratación, el disacárido resguarda la estructura tridimensional de proteínas y membranas, manteniéndolas funcionales hasta que nuevamente entren en contacto con agua. Además, la trehalosa posee propiedades químicas útiles como para ser utilizada como conservador de alimentos, pues no produce oscurecimiento ni afecta el sabor de los mismos (Valenzuela A y Valenzuela S, 2009).

Los oligosacáridos consisten de cadenas cortas de uniones de monosacáridos, que poseen entre tres y veinte unidades. En las células, la mayor parte de estos compuestos no se encuentra como entidades libres sino unidas a moléculas de lípidos o proteínas, a través de enlaces O- o N-glicosídicos, formando los glicoconjugados. Entre sus principales funciones se mencionan la de ser parte constituyente de receptores celulares y participar del reconocimiento y transferencia de información entre células (Berg y col., 2002; Voet y Voet, 2006).

Los polisacáridos son polímeros que contienen más de 20 unidades de monosacáridos, pudiendo llegar a contener cientos o miles de ellas. Difieren entre sí en el tipo de monosacárido constituyente, en la longitud de sus cadenas, en el tipo de unión y en el grado de ramificación. Según la homogeneidad del monosacárido constituyente, se los puede clasificar en homo o heteropolisacáridos. (Voet y Voet, 2006).

Los homopolisacáridos de la D-Glc, denominados glucanos, son los polisacáridos más abundantes en la naturaleza; siendo el glucógeno, el almidón y la celulosa los cuantitativamente más importantes. A pesar de estar constituidos por las mismas unidades monosacáridas, los distintos enlaces glucosídicos que presentan, determinan diferencias estructurales biológicamente importantes. El glucógeno y el almidón, con enlaces tipo α -glucosídicos, adquieren una estructura tridimensional en forma de hélice. A modo de ejemplo, en la Figura 3.1 se muestra la conformación helicoidal que adquiere la amilosa, uno de los constituyentes del almidón. Esta conformación es muy útil para la función de almacenaje de carbono y energía que éstos desempeñan (se detalla más abajo, en la Sección 3.2.1). En tanto que los enlaces del tipo β -glucosídicos de la celulosa le permiten formar cadenas lineales paralelas que interaccionan entre sí a través de puentes de hidrógeno (Figura 3.2). Esta conformación resulta óptima para la construcción de fibras con alta resistencia a la tracción y de esta manera, al ser la celulosa el principal componente de las paredes celulares de plantas y algas, puede proporcionar sostén mecánico y protección frente a los fenómenos osmóticos desfavorables.

Otro homopolisacárido cuantitativamente importante es la quitina, constituida por residuos de N-acetilglucosamina unidos por enlaces β -1,4. Es el componente estructural principal del exoesqueleto de invertebrados tales como crustáceos, insectos y arañas y un componente importante de las paredes celulares de gran parte de los hongos y de las algas (Voet y Voet, 2006).

Dentro de los heteropolisacáridos de importancia se encuentra la mureína (también llamado peptidoglicano), formada por unidades repetitivas de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina, entrecruzadas por peptidos cortos, constituyendo las paredes rígidas de las bacterias. Otros, como el ácido hialurónico, constituido por unidades alternantes de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, actúa como lubricante en el líquido sinovial presente en las articulaciones y forma parte de la matriz extracelular de cartílagos y tendones (Nelson y col., 2004).

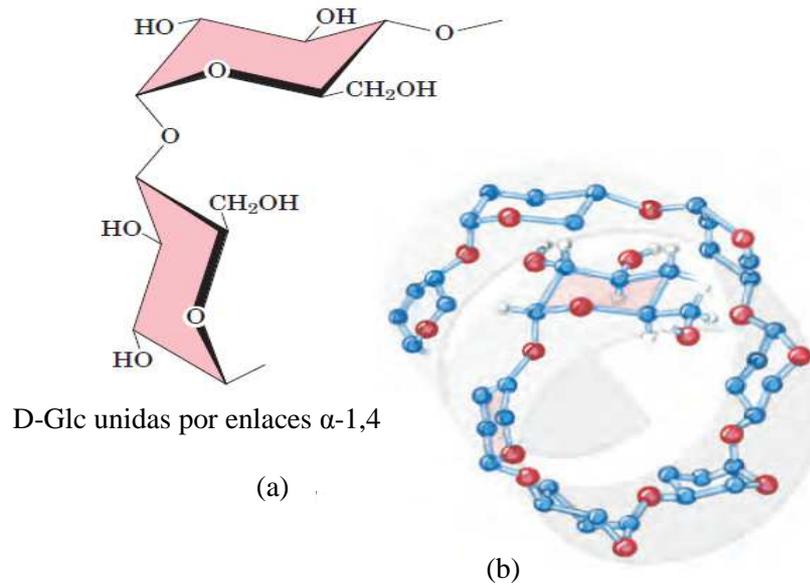


Figura 3.1. Estructura de la amilosa (a): posición relativa que adquieren dos unidades consecutivas de Glc unidas por enlaces α -1,4 (b): conformación tipo hélice determinada por las uniones α -1,4. Figura adaptada de (Nelson y col., 2004)

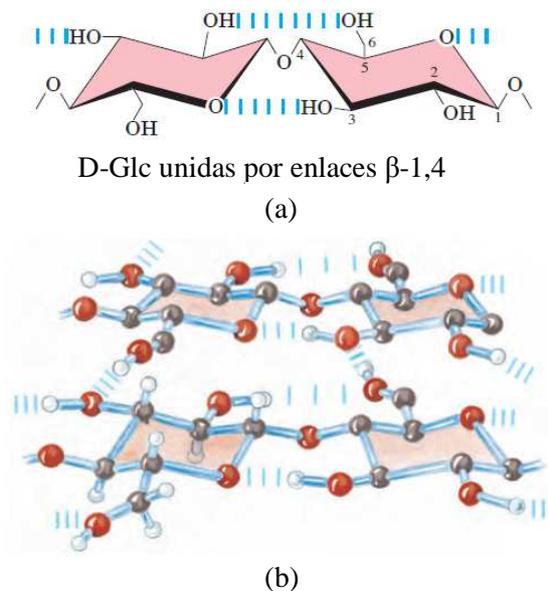


Figura 3.2. Estructura de la celulosa. (a): posición relativa que adoptan dos unidades de Glc unidas por enlaces β -1,4. (b): interacciones que se establecen entre dos cadenas lineales paralelas. Tanto en (a) como en (b) se muestran las interacciones puente de hidrógeno. Figura modificada de (Nelson y col., 2004).

3.2. Polisacáridos de reserva

3.2.1. Estructura y función

La mayoría de los organismos vivos acumulan reservas de carbono y energía para hacer frente a condiciones temporalmente adversas en el medio que los rodea (Preiss, 1984; Iglesias y Preiss, 1992). Estas reservas están constituidas principalmente por α -1,4-poliglucanos. Los animales, hongos y bacterias (incluyendo las cianobacterias) y las arqueobacterias acumulan glucógeno; mientras que en algas verdes y plantas el almidón es el principal polisacárido de reserva (Ballicora y col., 2004).

La estructura del glucógeno bacteriano ha sido menos estudiada que la de los mamíferos, pero los datos disponibles apuntan a la similitud entre ellos (Melendez y col., 1998; Preiss, 2006). El glucógeno es un homopolímero de alta masa molecular (10^7 - 10^9 Da), formado por residuos de α -D-Glc, unidos por enlaces α -1,4 glucosídicos, que presenta ramificaciones α -1,6 glucosídicas cada ocho a doce unidades de Glc (Iglesias y Preiss, 1992). La molécula de este compuesto altamente ramificado, posee una forma casi esférica (Figura 3.3), con sus cadenas organizadas en capas concéntricas (Melendez y col., 1997). Debido a que cada ramificación termina en un extremo no reductor, la molécula de glucógeno tiene tantos extremos no reductores como ramificaciones haya, pero sólo un extremo reductor. Cuando el glucógeno se utiliza como fuente de carbono y energía, las unidades de Glc son separadas a partir de estos extremos no reductores. De este modo, las enzimas degradativas que actúan sólo sobre los extremos no reductores, pueden procesar simultáneamente varias ramas, acelerando la utilización del polímero (Nelson y col., 2004). Lo mismo ocurre en la síntesis del polisacárido, ya que la enzima glucógeno sintasa produce la elongación de las cadenas formando uniones α -1,4 en los extremos no reductores.

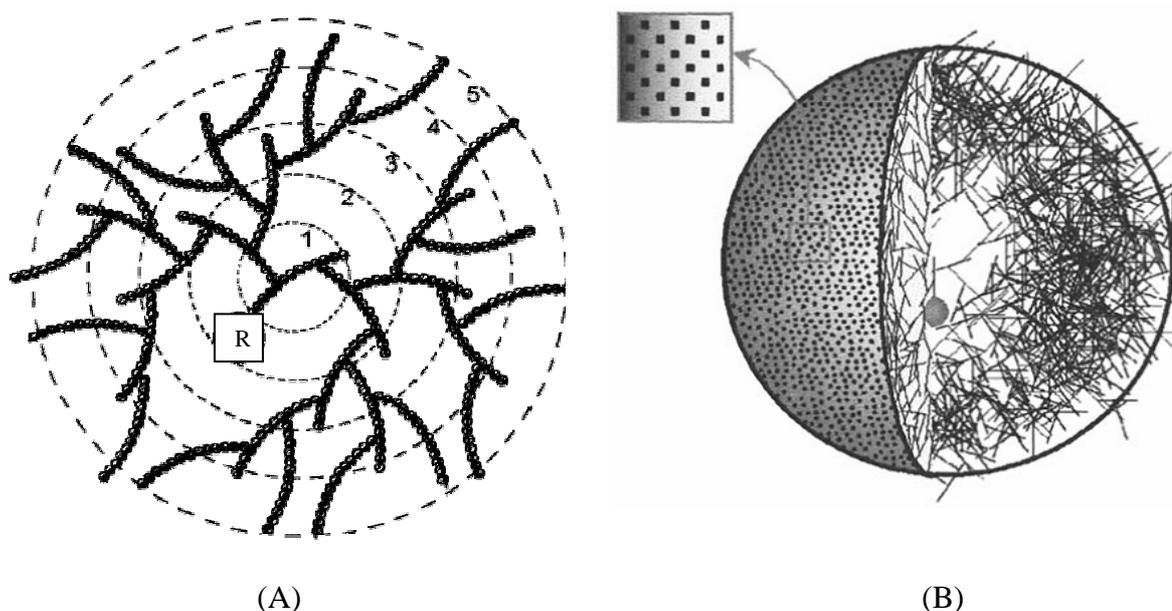


Figura 3.3. Estructura del glucógeno. (A): esquema de la molécula de glucógeno, con forma circular y una disposición en capas (en línea punteada), de las cuales sólo se representan cinco de ellas; R: simboliza la molécula de Glc con el carbono anomérico libre (extremo reductor del glucógeno) (B): corte de la molécula de glucógeno, nótese que el extremo reductor se localiza en el centro, mientras que los extremos no reductores terminales de la última capa forman una superficie sobre la cual pueden actuar las enzimas. Figuras adaptadas de: (A), (Melendez y col., 1998); (B), (Melendez y col., 1999).

El rol preciso del glucógeno en bacterias no está claramente definido. Se postula que su presencia sirve para la preservación de aquellos componentes celulares que se degradan para obtener energía durante períodos de carencia, fundamentalmente durante la fase estacionaria (Preiss, 2006). Esto se basa en experiencias realizadas en condiciones de escasez, donde bacterias como *E. coli* y *Enterobacter aerogenes*, que contienen glucógeno, no degradan su ARN ni sus componentes proteicos a amonio, tal como lo hacen aquellas células que no lo contienen (Ribbons y Dawes, 1963; Strange, 1968). En algunas bacterias la acumulación de glucógeno se produce cuando el crecimiento se atenúa o cesa por carencia de nutrientes esenciales como fósforo, nitrógeno o azufre (Preiss, 2006) combinado con la presencia de una fuente de carbono en exceso. Por esto, la acumulación de glucógeno en bacterias se produciría principalmente en la fase estacionaria de crecimiento (Preiss, 1984; Iglesias y Preiss, 1992; Ballicora y col., 2003a). Sin embargo, en *Streptococcus mitis* (Gibbons y Kapsimalis, 1963), *Mycobacterium smegmatis* (Belanger y Hatfull, 1999) y *Rhodopseudomonas capsulata* (Eidels y Preiss, 1970), se

observó que los niveles óptimos de acumulación del glucógeno se producen en la fase exponencial del crecimiento.

En *Bacillus subtilis*, la síntesis de glucógeno ha sido asociada con la esporulación, suministrando los recursos necesarios para conducir a la diferenciación (Kiel y col., 1994). En *Streptococcus mutans* se ha observado que un polisacárido intracelular similar al glucógeno juega un rol central en la capacidad cariogénica de la bacteria (Spatafora y col., 1995). En *Salmonella enteritidis* se ha informado sobre una relación entre la síntesis de glucógeno y la formación de *biofilms* y virulencia de esta cepa. (Bonafonte y col., 2000). Más recientemente, en *Mycobacterium tuberculosis* se ha demostrado que la síntesis de poliglucanos α -1,4 ramificados es esencial para la supervivencia de la bacteria (Sambou y col., 2008). Este microorganismo posee dos genes que codifican para enzimas α -1,4 glucosiltransferasas, que intervienen en la síntesis de estos poliglucanos, entre los que se encuentra el glucógeno. Los autores observaron que, como consecuencia de la anulación de estos dos genes, mediante la técnica del *knockout* por recombinación homóloga, no se recuperaron células viables. Lo mismo ocurrió al hacer el *knockout* del gen *glgB* que codifica para la enzima ramificante. Basándose en estas experiencias, los autores del trabajo afirman que la producción de poliglucanos α -1,4 de cadena ramificada, es un requerimiento fisiológico esencial del bacilo tuberculoso.

El almidón está presente en plantas, en muchos de sus tejidos y órganos tales como hojas, frutos, granos, brotes, raíces y tallos (Iglesias y Preiss, 1992). Está constituido por dos tipos de polímeros de Glc, la amilosa y la amilopectina. Ambas moléculas están compuestas de unidades polimerizadas mediante uniones α -1,4. La amilosa es esencialmente una cadena lineal con pocas uniones α -1,6 mientras que la amilopectina se encuentra altamente ramificada mediante uniones α -1,6 cada 25-30 residuos de Glc (Figura 3.4). Como se mencionó anteriormente, debido a que las uniones son de tipo α , ambas adquieren una estructura helicoidal. En el gránulo de almidón, se encuentran distribuidas radialmente, de forma tal que sus extremos reductores se orientan hacia el centro, mientras que los extremos no reductores, donde ocurre la síntesis y la degradación, quedan orientados hacia afuera. (Iglesias y Preiss, 1992).

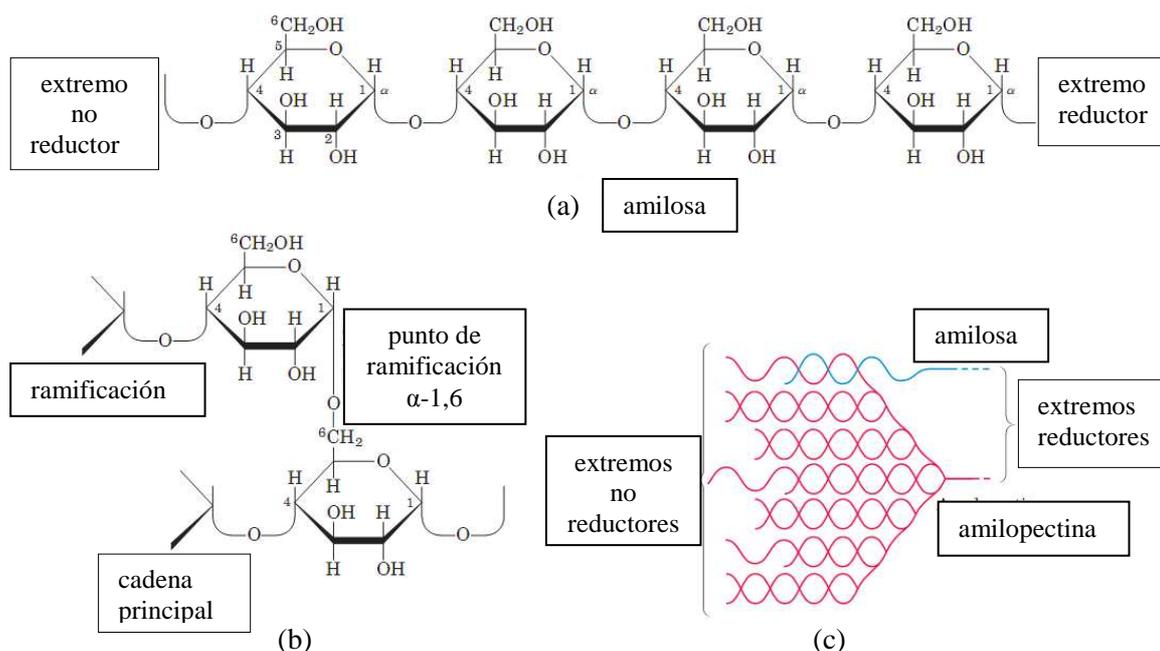


Figura 3.4. (a): pequeño segmento de la cadena de amilosa donde se observa el tipo de unión α -1,4 que se establece entre las moléculas de D-Glc. (b): enlaces α -1,6 presentes en la amilopectina (c): esquema donde se muestra la estructura que tendría el almidón. La amilopectina (en rojo) adquiere una estructura helicoidal, interaccionando consigo misma y con la hélice de amilosa (en azul). Figura adaptada de (Nelson y col., 2004).

Los procesos biosintéticos del almidón se realizan dentro de los plástidos, cloroplastos en los tejidos que realizan fotosíntesis y amiloplastos en los tejidos de reserva. En las hojas, la síntesis se realiza durante el día a partir de azúcares-P provenientes de la fijación fotosintética del carbono y la acumulación del polisacárido es transitoria. La degradación se produce en oscuridad, obteniéndose productos que, en su mayoría, se utilizan para la síntesis de sacarosa (Ballicora y col., 2004). En los órganos de almacenamiento, tales como frutos o semillas, la síntesis de almidón se produce durante el desarrollo (Sivak y Preiss, 1998). En el momento de la germinación de las semillas o tubérculos, o de maduración de los frutos, el almidón es degradado y utilizado como fuente de carbono y energía. En estos tejidos de almacenamiento los procesos de biosíntesis y degradación del almidón guardan una separación temporal mayor que la que ocurre en los tejidos fotosintéticos (Ballicora y col., 2004). Los gránulos de almidón en los tejidos de almacenamiento pueden variar en forma, tamaño y composición dependiendo de la planta de origen, pudiéndose observar diferencias entre los distintos tejidos de una misma planta (Ballicora y col., 2004).

El cúmulo de polisacáridos como reserva presenta la ventaja de afectar de modo insignificante la presión osmótica interna celular debido a sus elevados pesos moleculares (Iglesias y Preiss, 1992). Un ejemplo extraído de (Nelson y col., 2004) es ilustrativo acerca de las ventajas de almacenar Glc en forma polimérica. Se ha calculado que los hepatocitos almacenan glucógeno equivalente a una concentración 0,4 M de Glc, en cambio, la concentración de glucógeno es de aproximadamente 0,01 μ M. Esto último, sumado a que el glucógeno es relativamente menos soluble, hace que su acumulación apenas contribuya a la osmolaridad del citosol. Si en el citosol hubiera 0,4 M de Glc, la osmolaridad sería tan elevada que provocaría una entrada masiva de agua, lo que llevaría a la lisis celular. Por otro lado, la concentración de Glc en el exterior celular en sangre de mamíferos es de aproximadamente 5 mM, por lo que, el cambio de energía libre necesario para ingresar Glc a la célula en contra de este gradiente elevado, sería prohibitivo.

3.2.2. Biosíntesis de α -1,4 poliglucanos.

Las rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos se dilucidaron luego del descubrimiento de los nucleósido-difosfo-azúcares por L.F. Leloir y colaboradores, en la década de 1950 (Leloir, 1971). Se demostró que la ruta de síntesis utilizaba una forma activada de Glc y se estableció claramente que la biosíntesis y la degradación del glucógeno en mamíferos ocurrían por caminos diferentes. En estudios realizados con extractos de hígado de mamíferos se determinó que la UDP-Glc era el donante de grupos glucosilo para la síntesis del glucógeno (Leloir y Goldemberg, 1960). En un primer momento, a partir de extractos de plantas, se informó que la incorporación de los residuos glucosilo al almidón también se producía utilizando UDP-Glc (Leloir y col., 1961); pero estudios posteriores (Recondo y Leloir, 1961) demostraron que la ADP-Glc era un mejor sustrato para esta síntesis. Posteriormente, se aisló ADP-Glc a partir de extractos de maíz (Recondo y col., 1963) y se identificó por primera vez la enzima involucrada en su síntesis, la ADP-Glc pirofosforilasa (ADP-Glc PPasa) (Espada, 1962). Otros trabajos (Sigal y col., 1964), al estudiar cepas mutantes de *E. coli* que presentaban una deficiencia en la síntesis de UDP-Glc pero niveles normales de glucógeno, encontraron grandes cantidades de la enzima glucógeno sintasa específica para ADP-Glc y de la enzima ADP-Glc PPasa.

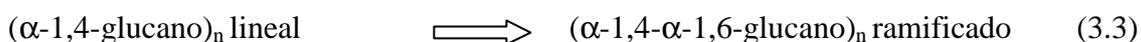
En función de lo expuesto, se pudo establecer que la síntesis de polisacáridos de reserva en bacterias y plantas (glucógeno y almidón, respectivamente) ocurre principalmente, mediante la utilización de ADP-Glc como dador de residuos glucosilo para la elongación de una cadena α -1,4 preformada (Ballicora y col., 2003a; , 2004), a diferencia de lo que ocurre en las células animales, hongos y organismos eucariotas heterotróficos que utilizan UDP-Glc (Iglesias y Preiss, 1992; Ballicora y col., 2003a).

3.2.2.1. Biosíntesis de α -1,4 polisacáridos en bacterias y plantas

La biosíntesis de glucógeno bacteriano y de almidón en vegetales, que utiliza ADP-Glc como donante glucosídico, comprende las siguientes etapas:

- (1) síntesis de la molécula de Glc activada, donde a partir de una molécula de azúcar-P se obtiene el nucleósido difosfo-Glc (NDP-Glc).
- (2) transferencia del grupo glucosilo desde la molécula de NDP-Glc hacia el α -1,4 polisacárido preformado.
- (3) remodelado de la estructura del polisacárido, con la producción de las ramificaciones.

La secuencia de reacciones metabólicas involucradas en el proceso es:



Las enzimas que catalizan los distintos pasos son:

(3.1) ADP-Glc PPasa [ATP: α -D-Glc1P adenililtransferasa; EC 2.7.7.27]

(3.2) Glucógeno/almidón sintasa [ADP-Glc: 1,4- α -D-glucano-4- α -D-glucosiltransferasa; EC 2.4.1.21].

(3.3) Enzima ramificante [1,4- α -D-glucógeno: 1,4- α -D-glucógeno-6- α -1,4- α -D-glucógeno transferasa; EC 2.4.1.18].

La regulación de la síntesis de glucógeno se produce en distintos niveles, según el organismo. En mamíferos y eucariotas heterótrofos, la regulación ocurre a nivel de la glucógeno sintasa, mediante fosforilación/desfosforilación y regulación alostérica (Preiss y Romeo, 1989; Voet y Voet, 2006). En cambio, en bacterias y plantas, el paso regulatorio es la producción de ADP-Glc, a nivel de la reacción catalizada por la enzima ADP-Glc PPasa y ocurre principalmente por regulación alostérica mediada por metabolitos relacionados con la vía principal de utilización del carbono en el respectivo organismo (Sivak y Preiss, 1998).

La glucógeno sintasa de bacterias y la almidón sintasa de plantas catalizan la segunda etapa en la biosíntesis del respectivo polisacárido de reserva, que consiste en transferir la Glc activada hacia el extremo no reductor de una molécula de poliglucano en crecimiento. Son enzimas no reguladas, que utilizan ADP-Glc como principal donante glucosídico. Tal como se detalló en la Sección 3.2.2, la reacción de la almidón sintasa fue descrita por primera vez utilizando UDP-Glc como dador de grupos glucosilo (Leloir y col., 1961), pero poco después se demostró que la ADP-Glc resultaba ser más eficiente en términos de V_{max} y K_m (Recondo y Leloir, 1961). Ambas glucosiltransferasas conservan la configuración del carbono anomérico de la molécula de Glc que transfieren.

La enzima ramificante cataliza el último paso en la biosíntesis del glucógeno y de la amilopectina. La reacción que cataliza consta de dos etapas: la primera es el corte de la unión α -1,4 glucosídica para luego transferir el oligosacárido y establecer la unión α -1,6 responsable de que estos polisacáridos presenten ramificaciones en su estructura. Se ha informado la presencia de un solo gen (*glgB*) en bacterias y más de dos genes en plantas superiores (Sivak y Preiss, 1998). Como se mencionó anteriormente, el glucógeno bacteriano presenta un patrón de ramificación diferente al de la amilopectina. Mientras que en el glucógeno las ramificaciones son más cortas y las uniones α -1,6 representan alrededor del 10% del total de enlaces glucosídicos, en la amilopectina estos enlaces representan aproximadamente un 5% del total de uniones (Sivak y Preiss, 1998). Estas diferencias pueden atribuirse al hecho de que la enzima ramificante presente diferente especificidad con respecto a la cadena a transferir, o al tipo de interacción que establece con la glucógeno/almidón sintasa respectiva de cada organismo. Estudios realizados con

enzimas bacterianas truncas en el extremo N-terminal sugieren que esta región estaría involucrada en la determinación del tamaño de la cadena a transferir (Devillers y col., 2003).

3.3. ADP-Glc PPasa

Numerosas evidencias experimentales demostraron que el principal paso regulador en la síntesis de glucógeno en bacterias y de almidón en plantas corresponde a la formación de ADP-Glc. Como se mencionó previamente, esta reacción es catalizada por la enzima ADP-Glc PPasa (Preiss, 1984; Iglesias y Preiss, 1992; Preiss y Romeo, 1994; Ballicora y col., 2004) siendo descrita por primera vez en poroto de soja (Espada, 1962). Preiss y colaboradores describieron el requerimiento de un ión metálico, fisiológicamente el Mg^{2+} , así como su reversibilidad *in vitro*, con una constante de equilibrio cercana a 1 (Preiss y col., 1966). Sin embargo, *in vivo*, la utilización del nucleótido-azúcar para la síntesis del polisacárido y la hidrólisis del PPI, debida a la presencia de pirofosfatasa inorgánica en la célula, desplazan el equilibrio hacia la síntesis de ADP-Glc (Iglesias y Preiss, 1992; Ballicora y col., 2003a; , 2004).

3.3.1. Clasificación según sus propiedades estructurales y regulatorias

La mayoría de las ADP-Glc PPasas caracterizadas hasta el momento están reguladas alostéricamente por moduladores que comparten la característica de ser intermediarios de la ruta principal de asimilación del carbono en la célula considerada (Iglesias y Preiss, 1992). Los activadores de la ADP-Glc PPasa generalmente son metabolitos que representan señales de alto contenido de carbono y energía dentro de la célula. Con los inhibidores ocurre lo opuesto, ya que son intermediarios que indican bajos niveles de energía metabólica. Estas propiedades reguladoras de la enzima, junto con el hecho de que el ATP es uno de los sustratos de la reacción, sugieren una adecuada utilización de la energía, indicando que la síntesis de polisacáridos de reserva en bacterias y plantas será máxima cuando la energía y el carbono celular estén en exceso, y viceversa (Iglesias y Preiss, 1992; Ballicora y col., 2003a; , 2004).

La especificidad hacia los metabolitos que se comportan como reguladores alostéricos sirvió como base para la clasificación de las ADP-Glc PPasas en 9 grupos o clases diferentes (Ballicora y col., 2003a). En la Tabla 3.1 puede apreciarse la clasificación más reciente, incluyendo los activadores e inhibidores, la principal vía de asimilación del carbono para cada célula y también la estructura cuaternaria reportada para cada enzima. Las enzimas incluidas en la clase I pertenecen a bacterias que realizan glucólisis clásica (de Embden-Meyerhof) (enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella enterica serovar typhimurium*) reguladas principalmente por fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) como activador y adenosina-5'-monofosfato (AMP) como inhibidor (Preiss y col., 1966). Están codificadas por un solo gen, lo que da lugar a un homotetrámero (α_4), con una masa molecular aproximada de 200 kDa (Ballicora y col., 2003a; Preiss, 2006). Otras bacterias que realizan glucólisis poseen ADP-Glc PPasas que pueden ser activadas por FBP y fructosa-6-fosfato (F6P) e inhibidas por ADP y AMP (clase II) o que son insensibles a los activadores pero inhibidas por AMP (clase III) (Ballicora y col., 2003a).

Las enzimas incluidas en la clase IV son aquellas provenientes de bacterias cuya ruta principal de utilización del carbono es la de Entner-Doudoroff, como en el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, y que son principalmente activadas por F6P y piruvato (Pyr) e inhibidas por ADP y AMP (Ballicora y col., 2003a) (Tabla 3.1). Los organismos de esta clase carecen de fosfofructoquinasa, por lo que la FBP no es un metabolito importante en la asimilación de las hexosas. Es interesante destacar que aquellas enzimas que provienen de bacterias capaces de utilizar tanto la vía de Embden-Meyerhof como la de Entner-Doudoroff son reguladas por los tres activadores: FBP, F6P y Pyr (clase V) (Ballicora y col., 2003a).

Como se muestra en la Tabla 3.1, la clase VI comprende enzimas de bacterias anaeróbicas, capaces de crecer bajo condiciones heterotróficas en oscuridad o en forma autotrófica en condiciones de luz (mediante fotosíntesis anoxigénica). Estos organismos no pueden catabolizar la Glc pero crecen muy bien con Pyr u otros ácidos tricarbóxicos como fuente de carbono y dadores de electrones para realizar la fotosíntesis. Estas enzimas son específicamente reguladas por Pyr (Ballicora y col., 2003b).

Agrupadas dentro de la clase VII están aquellas ADP-Glc PPasas provenientes de bacterias capaces de esporular, como las del género *Bacillus* (Tabla 3.1). Estos microorganismos sintetizan glucógeno durante las etapas tempranas de esporulación, un proceso que les permite sobrevivir cuando las condiciones del medio son hostiles (Takata y col., 1997). Bajo estas condiciones, la ruta principal para la utilización del carbono es el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Las enzimas de *Bacillus stearothermophilus* (Takata y col., 1996) y *Bacillus subtilis* (Kiel y col., 1994) pertenecen a este grupo. Se las considera un grupo especial de enzimas, dado que no serían reguladas por metabolitos y, además, por presentar una estructura heterotetramérica del tipo $\alpha_2\delta_2$ producto de la expresión de dos genes (*glgC* y *glgD*, respectivamente) (Ballicora y col., 2003a). Es importante resaltar que esta subunidad δ es diferente a la subunidad β encontrada en eucariotas fotosintéticos.

El último grupo de ADP-Glc PPasas bacterianas (clase VIII) son aquellas provenientes de cianobacterias, procariotas que realizan una fotosíntesis oxigénica, proceso semejante al que ocurre en plantas (Tabla 3.1). Estas enzimas poseen al 3PGA y al Pi como principales efectores, activador e inhibidor, respectivamente. Cabe destacar que esta especificidad de las enzimas de cianobacterias es idéntica a la que presentan las ADP-Glc PPasas de eucariotas fotosintéticos, tales como algas verdes y plantas superiores, también agrupadas en la clase VIII. Todos estos organismos utilizan el ciclo de Benson-Calvin para fotoasimilar el CO₂ atmosférico, donde el 3PGA es el primer producto intermediario. En general, las ADP-Glc PPasas de la clase VIII son reguladas por la relación 3PGA/Pi en condiciones fisiológicas, permitiendo que la enzima esté preferentemente activada durante el día e inhibida durante la noche (Iglesias y Preiss, 1992; Ballicora y col., 2004). En tejidos no fotosintéticos, pueden distinguirse dos tipos de enzimas. La enzima de tubérculo de papa es una de las más estudiadas y al ser activada por 3PGA e inhibida por Pi pertenece al grupo VIII (Iglesias y col., 1993; Ballicora y col., 1995). En cambio, las ADP-Glc PPasas provenientes de tejidos de reserva de cereales se agrupan en la clase IX

(Tabla 3.1), ya que exhiben propiedades regulatorias diferentes (Plaxton y Preiss, 1987; Kleczkowski y col., 1993a; Gomez-Casati y Iglesias, 2002). La caracterización de la ADP-Glc PPasa de endosperma de trigo (Gomez-Casati y Iglesias, 2002) mostró que la enzima es alostéricamente inhibida por Pi, ADP y FBP y que esta inhibición podía ser

revertida por 3PGA y F6P, aunque en ausencia de inhibidores estos últimos metabolitos no tienen efecto sobre la actividad de la enzima.

La enzima nativa de plantas y algas verdes, forma un heterotetrámero ($\alpha_2\beta_2$), que comprende dos tipos de subunidades que difieren en sus masas moleculares y en la secuencia de sus aminoácidos (Iglesias y Preiss, 1992; Ballicora y col., 2003a; , 2004). La subunidad denominada pequeña (α o *small*, 50-54 kDa) se encuentra altamente conservada (85 a 95% de identidad) y posee un rol esencialmente catalítico. La subunidad grande (β o *large*, de 51-60 kDa) está menos conservada (50 a 60% de identidad) atribuyéndosele, en un principio, un rol modulador sobre la subunidad α (Preiss y col., 1991). En general, en plantas superiores, existe un solo gen que codifica para la subunidad pequeña y más de uno que codifica para la subunidad grande. Se ha informado que en *Arabidopsis thaliana* (Crevillen y col., 2003; Crevillen y col., 2005) distintas subunidades grandes se expresan de manera diferencial en la planta y su asociación con la subunidad pequeña da origen a heterotetrámeros con distintas propiedades cinéticas y regulatorias, acordes a las necesidades de síntesis de almidón.

La similitud entre subunidad pequeña y grande (~50% de identidad) sugiere un ancestro en común para las mismas. Estudios realizados con la subunidad grande de la enzima de tubérculo de papa demostraron que ésta es capaz de ser “resucitada”, o sea, de recuperar su capacidad catalítica, al mutarse solamente dos residuos (Lys⁴⁴ y Thr⁵⁴ por Arg y Lys respectivamente). Esto sugiere que, muy probablemente, derivan de un ancestro catalítico común, donde las subunidades grandes han mantenido la arquitectura del sitio activo incluyendo el sitio de unión a sustratos pero exhiben una inhabilidad de llevar a cabo la catálisis debido a mutaciones de aminoácidos esenciales para tal fin (Ballicora y col., 2005). En un estudio reciente (Ventriglia y col., 2008) se demostró que dos subunidades grandes de *A. thaliana* son catalíticamente activas (APL1 y APL2), ya que estas subunidades poseen naturalmente los residuos de Arg y Lys necesarios para la actividad catalítica como se demostró en el estudio de mutagénesis de la subunidad grande de tubérculo de papa (Ballicora y col., 2005). En un estudio más reciente (Kuhn y col., 2009), se informó que la subunidad grande del alga *Ostreococcus tauri* también presenta actividad catalítica. Además en este trabajo los autores demuestran que, en el heterotetrámero, la contribución de la subunidad grande en lo que respecta a actividad catalítica, es mayor que el aporte de la subunidad pequeña.

Tabla 3.1. Relación entre el metabolismo del carbono y las propiedades estructurales y regulatorias de las ADP-Glc PPasas de diferentes organismos. Tabla adaptada de (Ballicora y col., 2003a).

Organismo	Principal vía de utilización del carbono	ADP-Glc PPasas				Estructura cuaternaria
		Clase	Regulador alostérico			
			Activador/es	Inhibidor/es		
Acumulan glucógeno						
Procariotas						
Heterotróficos						
<i>Escherichia coli</i>	Vía de Embden-Meyerhof	I	FBP	AMP		Homotetrámero (α_4)
<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium	(glucólisis clásica)					
<i>Enterobacter aerogenes</i>						
<i>Aeromonas formicans</i>	Glucólisis clásica	II	FBP	AMP		
<i>Micrococcus luteus</i>			F6P	ADP		
<i>Mycobacterium smegmatis</i>						
<i>Serratia marcescens</i>	Glucólisis clásica	III	Ninguno	AMP		Homotetrámero (α_4)
<i>Enterobacter hafniae</i>						
<i>Clostridium pasteurianum</i>						
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Vía de Entner-Doudoroff	IV	Pyr	AMP		Homotetrámero (α_4)
<i>Arthrobacter viscosus</i>			F6P	ADP, Pi		
Fotosíntesis anoxigénica						
<i>Chromatium vinosum</i>	Vía de Entner-Doudoroff	IV	Pyr	AMP		Homotetrámero (α_4)
<i>Rhodobacter capsulata</i>			F6P	ADP		
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>						
<i>Rhodobacter gelatinosa</i>	Glucólisis y vía de Entner-Doudoroff	V	Pyr	AMP		Homotetrámero (α_4)
<i>Rhodobacter globiformis</i>			F6P	Pi		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>			FBP			
<i>Rhodocyclus purpureus</i>						
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	VI	Pyr	Ninguno		Homotetrámero (α_4)
<i>Rhodospirillum tenue</i>	y ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos					
Heterotróficos						
<i>Bacillus subtilis</i>	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos durante la esporulación	VII	Ninguno	Ninguno		Heterotetrámero ($\alpha_2\delta_2$)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>						
Fotosíntesis oxigénica						
Cianobacterias						
<i>Synechococcus</i> PCC 6301		VIII	3PGA	Pi		Homotetrámero (α_4)
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Ciclo de Calvin					
<i>Anabaena</i> PCC 7120						

Organismo	Principal vía de utilización del carbono	ADP-Glc PPasas			
		Clase	Regulador alostérico		Estructura cuaternaria
			Activador/es	Inhibidor/es	
Acumulan almidón					
Eucariotas					
Fotosíntesis oxigénica					
Algas verdes					
<i>Chlorella fusca</i>	Ciclo de Calvin	VIII	3PGA	Pi	Heterotetrámero
<i>Chlorella vulgaris</i>					($\alpha_2\beta_2$)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>					
Tejidos fotosintéticos	Ciclo de Calvin	VIII	3PGA	Pi	Heterotetrámero
Hojas de espinaca, trigo <i>A. thaliana</i> , maíz y arroz					($\alpha_2\beta_2$)
Células heterotróficas					
Tejidos no fotosintéticos					
Tubérculo de papa	Catabolismo de la sacarosa proveniente de tejidos fotosintéticos	VIII	3PGA	Pi	Heterotetrámero
					($\alpha_2\beta_2$)
Endosperma de maíz, cebada y trigo		IX	Ninguno directamente. 3PGA y F6P revierten inhibición	Pi ADP FBP	Heterotetrámero
					($\alpha_2\beta_2$)

Además de los metabolitos que se indican en la Tabla 3.1, se ha demostrado que la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa es regulada por un mecanismo redox. Tanto el ditiotreitól como las tiorredoxinas *f* y *m* de hojas de espinaca, activan la enzima debido a la reducción de un puente disulfuro que se establece entre las subunidades pequeñas a través de residuos de Cys N-terminales (Fu y col., 1998; Ballicora y col., 2000). Es interesante destacar que esta regulación se da también en otras especies, ya que se ha encontrado que la ADP-Glc PPasa de *Arabidopsis* también puede ser activada por agentes reductores y que esto tiene funcionalidad *in vivo* (Hendriks y col., 2003)

3.3.2. Cinética de la reacción catalizada

La reacción catalizada por la ADP-Glc PPasa transcurre por un mecanismo cinético de tipo bisustrato (bi-bi) secuencial ordenado. Paule y Preiss en la década de 1970 (Paule y Preiss, 1971) fueron los primeros en describir este mecanismo para la enzima de

Rhodospirillum rubrum. Posteriormente, los estudios de unión realizados sobre la enzima de *E. coli* por Haugen y Preiss apoyaron este modelo, mostrando que el ATP y la ADP-Glc se unían a la forma libre de la enzima y que la Glc1P no era capaz de unirse a la enzima, a menos que hubiera ATP y Mg^{2+} en el medio (Haugen y Preiss, 1979). También se destacaron las propiedades cooperativas de esta enzima y las interacciones heterotrópicas entre sustratos. Entre ellas, cabe mencionar que estos estudios mostraron que el ATP se une a la mitad de los sitios disponibles para tal fin, pero presenta una ocupación total en presencia de Glc1P. Más tarde, se publicaron los resultados obtenidos con la enzima de hojas de cebada (Kleczkowski y col., 1993b). El modelo cinético propuesto se corresponde con el modelo secuencial ordenado, pero en este caso el ATP y la ADP-Glc se unen a formas diferentes de la enzima libre, que experimentaría un proceso de isomerización. Esto podría estar reflejando diferentes estados conformacionales y/o de agregación de esta proteína heterotetramérica de plantas, fenómeno que no se observa en la enzima de *Rhodospirillum rubrum* debido probablemente a su estructura cuaternaria menos compleja. Este mecanismo propuesto coincide con el descrito para otras nucleotidil difosfo-azúcar pirofosforilasas (NDP-azúcar PPasas), tal como se detalla más adelante en la Sección 6.1.3.1).

3.3.3. Residuos relevantes para la unión de sustratos y para la catálisis.

Estudios de modificación química efectuados sobre ADP-Glc PPasas de diversos orígenes han permitido identificar residuos relevantes para la catálisis y para la unión de sustratos y efectores. El advenimiento de la era informática y el análisis de secuencias proteicas permitió localizar posibles aminoácidos blanco, cuyos roles, en su mayoría, han sido confirmados por mutagénesis sitio-dirigida.

Antes de que se conociera la estructura tridimensional de la ADP-Glc PPasa de *S. tuberosum*, estudios de análisis de regiones hidrofóbicas (*Hydrophobic cluster analysis*) y de predicción de estructura secundaria, aplicados a un gran número de ADP-Glc PPasas de diversos orígenes y representantes de las diferentes clases, dieron como resultado el modelo estructural que se muestra en la Figura 3.5. De acuerdo al modelo se postuló que existe un patrón de plegamiento común entre las ADP-Glc PPasas, más allá de sus

diferentes estructuras cuaternarias (α_4 en bacterias y $\alpha_2\beta_2$ en plantas) y especificidades por los reguladores alostéricos (Ballicora y col., 2003a; , 2004).

En la ADP-Glc PPasa de *E. coli*, la Tyr¹¹⁴ (Figura 3.5) resultó modificada por análogos de fotoafinidad del ATP y de la ADP-Glc: 8-azido ATP y 8-azido ADP-Glc respectivamente (Lee y col., 1986; Lee y Preiss, 1986). Posteriormente, la mutagénesis sitio-dirigida de este residuo generó una enzima mutante que exhibió una marcada disminución en la afinidad por el ATP (Kumar y col., 1988). Esto indicaría que este residuo está implicado en la interacción con el anillo de adenina presente en los sustratos ATP y ADP-Glc.

El piridoxal-5'-fosfato (PLP) es un reactivo capaz de formar bases de Schiff con residuos de Lys, unión covalente que se estabiliza con una posterior reducción con NaBH₄. Ya que el PLP puede ser considerado un análogo estructural de la FBP y del 3PGA (en efecto, se comporta como activador de las enzimas de *E. coli*, de *Anabaena* PCC7120 y de hojas de espinaca) (Preiss, 1996), lo hace muy útil para identificar residuos ubicados en los sitios de unión de aquellos activadores. En la ADP-Glc PPasa de *E. coli*, (Parsons y Preiss, 1978a; 1978b) el PLP se unió a dos residuos de Lys diferentes, observándose que el sustrato ADP-Glc protegía uno de esos sitios de unión (Parsons y Preiss, 1978b), siendo éste uno de los primeros trabajos que demostraron la importancia de un residuo de Lys en la unión del componente glucosídico. La mutagénesis sitio-dirigida de la Lys¹⁹⁵ (Figura 3.5) confirmó el rol específico que posee este residuo en la unión de la Glc1P, dado que las enzimas mutantes presentaron un aumento de 100 a 10.000 veces en el S_{0,5} para la Glc1P, en tanto que las constantes cinéticas para ATP, Mg²⁺ y FBP resultaron similares a las de la enzima salvaje (Hill y col., 1991; Ballicora y col., 2007).

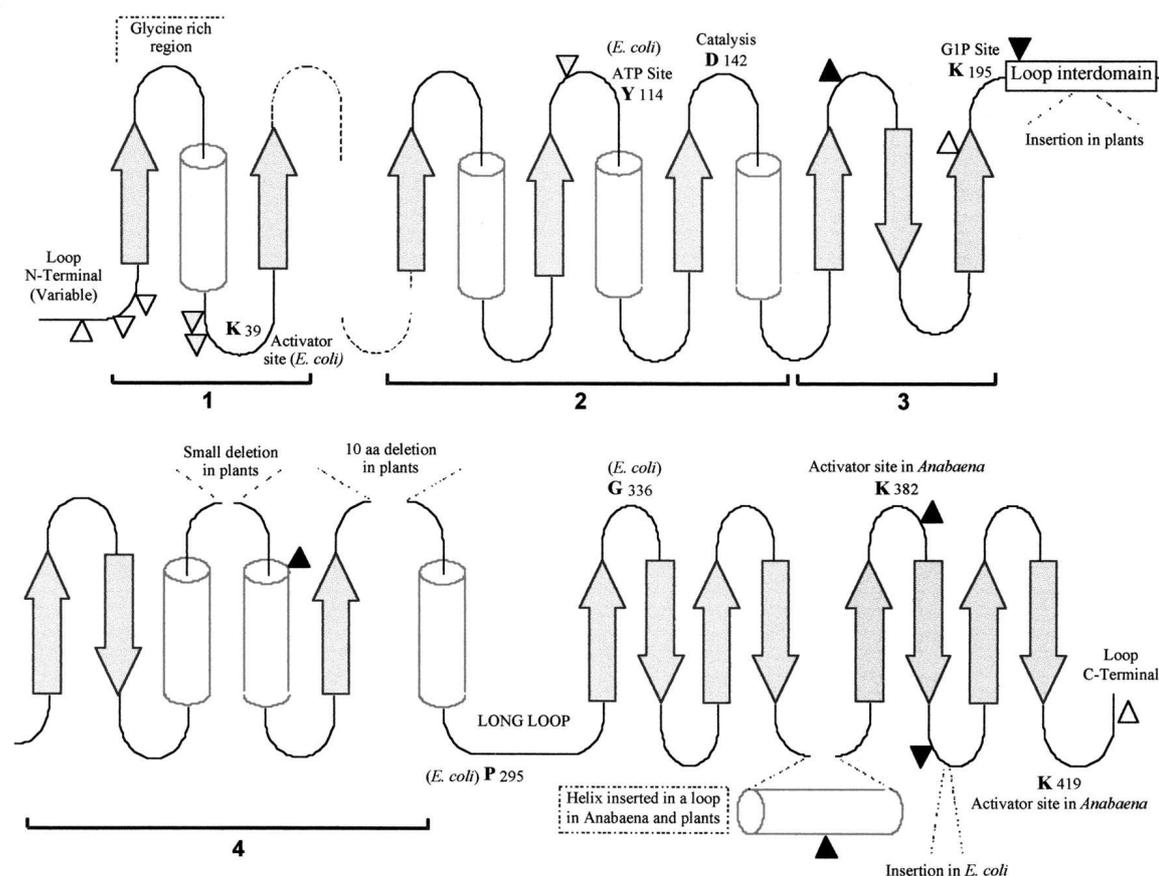


Figura 3.5. Modelo estructural común de las ADP-Glc PPasas, donde se muestra la distribución de estructuras secundarias y de dominios. Las estructuras secundarias se muestran como cilindros (hélices α), flechas (láminas β), estando interconectadas entre sí por secuencias aminoacídicas de ordenamiento al azar (*loops*) representados mediante líneas. Se muestran algunos de los residuos señalados como importantes en la interacción con sustratos y activadores. Los triángulos indican zonas de hidrólisis (en algunos casos parciales) producidos por proteasas sobre las enzimas de *E. coli* y de *Anabaena*. El dominio catalítico estaría formado por las regiones 1, 2, 3 y 4, mientras que la región ubicada luego del *loop* largo sería importante para la regulación alostérica. Figura obtenida de (Ballicora y col., 2003a).

La mutagénesis sitio dirigida de los residuos homólogos en la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa (Lys^{198} en la subunidad pequeña y Lys^{213} en la subunidad grande) confirmó un papel semejante para el residuo de la subunidad pequeña, pero no para el de la subunidad grande. Las mutaciones de la Lys^{198} en la subunidad α disminuyeron la afinidad aparente por Glc1P entre 135 y 550 veces; mientras que las mutaciones de la Lys^{213} en la subunidad β tuvieron efectos mínimos en la afinidad por Glc1P (Ballicora y col., 2007). Esto concuerda con la idea de que, en la enzima de *S. tuberosum* la subunidad grande no

posee actividad catalítica, sino que ejerce un efecto modulador (Ballicora y col., 1995; Ballicora y col., 2003a; , 2004). Es importante destacar que este residuo está conservado en la mayoría de las nucleotidilil-transferasas (Blankenfeldt y col., 2000).

Estudios posteriores realizados sobre la enzima de *E. coli* posibilitaron una descripción detallada de la arquitectura del sitio de unión de la Glc1P (Bejar y col., 2006b). Entre los aminoácidos estudiados por mutagénesis sitio-dirigida están: Glu¹⁹⁴, Ser²¹², Tyr²¹⁶, Asp²³⁹, Phe²⁴⁰, Trp²⁷⁴ y Asp²⁷⁶. Las mutaciones de estos aminoácidos por Ala mostraron en todos los casos una disminución de la afinidad por Glc1P de 1 o 2 órdenes de magnitud, indicando que los mismos están involucrados, en mayor o menor medida, en la interacción con este sustrato.

Por otra parte, el aminoácido Asp¹⁴² de la enzima de *E. coli* (Figura 3.5), residuo conservado dentro de las ADP-Glc PPasas de diferentes organismos, fue identificado como un residuo fundamental en la catálisis enzimática. Las enzimas mutantes D142A y D142N, mostraron una disminución en la actividad catalítica de cuatro órdenes de magnitud, mientras que los demás parámetros cinéticos no mostraron cambios significativos (Frueauf y col., 2001). Resultados equivalentes se obtuvieron al mutar el residuo homólogo, el Asp¹⁴⁵, de la subunidad pequeña de la enzima de tubérculo de papa (Frueauf y col., 2003), pero no al mutar el residuo correspondiente en la subunidad grande, lo que era de esperarse debido a la carencia de actividad catalítica de esta última.

Analizando las secuencias de diferentes ADP-Glc PPasas de bacterias y de las subunidades pequeña y grande de plantas, se observó que aquellas subunidades con actividad catalítica poseían ciertos residuos que no se encuentran conservados en las subunidades no catalíticas (Ballicora y col., 2005). Como se describió más arriba, se logró recuperar el rol catalítico de la subunidad grande de la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa mutando los residuos Lys⁴⁴ y Thr⁵⁴ por Arg y Lys, respectivamente (Ballicora y col., 2005). Estos resultados establecen claramente la importancia que poseen estos dos residuos (Arg³² y Lys⁴² en la enzima de *E. coli*) en la catálisis.

3.3.4. Residuos importantes para la regulación por efectores

Como ya se mencionó en el inciso anterior, los estudios de modificación química realizados sobre la enzima de *E. coli* (Parsons y Preiss, 1978a; 1978b) demostraron que el PLP, análogo de la FBP y activador de la enzima, se unía principalmente a dos sitios diferentes de la proteína: Lys³⁹ y Lys¹⁹⁵. Esta modificación sobre la Lys³⁹ (Figura 3.5), curiosamente era protegida por la FBP y por el 1,6 hexanediol bisfosfato, siendo también este último un activador de la enzima. Posteriormente, se demostró que la mutación de este residuo disminuía, de manera notable, la afinidad aparente por la FBP, confirmándose la importancia de este residuo en la interacción con el activador (Gardiol y Preiss, 1990). En las cercanías de la Lys³⁹ hay predominio de residuos básicos, como los residuos argininas 29, 32 y 40 y lisinas 34, 39 y 42, lo que implica que hay cargas positivas suficientes como para unir grupos fosfatos, carboxilatos o aldehídos (a través de la formación de base de Schiff). Los activadores más efectivos de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* generalmente tienen dos residuos fosfato, como la FBP, 1,6-hexanediol-bisfosfato, NADPH o una molécula conteniendo un grupo fosfato y uno aldehído, como en el caso del PLP, o conteniendo un fosfato más un carboxilato como en el caso del PEP, 2 fosfo-glicerato y ácido 4-piridóxico-5P (Preiss y Romeo, 1989). La idea de que estos diversos activadores se unen al mismo sitio (o en las cercanías) ha sido avalada por estudios cinéticos (Preiss y col., 1966; Gentner y col., 1969) y estudios de equilibrio de unión (Haugen y Preiss, 1979).

Como el PLP es capaz de activar a las ADP-Glc PPasas de *Anabaena* y de hojas de espinaca, también se lo utilizó para identificar residuos de Lys localizados en el sitio de unión del 3PGA. En la enzima de *Anabaena*, se unió a los residuos Lys³⁸² y Lys⁴¹⁹ (Figura 3.5), cuya participación en la unión del activador fue confirmada por mutagénesis sitio-dirigida (Charng y col., 1994; Sheng y col., 1996). Las mutaciones de estos residuos en la enzima de tubérculo de papa demostraron que también formarían parte del sitio de unión del 3PGA y que la contribución de estos residuos a la unión del activador es aditiva. Sin embargo, las mutaciones de estos residuos en la subunidad pequeña resultaron en enzimas con menor afinidad por el 3PGA que sus mutantes homólogos en la subunidad grande. Esto indica que la Lys⁴⁰⁴ y la Lys⁴⁴¹ de la subunidad pequeña de la enzima de tubérculo de papa (homólogas a las Lys³⁸² y Lys⁴¹⁹ de la enzima de *Anabaena*,

respectivamente) son más importantes que sus equivalentes en la subunidad grande (Ballicora y col., 1998). Esto sugiere que los residuos relevantes para la activación se encuentran en la subunidad pequeña de la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa y que la subunidad grande contribuye a la activación enzimática por hacer más eficiente la unión del efector a los sitios ya presentes en la subunidad pequeña, antes que aportando nuevos sitios de unión al 3PGA. En estudios similares efectuados con la enzima de hojas de espinaca, el PLP se unió a la Lys⁴⁴⁰ de la subunidad pequeña (muy cercana al C-terminal) y a otras tres Lys de la subunidad grande. La piridoxilación de estas Lys fue evitada por el 3PGA, indicando que las mismas se encuentran cercanas al sitio de unión de este activador o están directamente involucradas en dicha unión (Morell y col., 1988; Ball y Preiss, 1994).

En algunas ADP-Glc PPasas se han identificado residuos de Arg funcionalmente importantes. La mutagénesis de las argininas de la enzima de *Anabaena* mostró que el residuo Arg²⁹⁴, conservado en las enzimas pertenecientes a plantas y cianobacterias, está involucrado en la selectividad hacia el inhibidor de la enzima, el Pi (Sheng y Preiss, 1997; Frueauf y col., 2002). Mediante técnicas de modificación química y mutagénesis exploratoria con Ala se demostró la importancia de ciertos residuos de Arg del extremo N-terminal de la enzima de *A. tumefaciens* y su participación diferencial en la unión y/o acción de los activadores de la enzima: la F6P y el Pyr (Gomez-Casati y col., 2001). Por ejemplo, la mutante R32A posee afinidad reducida para la F6P, pero con respecto a la activación por Pyr, se comporta de manera muy semejante a la enzima salvaje. Las mutantes R33A y R45A presentan mayor actividad enzimática, en ausencia de activadores, que la enzima salvaje, pero exhiben escasa activación por Pyr, ninguna respuesta a la F6P y desensibilización a la inhibición por Pi.

Estudios de mutagénesis al azar permitieron identificar al residuo Asp⁴⁰³ de la subunidad pequeña de papa como importante para la activación por 3PGA (Greene y col., 1996). En la secuencia aminoacídica, este Asp es el aminoácido contiguo a la Lys⁴⁰⁴, implicada en la unión del activador 3PGA (Ballicora y col., 1998).

3.3.5. Caracterización de dominios involucrados en la regulación

Según los estudios analizados en el inciso anterior, podría interpretarse que los sitios de unión de los activadores alostéricos estarían localizados en dominios diferentes en las enzimas de organismos heterótrofos (bacterias) con respecto a los autótrofos (plantas y cianobacterias). En bacterias heterotróficas, como *E. coli* y *A. tumefaciens*, estos sitios estarían localizados mayormente en el extremo N-terminal (Ballicora y col., 2003a; , 2004). En los organismos autótrofos, aquellos residuos involucrados en la regulación alostérica, en su mayoría Lys y Arg, pertenecen al extremo C-terminal. Además otros estudios han demostrado que cambios en los aminoácidos del dominio C-terminal de enzimas de plantas provocan un viraje en la preferencia por el activador, desde 3PGA hacia F6P o FBP (Salamone y col., 2002).

Sin embargo, un estudio realizado por (Ballicora y col., 2002), donde se construyeron enzimas quiméricas, híbridas entre las proteínas de *E. coli* y *A. tumefaciens*, demostró que, aunque hay residuos importantes para la activación identificados en el extremo N-terminal de estas dos enzimas, el dominio C-terminal era determinante de la afinidad y especificidad por el activador. En consecuencia, los resultados obtenidos con las enzimas quiméricas pusieron en evidencia la importancia de la interacción entre ambos dominios en la determinación de la especificidad hacia el efector. Además, cuando se co-expresaron los dominios N- y C-terminales de la enzima de *E. coli* se observó que existe una fuerte interacción entre ellos, importante para las propiedades alostéricas y la estabilidad estructural de la misma (Bejar y col., 2004).

La longitud del dominio N-terminal es importante en la regulación alostérica. Dos enzimas mutantes de *E. coli*, trucas en el extremo N-terminal (N- Δ 11 y N- Δ 15) exhibieron, en ausencia de FBP, una actividad específica mayor que la de la enzima salvaje, y no mostraron activación considerable por este activador ni tampoco respondieron a la inhibición por AMP (Bejar y col., 2006a). En plantas, también el extremo N-terminal estaría involucrado en la regulación. Tal es el caso de la enzima de tubérculo de papa, donde la falta de 10 aminoácidos en este dominio de la subunidad pequeña, al ser expresada junto con la subunidad grande, aumentó la afinidad aparente de la enzima por el 3PGA, siendo menos sensible a la inhibición por Pi (Ballicora y col., 1995).

Al truncar 17 aminoácidos de la subunidad grande se obtuvieron resultados similares respecto del Pi, pero una mayor afinidad aparente con respecto al 3PGA, indicando asimismo que este dominio tendría una injerencia mayor en la regulación alostérica de estas enzimas (Laughlin y col., 1998).

Con respecto al dominio C-terminal de la enzima de bacterias, hay evidencias de que también sería responsable de la activación alostérica, ya que en la enzima de *E. coli* se caracterizaron dos mutantes del extremo C-terminal, P295S y G336D (Figura 3.5), que presentaban mayor afinidad por el activador (Meyer y col., 1998a; Meyer y col., 1998b). Esto indica que estos residuos no estarían directamente involucrados en la unión del activador (ya que en dicho caso la afinidad debería ser menor) pero igualmente sugiere que, cambios en este dominio C-terminal afectan la respuesta de la enzima a los efectores.

Se puede afirmar entonces que, mientras la región central de estas enzimas estaría involucrada en la unión de sustratos y en la catálisis, serían los dominios N- y C-terminales los responsables de la regulación alostérica de las mismas, residiendo en ellos la especificidad hacia los distintos efectores de las diferentes clases de ADP-Glc PPasas (Ballicora y col., 2003a) y siendo indispensable para tal fin la existencia de un arreglo combinado entre ambos.

3.3.6. Predicción de la estructura tridimensional de la enzima ADP-Glc PPasa

Tal como se comentó en la Sección 3.3.3, mediante estudios de predicción de estructura secundaria y de regiones hidrofóbicas se logró un modelo estructural común para las ADP-Glc PPasas. El modelo, mostrado en la Figura 3.5, muestra una zona típica de proteínas que unen nucleótidos. La región 1 presenta una lámina plegada β , seguida de un *loop* rico en glicinas semejante a los “P *loop*” (del inglés: *phosphate binding loop*) presente en proteinquinasas o en sitios de unión a nucleótidos (Saraste y col., 1990). La región 2 posee un arreglo de 3 láminas plegadas β y 3 hélices α , conformación compatible con el plegamiento de Rossman (Rossman 1974). Además la Tyr¹¹⁴, residuo involucrado en la unión del ATP (Lee y col., 1986; Lee y Preiss, 1986; Kumar y col., 1988), se encuentra en esta zona. Esto sugiere, que las zonas 1 y 2 serían dominios o subdominios de unión del

ATP (Ballicora y col., 2003a). Es importante destacar que la mayor parte de aquellos residuos conservados entre las ADP-Glc PPasas, que poseen roles específicos en la unión de sustratos (en *E. coli*, Tyr¹¹⁴ y Lys¹⁹⁵), en la catálisis (en *E. coli*, Asp¹⁴²) y en la regulación alostérica (en *E. coli*, Lys³⁹; en *Anabaena*, Lys³⁸² y Lys⁴¹⁹) se encuentran ubicados en zonas predichas como *loops*. Igualmente, los residuos Pro²⁹⁵ y Gly³³⁶, que cumplen una función importante en la regulación de la enzima de *E. coli*, también se posicionan en *loops* (Meyer y col., 1998a; Meyer y col., 1998b).

Cabe destacar que este modelo estructural concuerda, en cuanto a la distribución de estructuras secundarias, con las estructuras de otras NDP-azúcar PPasas cristalizadas, sugiriendo que, si bien la identidad de secuencia de estas enzimas es baja en comparación a la que presentan entre sí las ADP-Glc PPasas, todas ellas poseen un dominio catalítico común (Ballicora y col., 2004). En el año 2005 se conoció la estructura cristalina de la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa (Jin y col., 2005), y en el 2007 la de *A. tumefaciens* (Cupp-Vickery y col., 2008), las cuales aportaron información más detallada, pero siempre en concordancia con este modelo.

3.3.7. Estructura cristalina de la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa.

La estructura obtenida de la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa presenta ciertas limitaciones. Por un lado, fue cristalizada como homotetrámero (α_4) que posee propiedades cinéticas propias, como una menor afinidad por el 3PGA, el cual resulta esencial para su actividad y una mayor sensibilidad a la inhibición por Pi que el heterotetrámero ($\alpha_2\beta_2$) que conforma a la enzima nativa. Sin embargo, la afinidad por los sustratos y el Mg²⁺ es esencialmente la misma para ambas estructuras (Ballicora y col., 1995). Además la cristalización se realizó en presencia de elevadas concentraciones de sulfato de amonio y, siendo éste un inhibidor de la enzima por su analogía estructural con el Pi, la estructura corresponde a una forma alostéricamente inhibida (Jin y col., 2005).

El monómero de la subunidad cristalizada de ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa está constituido por un dominio catalítico N-terminal y un dominio C-terminal, conectados entre sí por un *loop* interdominio (Figura 3.6-A). El dominio catalítico está compuesto por

siete láminas plegadas β rodeadas de hélices α . El *loop* que conecta ambos dominios comprende los aminoácidos 300 al 320 y establece numerosas interacciones con el *loop* equivalente de otra subunidad. Uno de los mayores aportes de esta estructura cristalina fue acerca de la conformación del dominio C-terminal, mostrando que adopta una forma de hélice de láminas β paralelas con giro hacia la izquierda y al interactuar con el C-terminal de otro monómero, la enzima adquiere un estado oligomérico distintivo que se muestra en la Figura 3.6-B. Este dominio C-terminal no se encuentra en otras PPasas o, si está presente, como en el caso de la N-acetilglucosamina-1P uridilil-transferasa de *E. coli* (Brown y col., 1999), su conformación con respecto al dominio N-terminal es totalmente diferente (Jin y col., 2005) (ver también Sección 3.3.9).

Esta estructura cristalina brindó importante información con respecto a la estructura cuaternaria de la enzima. Tal como se observa en la Figura 3.6-B, los monómeros denominados A y B interactúan mediante sus dominios C-terminales y a través de los *loops* interdominios ya mencionados. Entre los monómeros denominados A y A' (B y B') se establece un puente disulfuro entre las Cys¹², siendo ésta la única interacción establecida entre ellos. Como esta Cys¹² se encuentra presente en las subunidades (α) y no en las (β), este puente disulfuro sugiere que la posición relativa de las subunidades (α) en el heterotetrámero sería equivalente a la que ocupan las denominadas A y A' en el homotetrámero. Como se detalló en la Sección 3.5.1, este puente disulfuro sería el responsable de la regulación redox que presenta la enzima (Fu y col., 1998; Ballicora y col., 2000). Esta Cys no se encuentra conservada en las enzimas de bacterias conocidas hasta el presente, por lo que este enlace intercatenario no se establece entre las ADP-Glc PPasas bacterianas.

Junto a la enzima cristalizan iones sulfato (Figura 3.6-A). Como la mayoría de los residuos que interactúan con estos iones se encuentran fuertemente conservados entre enzimas de plantas y bacterias, se ha sugerido que estos sitios serían relevantes para la unión de efectores metabólicos de carga negativa, como son el 3PGA y Pi de las enzimas de plantas (Jin y col., 2005). Es importante mencionar que los residuos que interactúan con los aniones sulfato se encuentran tanto en el dominio N- como en el C-terminal, confirmando estudios previos que muestran la importancia de ambos dominios en las propiedades

regulatorias de las ADP-Glc PPasas (Ballicora y col., 2002; Bejar y col., 2004; Jin y col., 2005).

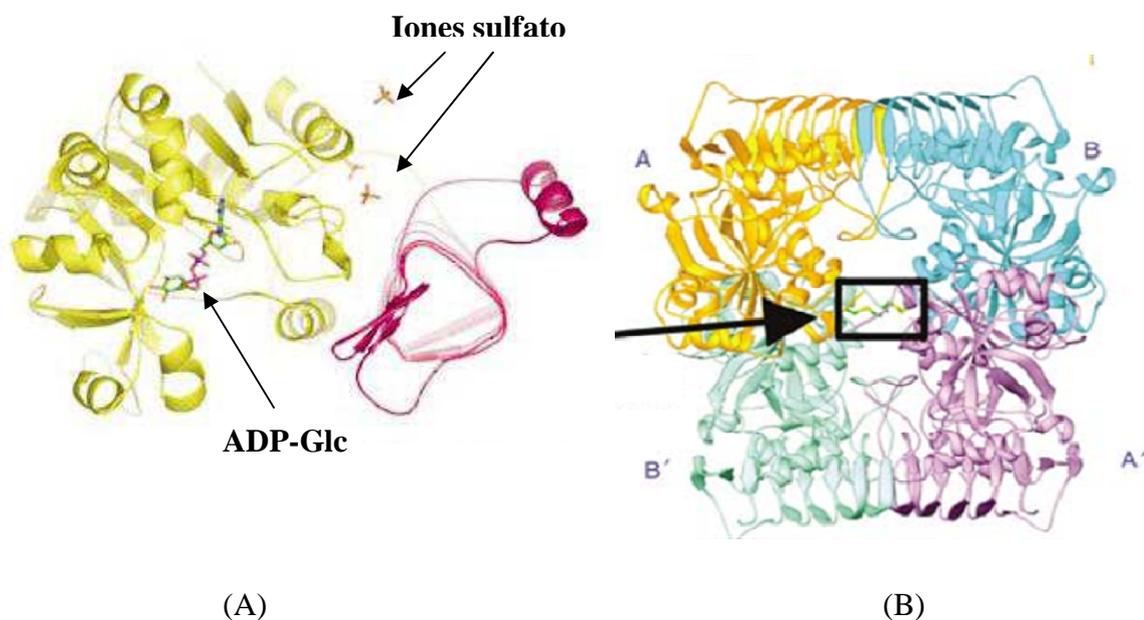


Figura 3.6. (A). Estructura cristalina del monómero (α) de la ADP-Glc PPasa de *S. tuberosum* con el sustrato ADP-Glc y los iones sulfato. En amarillo: dominio N-terminal, en rojo: dominio C-terminal, ADP-Glc y sulfatos se muestran según el tipo de átomo: carbono, verde; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; fósforo, magenta y azufre, naranja. (B). Estructura cristalina del homotetrámero (α_4), donde se indica el puente disulfuro que se establece entre las subunidades A y A'. Figuras adaptadas de (Jin y col., 2005). Las coordenadas de la estructura (1YP4) están disponibles en el servidor Protein Data Bank.

El sitio activo de la ADP-Glc PPasa consiste en una larga hendidura, recubierta por residuos aminoacídicos conservados en otras nucleotidil-transferasas. La estructura cristalina muestra que sólo las subunidades A y A' unen ATP, lo que concuerda con los resultados hallados por métodos de equilibrio de unión (Haugen y Preiss, 1979). La molécula de ATP se ubica en el sitio activo en una conformación completamente diferente de la observada en otros complejos NTP/azúcar-nucleótido PPasa, ya que los fosfatos β y γ ocupan parcialmente el sitio de unión de la Glc1P, siendo entonces esta conformación incompetente para la catálisis. En ambas subunidades que unen el ATP los cambios observados son idénticos y los más significativos ocurren en el *loop* rico en glicinas, cuya

secuencia, muy conservada en nucleotidilil-transferasas, es: GGXGXRL, (Sivaraman y col., 2002; Jin y col., 2005) (en la enzima de *E. coli* corresponde a los residuos 27 al 33, cuya secuencia es: GGRGTRL) y en el *loop* de los residuos 106 al 119 (el cual contiene a la Phe¹¹⁷, homóloga a la Tyr¹¹⁴ de la enzima de *E. coli*). Además, la estructura cristalina muestra la presencia de interacciones entre subunidades ya que la unión del ATP a las subunidades A y A' produce cambios conformacionales en las subunidades B y B'.

En lo que respecta a la unión de la ADP-Glc en la estructura cristalina, este sustrato se une a tres subunidades, pero sólo en una de ellas la molécula está bien posicionada, adoptando conformaciones semejantes a aquellas vistas en otros complejos estructurales de NDP-azúcar PPasas. Entre las interacciones más importantes se encuentran los puentes de hidrógeno entre la molécula de Glc y los residuos Glu¹⁹⁷, Ser²²⁹ y Asp²⁸⁰ y el puente salino que establece la Lys¹⁹⁸ con el fosfato de la Glc1P. (Jin y col., 2005). Los autores de este trabajo afirman que los residuos Glu¹⁹⁷ y Lys¹⁹⁸ juegan un papel importantísimo en la unión de la molécula de Glc1P, siendo ambos parte de un motivo conservado, presente en varias NDP-azúcar PPasas.

3.3.8. Estructura tridimensional de la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens*

En un trabajo reciente se logró cristalizar la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* en su forma tetramérica (Cupp-Vickery y col., 2008), siendo ésta la primera estructura cristalina obtenida para una enzima de origen bacteriano perteneciente a esta familia. Los cristales fueron obtenidos utilizando sulfato de litio como precipitante, dando lugar a una forma alostéricamente inhibida de la enzima. Los dominios estructurales que conforman la proteína resultaron ser casi idénticos a los obtenidos para la enzima cristalizada de tubérculo de papa, un dominio N-terminal que corresponde a una proteína α/β y uno C-terminal en forma de hélice de láminas β paralelas. Mediante mutagénesis sitio-dirigida se demostró la importancia del *loop* de las Gly, tanto en la unión del ATP como en la catálisis, cuyo cambio de conformación al unirse este sustrato a la enzima de *S. tuberosum* ya había sido descrito (Jin y col., 2005). Se modeló la F6P, principal activador de la enzima, en la región de interfase entre los dominios N- y C-terminales, ya que en esta zona

se unen iones sulfato, inhibidores competitivos de este activador. Basándose en este modelo y en análisis de alineamiento de secuencias, se construyeron enzimas mutantes de la His³⁷⁹ que resultaron ser activadas por FBP, quedando establecida la importancia de esta zona de interfase en la especificidad por estos efectores.

3.3.9. Similitudes y diferencias entre la ADP-Glc PPasa y otras NDP-azúcar PPasas.

La comparación de las estructuras tridimensionales de las ADP-Glc PPasas con las estructuras que presentan varias NDP-azúcar PPasas, como las enzimas N-acetilglucosamina1P uridilil transferasa de *E. coli*, Glc1P timidilil transferasa de *Pseudomonas aeruginosa* y de *E. coli* y Glc1P uridilil transferasa de *Corynebacterium glutamicum*, entre otras, muestra que estas enzimas poseen un dominio PPasa común con un plegamiento similar, que se asemeja al de tipo Rossmann de unión a nucleótido (Brown y col., 1999; Blankenfeldt y col., 2000; Sivaraman y col., 2002; Jin y col., 2005; Thoden y Holden, 2007b). El alineamiento de secuencias de aminoácidos de estas enzimas muestra un patrón de residuos conservados y coherente con la reacción similar que catalizan. Estos residuos, ya mencionados previamente en distintas secciones, se encuentran en el dominio pirofosforilasa que presentan en común y corresponden a las siguientes zonas o residuos:

- El *loop* rico en glicinas presente en el extremo N-terminal de la proteína que forma parte del sitio de unión al nucleótido. (Preiss, 1996; Jin y col., 2005; Cupp-Vickery y col., 2008). En las NDP-azúcar PPasas dicha región se compone del motivo (G)GXGXR(L) (Blankenfeldt y col., 2000; Sivaraman y col., 2002).
- Los residuos Asp¹⁴² y Asp²⁷⁶ de la enzima de *E. coli*, presentes en todas las ADP-Glc PPasas y muy conservados en diferentes nucleotidil transferasas (Blankenfeldt y col., 2000; Thoden y Holden, 2007b). Ambos son esenciales para la catálisis y se ha propuesto que interactúan con el catión divalente Mg²⁺ (Frueauf y col., 2001; Jin y col., 2005).
- El motivo EKP (aminoácidos 194 al 196 en la enzima de *E. coli*), conservado en las ADP-Glc PPasas y la mayoría de las NDP-azúcar PPasas y cuyos residuos contiguos, EK, están involucrados en la unión del sustrato azúcar-P (Blankenfeldt y col., 2000; Jin y col., 2005; Bejar y col., 2006b).

El plegamiento común del dominio pirofosforilasa y los residuos conservados ubicados en el mismo, sugieren que las NDP-azúcar PPasas comparten el mismo mecanismo básico de catálisis, (Haugen y Preiss, 1979; Blankenfeldt y col., 2000).

La principal diferencia entre las ADP-Glc PPasas y otras NDP-azúcar PPasas radica en el dominio C-terminal que poseen las primeras. La enzima N-acetilglucosamina1P uridilil transferasa de *E. coli* posee también un dominio C-terminal con estructura de hélice compuesta por láminas plegadas β , pero tanto la orientación respecto del dominio N-terminal, como la función, son diferentes (Ballicora y col., 2003a; Jin y col., 2005). Mediante diversos estudios, se ha demostrado que el dominio C-terminal se encuentra, directa o indirectamente, involucrado en las propiedades reguladoras alostéricas de las ADP-Glc PPasas de diferentes fuentes (Ballicora y col., 2003a; , 2004), lo que sugiere que la falta de regulación alostérica en las demás NDP-azúcar PPasas puede deberse a la falta de tal dominio modulador de la actividad enzimática. Estas similitudes y diferencias encontradas entre las diferentes NDP-azúcar PPasas aportan indicios acerca del mecanismo evolutivo de la familia de las PPasas. A la vez que conservan dominios y residuos esenciales para su actividad, difieren en otros dominios estructurales y en las propiedades regulatorias, posiblemente debido a la adaptación de las enzimas a las diferentes rutas biosintéticas a las que pertenecen (Ballicora y col., 2004).

4. OBJETIVOS.

El presente Trabajo de Tesis tiene como objetivo general profundizar el conocimiento de las relaciones estructura-función de la enzima ADP-Glc PPasa (EC 2.7.7.27). Se propone estudiar las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de la enzima, para caracterizar la unión y cambios conformacionales producidos por sustratos, cationes divalentes (que actúan como activadores esenciales) y reguladores alostéricos y establecer posibles interacciones entre los mismos.

De acuerdo a lo antes mencionado, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a. Diseñar, construir, producir y purificar mutantes sitio dirigidas, truncadas y de inserción para avanzar en el estudio del mecanismo de regulación alostérica de las ADP-Glc PPasas, en particular las de *E. coli* y *A. tumefaciens*.
- b. Caracterizar la interacción de los diferentes efectores con la ADP-Glc PPasa, ya sea sobre la enzima nativa o modificada, por medio de estudios cinéticos y de equilibrio de unión utilizando métodos de electroforesis capilar, espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular.
- c. Estudiar el efecto simultáneo de los dos activadores principales de la enzima de *A. tumefaciens*, la F6P y el Pyr. Plantear y evaluar un posible mecanismo cinético de reacción que permita explicar este comportamiento.
- d. Utilizar herramientas informáticas de modelado que permitan establecer correlaciones de los datos experimentales con la estructura tridimensional de las secuencias en estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Vectores utilizados

Los vectores que se emplearon en esta tesis son derivados de la familia pET.

- pETEC: vector derivado del pET24a que posee el gen *glgC* que codifica para la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli*, subclonado entre los sitios de restricción *NdeI* y *SacI*, (Ballicora y col., 2002).

- pETAT: plásmido derivado del pET24a que posee la secuencia del gen *glgC* de *A. tumefaciens*, subclonado entre los sitios de restricción *NdeI* y *SacI* (Ballicora y col., 2002).

5.2. Cepas bacterianas

En el clonado y expresión de las proteínas recombinantes se emplearon las siguientes cepas de *E. coli*:

a. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen).

b. *Escherichia coli* BL21(DE3) (Invitrogen).

5.3. Medios de cultivo

a. Luria-Bertani (LB): triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l.

b. LB-agar: medio LB adicionado de 1,6% (p/v) de agar.

c. LB-Glc: medio LB con el agregado de Glc al 2,0% (p/v).

5.4. Antibióticos utilizados

Se utilizó Kanamicina (Kan) en una concentración final de 50 µg/ml, ya que los vectores pETEC y pETAT confieren resistencia hacia este antibiótico.

5.5. Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1% (p/v) preparados con *buffer TAE* [Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, pH: 8,0] con el agregado de bromuro de etidio en una concentración final de 0,3 µg/ml. Las muestras se acondicionaron con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v) antes de realizar la siembra. Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (100 V) por 30 min aproximadamente. Para visualizar las bandas se utilizó un transiluminador UV a 302 nm (DyNA Light, LabNet International Inc.). Como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el bacteriófago λ (Promega) digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Para la extracción de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5.6. Mutagénesis sitio dirigida.

Se utilizó la técnica de *QuikChange* (Stratagene). Este procedimiento utiliza un par de oligonucleótidos portadores de la mutación, complementarios a una misma secuencia de ADN en cuya región central se encuentra el residuo a mutar. Mediante la técnica de PCR se extienden ambas cadenas del ADN molde (plásmido). Luego, la muestra se somete a digestión con la enzima de restricción *DpnI* que hidroliza el ADN usado como templado. El ADN plasmídico sintetizado en la reacción de PCR se utiliza para transformar células *E. coli* TOP10. La búsqueda de clones que contengan la mutación se realiza mediante secuenciación.

5.7. Obtención de células competentes

5.7.1. Método del CaCl₂

Se utilizó un cultivo saturado de la cepa de *E. coli* correspondiente, para inocular medio LB fresco, en una dilución 1/20. Cuando el cultivo bacteriano alcanzó una DO₆₀₀ ~0,4, las células se fraccionaron en alícuotas de 1 ml y se centrifugaron a 5000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendieron en 500 µl de ST1 (MOPS-NaOH 10 mM; KCl

10 mM; pH 7,0). Luego de centrifugar nuevamente las células en las mismas condiciones que el paso anterior, se resuspendieron en 500 µl de ST2 (MOPS-NaOH 100 mM; KCl 10 mM; CaCl₂ 50 mM; pH 6,5) y se incubaron 15 min en hielo; las células se separaron mediante una nueva centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de ST2 y se procedió a la transformación mediante tratamiento térmico (Sección 5.8).

5.8. Transformación de células competentes

Para transformar las células competentes, a una alícuota de 100 µl se le adicionaron de 2 a 4 µl de ADN plasmídico o mezcla de ligación, según corresponda (~100 ng). Esta mezcla se conservó en hielo durante 1 h para luego someterla a un pulso térmico de 45 s a 42 °C. La recuperación de las células se realizó en medio LB-Glc durante 1 h a 37 °C para posteriormente sembrarlas en medio LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente. Estas placas se incubaron durante 16 a 18 h a 37 °C. Se prepararon además, los controles habituales de competencia y sensibilidad al antibiótico de selección de las células utilizadas.

5.9. Extracción de ADN plasmídico a partir de células transformadas

Las células de *E. coli* transformadas se repicaron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron a 37 °C durante 16 a 18 horas. Las células se cosecharon por centrifugación y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el equipo comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). La obtención del ADN plasmídico se corroboró por electroforesis en gel de agarosa y el plásmido recuperado se almacenó a -20 °C.

5.10. Precipitación del ADN

Para concentrar muestras de ADN, o para acondicionarlas entre dos digestiones enzimáticas sucesivas, se realizó una precipitación agregando etanol al 67% (v/v) y acetato de sodio 0,1 M. Para favorecer el proceso, la muestra se mantuvo a -20 °C durante 16 a

18 h y posteriormente se la centrifugó a 15000 x g durante 15 min a 4 °C. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua *MilliQ*® esterilizada por filtración.

5.11. Ligación de los fragmentos de ADN

La ligaciones de los fragmentos de ADN se realizaron utilizando T4 ADN ligasa (Promega), según las indicaciones del fabricante. Las ligaciones se incubaron toda la noche a 16 °C y luego se utilizaron para transformar células competentes *E. coli* Top 10.

5.12. Obtención del gen *glgC* de *E. coli* con dos mutaciones.

La estrategia fue la misma en todos los casos: en vez de producir una segunda mutación en la mutante simple, el gen con las dos mutaciones se obtiene a partir de combinar los fragmentos de los genes que posean las mutaciones simples. Los plásmidos cuyas mutaciones quieren combinarse se digieren con las mismas dos enzimas de restricción convenientemente elegidas tal que, luego de la digestión, una de las mutaciones quede unida al resto del vector mientras que la región mutada proveniente del otro plásmido, queda localizada en el fragmento que se separa del resto del vector. Luego de una adecuada purificación a partir de geles de agarosa y posterior ligación, se logra reconstruir en el plásmido, el gen con ambas mutaciones presentes.

En una primera instancia se transformaron células *E. coli* TOP10 con los siguientes plásmidos: [pETEC/NΔ15], [pETEC/G336D], [pETEC/Q74A] y [pETEC/W113A], para luego proceder a la extracción y así disponer de grandes cantidades de los mismos.

En la construcción del gen con dos mutaciones derivadas del gen mutante [pETEC/NΔ15], los vectores correspondientes a las simples mutantes NΔ15, Q74A y W113A, se trataron consecutivamente con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I (Promega) (Figura 5.1). Al digerir de esta manera el vector [pETEC/NΔ15], el extremo del gen que codifica para el N-terminal de la proteína, truncado en este caso, permanece unido al vector y puede ligarse a los fragmentos que poseen la mutación Q74A o W113A, provenientes de los vectores [pETEC/Q74A] y [pETEC/W113A], respectivamente, digeridos con las mismas enzimas.

Para lograr los otros genes mutados se procedió de la misma manera, utilizándose las enzimas que se indican en la Figura 5.1.

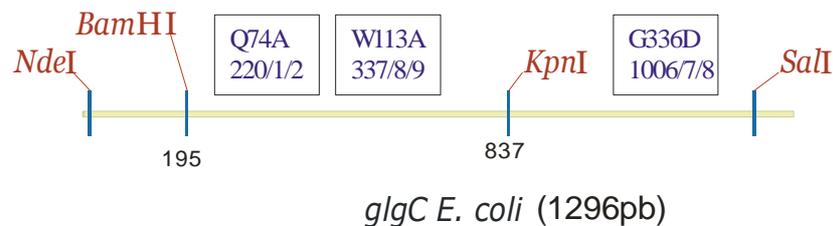


Figura 5.1. El gen *glgC* de *E. coli* en pETEC. Se muestra el sitio de corte de las enzimas de restricción y se indica numeración de las bases correspondientes al codón que codifica para los residuos mutados. Para obtener las dobles mutantes N-Δ15+Q74A, N-Δ15+W113A y N-Δ15+G336D, los plásmidos con la mutación simple correspondiente fueron digeridos con *BamHI* y *SalI*. Para construir las mutantes Q74A+G336D y W113A+G336D se trabajó con las enzimas *NdeI* y *KpnI*.

Todas las digestiones enzimáticas se realizaron individualmente, siguiendo las indicaciones del fabricante y, entre una y otra, se realizó una precipitación del ADN (Sección 5.10). Los fragmentos deseados, previa separación electroforética, se purificaron a partir de geles de agarosa y para la reacción de ligación se utilizó la enzima T₄ ADN ligasa (Promega). Con la mezcla de ligación se transformaron células de *E. coli* TOP10. La presencia de ambas mutaciones en el gen fue confirmada por secuenciación (Macrogen, Corea del Sur).

5.13. Expresión de las proteínas recombinantes

Las células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos correspondientes, se cultivaron durante toda la noche en medio LB-Kan, a 37 °C y en agitación. A este cultivo se lo diluyó 1/100 en medio LB-Kan y las células crecieron a 37 °C en agitador orbital a 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ ~0,6. La expresión se indujo con el agregado de IPTG 0,2 mM a los cultivos, manteniéndolos durante 20 h a una temperatura de 28 °C en condiciones de agitación. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 x g durante 15 min y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

5.14. Purificación de las ADP-Glc PPasas

Algunos procesos de purificación fueron comunes a todas las ADP-Glc PPasas, como es el caso de la obtención del extracto crudo, fraccionamiento salino y cromatografía de intercambio iónico. A continuación se detalla como se llevaron a cabo.

Las células que expresaban las proteínas recombinantes se resuspendieron en *Buffer A* [MOPS-NaOH 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM, sacarosa 5% (p/v)] y se procedió a su disrupción por sonicación. Se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C y la fracción soluble se sometió a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio al 30% de saturación de la misma sal, descartándose el precipitado. El sobrenadante se ajustó al 80% de saturación; el precipitado obtenido se resuspendió en *Buffer A* y fue desalado utilizando columnas de 10 ml de *Biogel Fast Desalting P-6DG* (Biorad). La muestra desalada se sembró en una columna de DEAE-*Sepharose* (Sigma) previamente equilibrada con *Buffer A*. La resina se lavó con este *buffer* y la elución de las proteínas retenidas se realizó con un gradiente lineal de NaCl (0,1 a 0,5 M) en *Buffer A*. Las fracciones que contenían actividad de ADP-Glc PPasa se juntaron y desalaron mediante columnas de *Biogel Fast Desalting P-6DG* (Biorad) equilibradas en *Buffer A* y fueron sometidas a un nuevo proceso de purificación cromatográfico, utilizando alternativamente las cromatografías que se describen a continuación:

A)-Cromatografía hidrofóbica

La resina utilizada fue una *Phenyl-Sepharose* (GE Healthcare). Tanto la muestra como la columna fueron previamente equilibradas con *Buffer B* (*Buffer A* + sulfato de amonio 1 M). Luego de sembrar la muestra, la columna se lavó con *Buffer B* y las proteínas retenidas se eluyeron al aplicar un gradiente de sulfato de amonio de 1 a 0 M en *Buffer A*.

B)- Cromatografía en resinas de pseudoafinidad por colorantes y afinidad por análogo de sustrato

La muestra, en *Buffer A*, se sembró en una columna de *Green A* (Amicon) o de 2'5' ADP-*Sepharose* (GE Healthcare), previamente equilibradas en este *buffer*. Luego de los correspondientes lavados con *Buffer A*, la elución de las proteínas se realizó con un gradiente de NaCl de 0,1 a 1M en *Buffer A*.

En lo que respecta a la conservación y almacenamiento de las muestras, las fracciones que contenían actividad enzimática se reunieron y la muestra resultante se desaló en resinas *Biogel Fast Desalting P-6DG* (Biorad) equilibradas previamente con *Buffer A*. Posteriormente, las muestras se concentraron y se conservaron convenientemente fraccionadas a -80 °C hasta su uso. En estas condiciones la actividad de las enzimas se mantuvo estable durante, al menos, 10 meses.

5.15. Ultrafiltración

Este proceso se utilizó para concentrar y eventualmente reacondicionar las fracciones que contenían las enzimas. Se utilizaron dispositivos concentradores (Amicon) con un MWCO de 10 kDa.

5.16. Contenido proteico

La concentración proteica se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), basado en la interacción del colorante Coomassie Blue (*Coomassie Brilliant Blue G*) con las proteínas y se utilizó BSA como estándar. Las mediciones se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro 325 BD (Metrolab).

5.17. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Se empleó el equipo Mini Protean II (Bio-Rad) utilizándose como soporte geles discontinuos con diferente concentración de acrilamida. La concentración del gel de apilamiento fue de 4% (p/v), mientras que la concentración del gel de separación osciló entre el 10% y el 15% (p/v), dependiendo de la masa molecular de las proteínas a separar. Las muestras se diluyeron con buffer de siembra 4X [Tris-HCl 12,5% (v/v), pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), Azul de Bromofenol 0,2% (p/v)] e incubadas en baño de 100 °C durante 8 min. La tinción de los geles se realizó con *Coomassie® Brilliant*

Blue R-250 al 0,1% (p/v) en una mezcla de metanol:ácido acético:agua en proporción 40:10:50. Para la decoloración de los geles se usó una solución compuesta por metanol:ácido acético:agua en una relación 5:7,5:87,5. En cada experiencia se utilizaron proteínas de masa molecular conocida como marcadores.

5.18. Estimación de la masa molecular de las proteínas en estado nativo

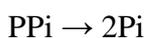
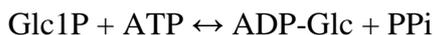
Para estimar la masa molecular de las proteínas recombinantes en su estado nativo, las muestras se sometieron a cromatografía de filtración por geles. Para ello, se equilibró una columna de *Superdex 200 HR 10/30* (GE Healthcare) con *Buffer G* [Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM]. Para calibrar la columna, se utilizaron proteínas de masa molecular conocida: anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), BSA (67 kDa), IgG de suero equino (140 kDa) y ADP-Glc PPasa de *E. coli* recombinante (200 kDa).

5.19. Medida de actividad de ADP-Glc PPasa

Una unidad (U) de actividad enzimática es igual a 1 μmol de producto (ADP-Glc), formado por minuto, bajo las condiciones especificadas en cada ensayo.

5.19.1. Ensayo A: método colorimétrico

Este método se basa en la cuantificación de Pi, por medio de una reacción de color con el complejo Verde de Malaquita-molibdato de amonio (Fusari y col., 2006). El Pi se genera por hidrólisis enzimática del producto de la reacción, el PPi, llevada a cabo por una pirofosfatasa inorgánica. Las reacciones acopladas del método son:



Se prepara una mezcla previa de reacción estándar que contiene, salvo indicación en contrario, MOPS-NaOH 100 mM pH 8,0, MgCl_2 7 mM, BSA 0,2 mg/ml, 0,025 U de pirofosfatasa inorgánica (Sigma), y alternativamente los sustratos ATP 1 mM o

Glc1P 1,5 mM y la muestra en una dilución adecuada. Se inicia la reacción con el agregado del sustrato faltante, alcanzando en este momento un volumen final de reacción de 50 μ l. Se deja transcurrir la reacción a 37 °C por 10 min, luego de los cuales se finaliza mediante el agregado de 375 μ l de reactivo de color (Verde de Malaquita en molibdato de amonio). Se adicionan 50 μ l de citrato de sodio 34% (p/v) para estabilizar el color desarrollado. La lectura de la absorbancia de cada muestra se midió a 630 nm en un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation). Estos valores de absorbancia se convirtieron en U/mg utilizando el factor de conversión obtenido mediante una curva de calibrado con testigos de Pi procesados de la misma manera que las muestras.

5.19.2. Ensayo B: método radioquímico

Alternativamente, se utilizó un método radioactivo que utiliza [14 C]Glc1P y que permite la cuantificación de [14 C]glucógeno (Yep y col., 2004). La reacción se llevó a cabo durante 10 min a 37 °C en una mezcla que contiene Hepes 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 7 mM, [14 C]Glc1P 0,5 mM (800 a 1000 cpm/nmol), ATP 1,5 mM, pirofosfatasa 0,0015 U/ μ l y BSA 0,2 mg/ml con el agregado de cantidad conveniente de la muestra a analizar en un volumen total de 100 μ l. La reacción enzimática se detuvo por calentamiento a 100 °C durante 1 min. La [14 C]ADPGlc formada fue convertida en [14 C]glucógeno utilizando glucógeno sintasa de *E. coli* y glucógeno no radioactivo. El glucógeno formado se precipitó con una solución de KCl 1% (p/v) en metanol al 75% (v/v), se lavó con la misma solución y la radiación se midió en un contador de centelleo.

5.20. Análisis cinético

En todos los casos se determinaron velocidades iniciales (menos del 10 % de conversión de sustrato en producto). Como en la mayoría de las experiencias el objetivo fue la caracterización cinética de efectores, las medidas de velocidad se realizaron en presencia de concentraciones saturantes o condiciones estándar para todos los componentes de la mezcla de reacción mientras se variaba la concentración del efector en estudio.

La determinación de parámetros cinéticos se efectuó en base a un ajuste no lineal de los datos a las ecuaciones de velocidades iniciales correspondientes, utilizando el programa

Origin™ 7.0. En general, para el ajuste de datos de curvas de velocidad en función de la concentración, se utilizaron ecuaciones sencillas de tipo efecto medio de la dosis-respuesta, tales como la ecuación de Hill (Dahlquist, 1978; Segel, 1993; Bisswanger, 2002):

$$v = V_{\max} C^{n_H} / (C_{0,5}^{n_H} + C^{n_H}) \quad (5.1)$$

Otra ecuación utilizada fue la ecuación de Hill modificada, para aquellos casos en los que se consideró la presencia de un efector distinto del sustrato:

$$v = v_0 + (V_{\lim} - v_0) C^{n_H} / (C_{0,5}^{n_H} + C^{n_H}) \quad (5.2)$$

En ambas ecuaciones, v es la velocidad inicial que se obtiene para cada concentración inicial de sustrato o efector; n_H es el coeficiente de Hill que representa el grado de cooperatividad que existe en la unión del ligando a la enzima (en algunos sistemas también puede estar representando el grado de heterogeneidad de los sitios) (Segel, 1993), C es la concentración de sustrato o efector utilizada en cada experiencia.

En la ecuación (5.1), V_{\max} corresponde a la velocidad máxima de reacción a concentraciones saturantes del ligando considerado y $C_{0,5}$ es la concentración de ligando necesaria para alcanzar un 50 % de la V_{\max} .

En la ecuación (5.2), v_0 es la velocidad sin efector presente, V_{\lim} es la velocidad límite alcanzada en presencia de concentraciones saturantes del efector. Este efector puede ser alternativamente un activador (A) o un inhibidor (I), donde $(V_{\lim} - v_0)/v_0$ representa las veces “netas” de activación (o inhibición) máximas y $A_{0,5}$ (o $I_{0,5}$) representa la concentración de activador (o inhibidor) necesaria para obtener una activación (o inhibición) igual a la mitad de ese valor, respectivamente.

Para el caso particular de los inhibidores la ecuación (5.2) resulta:

$$v_i = v_0 + (V_{\lim} - v_0) I^{n_H} / (I_{0,5}^{n_H} + I^{n_H}) \quad (5.3)$$

luego,

$$v_i/v_0 = 1 + (V_{\lim}/v_0 - 1) I^{n_H} / (I_{0,5}^{n_H} + I^{n_H}) \quad (5.4)$$

donde (v_i/v_0) representa la actividad enzimática remanente para cada concentración de inhibidor.

Los valores de las constantes cinéticas se determinaron en base al resultado de al menos dos determinaciones independientes, con una variación menor a $\pm 10\%$.

5.21. Electroforesis capilar

El equipo de electroforesis capilar utilizado fue un SpectraPHORESIS 100 (Thermo Separation Products). Se usaron capilares recubiertos con grupos sulfónicos (CE100-SA, Zero EOF, Microsolv) que tienen la particularidad de no presentar flujo electrosmótico. Su diámetro interno es de 100 μm y su longitud total de 100 cm, siendo de 45 cm la distancia desde el lugar de ingreso de la muestra hasta la zona del capilar donde se produce la detección de los compuestos por absorción UV. Los datos fueron registrados y procesados con el programa RIAC-Procesar V 2.0, con una velocidad de adquisición de 10 datos/s.

El marcador de corrida utilizado fue el ácido hidrocafeico [ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico (Sigma)], que a pH 8,0 tiene carga negativa y además presenta un grupo fenilo, con elevada absorbancia específica a 220 nm. Como *buffer* de corrida electroforética se utilizó MOPS-NaOH 100 mM a pH 8,0, solo o con la adición del ligando correspondiente a una dada concentración, de acuerdo a la experiencia. Las soluciones de las enzimas estudiadas, de ATP, de Glc1P y de ácido hidrocafeico fueron preparadas en el *buffer* de corrida correspondiente. Para todas las soluciones se utilizó agua calidad *MilliQ*. Previo a su uso, las soluciones proteicas fueron centrifugadas a 10.000 x g durante 10 min mientras que las demás soluciones fueron filtradas (filtros de 0,22 μm) y desgasificadas por sonicación en un equipo Cole-Palmer modelo 8891. La concentración de proteína utilizada en las distintas experiencias fue de 0,3 mg/ml. Las condiciones utilizadas en electroforesis capilar fueron las siguientes: polaridad negativa, o sea, el ánodo conectado al lugar de salida de la muestra, voltaje: 15 kV, detección a 220 nm, temperatura 25° C. Previo a cada corrida, se realizó, un lavado de 5 min con agua *MilliQ* seguido de las siguientes etapas, todas realizadas con el *buffer* de corrida correspondiente: un lavado de 5 min, migración electroforética por 10 min y finalmente un lavado de 3 min. Las inyecciones de siembra se realizaron por vacío. Se utilizó un método de siembra escalonado (Varenne y col., 2003), intercalando *buffer* de corrida entre el marcador de variación de campo eléctrico y la muestra, para evitar posibles interacciones entre ellos. Se procedió de la siguiente manera: primero se inyectó el marcador (1 s), luego *buffer* de corrida (1 s) y finalmente la enzima correspondiente (1 s).

5.21.1. Determinación de la constante de disociación de ligandos por electroforesis capilar de afinidad

La electroforesis capilar de afinidad (ECA) se basa en los cambios de movilidad electroforética que experimenta una proteína al unir un compuesto cargado (Heegaard y col., 1998). Se utilizó en el modo de equilibrio dinámico, en el que se mide la movilidad de la proteína al interactuar con un ligando que está presente en el medio de corrida, a una dada concentración (Heegaard y col., 1998; Varenne y col., 2003).

El cálculo de la constante de disociación (K_D) se efectuó ajustando los datos a la isoterma directa (Heegaard y col., 1998; Varenne y col., 2003) con una modificación, en lugar de ajustar los datos a una hipérbola rectangular se ajustaron a la ecuación de Hill (ecuación 5.1) utilizando el programa Origin™ 7.0 según:

$$\Delta\mu_{el} = (\mu_{el}^C - \mu_{el}^0) = \Delta\mu_{el_{max}} \cdot (L)^{nH} / [(L)^{nH} + (K_D)^{nH}] \quad (5.5)$$

Donde $\Delta\mu_{el}$ es la diferencia entre la movilidad de la proteína a una concentración dada del ligando L y la movilidad en ausencia de mismo (μ_{el}^C) y (μ_{el}^0), respectivamente. De forma semejante, el $\Delta\mu_{el_{max}}$ corresponde a la diferencia entre la movilidad de la proteína a concentraciones saturantes de ligando y la movilidad de la proteína en ausencia del mismo.

Como el capilar utilizado en nuestro trabajo no presenta flujo electrosmótico, no se necesita corregir la movilidad por este efecto, ya que los desplazamientos son sólo debidos a la movilidad electroforética de los compuestos y al campo aplicado, por lo que la expresión de la movilidad electroforética sería:

$$\mu_{el} = Vel / E = (Lv/tm) / (V/Lt) \quad (5.6)$$

Siendo, Vel: velocidad electroforética, E y V campo eléctrico y voltaje aplicados respectivamente; Lv: longitud desde el lugar de siembra hasta la ventana de detección, tm: tiempo que tarda el compuesto en recorrer Lv, Lt: longitud total del capilar.

Para corregir las posibles variaciones en los tiempos de migración que pudieran producirse en cada corrida, no atribuibles al fenómeno específico de unión, se sembró como referencia, junto con la proteína, un marcador con carga negativa al pH de trabajo.

Los valores de $\Delta\mu_{el}$ obtenidos para cada concentración de ligando fueron calculados corrigiendo los tiempos de migración con la siguiente ecuación:

$$\Delta\mu_{el} = (\mu_{el}^C - \mu_{el}^0) = [(1/tm_P^C) \cdot (tm_M^C / tm_M^0) - (1/tm_P^0)] Lv/E \quad (5.7)$$

Donde tm_P^0 y tm_P^C corresponden respectivamente a los tiempos de migración de la proteína en ausencia y presencia de una determinada concentración de ligando. De igual modo, tm_M^0 y tm_M^C son, respectivamente, los tiempos correspondientes al marcador en ambas condiciones.

5.21.2. Estimación del número de moléculas de FBP y PLP unidas a la enzima

Para estimar el número de moléculas unidas se utilizó la ecuación de Henry (Tanford, 1961):

$$\mu_{el} = Q_P \cdot f(K.R) / 6\pi\eta R (1+K.R) \quad (5.8)$$

Siendo Q_P : carga de la proteína; K : constante de Debye-Hückel, que depende de la fuerza iónica; R : radio hidrodinámico; η : viscosidad del medio; $f(K.R)$: función de Henry, que depende de la fuerza iónica a través de K y del radio hidrodinámico.

Además $Q_P = z_P \cdot e$, donde, z_P : valencia de la proteína y e : carga elemental del electrón.

Si se considera que el radio hidrodinámico de la macromolécula no cambia significativamente luego de la interacción no covalente con ligandos cargados, (Gao y col., 1994), y que también las restantes condiciones se mantienen constantes, el cociente de movilidades de la proteína entre una dada concentración de ligando (μ_{el}^C) y su ausencia (μ_{el}^0), resulta proporcional a la relación de las cargas respectivas o directamente a la relación de las valencias entre uno y otro caso, obteniéndose la siguiente ecuación,

$$\mu_{el}^C / \mu_{el}^0 = Q_P^C / Q_P^0 = (z_P + \Delta z) / z_P = ((z_P + n \cdot z_L) / z_P) \quad (5.9)$$

Siendo Δz variación (en este caso incremento) de valencia debida a la unión de ligandos, n : N° de ligandos unidos/molécula de proteína y z_L : valencia del ligando.

La relación entre la movilidad que presenta la enzima en presencia del ligando cargado con respecto a la movilidad que posee en ausencia del mismo, se calculó con los tiempos de migración obtenidos en las diferentes condiciones experimentadas, teniendo en cuenta las correcciones por efectos no específicos, según la siguiente expresión:

$$\mu_{\text{elP}}^{\text{C}} / \mu_{\text{elP}}^{\text{0}} = (\text{tm}_{\text{M}}^{\text{C}} / \text{tm}_{\text{P}}^{\text{C}}) \cdot (\text{tm}_{\text{P}}^{\text{0}} / \text{tm}_{\text{M}}^{\text{0}}) \quad (5.10)$$

La valencia de la enzima en ausencia de ligando (z_{P}) al pH de trabajo, se calculó utilizando el programa EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>). Al pH del buffer de corrida, la subunidad presenta una valencia calculada de -10,9913, lo que representa una valencia de -43,9652 por tetrámero de enzima. Como $\Delta z = n \cdot z_{\text{L}}$, para determinar el número de ligandos unidos por molécula de enzima (n), se le asignó una valencia (z_{L}) de (-4) para FBP, y de (-2) para el PLP (suponiendo constantes de disociación de los fosfatos semejantes a las del ácido orto-fosfórico).

5.22. Modificación química de las enzimas con PLP (fosfo-piridoxilación reductiva).

La enzima salvaje y las mutantes W113A y Q74A se sometieron a una fosfo-piridoxilación reductiva, que se realizó a temperatura ambiente, según técnica descrita en (Parsons y Preiss, 1978a), excepto que se utilizó PLP no radiactivo. Las enzimas, en una concentración aproximada de 50 $\mu\text{g/ml}$, se incubaron en HEPES-NaOH 50 mM pH 8,0, con PLP 10 μM en presencia de 2,5 mM de ADP-Glc. Luego de 30 min de incubación se agregó NaBH_4 hasta una concentración final de 2 mM. Se dejó transcurrir esta reducción por 30 min, luego de los cuales, las muestras fueron concentradas (equipos Centricon) y reacondicionadas en el buffer correspondiente, para posteriores análisis de contenido proteico, actividad y movilidad en electroforesis capilar.

5.23. Medidas espectrofluorimétricas

Se realizaron medidas de fluorescencia intrínseca. Los espectros se registraron en un espectrofluorímetro HITACHI F-2000. La longitud de onda de excitación (λ_{exc}) fue de 290 nm, con una ventana de 5 nm para la excitación y para la emisión. En general, salvo aclaración en contrario, el espectro de emisión se adquirió entre 300 y 400 nm a una velocidad de 120 nm/min.

La concentración de enzima utilizada en las distintas experiencias fue de 0,1 mg/ml (5 μ M en tetrámero), el volumen mínimo necesario para la lectura fue de 350 μ l, con cubeta termostatzada a 26 °C de 1 cm de paso de luz. Las soluciones de proteína se prepararon en MOPS-NaOH 100 mM pH 8,0; con el agregado de glicerol al 10 %. Los distintos efectores se prepararon en MOPS-NaOH 100 mM pH 8,0.

Los espectros se normalizaron, se corrigieron por dilución y se graficaron con el programa *Origin 7.0*. Previo a su análisis, utilizando este mismo programa, se realizó un *smoothing* de las curvas (suavizado), considerando un rango de 15 puntos.

Cuando las medidas se efectuaron en presencia de ligandos que presentaban absorción de luz a las longitudes de onda de trabajo, se efectuaron correcciones de intensidad de fluorescencia de acuerdo a:

$$F_c = F_{obs} \cdot 10^{0,5 \cdot (DO_{\lambda_{emis}} + DO_{\lambda_{excit}})} \quad (\text{Lakowicz, 1999}) \quad (5.11)$$

Siendo F_c la fluorescencia corregida, F_{obs} la fluorescencia medida, $DO_{\lambda_{emis}}$ y $DO_{\lambda_{excit}}$ las densidades ópticas que presenta el compuesto a la λ de emisión y a la λ de excitación respectivamente. Para estudios comparativos de espectros, donde todos presentaban el compuesto a la misma concentración, no se consideró necesaria la corrección.

5.24. Estudios de dicroísmo circular

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco-810 con muestras termostatzadas a 25°C. La concentración de la enzima salvaje y las mutantes fue de 0,23 mg/ml, en MOPS 20 mM pH 8,0. Las mediciones se realizaron a una velocidad de 100 nm/min, considerándose el espectro promedio. La cubeta tenía un paso de luz de

0,2 cm. Cada espectro se corrigió por sustracción del espectro blanco correspondiente y en las experiencias de titulación por efectores, los espectros se corrigieron también por dilución. Para graficarlos se calcula la elipticidad molar media $(\theta)_\lambda$ (en grado.cm²/dmol), de la siguiente forma:

$$(\theta)_\lambda = (\theta \cdot 0,1 \cdot \text{MRW}) / (\text{C} \cdot \text{L}) \quad (5.15)$$

Siendo: θ , el dato que informa el espectropolarímetro (en miligrados); MRW, la masa molar promedio de cada residuo para esa proteína; C, concentración de proteína (en mg/ml); L, paso de luz (en cm).

5.25. Obtención de los polipéptidos provenientes del corte con metal y reductores

Las soluciones de CuCl₂, del ácido ascórbico y de H₂O₂ fueron preparadas en el momento previo a su utilización. Antes de realizar las experiencias de corte, las enzimas se desalaron utilizando resinas de *Biogel Fast Desalting P-6DG* (Biorad) equilibradas con *buffer* MOPS-NaOH 100 mM pH 8,0. Se ensayaron diferentes condiciones de incubación de la enzima con el metal en lo que respecta a temperaturas, tiempos y concentraciones de reactivos. En base a los resultados obtenidos se estableció que las mejores condiciones son las siguientes (agregando los reactivos en este orden): *buffer* MOPS-NaOH 100 mM pH 8,0; Cu²⁺ 40 μM, enzima 0,4 mg/ml, ácido ascórbico 40 mM, H₂O₂ 1 mM. Incubar 4 min a temperatura ambiente. Detener la reacción con EDTA 25 mM pH: 8,0 y conservar a 0 °C hasta su procesamiento.

El análisis electroforético de los fragmentos se realizó por SDS-PAGE. Para determinar la influencia del Mg²⁺ o del ATP sobre la aparición de estos fragmentos, previo a la adición del metal y reductores, se incubó la enzima salvaje con estos sustratos, a concentraciones variables, durante 5 min.

5.25.1. Estudio cinético de la inactivación enzimática del Cu^{2+} y de la protección ejercida por el ATP y el Mg^{2+}

Se enfrentó la enzima a soluciones de concentración variable de CuCl_2 , adicionadas de ascorbato 20 mM y de H_2O_2 1mM, a 25 °C y en *buffer* MOPS-NaOH 50 mM pH 8,0. Para seguir el progreso de la inactivación se ensayó la actividad enzimática en alícuotas extraídas de la muestra principal, inhibidas con EDTA 25 mM en los intervalos de tiempo indicados. Las soluciones utilizadas se prepararon en el momento de usar. Para investigar la influencia del Mg^{2+} o ATP, antes de realizar la experiencia de inactivación, se incubó la enzima 5 min a 25 °C, con cada uno de estos compuestos.

5.26. Modelado molecular.

Se generaron modelos estructurales de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje (residuos 9 al 428) mediante el programa Modeller 9v2 (<http://salilab.org/modeller/>) (Sali y Blundell, 1993). Se utilizaron como templado las coordenadas atómicas de la ADP-Glc PPasa de *S. tuberosum*, cadena A de la subunidad pequeña, en ausencia de ligandos (PDB code 1YP2) o en complejo con el ATP (PDB code 1YP3) (Jin y col., 2005) y las de la enzima ADP-Glc PPasa de *Agrobacterium tumefaciens* (PDB code 3BRK) (Cupp-Vickery y col., 2008). El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa Bioedit v7.0.8 (IbisBioscience 2007) y también en forma manual, considerando aquellos residuos conservados funcionalmente y la predicción de estructuras secundarias. Las estructuras generadas fueron evaluadas empleando el programa *on-line* Verify 3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) (Bowie y col., 1991; Luthy y col., 1992; Eisenberg y col., 1997) y su visualización se realizó con el programa Deep view/Swiss PDB viewer v4.0 (www.expasy.org/spdbv) (Guex y Peitsch, 1997).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Capítulo I: Estudios realizados sobre la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli*

6.1.1. Caracterización del mecanismo de regulación alostérica que ejerce la FBP

6.1.1.1. Introducción

Aunque se dispone de abundante información de tipo cinético y estructural sobre las ADP-Glc PPasas, se desconoce hasta el momento el modelo mecanístico, a nivel molecular, de su regulación alostérica. En particular, la enzima de *E. coli* presenta como activador principal a la FBP, metabolito intermediario de la glucólisis por la vía de Embden-Meyerhof. Se han individualizado distintos residuos que participan de esta regulación alostérica, particularmente la Lys³⁹, involucrada en la unión del activador FBP y su análogo PLP (Parsons y Preiss, 1978a; 1978b; Gardiol y Preiss, 1990). Sumados a esta localización primaria de un residuo específico involucrado en la unión de la FBP (Parsons y Preiss, 1978a; 1978b; Gardiol y Preiss, 1990) estudios posteriores demostraron que la regulación es consecuencia de la interacción de los dominios N- y C-terminal (Ballicora y col., 2002; Bejar y col., 2004). Este último dominio es característico de las ADP-Glc PPasas reguladas, tal como lo muestra el hecho de que estas enzimas son más grandes, en su extremo C-terminal, que otras NDP-azúcar PPasas que no están sujetas a regulación (Ballicora y col., 2003a).

Otros estudios sobre residuos involucrados, como la mutagénesis de Ala⁴⁴ y de His⁸³, generó enzimas con baja afinidad por el activador (Meyer y col., 1993; Hill y Preiss, 1998), mientras que el reemplazo de los residuos Gly³³⁶ y Pro²⁹⁵, principalmente por Asp, generó mutantes preactivadas y con mayor afinidad aparente por FBP (Meyer y col., 1998a; Meyer y col., 1998b). Además, la Arg⁴⁰ y la Arg⁵² se alinean con dos Arg importantes para la activación en la enzima de *A. tumefaciens* por F6P (Gomez-Casati y col., 2001). En un trabajo reciente, (Ballicora y col., 2007) ubicaron los residuos mencionados en el modelo tridimensional de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* obtenido por homología, y encontraron que todos se encuentran en la interfase comprendida entre los dominios N- y C-terminal (Figura 6.1). Este hallazgo refuerza la hipótesis de que esta interfase juega un rol fundamental en la interacción del activador con la enzima. En el

trabajo de (Ballicora y col., 2007), utilizando una técnica exploratoria de mutagénesis al azar de inserción de un pentapéptido, se encontró que una de las mutantes obtenidas, denominada “de inserción 8” (Ec-ins8) presentaba un comportamiento muy peculiar con respecto al activador. Así, esta enzima mutante perdía la capacidad de ser activada por FBP cuando la inserción que presentaba se producía entre los residuos Leu¹⁰² y Pro¹⁰³ que corresponden al *loop* donde se encuentra la Tyr¹¹⁴, residuo identificado como involucrado en la unión del ATP (Kumar y col., 1988). A pesar de que esta inserción no se producía en el sitio de unión del activador, las características cinéticas particulares de esta mutante sugieren que esta región está relacionada de alguna manera con la regulación alostérica (Ballicora y col., 2007).

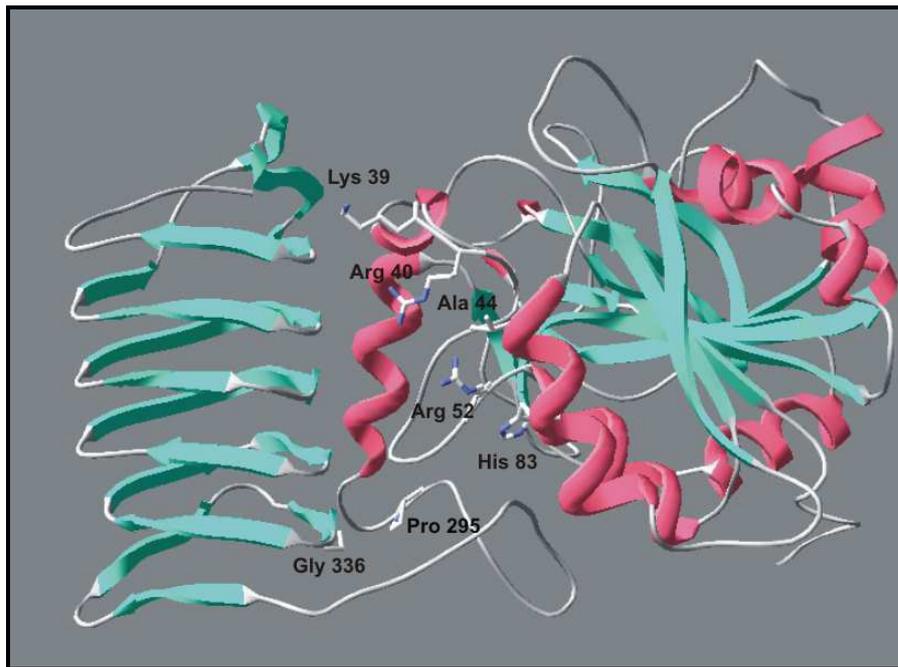


Figura 6.1. Modelo de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* obtenido por homología a partir de la estructura cristalina del homotetrámero de la enzima de *S. tuberosum* y de *A. tumefaciens* (Sección 5.25) donde se indican los residuos involucrados en la activación, localizados a lo largo del surco que separa los dominios N- y C-terminales. En verde se muestran las láminas β , en rosado las hélices α y los *loops* en gris. Figura obtenida con el programa Deep view/Swiss PDB viewer v4.0.

6.1.1.2. Resultados

Estudios de modelado molecular de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* mostraron que en el dominio N-terminal hay tres *loops* vecinos dirigidos hacia la zona de unión del ATP. Uno de ellos está directamente involucrado en la regulación alostérica, ya que contiene a la Lys³⁹. Otro es el *loop* donde se produce la inserción de la mutante Ec-ins8 y que contiene a la Tyr¹¹⁴ y, finalmente, hay un tercer *loop*, intermedio y adyacente a ambos dos (Figura 6.2). A partir de este escenario derivado del modelado molecular se planteó una hipótesis de trabajo que permitiera explicar por qué la enzima mutante Ec-ins8 es insensible a la activación por FBP, pese a que la mutación está localizada distante del sitio de unión del activador alostérico (Ballicora y col., 2007). En tal hipótesis se plantea que hay una interacción entre los tres *loops* adyacentes que estaría involucrada en el mecanismo de regulación alostérica de la FBP. Al realizar un alineamiento de secuencias entre las ADP-Glc PPasas de distintas bacterias y plantas, se observó que en estos dos últimos *loops*, los residuos W¹¹³ y Q⁷⁴ (numeración para la enzima de *E. coli*) estaban altamente conservados entre las ADP-Glc PPasas de bacterias y plantas, en uno y otro *loop*, respectivamente (Figura 6.3), por lo que tales residuos podrían ser críticos en el mecanismo regulatorio según el modelo hipotético planteado.

La hipótesis de trabajo se ve, en principio, soportada por los modelos estructurales tridimensionales de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* obtenidos a partir de las estructuras de las enzimas de *S. tuberosum* y *A. tumefaciens*, mostrados en la Figura 6.4. En esta figura se observan dos estructuras: una forma abierta, sin sustrato (Figura 6.4-A), y una forma cerrada, modelada a partir de la estructura que posee ATP unido (Figura 6.4-B). Estos modelos estructurales difieren principalmente en la región que incluye al *loop* que contiene a la Lys³⁹ (involucrada en la unión del activador) y en los *loops* adyacentes donde están localizados la Gln⁷⁴ y el Trp¹¹³, respectivamente. En el modelo de la forma cerrada, el grupo amida de la Gln⁷⁴ establece uniones tipo puente hidrógeno con grupos de la cadena peptídica de la Arg²⁹ y Trp¹¹³ (Figura 6.4-B). La Arg²⁹ forma parte del *loop* rico en Gly propuesto como parte del sitio activo (Cupp-Vickery y col., 2008). Estas uniones se interrumpen al producirse el cambio conformacional que lleva a la forma abierta (Figura 6.4-A).

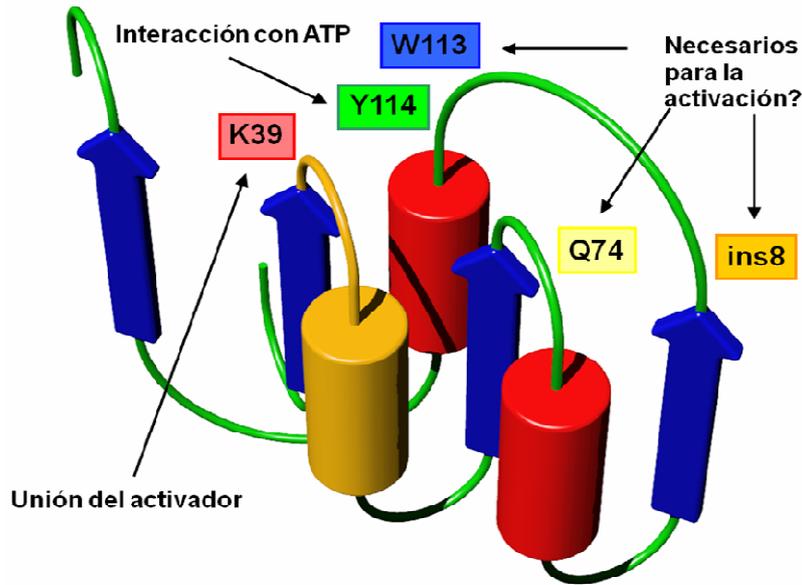


Figura 6.2. Arreglo tridimensional del extremo N-terminal de la ADP-Glc PPasa de *E. coli*. Representación tipo *cartoon* del modelo correspondiente a la primera mitad del dominio tipo Rossman (150 residuos). Los aminoácidos involucrados en la interacción con ATP (Tyr¹¹⁴) y con FBP (Lys³⁹) se destacan en verde y en rojo respectivamente. El sitio de la inserción en la mutante Ec-ins8 se destaca en naranja. Los residuos altamente conservados Trp¹¹³ y Gln⁷⁴ localizados en regiones de *loops* se muestran en azul y amarillo respectivamente.

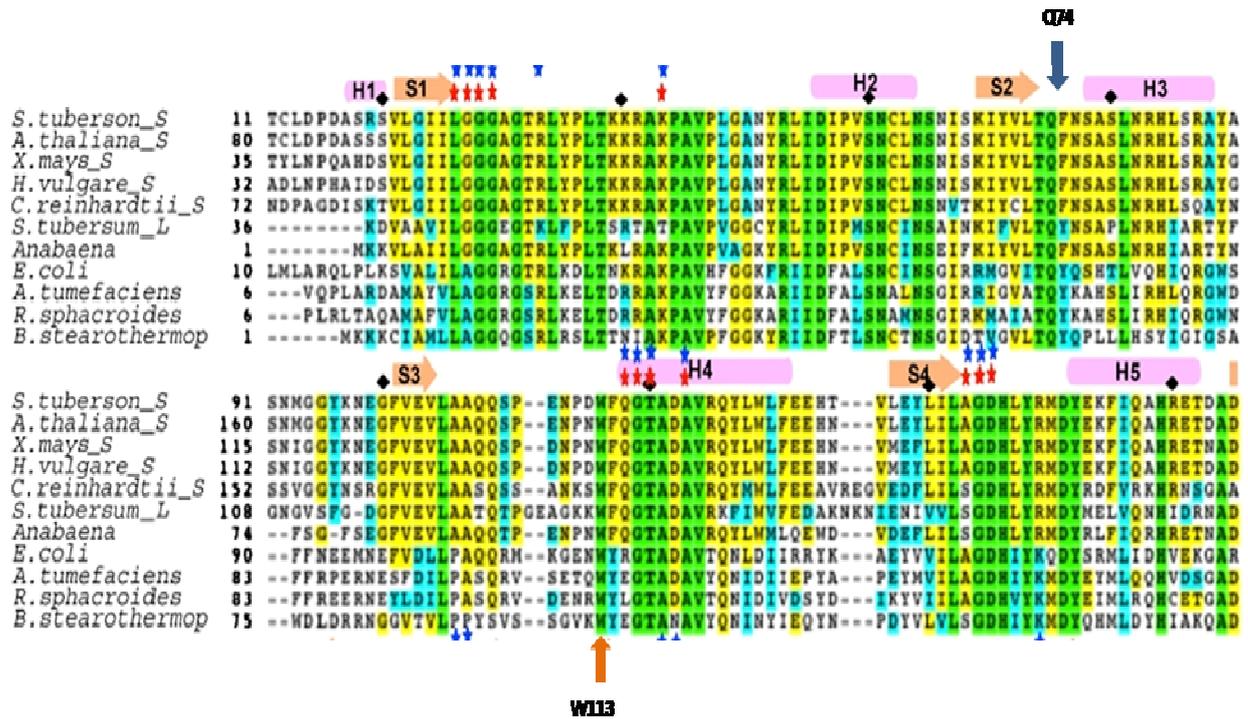


Figura 6.3. Alineamiento de secuencias de las ADP-Glc PPasas de diversos orígenes. Se muestra la zona donde se encuentran los residuos Gln⁷⁴ y Trp¹¹³ (numeración de la enzima de *E. coli*) indicados con flechas, conservados en todas estas secuencias peptídicas. Las estructuras secundarias se muestran por encima de las secuencias y se indican como: H: hélices α ; S: láminas β . Estrellas azules: residuos que interaccionan con ADP-Glc; estrellas rojas: residuos que interaccionan con ATP. Figura adaptada de (Jin y col., 2005).

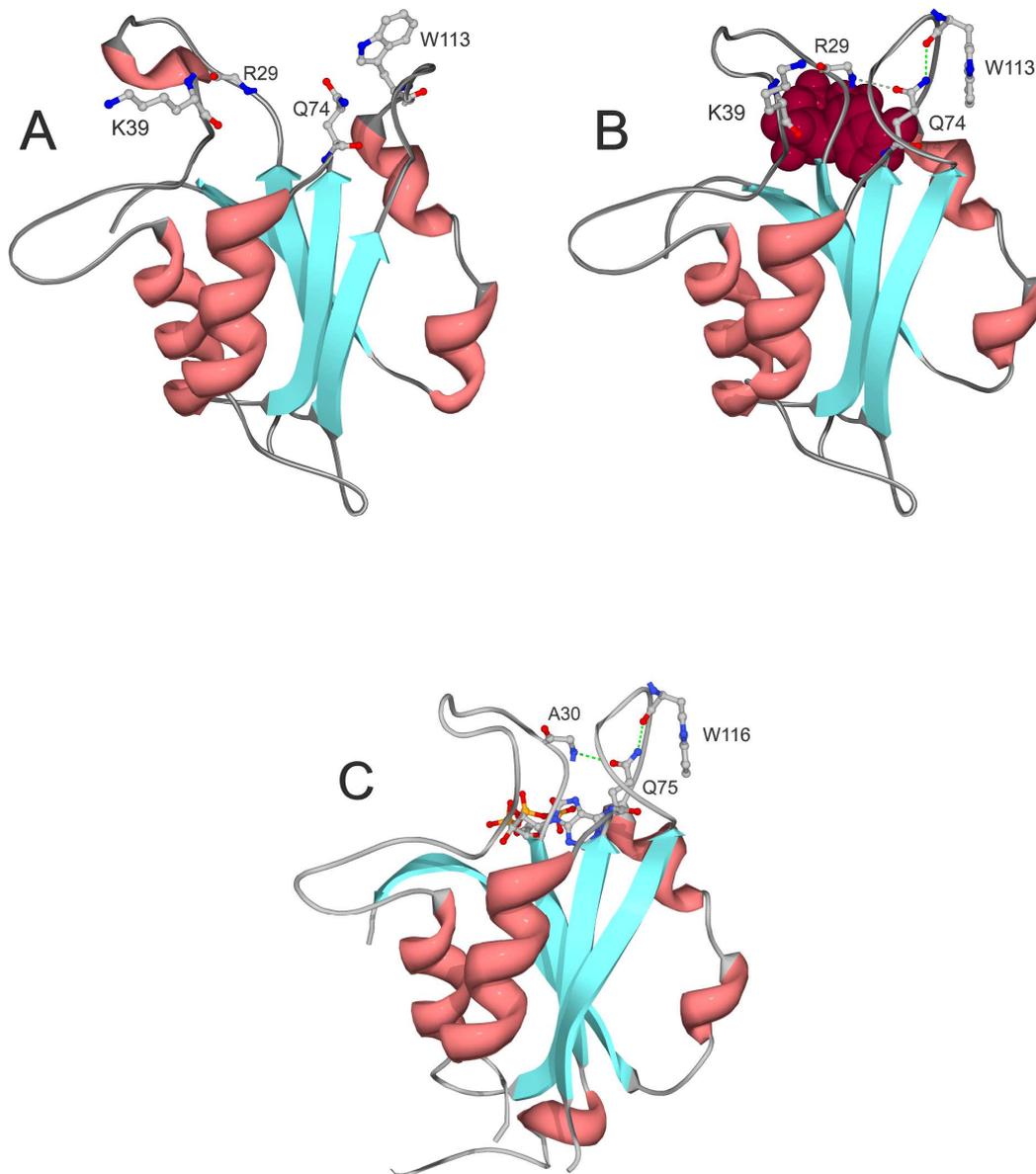


Figura 6.4. Modelos que muestran el arreglo tridimensional de los *loops* estudiados en este trabajo y reconocidos como críticos para la regulación alostérica (dominio N-terminal). **(A):** modelo de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* sola **(B):** modelo de la enzima con el sustrato ATP unido (en rojo representados los radios de Van der Waals). Se muestran las uniones puente hidrógeno que se establecen en esta forma “cerrada” de la enzima entre los residuos clave para la regulación alostérica. **(C):** estructura cristalina de la ADP-Glc PPasa de papa en complejo con ATP. Las interacciones que se observan en la Figura 6.4-B también se establecen en la estructura cristalina de la enzima de tubérculo de papa. Los modelos se construyeron tal como se describe en Materiales y Métodos (Sección 5.26).

Las distancias entre los átomos involucrados en estas uniones hidrógeno en la forma cerrada, aumentan de 3,2 a 6,2 y de 2,6 a 7,2 Å, respectivamente, en la forma abierta. Por lo tanto, estos modelos proveen de información estructural relevante a favor de la hipótesis por la cual el principal efecto del activador alostérico FBP se ejercería favoreciendo y/o estabilizando la forma cerrada de la enzima induciendo un cambio conformacional desde la forma abierta. Según esta hipótesis la Gln⁷⁴ comunica un *loop* importante para la catálisis con un *loop* importante para la regulación.

Para investigar esta hipótesis se construyeron las proteínas mutantes W113A y Q74A de la ADP-Glc PPasa de *E. coli*. Los plásmidos correspondientes a estas mutantes, [pETEC/W113A] y [pETEC/Q74A], se expresaron en células de *E. coli* BL21(DE3). Las proteínas mutantes obtenidas se purificaron en forma similar a la enzima salvaje, realizando, consecutivamente, cromatografías de intercambio iónico (DEAE-*Sepharose*) y de afinidad por colorantes (*Green A*) (Sección 5.14.1.2). El grado de pureza alcanzado fue, en ambos casos, superior al 90 % (Figura 6.5).

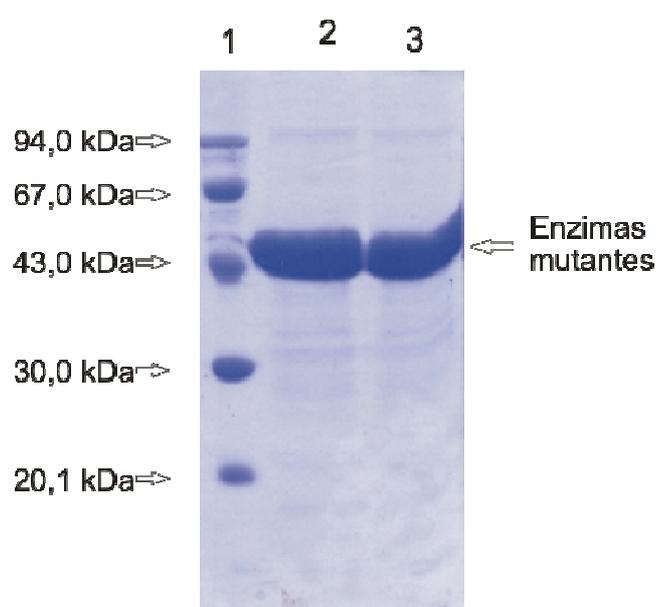


Figura 6.5. Análisis de las enzimas mutantes por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Calle 1: Marcadores de masa molecular (GE Healthcare). Calle 2: enzima mutante W113A. Calle 3: enzima mutante Q74A.

Se determinaron las propiedades cinéticas de la enzima salvaje y las enzimas mutantes con respecto al activador FBP. La Figura 6.6 muestra que las enzimas mutantes resultan prácticamente insensibles a la activación por FBP, siendo, por consiguiente, su comportamiento cinético similar al informado para la mutante Ec-ins8 (Ballicora y col., 2007). Mientras las enzimas mutantes no muestran activación por parte de la FBP (sólo 1,5 veces), este efector aumenta la V_{max} de la enzima salvaje aproximadamente 55 veces (Figura 6.6).

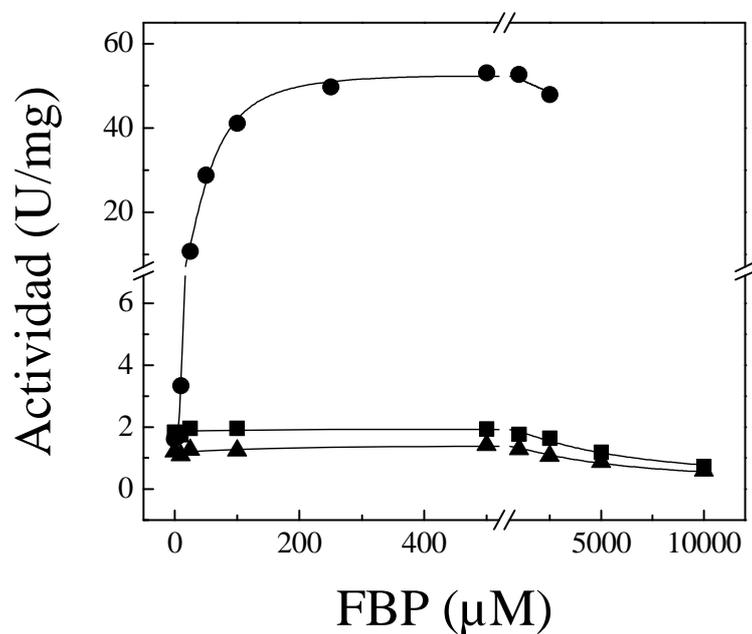


Figura 6.6. Falta de sensibilidad a la activación por FBP de las enzimas ADP-Glc PPasas mutantes W113A y Q74A. Curvas de saturación por FBP obtenidas para la enzima salvaje (●), mutante Q74A (▲) y mutante W113A (■). Las experiencias se realizaron utilizando el Ensayo B descrito en Materiales y Métodos (Sección 5.19.1.2).

Ambas enzimas se caracterizaron con respecto a los sustratos en ausencia y en presencia del activador FBP. La Tabla 6.1 muestra que la única diferencia cinética significativa, exhibida por las mutantes, fue la insensibilidad al activador alostérico FBP. Los parámetros cinéticos de la enzima salvaje hacia los sustratos fueron afectados por la FBP, ya que la presencia del activador aumenta la afinidad por la Glc1P ~5 veces y hacia el ATP ~35 veces. Para las enzimas mutantes los valores de $S_{0.5}$ para los sustratos no disminuyeron

significativamente y hasta en algunos casos aumentaron ligeramente en presencia de FBP. En su totalidad, los resultados de la Tabla 6.1 muestran que los parámetros cinéticos para los sustratos de ambas enzimas mutantes son semejantes a los de la enzima salvaje en ausencia del regulador alostérico.

Tabla 6.1. Parámetros cinéticos obtenidos para la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje y mutantes W113A y Q74A. Las reacciones se realizaron según el Ensayo B. Los datos son el promedio de al menos tres experiencias idénticas e independientes \pm la diferencia promedio de los triplicados.

Enzima	FBP (mM)	ATP		Glc1P		Mg ²⁺	
		S _{0,5} (mM)	n _H	S _{0,5} (mM)	n _H	S _{0,5} (mM)	n _H
Enzima salvaje	0	11,2 \pm 4,0	1,3	0,21 \pm 0,05	0,6	5,0 \pm 0,5	2,0
	2	0,32 \pm 0,02	2,3	0,04 \pm 0,01	1,1	2,4 \pm 0,1	3,6
W113A	0	5,8 \pm 1,2	1,1	0,33 \pm 0,07	1,3	4,8 \pm 0,2	2,2
	2	2,5 \pm 0,26	1,5	0,41 \pm 0,04	1,0	3,7 \pm 0,6	2,5
Q74A	0	7,6 \pm 2,1	1,0	0,41 \pm 0,08	1,2	3,0 \pm 0,3	2,4
	2	9,8 \pm 4,0	1,1	0,47 \pm 0,07	1,0	4,0 \pm 0,1	2,3

Para investigar la importancia funcional de las características fisicoquímicas de la cadena lateral de las posiciones 113 y 74, se reemplazó al Trp¹¹³ por Leu o Tyr y a la Gln⁷⁴ por Glu o Asn. La enzima mutante W113L fue activada sólo 3 veces por FBP; sin embargo la mutación del Trp¹¹³ por Tyr dio como resultado una mutante que se activa aproximadamente 15 veces (Figura 6.7), valor más próximo a las 55 veces de activación de la enzima salvaje (Tabla 6.2). Además el valor de A_{0,5} para la FBP de la mutante W113Y no fue significativamente diferente al de la enzima salvaje (Tabla 6.2). Esto sugiere la importancia que reviste la presencia de un residuo aromático en la posición 113. La mutante Q74E fue insensible a la FBP de manera semejante a la enzima Q74A. En cambio, la enzima mutante Q74N se activó 35 veces, lo que indica que un grupo amida en esta posición es más importante para la regulación que el tamaño del residuo (Figura 6.7). El

valor de $A_{0,5}$ de esta mutante es apenas superior al que presenta la enzima salvaje (Tabla 6.2).

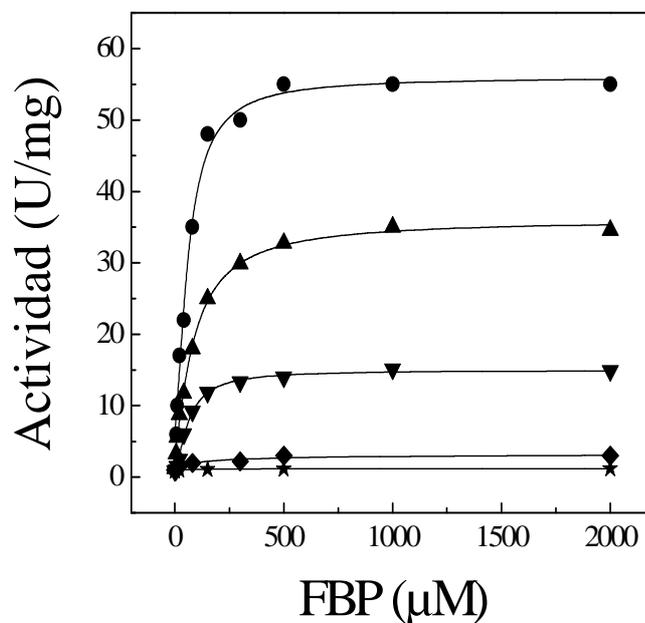


Figura 6.7. Diferente respuesta a la activación por FBP de las enzimas ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje y mutantes. La activación por FBP fue analizada para la enzima salvaje (●), W113L (◆), W113Y (▼), Q74E (★) y Q74N (▲). La actividad de las enzimas se determinó utilizando el ensayo B.

Tabla 6.2. Parámetros cinéticos para la FBP de las enzimas *E. coli* salvaje y mutantes W113Y y Q74N. Las “veces de activación” se calcularon como el cociente entre la actividad enzimática con FBP a concentración saturante y la actividad enzimática sin FBP. Los datos se obtuvieron de las curvas mostradas en la Figura 6.7 y son el promedio de dos experiencias idénticas e independientes \pm la diferencia promedio de los duplicados.

	$A_{0,5}$ (μM)	n_H	Activación (veces)
Enzima salvaje	60 ± 9	1,5	55
W113Y	60 ± 5	1,4	15
Q74N	89 ± 9	1,2	35

También se analizó el comportamiento de las mutantes W113A y Q74A en lo que respecta a la regulación por AMP, el principal inhibidor de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli*. Distintos estudios han demostrado la existencia de una interacción entre este inhibidor y la activación producida por la FBP, ya que el AMP ejerce una mayor inhibición cuando el activador está presente (Haugen y col., 1976; Gardiol y Preiss, 1990; Sivak y Preiss, 1998; Ballicora y col., 2003a; , 2004; Bejar y col., 2004; Bejar y col., 2006a). En la Tabla 6.3 se observa que, en ausencia del activador, el AMP causa una inhibición semejante sobre la enzima salvaje y las mutantes. Por otro lado, el aumento del efecto inhibitorio en presencia de FBP se observó claramente en la enzima salvaje pero no en las mutantes. Por consiguiente, sería esta falta de activación lo que explicaría el escaso efecto del inhibidor sobre las enzimas mutantes W113A y Q74A.

Tabla 6.3. Efecto del AMP y de la FBP sobre la actividad de la enzima de *E. coli* salvaje y mutantes. La actividad se determinó en sentido de síntesis de ADP-Glc, a concentraciones óptimas de sustrato con o sin el agregado de AMP, FBP o ambos, en las concentraciones indicadas.

Efactor	Actividad enzimática (U/mg)		
	Enzima salvaje	W113A	Q74A
Ausencia	1,08 ±0,12	1,45 ±0,05	1,93±0,01
AMP 0,5 mM	0,72±0,11	0,63±0,05	1,05±0,08
FBP 2,5 mM	47,6±1,30	1,12±0,09	1,60±0,08
AMP 0,5 mM+ FBP 2,5 mM	3,60±0,18	0,61±0,03	0,82±0,02

En función de los resultados obtenidos, que muestran una falta de respuesta de las enzimas mutantes W113A y Q74A al activador principal FBP, se consideró necesario evaluar si este comportamiento se debía a que las mutaciones impedían la unión del activador a las enzimas correspondientes. Para tal fin, se realizaron estudios de unión de la FBP a las enzimas ADP-Glc PPasa salvaje y mutantes W113A y Q74A utilizándose un método de electroforesis capilar de afinidad (ECA) (Kaddis y col., 2004; Li y col., 2004). Se ha

demostrado la utilidad de esta técnica en el estudio de interacciones moleculares entre proteínas y sus ligandos (Varenne y col., 2003), proteínas y metales (Rasmussen y Bjerrum, 2003), proteínas y anticuerpos (Li y col., 2004), entre otros. De las variantes de ECA que se conocen, se utilizó un método de equilibrio dinámico para investigar interacciones de unión, donde la macromolécula, presente en la muestra sembrada, interacciona con su ligando, presente en el *buffer* de corrida, con el que se ha equilibrado previamente el capilar. Como consecuencia de la interacción entre ambos, se observa una variación en el tiempo de migración de la proteína, ya que la unión de moléculas de ligando cargadas cambia la relación carga/masa que presentaba originalmente la macromolécula.

En un primer momento se utilizaron capilares de sílica fundida, pero al comprobarse que los mismos presentaban elevada adsorción proteica, se pensó en distintas estrategias para minimizar este efecto. Sin embargo, no había muchas variables que pudieran modificarse. El pH del *buffer* era el adecuado, ya que al ser un pH superior al punto isoeléctrico de la proteína, ésta presentaba carga negativa, lo que favorecería la repulsión electrostática entre la macromolécula y las paredes cargadas negativamente del capilar de sílica. La fuerza iónica del *buffer* de corrida era relativamente elevada (100 mM), lo que minimizaría las posibles fuerzas atractivas entre el capilar y las cargas puntuales positivas de la macromolécula. Se evaluó la influencia de una diamina, la putrescina, como recubrimiento dinámico (Verzola y col., 2000) agregada en concentraciones variables al sistema, ya sea junto con el *buffer* de corrida o sembrándola junto con la muestra, no obteniéndose resultados satisfactorios. Además convenía evitar la introducción de compuestos extraños que pudieran interferir en el equilibrio estudiado. Por este motivo, se decidió utilizar capilares recubiertos con grupos sulfónicos, donde el flujo electrosmótico es nulo y donde la adsorción proteica es mínima, a pesar de no haberse descrito su uso en ECA. Como los compuestos migran por su propia carga, los tiempos de migración son mucho mayores que para la electroforesis capilar convencional, donde la velocidad de migración es elevada debido al potente flujo electrosmótico. Como consecuencia de este mayor tiempo de migración, se produce un ensanchamiento de banda que se traduce en picos más anchos que los obtenidos con capilares de sílica. Para corregir posibles variaciones de la movilidad

entre corridas, debidas a fenómenos no específicos, se utilizó como compuesto indicador ácido hidrocafeico (AHC).

Se utilizaron testigos de unión específica a la enzima ADP Glc PPasa salvaje. Como testigo positivo de unión se utilizó el sustrato ATP, para el cual se determinó una constante de disociación aparente (K_D'), en ausencia de Mg^{2+} , de 100 μM . En estudios previos realizados por equilibrio de diálisis (Haugen y Preiss, 1979), se informó para esta enzima una K_D' para el ATP de 182 μM , obtenida en presencia de Mg^{2+} y FBP. Como estos investigadores encontraron que el ATP se une a la enzima en igual proporción, tanto en ausencia como en presencia de ambos efectores, podemos afirmar que la K_D' obtenida por ECA fue concordante con los datos publicados con anterioridad. Como testigo negativo de unión se utilizó Glc1P, no observándose modificaciones en los tiempos de migración electroforética de la enzima. Esto concuerda con el mecanismo propuesto para esta enzima, secuencial ordenado (Haugen y Preiss, 1979), con ingreso de ATP como primer sustrato.

La Figura 6.8 muestra los electroferogramas registrados al enfrentar la ADP-Glc PPasa salvaje a concentraciones variables de FBP, observándose que los tiempos de migración de la enzima son menores a medida que aumenta la concentración del activador. Esto concuerda con el hecho de que la unión de la FBP a la enzima produce un cambio hacia una carga más negativa del complejo enzima-activador. Se repitió este procedimiento con las enzimas mutantes. Por simplicidad, en la Figura 6.9 se muestra sólo la modificación “neta” (en ausencia y en presencia de una concentración saturante de FBP), que experimentan los tiempos de migración para las tres enzimas. En esta figura se observa que ambas mutantes poseen perfiles semejantes entre ellas y con la enzima salvaje, lo que indica que todas unen FBP.

Los resultados obtenidos por ECA permitieron caracterizar la interacción de las enzimas con la FBP, determinándose las constantes de disociación aparentes. Los valores de K_D' calculados para la enzima salvaje y mutantes W113A y Q74A fueron 25 μM ($n_H=1,0$), 71 μM ($n_H =1,1$) y 80 μM ($n_H =1,2$), respectivamente. Las ecuaciones utilizadas para el cálculo, se muestran en la Sección 5.21.1.

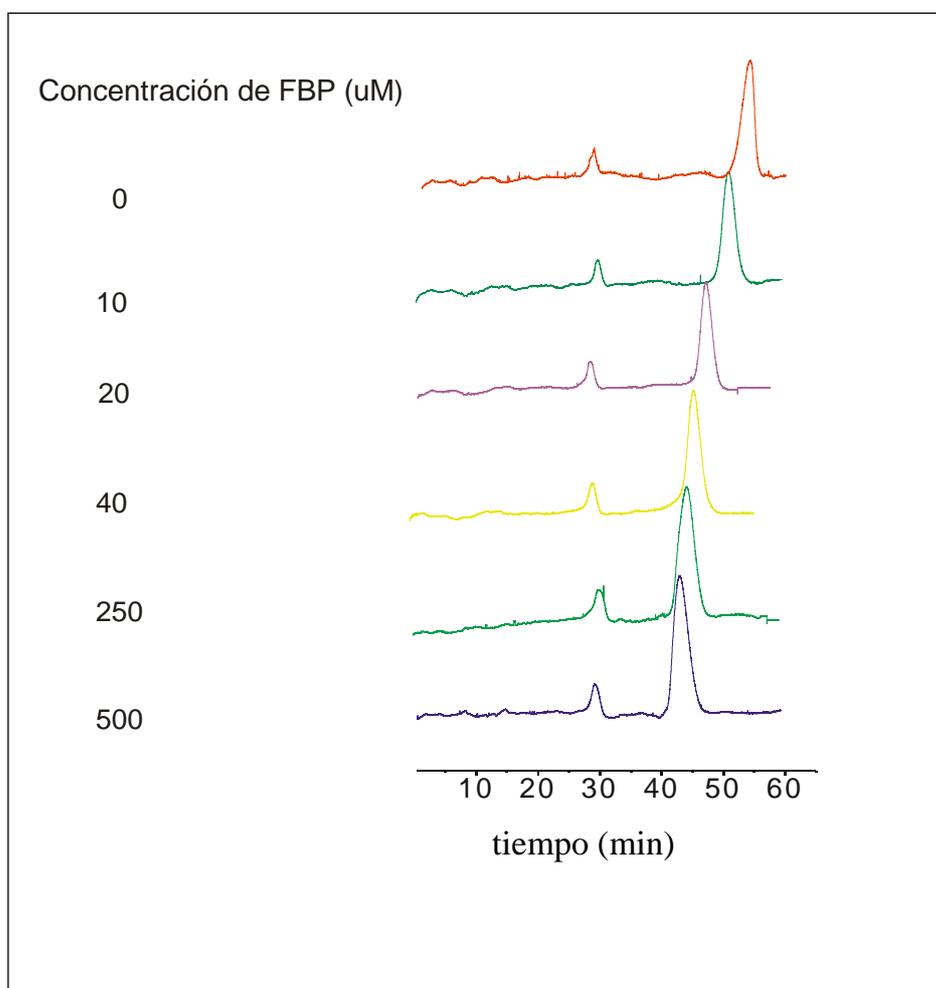


Figura 6.8. Electroferogramas obtenidos para la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje en equilibrio con distintas concentraciones de FBP. El pico más pequeño con menor tiempo de migración, en todos los casos, corresponde al marcador (AHC).y el más grande a la enzima. Condiciones de corrida: polaridad negativa (el ánodo conectado al final del capilar), voltaje: 15 kV, detección a 220 nm, temperatura 25°C. La concentración de la enzima fue de 0,4 mg/ml.

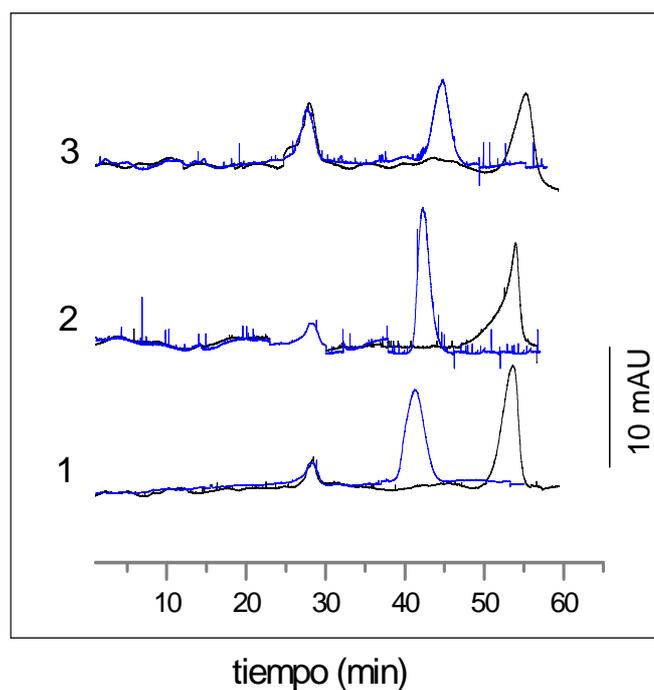
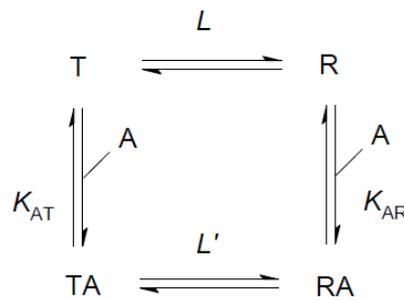


Figura 6.9. Electroferogramas obtenidos para la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje (1); mutante W113A (2) y mutante Q74A (3). El pico con menor tiempo de migración, en todos los casos, corresponde al marcador (AHC) y los picos más altos corresponden a las enzimas indicadas. En color negro se muestran los electroferogramas en ausencia de FBP, y en color azul, los resultados en presencia de una concentración saturante de FBP (2,5 mM). Las condiciones de las corridas electroforéticas son las mismas que para la Figura 6.8.

Podríamos decir entonces que, el efecto más dramático observado en las enzimas mutantes W113A y Q74A es la falta de activación por FBP. Curiosamente, el efector alostérico se sigue uniendo a las enzimas mutantes y con una afinidad de unión que es sólo 3 veces inferior respecto a lo observado para la ADP-Glc PPasa salvaje. De acuerdo al modelo concertado de alosterismo (Monod y col., 1965) es de esperar que estas mutaciones modifiquen apenas el valor de la K_D' por el activador, incluso si la única función de los residuos mutados fuera desencadenar la activación sin una interacción directa con el ligando. Esto es porque cuando se desencadena la activación, el cambio conformacional desplaza el equilibrio hacia la forma cerrada (R en el modelo concertado). Para explicar este comportamiento se desarrolló un esquema simplificado en el cual el activador se une a la forma cerrada (R) para formar un complejo (RA) y también a la forma abierta (T) para formar el complejo correspondiente (TA) pero con mucha menor afinidad (Esquema 6.1). La constante experimental de disociación para la enzima salvaje estaría determinada por

todas las especies unidas (complejos TA y RA). Sin embargo, en nuestro modelo, para las enzimas mutantes donde la activación es ineficiente (estaría interrumpida la transición de T a R) la K_D' estaría determinada solamente por la unión del activador a la forma T.

Esquema 6.1. Mecanismo propuesto para la unión de la FBP a la ADP-Glc PPasa de *E. coli*. El activador (A) se une a la forma relajada (R) y a la forma rígida (T) de la enzima para dar los complejos RA y TA, respectivamente [nomenclatura según el modelo concertado de alosterismo (Monod y col., 1965)]. K_{AT} y K_{AR} son las constantes de disociación del activador para las formas T y R, respectivamente. La constante de disociación aparente para la enzima salvaje (K_D') está determinada por todas las especies unidas (complejos TA y RA) mientras que en las mutantes la K_D' está solo determinada por la forma TA. El cociente entre la K_D' de las mutantes y la enzima salvaje estaría dado por $1+1/L'$, donde L' es la constante de equilibrio entre las formas TA y RA.



$$L = [T] / [R] \quad (6.1)$$

$$L' = [TA] / [RA] \quad (6.2)$$

$$K_{AT} = [A] [T] / [TA] \quad (6.3)$$

$$K_{AR} = [A] [R] / [RA] \quad (6.4)$$

$$K_D' = [A] [\text{especies enzimáticas libres}] / [\text{especies enzimáticas con FBP unida}]$$

o sea, $K_D' = [A] ([T] + [R]) / ([TA] + [RA]) \quad (6.5)$

Reemplazando [A] en la ecuación (6.5) según ecuación (6.3)

$$K_D' = K_{AT} [TA] ([T] + [R]) / [T] ([TA] + [RA]) = K_{AT} (1 + [R] / [T]) / (1 + [RA] / [TA]) \quad (6.6)$$

Reemplazando [R]/[T] y [RA]/[TA] en la ecuación (6.6) según ecuaciones (6.1) y (6.2) y reordenando:

$$K_D' = K_{AT} (1 + 1/L) / (1 + 1/L') \quad (6.7)$$

$$K_{AT} / K_D' = (1 + 1/L') / (1 + 1/L) \quad (6.8)$$

Si $L \gg 1$, (suposición razonable para enzimas activadas alostéricamente).

$$K_{AT} / K_D' = (1 + 1/L') \quad (6.9)$$

Entonces, la relación entre las K_D' de las mutantes y de la enzima salvaje estaría dada por: $1+1/L'$ (ecuación 6.9). La relación observada, que fue de ~ 3 (valores de K_D' de 71 y 80 μM para W113A y Q74A, respectivamente y 25 μM para la enzima salvaje) se corresponde con un valor de $L' \sim 0,5$ lo que implicaría que las formas cerrada y abierta, a concentraciones saturantes del activador, aún estarían en equilibrio dinámico.

También se evaluó la respuesta de las ADP-Glc PPasas W113A y Q74A hacia otro activador de la enzima salvaje, el PLP, análogo estructural de la FBP (Sección 3.3.3). Tal como se había informado previamente (Haugen y col., 1976), cuando el PLP está presente en el medio de reacción, activa a la enzima salvaje en una proporción semejante a la FBP y con afinidad aún mayor. Sin embargo, no produjo tal efecto sobre la actividad de las enzimas W113A y Q74A (Figura 6.10). A bajas concentraciones, el PLP puede unirse covalentemente por reducción con NaBH_4 , modificando un residuo que interviene en la unión del activador, la Lys³⁹ (Parsons y Preiss, 1978a; 1978b). En este trabajo se modificó covalentemente con PLP a la enzima salvaje y a las mutantes W113A y Q74A, en presencia del sustrato ADP-Glc, que protege de la piridoxilación a otra Lys (ésta esencial), la Lys¹⁹⁵, para que el residuo mayormente modificado sea la Lys³⁹ (Sección 3.3.4). Los resultados de actividad enzimática para la enzima salvaje (Tabla 6.4) muestran, en concordancia a estudios anteriores (Parsons y Preiss, 1978a; 1978b), que la enzima estaba en una forma más activa y menos sensible a una posterior activación por FBP. Nuevamente, las enzimas mutantes W113A y Q74A mostraron no ser activadas por la piridoxilación ni por una posterior exposición a FBP (Tabla 6.4).

Para investigar si las enzimas mutantes podían unir al PLP en forma covalente, se realizaron experiencias de ECA con las enzimas sometidas a fosfo-piridoxilación. Se observó que la enzima salvaje fosfo-piridoxilada migró a una velocidad mayor que la enzima sin modificar (Figura 6.11-A), debido a una mayor carga negativa por haber unido al PLP. Curiosamente, las enzimas mutantes luego de la fosfo-piridoxilación reductiva, migraron también más rápido en ECA (Figuras 6.11-B y 6.11-C), lo que indica que también unieron PLP en forma covalente, a pesar de no haber mostrado diferencias significativas en la actividad enzimática. Estos resultados apoyan firmemente el modelo en el cual las enzimas mutantes tienen alterada la traslación de la señal regulatoria, ya que

pueden ser modificadas covalentemente con PLP en la Lys³⁹ pero esta unión es ineficiente en términos de activación.

Para la enzima salvaje, si consideramos la activación conjunta del PLP (8,6 veces) y posterior activación de la FBP (4,1 veces) sobre la enzima fosfo-piridoxilada, obtenemos un total aproximado de 35 veces de activación. Este valor, aunque ligeramente inferior a la activación total producida por la FBP, argumentaría a favor de que la unión de este activador a los sitios residuales, completaría la saturación de esos sitios. Paralelamente, se observó en experiencias de ECA, que la enzima salvaje fosfo-piridoxilada modificó su tiempo de migración al ser enfrentada a la FBP (Tabla 6.4), indicando, en concordancia a los resultados de actividad enzimática, que la unión del PLP al sitio que comparte con la FBP no sería completa. En cambio, la mutante modificada W113A experimentó una pequeña modificación en los tiempos de migración (Figura 6.11-B) en presencia de FBP, mientras que la mutante piridoxilada Q74A no sufrió modificación en su movilidad. (Figura 6.11-C).

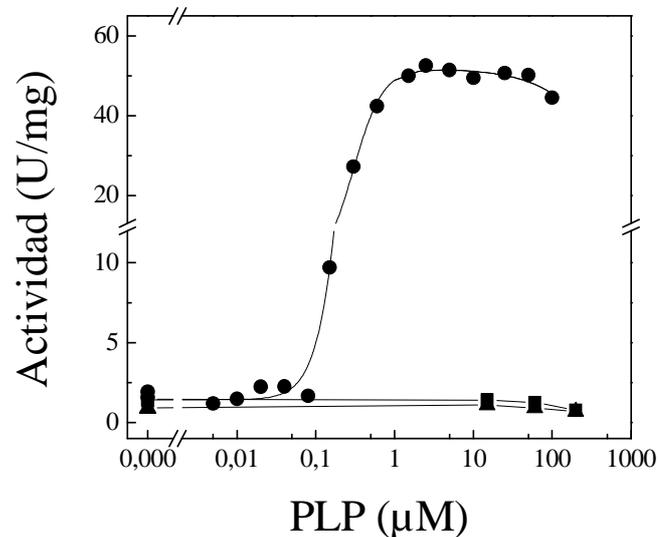
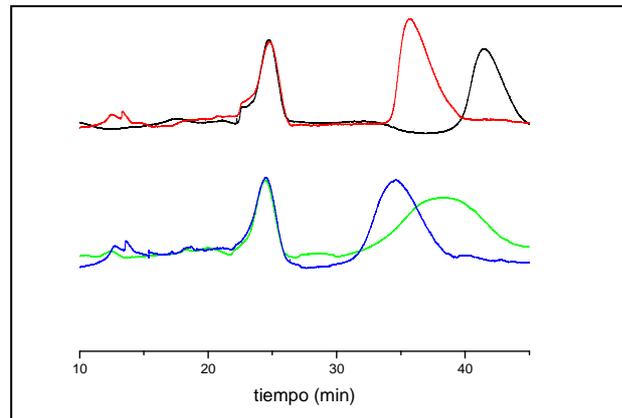


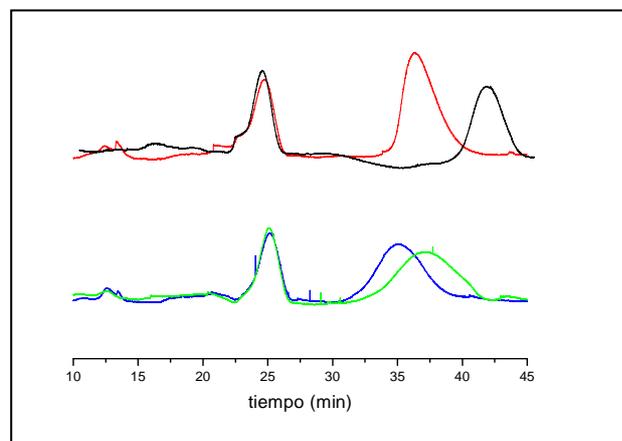
Figura 6.10. Diferente respuesta frente a la activación por PLP de la ADP-Glc PPasa salvaje y mutantes. Las experiencias de actividad se realizaron utilizando el ensayo B, con adición de PLP a la enzima salvaje (●), mutante W113A (■) y mutante Q74A (▲).

Tabla 6.4. Actividad enzimática y respuesta a la FBP de la ADP-Glc PPasa *E. coli* salvaje y sus mutantes W113A y Q74A antes y después de la fosfo-piridoxilación reductiva. La actividad enzimática se midió en el sentido de síntesis con el método Verde de Malaquita, ensayo A de Materiales y Métodos (Sección 5.19.1.1). Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron, Glc1P: 1,5 mM; ATP: 1,5 mM; MgCl₂: 7 mM. Las “veces de activación” se calcularon como el cociente entre la actividad enzimática con FBP a concentración saturante y la actividad enzimática sin FBP.

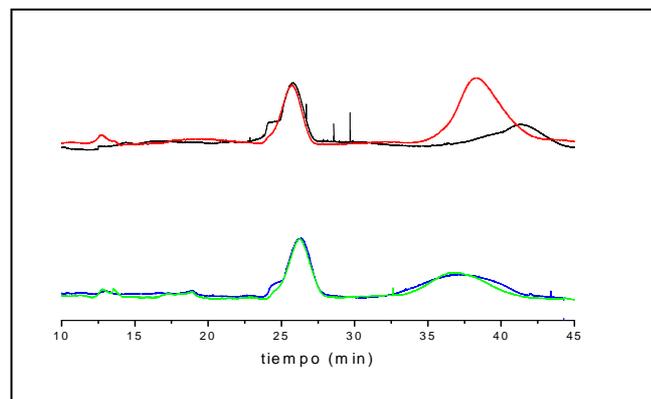
Modificación		Enzima salvaje	W113A	Q74A
Ninguna	Actividad (U/mg)	1,4 ± 0,5	1,2 ± 0,3	3,1 ± 0,5
	Actividad+FBP (U/mg)	63 ± 10	1,9 ± 0,3	3,8 ± 0,5
	Activación (veces)	44	1,6	1,2
Fosfo-piridoxilación Reductiva	Actividad (U/mg)	12 ± 2	0,87 ± 0,02	1,61 ± 0,10
	Actividad+FBP (U/mg)	49 ± 5	1,2 ± 0,5	1,7 ± 0,2
	Activación (veces)	4,1	1,4	1,1



(A)



(B)



(C)

Figura 6.11. Electroferogramas obtenidos para la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje y mutantes, antes y después de la fosfo-piridoxilación reductiva, tanto en ausencia como en presencia de FBP. Referencias: (A): enzima salvaje, (B): mutante W113A, (C): mutante Q74A. En las tres figuras, los electroferogramas corresponden a corridas electroforéticas realizadas en los siguientes condiciones de equilibrado: (—): enzima en *buffer* MOPS, (—): enzima y *buffer* MOPS-FBP (—): enzima fosfo-piridoxilada en MOPS, (—): enzima fosfo-piridoxilada en MOPS-FBP. Las demás condiciones de corrida electroforética son idénticas a las de la Figura 6.8.

Este comportamiento pudo ser explicado cuando, utilizando las ecuaciones descriptas en Sección 5.21.2, se estimó el número de moléculas de PLP y FBP unidas por molécula de proteína a partir del aumento relativo de movilidad electroforética. En la Tabla 6.5 se observa que se unen dos moléculas de FBP/molécula de enzima, tanto para la salvaje como para las mutantes. Este mismo valor se había informado previamente para la enzima salvaje, por método de equilibrio de diálisis en presencia de Mg^{2+} (Haugen y Preiss, 1979). En lo que respecta al PLP, la enzima salvaje unió un promedio de 2 moléculas de PLP/molécula de proteína, mientras que las enzimas mutantes resultaron modificadas en un $n=3-4$ moléculas de PLP/tetrámero. El valor obtenido para la enzima salvaje era inferior al esperado, ya que (Parsons y Preiss, 1978b) determinaron que se unen 1,01 molécula de PLP por subunidad, lo que representa 4 moléculas de PLP por tetrámero. Al ser equilibrada con FBP la enzima salvaje fosfo-piridoxilada unió una molécula adicional de FBP. Esto concuerda con los resultados de actividad enzimática que se muestran en la Tabla 6.4, en los que se observó que la enzima salvaje modificada por PLP era adicionalmente activada en presencia de FBP, indicando que no se logró la máxima modificación con PLP de la enzima. En cambio, las mutantes modificadas no mostraron una unión adicional al equilibrarlas con FBP, ya que previamente habían unido una mayor cantidad de moléculas de PLP.

Tabla 6.5. Variación de la valencia (Δz) producida por la unión de ligandos, para cada enzima y condición ensayada y número de moléculas unidas (n) (de FBP, de PLP y totales) por mol de enzima, calculados mediante experiencias de ECA. Δz son las diferencias de valencia con respecto a la proteína sin tratar (sin FBP ni PLP). n_{TL} : número total de ligandos

Tratamiento	sin modificación		fosfo-piridoxilación		fosfo-piridoxilación	
<i>buffer</i> ECA	MOPS-FBP		MOPS		MOPS-FBP	
	Δz	n_{FBP}	Δz	n_{PLP}	Δz	n_{TL}
<i>E. coli</i> salvaje	-8,6	2	-4,4	2	-8,7	3 (2PLP+1FBP)
W113A	-7,5 \pm	2	-7,5	3 – 4	-7,5	3–4 (3-4 PLP)
Q74A	-7,5	2	-10,9	5	-10,6	5 (5PLP)

La determinación del número de moléculas de efector/molécula de enzima, mediante la utilización de ecuaciones sencillas, resulta novedoso, ya que en la mayoría de los trabajos publicados, sólo se determinan las constantes de disociación. En base a estos cálculos, del comportamiento de las enzimas mutantes se deduce que, una vez unido el máximo número de moléculas de PLP/molécula de enzima, no se unen moléculas de FBP adicionales. Esto refuerza lo postulado (Parsons y Preiss, 1978a; 1978b) acerca de que la FBP y el PLP se estarían uniendo al mismo sitio o a sitios espacialmente muy cercanos en la estructura, tal que exista un impedimento estérico con respecto a la unión de ambos efectores. Para el caso de la enzima salvaje, al no modificarse con el máximo número de moléculas de PLP, fue capaz de unir una molécula adicional de FBP.

Por otro lado, se realizaron estudios de espectroscopía de fluorescencia con el objetivo de analizar si existían diferencias conformacionales observables entre la enzima salvaje y las enzimas mutantes y, particularmente, si la unión de sustratos y/o efectores producía cambios conformacionales diferenciales entre ellas, que pudieran evidenciarse por cambios en las señales, ya sea de intensidad de fluorescencia o corrimientos en las longitudes de onda de máxima emisión.

Se registraron los espectros de emisión en ausencia de efectores de la enzima salvaje y mutantes, graficándose la intensidad de fluorescencia (I) en unidades arbitrarias (ua) (Figura 6.12). Al realizar estas experiencias se observó que la mutante Q74A posee un espectro muy similar al de la enzima salvaje, presentando ambos la misma longitud de onda para la cual la intensidad de emisión es máxima ($\lambda_{E_{max}}=334$ nm). En cambio, el espectro de emisión de la mutante W113A difiere de estas dos, presentando una $\lambda_{E_{max}}$ de 332 nm (Tabla 6.6). Aunque el cambio de $\lambda_{E_{max}}$ es de 2 nm, esta variación se repitió todas las veces que se realizó la experiencia en los tres fluorímetros en los que se trabajó.

Si se tiene en cuenta que el espectro completo de emisión de la proteína resulta de la contribución de todos sus Trp, el corrimiento hacia el azul en la mutante W113A, como resultado de una disminución de la fluorescencia intrínseca de la proteína en esa zona estaría indicando que el Trp¹¹³ emitiría a una longitud mayor que el promedio de los restantes en la enzima salvaje. Por lo tanto el corrimiento de 2 nanómetros hacia el azul en la W113A concuerda con la estructura tridimensional modelada para la enzima de *E. coli*, donde se observa que el Trp¹¹³ sería el que estaría más expuesto al solvente.

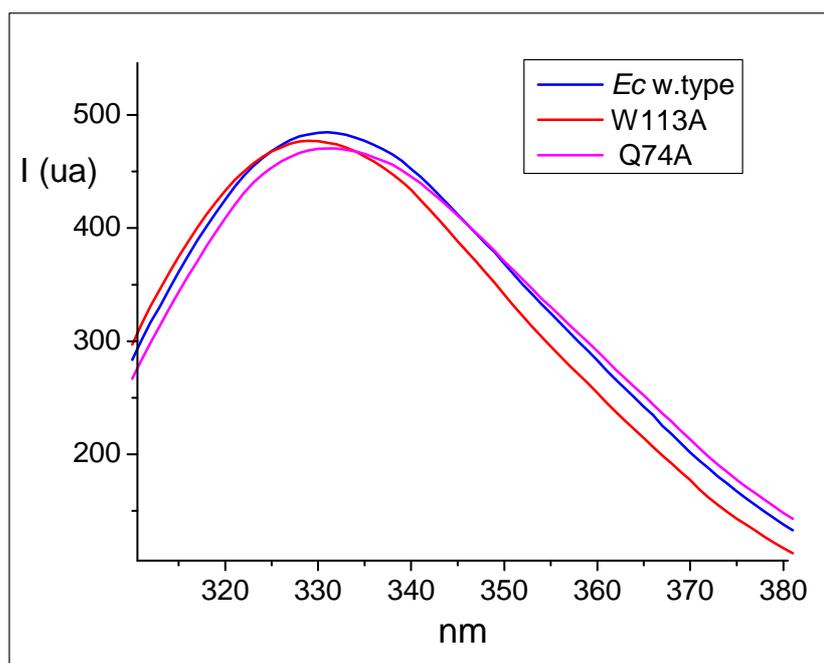


Figura 6.12. Espectros de emisión de fluorescencia para las enzimas ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje y mutantes W113A y Q74A. La longitud de onda de excitación (λ_{excit}) fue 290 nm. Nótese el corrimiento hacia el azul de la λ_{Emax} del espectro de la mutante W113A. La concentración de las enzimas fue de 0,1 mg/ml (demás condiciones en Sección 5.23). En general, salvo aclaración en contrario, el espectro de emisión se adquirió entre 300 y 400 nm a una velocidad de 60 nm/min.

Se registraron también los espectros de emisión de fluorescencia de la enzima salvaje y las mutantes en presencia de sustratos y efectores solos o en distintas combinaciones. Las concentraciones utilizadas se eligieron teniendo en cuenta los valores de $S_{0,5}$ y $A_{0,5}$ de los mismos. Las concentraciones de Mg^{2+} evaluadas oscilaron entre 0,5 y 10 mM o entre 0,5 y 20 mM, ya sea en presencia o ausencia de FBP, respectivamente. La FBP se ensayó hasta 2 mM y el ATP hasta una concentración 1 mM. No se ensayaron mayores concentraciones debido a que el ATP posee absorción en el rango de medida de emisión, por tal motivo, los espectros de las experiencias que involucran al ATP se corrigieron según ecuación (5.11).

De todos los espectros obtenidos, sólo en el caso de la enzima salvaje en presencia de FBP+ATP+ Mg^{2+} se observó un corrimiento de la λ_{Emax} , en este caso particular, de 2 nm hacia el azul (Tabla 6.6). Este cambio se produjo independientemente del orden de agregado, pero era necesaria la presencia de los tres para que se dé el corrimiento. Esta

modificación no se observó en ninguna de las enzimas mutantes, en las cuales la $\lambda_{E_{max}}$ permaneció invariable. Este cambio se produce en la enzima salvaje cuando el sustrato y el cofactor esencial (ATP+Mg²⁺, pero no ATP solo, o Mg²⁺ solo) se unen a la enzima en presencia de FBP. Se postula entonces que esta observación indicaría el cambio necesario para lograr la conformación más activa (o sea la más eficiente) de ese complejo. No se puede identificar cuáles serían los residuos aromáticos, fundamentalmente Trp, que estarían cambiando su entorno en relación al que tendrían cuando el complejo se forma en ausencia de FBP. De los seis residuos Trp presentes en la enzima, hay dos que se encuentran más próximos al sitio activo, Trp¹¹³ y Trp²⁷⁴, y de los restantes, otros dos están en sitios estratégicos, como el Trp²⁸⁴ que se encuentra en la interfase entre el dominio N- y C- terminal y el Trp³⁰⁴ que se encuentra dentro del *loop* largo que interconecta ambos dominios. Si suponemos que el Trp¹¹³ es el principal responsable de la modificación en la $\lambda_{E_{max}}$, en la mutante W113A no se observaría el cambio ya que no está presente; y aún estando presente, como en la mutante Q74A, al no modificarse su entorno en la misma magnitud que la enzima salvaje, no se observaría el cambio que ésta experimenta. Esto sería una nueva evidencia de que ambos residuos, el Trp¹¹³ y la Gln⁷⁴, son necesarios para que la FBP realice su acción.

Tabla 6.6. Longitudes de onda máximas de emisión de la enzima salvaje y mutantes W113A y Q74A en ausencia y en presencia de ATP, Mg²⁺ y FBP. La concentración de las enzimas fue de 0,1 mg/ml. Las condiciones en que se recogieron los espectros fueron idénticas a las de la Figura 6.12.

Efectores	$\lambda_{E_{max}}$ (nm)		
	<i>E. coli</i> salvaje	W113A	Q74A
ninguno	334	332	334
ATP+Mg ²⁺	334	332	334
FBP+ATP+Mg ²⁺	332	332	334

6.1.1.3. Discusión

Estudios pioneros realizados sobre ADP-Glc PPasas de distintas fuentes permitieron establecer importantes correlaciones de estructura a función. Se identificaron distintos dominios involucrados en la unión de sustratos (Lee y Preiss, 1986; Kumar y col., 1988; Bejar y col., 2006b), activadores alostéricos (Haugen y col., 1976; Parsons y Preiss, 1978a; 1978b; Gardiol y Preiss, 1990; Gomez-Casati y col., 2001) así como residuos críticos para la catálisis (Frueauf y col., 2001; Bejar y col., 2006b). La reciente resolución cristalográfica de las estructuras de las ADP-Glc PPasas homotetraméricas de tubérculo de papa (Jin y col., 2005) y de *A. tumefaciens* (Cupp-Vickery y col., 2008) permitió conocer la estructura en detalle y corroborar, en parte, estos estudios. Sin embargo, no han sido descritas las interacciones interdominio específicas que determinan el efecto alostérico.

Los resultados presentados en este capítulo permiten identificar un mecanismo dinámico para la regulación alostérica de la ADP-Glc PPasa de *E. coli*; en el cual la propagación de la señal involucra tres *loops* adyacentes, según la estructura tridimensional de la enzima. Teniendo en cuenta los modelos obtenidos para la enzima de *E. coli*, se postuló que la unión del activador en un *loop* situado cerca del N-terminal estabiliza una conformación más activa facilitando el movimiento relativo de otro *loop* desde una conformación abierta hacia una conformación cerrada. El primer *loop* es el que comprende a la Lys³⁹, sitio de unión del activador (Parsons y Preiss, 1978a; 1978b; Gardiol y Preiss, 1990), y también a una Arg importante para la regulación (Gomez-Casati y col., 2001); mientras que el segundo *loop* es el que comprende a la Tyr¹¹⁴ (Lee y Preiss, 1986; Kumar y col., 1988) involucrada en la unión del ATP. El tercer *loop*, el que contiene a la Gln⁷⁴, facilitaría la comunicación entre los otros dos *loops* a través de uniones puente hidrógeno. Por lo tanto, la regulación de la enzima estaría determinada por el posicionamiento relativo de estos *loops*, donde el cambio conformacional inducido por los sustratos y facilitado por el activador haría que la forma abierta pase hacia una forma cerrada más activa. Este tipo de mecanismo se ha observado en otras enzimas, donde un arreglo cerrado de *loops* aproxima los sustratos y los residuos catalíticos, confiriendo un entorno apropiado para una catálisis productiva (Raboni y col., 2005; Datta y col., 2008; del Sol y col., 2009).

Para comprobar esta hipótesis se realizaron mutagénesis sitio-dirigida. El reemplazo de la

Gln⁷⁴ por Ala, cuya cadena lateral no puede formar puente hidrógeno, dio como resultado una enzima completamente insensible a la activación. Además, la baja afinidad por al ATP de esta mutante es similar a la que posee la enzima salvaje en ausencia del activador. Como la unión de la FBP fue confirmada por ECA, se propone que es la comunicación entre los *loops* la que resulta interrumpida. De hecho, la importancia de los puentes de hidrógeno fue confirmada cuando se reemplazó la Gln⁷⁴ por Asn, ya que esta mutante, a diferencia de la Q74A, fue sensible a la activación. El residuo de Asn posee un metileno menos que la Gln, pero aun así es capaz de formar dos puentes de hidrógeno. Por otro lado, la mutación hacia Glu, que puede aceptar pero no puede ser donador de puente hidrógeno a pH neutro, resultó en una enzima insensible a la activación. El nitrógeno de la cadena lateral de la Gln⁷⁴ actuaría como donador de puente hidrógeno hacia el oxígeno de la cadena principal del altamente conservado Trp¹¹³. El reemplazo de la cadena lateral en posición 113 no debería interferir en la formación del puente hidrógeno, ya que el aceptor es un átomo de la cadena principal. Sin embargo, la mutación del Trp¹¹³ hacia Ala convierte a la enzima mutante en insensible hacia el activador. Un residuo hidrofóbico voluminoso como la Leu no es capaz de reemplazar de manera efectiva al Trp, pero un residuo aromático como la Tyr puede reemplazarlo de manera parcial. Por consiguiente, la importancia del Trp¹¹³ estaría en relación a su anillo aromático. Se postula entonces, que el rol de este Trp sería el de mantener a este *loop* en una conformación tal que la cadena principal pueda interactuar con la Gln⁷⁴. En otras enzimas tetraméricas se ha propuesto que la transición de la forma abierta a la cerrada no sólo induce un aumento en la actividad enzimática de una subunidad sino que también podría inducir una señal inter-subunidad que establezca un estado activado general de todo el tetrámero (Raboni y col., 2005; del Sol y col., 2009; Smock y Gierasch, 2009). En la estructura cristalina de la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa se observó que el *loop* que contiene al residuo homólogo al Trp¹¹³ se encuentra cercano a la interface entre subunidades (Jin y col., 2005), lo que haría posible que esta señal alostérica se propague a través del tetrámero completo.

Los estudios de fluorescencia intrínseca sugieren que la enzima nativa en presencia de ATP y FBP, a diferencia de las mutantes W113A y Q74A, adquiere una estructura más cerrada, más compacta, avalando la hipótesis planteada.

Los roles de los cambios conformacionales y movimientos que ocurren en las proteínas, están cobrando impulso debido a la relevancia que tienen para la catálisis enzimática y la regulación alostérica (Gutteridge y Thornton, 2004; , 2005; Raboni y col., 2005; Swain y Gierasch, 2006; Lee y Craik, 2009; Smock y Gierasch, 2009; Tokuriki y Tawfik, 2009). La visión actual es que las proteínas están en constante movimiento (Vinson, 2009) y que las propiedades dinámicas intrínsecas son responsables de la transmisión de señales y del alosterismo (Swain y Gierasch, 2006; Smock y Gierasch, 2009). La dinámica de proteínas incluye cambios conformacionales que ocurren, principalmente, según dos procesos: movimientos de dominios (donde dos dominios rígidos, unidos por una bisagra flexible, se mueven uno con respecto al otro), y movimientos de *loops* (cuando *loops* flexibles, generalmente presentes en la superficie de la macromolécula, cambian su conformación) (Gutteridge y Thornton, 2005). Estos cambios conformacionales son desencadenados por unión de sustratos o efectores alostéricos y desempeñan diversos roles en el proceso catalítico, principalmente en la orientación de grupos para favorecer la unión y/o el posicionamiento de sustratos, así como también en la eliminación de agua o estabilizando intermediarios activados (Gutteridge y Thornton, 2005; Raboni y col., 2005; Lee y Craik, 2009; Tokuriki y Tawfik, 2009). El trabajo realizado sobre la ADP-Glc PPasa de *E. coli* permite proponer un mecanismo regulatorio según el cual la interacción del activador alostérico con la enzima comunica la señal regulatoria por medio de cambios conformacionales de los *loops* que contienen a los residuos Trp¹¹³ y Gln⁷⁴. Este es un dominio estructural conservado en todas las ADP-Glc PPasas, aún en aquellas con diferentes propiedades alostéricas y baja identidad de secuencia. Por esta razón, se puede pensar que esta familia de enzimas tendrían un disparador alostérico común, en el cual, un sitio catalítico conservado interactúa con un sitio alostérico divergente. Este sería un mecanismo evolutivo muy efectivo para activar metabólicamente diversas enzimas.

6.1.2. Estudio comparativo de la activación por FBP e inhibición por AMP de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje frente a enzimas con mutaciones simples o dobles: G336D, Q74A, W113A y N-Δ15.

6.1.2.1. Introducción

Se ha demostrado que en la regulación alostérica de las ADP-Glc PPasas bacterianas están involucrados tanto el dominio N- como el C-terminal y la zona de interacción entre ambos (ver Sección 3.3.5). La importancia de la región N-terminal de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje en la regulación alostérica se puso nuevamente en evidencia con la caracterización de enzimas truncadas en dicho extremo (Bejar y col., 2006a). Aquellas que carecían de 3 y 7 aminoácidos (N-Δ3 y N-Δ7, respectivamente), no cambiaron sus parámetros cinéticos con respecto a la enzima salvaje. En cambio, las mutantes N-Δ11 y N-Δ15 presentaban elevada actividad en ausencia del activador FBP. En particular, la enzima N-Δ15 mostró una mayor afinidad aparente por la FBP que la enzima salvaje, siendo, menos sensible que esta última a la regulación alostérica ejercida por la FBP y el AMP. En las estructuras cristalinas de la ADP-Glc PPasa de *S. tuberosum* (Jin y col., 2005) y de *A. tumefaciens* (Cupp-Vickery y col., 2008) no se lograron modelar, respectivamente, los primeros 10 y 6 residuos del segmento N-terminal. Por ende, tampoco se pudo efectuar su modelado por homología en la enzima de *E. coli*. Sin embargo, se cree que estos efectos, causados por un extremo N-terminal más corto, podrían responder a cambios conformacionales que favorecerían una regulación positiva, más que a una disrupción de los sitios de unión de los efectores alostéricos (Bejar y col., 2006a).

Con respecto al extremo C-terminal, al estudiarse la ADP-Glc PPasa de una cepa de *E. coli* mutante que presentaba mayores velocidades de acumulación de glucógeno que la cepa salvaje, se observó que esta característica se debía a la mutación de un solo residuo, la Gly³³⁶, que estaba cambiada por un Asp (Leung y col., 1986). Posteriormente, se obtuvo la enzima mutante G336D por mutagénesis sitio-dirigida (Meyer y col., 1998a) y se comprobó que presentaba las mismas características que la enzima nativa obtenida a partir de la cepa mutante. La proteína mutante G336D presenta propiedades cinéticas diferentes a las de la enzima salvaje, ya que posee mayor actividad en ausencia del activador FBP, mayor afinidad aparente por la FBP y los sustratos y menor afinidad aparente por el AMP en presencia del activador (Meyer y col., 1998a).

Por otro lado, se ha demostrado que las mutantes Q74A y W113A presentan diferencias importantes a las mutantes arriba descritas, ya que no responden al activador principal FBP. Esto implica que el activador no provoca ninguno de los dos efectos que sí se observan en la enzima salvaje: un aumento de la afinidad por los sustratos y un incremento de la constante catalítica. Los resultados obtenidos mediante ECA permiten afirmar que ambas mutantes unen FBP, por lo que se asume que estos residuos no estarían directamente involucrados en la unión del activador.

6.1.2.2. **Objetivos y mutantes elegidas para este estudio.**

Para lograr una mayor comprensión de los mecanismos de activación e inhibición de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* se propuso analizar los efectos recíprocos combinados de mutaciones que actúan de manera aparentemente antagónica en relación a la capacidad de adquirir una conformación estructural más activa que la de la enzima salvaje. Para profundizar en el conocimiento de estos distintos estados conformacionales se diseñaron dobles mutantes que combinan en su secuencia una mutación que aisladamente les confiere preactivación junto a otra mutación que les confiere insensibilidad frente al activador. Las enzimas preactivadas elegidas para este estudio fueron las mencionadas N- Δ 15 y G336D, considerando que sus características diferenciales con respecto a la enzima salvaje se atribuyen a diferentes dominios (extremos N- y C-terminal, respectivamente). Como enzimas que no responden al activador se utilizaron las mutantes Q74A y W113A. Aunque ambas presentan un comportamiento cinético semejante, según nuestro modelo, pertenecen a *loops* diferentes, por lo que su comportamiento podría no ser el mismo en presencia de otra mutación. También se consideró de utilidad obtener una doble mutante combinando las dos mutantes preactivadas. En la Figura 6.14 se muestra la localización relativa de estas mutaciones en el monómero modelado de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli*.

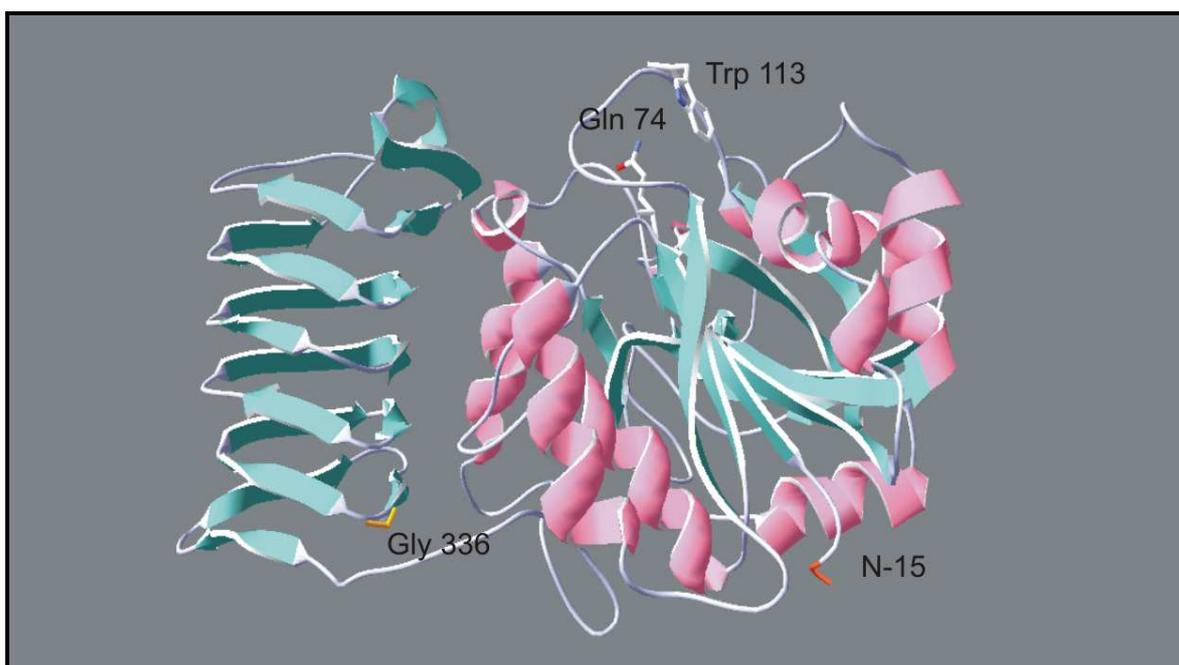


Figura 6.14. Modelo del monómero de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* obtenido por homología a partir de la estructura cristalina del homotetrámero de la enzima de *S. tuberosum* y del monómero de la enzima de *A. tumefaciens*. Se indica el extremo N-terminal sin los 15 primeros residuos (N-15), el residuo de Gly³³⁶ (en amarillo para una mejor visualización) y los residuos Gln⁷⁴ y Trp¹¹³ cuyos átomos se colorean según su tipo: O: rojo, C: blanco, N: azul. Figura obtenida con el programa Deep view/Swiss PDB viewer v4.0.

6.1.2.3. Estudios conformacionales realizados con las mutantes simples

Se efectuaron estudios espectroscópicos de DC de la enzima salvaje y de las mutantes simples. Los estudios realizados mostraron que ambas mutantes preactivadas presentan diferencias conformacionales con la enzima salvaje y con las mutantes simples Q74A y W113A (Figura 6.15). Esta diferencia se visualiza en el UV cercano, que prácticamente no exhibe bandas en la enzima salvaje, Q74A y W113A, pero que presenta una banda ancha de elipticidad positiva en las mutantes preactivadas, algo más angosta en la G336D, sugiriendo que estas enzimas mutantes presentan cambios conformacionales importantes con respecto a la enzima salvaje, a nivel de la estructura terciaria y/o cuaternaria.

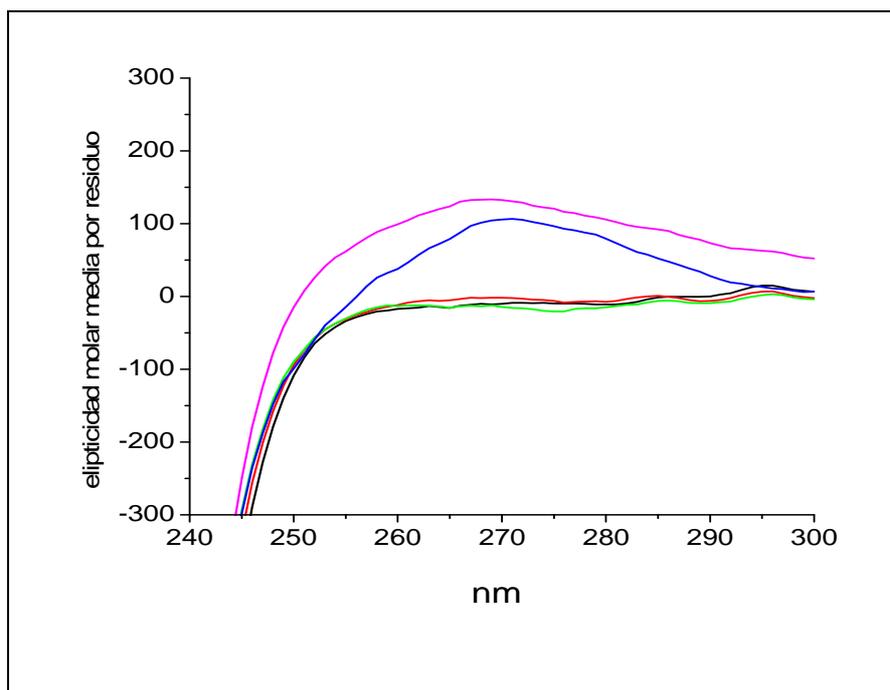


Figura 6.15. Espectros de dicroísmo circular obtenidos para las ADP-Glc PPasas de *E. coli* salvaje y mutantes simples. Las enzimas, en una concentración de 0,25 mg/ml en *buffer* MOPS-NaOH 20 mM pH 8,0; termostatzadas a 25 °C, se analizaron 10 veces a una velocidad de 100 nm/min considerándose el espectro promedio. Referencias: enzima salvaje (■), N-Δ15 (■), G336D (■), W113A (■) y Q74A (■).

6.1.2.4. Obtención, expresión y purificación de las enzimas ADP-Glc PPasa de *E. coli* dobles mutantes.

La construcción de las dobles mutantes se realizó por corte, con enzimas de restricción, de los vectores correspondientes que contenían cada mutación simple y posterior ligación de los fragmentos (Sección 5.12). Mediante secuenciación automática se confirmó la identidad de las construcciones que codificaban para las enzimas de *E. coli* que poseían respectivamente las mutaciones: Q74A+G336D, W113A+G336D, N-Δ15+Q74A, N-Δ15+W113A y N-Δ15+G336D. Estas enzimas, así como las mutantes simples que les dieron origen y la enzima salvaje, fueron expresadas en células BL21(DE3). La purificación se realizó mediante fraccionamiento salino seguido del correspondiente desalado y posterior cromatografía en resinas de DEAE-*Sepharose*. Por último se purificaron por cromatografía en columna de 2'5' ADP-*Sepharose* (GE Healthcare) (Sección 5.14). En todos los casos, las enzimas se obtuvieron con un grado de pureza

superior al 90%, según el análisis de las mismas por SDS-PAGE. A modo de ejemplo, en la Figura 6.16 se muestra el análisis electroforético correspondiente a las fracciones obtenidas en las sucesivas etapas de purificación de la doble mutante G336D+W113A, el que fue similar a lo obtenido para el resto de las enzimas mutantes.

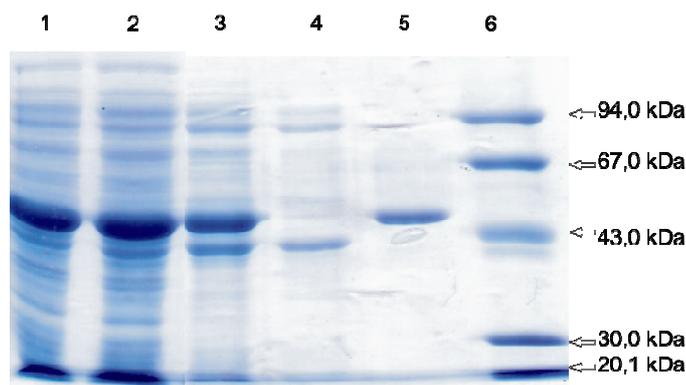


Figura 6.16. Análisis de la purificación de la enzima mutante ADP-Glc PPasa de *E. coli* G336D+W113A por SDS-PAGE. Calle 1: extracto crudo, calle 2: fracción precipitada con sulfato de amonio seguida de desalado; calle 3: fracción purificada por cromatografía en columna de DEAE-*Sepharose*; calles 4 y 5 fracciones provenientes de cromatografía en 2'5' ADP-*Sepharose*, siendo respectivamente la fracción no retenida (4) y la fracción eluida con gradiente de NaCl, donde se obtiene la enzima en estudio (5); calle 6: marcadores de masa molecular (GE Healthcare).

6.1.2.5. Caracterización cinética de la activación ejercida por la FBP

Las experiencias se realizaron, para todas las enzimas, en el sentido de síntesis de ADP-Glc, con el método Verde de Malaquita (Sección 5.19.1.1). Las concentraciones usadas en todos los casos fueron: ATP 1,5 mM; Mg^{2+} 7 mM y Glc1P 1,5 mM. Los valores obtenidos se ajustaron a la ecuación de Hill modificada (ecuación 5.2).

Al estudiar el comportamiento cinético de la enzima salvaje y de las mutantes frente a concentraciones variables de FBP se observó que, en ausencia de FBP, la segunda mutación altera muy poco la actividad enzimática de aquellas mutantes derivadas de la G336D (Figura 6.17 y Tabla 6.8), ya que en promedio disminuyen 1,5 veces su actividad específica. En cambio, aquellas derivadas de la N- Δ 15, disminuyen más su actividad, aproximadamente 3 veces, no observándose diferencias significativas según esta segunda mutación sea sobre el Trp¹¹³ o la Gln⁷⁴ (Figura 6.18 y Tabla 6.8). Estos resultados sugieren

que el estado preactivado de la enzima G336D es mantenido al introducir la segunda mutación en los residuos Gln⁷⁴ o Trp¹¹³, mientras que esto no sucedería con la enzima mutante N- Δ 15. Por otro lado, la doble mutante derivada de ambas enzimas preactivadas, la mutante N- Δ 15+G336D, presenta un valor de actividad enzimática intermedio comparado con las demás dobles mutantes, pero siempre inferior a las mutantes de las cuales proviene (Tabla 6.8); lo que sería indicativo de que ambas mutaciones no operan en forma sinérgica.

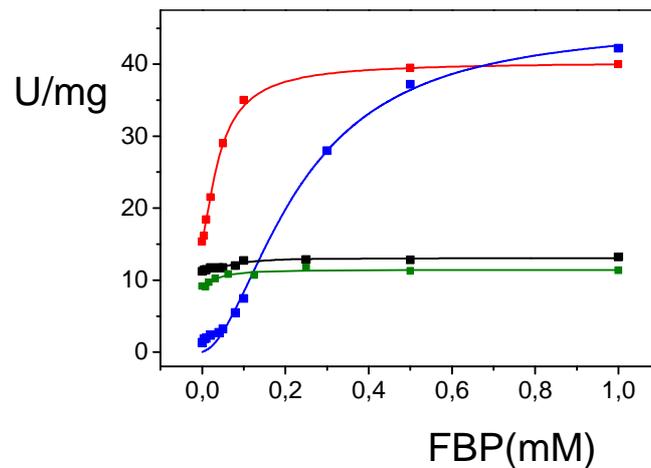


Figura 6.17. Respuesta al activador FBP de las ADP-Glc PPasas de *E. coli* salvaje y mutantes G336D y sus derivadas. Referencias: enzima salvaje (■), mutante G336D (■), Q74A+G336D (■) y W113A+G336D (■).

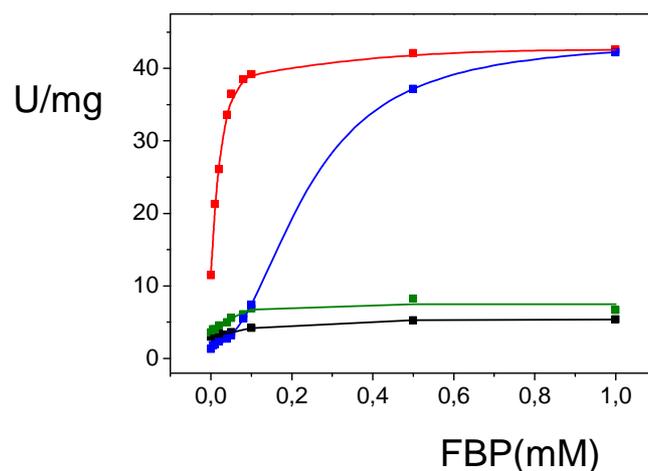


Figura 6.18. Curvas de saturación con FBP de las ADP-Glc PPasas de *E. coli* salvaje y mutantes con el extremo N-terminal truncado. Referencias: enzima salvaje (■), mutantes N- Δ 15 (■), N- Δ 15+Q74A (■) y N- Δ 15+W113A (■).

Tabla 6.8. Parámetros cinéticos de activación por FBP para las enzimas salvaje y mutantes (simples y dobles), en sentido de síntesis, método Verde de Malaquita. Los valores de V_{\max} , $A_{0,5}$ y n_H se calcularon según la ecuación de Hill modificada (ecuación 5.2). Las veces de activación se determinaron como la relación entre las V_{\max} en presencia y en ausencia de FBP. n.d.: no determinado, algunos valores de $A_{0,5}$ no se determinaron porque las veces de activación no son significativas

Enzima	$A_{0,5}$ FBP (mM)	n_H	V_{\max} (U/mg)		Activación (veces)
			sin FBP	con FBP	
<i>E. coli</i> salvaje	0,251± 0,032	2,0	1,2	46	38,0
N-Δ15	0,025 ± 0,002	1,1	11	47	4,3
G336D	0,044±0,003	1,3	15	40	2,7
W113A	n.d.	n.d.	2,0	2,3	1,1
Q74A	n.d.	n.d.	2,3	2,7	1,2
N-Δ15+W113A	0,054± 0,002	1,9	3,9	7,5	1,9
N-Δ15+Q74A	0,110± 0,009	1,8	3,2	5,7	1,8
G336D+W113A	0,031± 0,002	1,5	9	11	1,2
G336D+Q74A	0,079± 0,005	2,2	11	13	1,2
N-Δ15+G336D	0,022± 0,002	1,6	5	9	1,7

En lo que respecta a las veces de activación, la enzima salvaje es la que presenta una mayor respuesta; mientras que en las mutantes preactivadas, debido a su condición, muestran una menor respuesta. Por otra parte, las dobles mutantes resultan casi insensibles a la activación, en forma semejante al comportamiento de las mutantes Q74A y W113A. Las actividades enzimáticas alcanzadas por las dobles mutantes en presencia de FBP, si bien fueron superiores a las de las simples mutantes W113A o Q74A, en ningún caso alcanzaron los valores de actividad de las enzimas preactivadas o de la enzima salvaje, obteniéndose valores intermedios entre las preactivadas y las insensibles al activador. Por lo expuesto, es muy importante destacar que, al igual que las simples mutantes Q74A y W113A, el efecto que produce el activador sobre las dobles mutantes es muy bajo, lo que reafirma la importancia de la presencia del Trp¹¹³ y de la Gln⁷⁴ para que la señal inducida

por el activador provoque el efecto favorable en el sitio activo. Los valores de $A_{0,5}$ de las dobles mutantes resultan significativamente menores a los de la enzima salvaje y en general, ligeramente mayores a los de las enzimas simples preactivadas, lo que indicaría que la segunda mutación no altera la capacidad del activador de unirse con elevada afinidad aparente.

6.1.2.6. Caracterización cinética de la inhibición por AMP

Un aspecto interesante de la regulación de la actividad de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje es la respuesta diferencial con respecto a la inhibición ejercida por el AMP según esté presente o no la FBP (Sección 6.1.1.2). Se estudiaron entonces los efectos que el AMP ejerce sobre las enzimas mutantes simples y dobles, en forma aislada y en forma conjunta con el activador FBP (Tabla 6.9).

Tabla 6.9. Valores de actividad remanente (%) (calculados como el cociente entre la actividad enzimática en presencia de AMP 2 mM con respecto a la actividad enzimática en ausencia del inhibidor, multiplicado por 100) obtenidos para las enzimas de *E. coli* salvaje y simples y dobles mutantes, en ausencia y presencia de 1,5 mM de FBP. Método utilizado: Verde de Malaquita, sentido de síntesis.

Enzima	Actividad remanente (%) a 2 mM de AMP	
	ausencia FBP	FBP 1,5 mM
<i>E. coli</i> salvaje	58±3	4±0,2
N-Δ15	62±4	51±4
G336D	37±2	21±1
W113A	79±5	38±2
Q74A	70±4	42±4
N-Δ15+W113A	94±4	55±4
N-Δ15+Q74A	79±4	45±3
G336D+W113A	65±3	51±3
G336D+Q74A	70±3	39±2

En lo que respecta a las simples mutantes, los resultados de la Tabla 6.9 muestran que, en ausencia del activador, la enzima salvaje y las simples mutantes, a excepción de la G336D, son muy poco inhibidas ya que ninguna de ellas supera el 50% de inhibición. Se observa también que las dobles mutantes que poseen las mutaciones Q74A o W113A son muy poco sensibles al AMP, aún aquellas derivadas de la mutante G336D. Comparando los resultados hallados en ausencia y en presencia de FBP, se observa que todas las mutantes, son más sensibles al inhibidor en presencia del activador, a semejanza de lo que ocurre con la enzima salvaje, pero esta sensibilidad al inhibidor es, en todos los casos, inferior a la que posee la enzima salvaje.

6.1.2.7. Discusión

Los resultados obtenidos con las enzimas dobles mutantes mostraron nuevamente la relevancia de los residuos Gln⁷⁴ y Trp¹¹³ para que se produzca, en forma importante, tanto la activación por FBP como la inhibición por AMP. En lo que respecta a la activación, esta afirmación está basada en que, al igual que lo observado para la enzima salvaje, la introducción de estas mutaciones en las enzimas preactivadas disminuye la sensibilidad a dicho activador. Es interesante destacar que, tanto las mutantes preactivadas como sus dobles mutantes, muestran una mayor afinidad aparente por la FBP que la enzima salvaje, independientemente de las veces de activación resultantes. O sea que en ambos casos, la segunda mutación no altera la capacidad del activador de unirse con alta afinidad pero sí la de producir una mayor activación.

Respecto a la inhibición por AMP, en ausencia de activador las dobles mutantes se comportaron en forma semejante a la enzima salvaje mostrando una inhibición máxima inferior al 50%. En cambio, en presencia del activador, a diferencia de lo que ocurre con la enzima salvaje y en forma semejante a lo observado en las mutantes simples, la FBP solo aumentó ligeramente la inhibición de las dobles mutantes, aún aquellas derivadas de la enzima G336D, la única enzima mutante que sufre una inhibición importante en presencia de FBP. O sea que nuevamente la ausencia de cualquiera de estos dos residuos en las dobles mutantes las torna más insensibles al inhibidor, con respecto a la sensibilidad que posee la enzima mutante G336D. La escasa modificación de la inhibición en presencia del

activador se debería a que esos residuos son importantes para lograr el cambio conformacional “local, en el sitio activo” que produce la FBP, por lo tanto, para estas mutantes las conformaciones que tienen unida FBP se comportarían prácticamente en forma semejante a las que no la tienen y el efecto que causa el inhibidor es similar, tanto en presencia como en ausencia de activador.

Los resultados obtenidos por DC muestran diferencias entre las conformaciones de las enzimas preactivadas y las enzimas salvaje y mutantes W113A y Q74A. O sea que es válido plantear como hipótesis que un efecto sobre las estructuras terciaria y cuaternaria ocurre en las mutantes preactivadas y que podría corresponder a una relajación de estas estructuras. La mayor flexibilización de estas interacciones entre dominios y subunidades permitiría una mayor flexibilidad en el sitio activo facilitando la adaptación del entorno a los sustratos y los movimientos de apertura y cierre en el ciclo catalítico. Por otro lado, los resultados ponen en evidencia que los mecanismos de activación que operan en las mutantes preactivadas son diferentes, ya que si bien en ambos casos las segundas mutaciones las tornaron menos sensibles al activador, las actividades específicas en su ausencia se vieron afectadas en distinta magnitud. La enzima mutante N- Δ 15 se vio más afectada en su actividad específica indicando que el mecanismo por el cual adquiere esa preactivación sería más dependiente de la presencia de esos residuos. Para el caso de esta enzima mutante podría postularse que la mutación actuaría tanto en forma directa, sobre el sitio de unión de sustratos, como afectando también la interacción entre subunidades por la zona del dominio N-terminal. (Bejar y col., 2006a) postularon el carácter flexible del extremo N-terminal, y sugirieron un rol regulatorio para esta zona, que actuaría como un “interruptor alostérico”, ya que, probablemente un extremo N-terminal más corto permite un reacomodamiento de zonas que están a continuación, importantes para la catálisis. Además se ha demostrado que la ADP-Glc PPasa de tubérculo de papa es regulada por un mecanismo redox, según el cual, la enzima se activa cuando ocurre la reducción de un puente disulfuro que se establece entre las subunidades pequeñas a través de residuos de Cys pertenecientes al extremo N-terminal (Fu y col., 1998; Ballicora y col., 2000). Así que, muy probablemente, en la enzima de *E. coli*, aunque carece de estas Cys, se establezcan también interacciones entre subunidades a través de los extremos N-terminal.

En lo que respecta a la enzima G336D, al introducir una segunda mutación en los residuos Gln⁷⁴ o Trp¹¹³, las dobles mutantes resultantes conservan el estado preactivado. Esto indicaría que la activación encontrada en la mutante G336D tiene un componente que escaparía al acomodamiento de los *loops* que se había puesto en evidencia al estudiar las mutantes Q74A y W113A. En esta enzima, la mutación se sitúa en un dominio diferente al del sitio activo, en el extremo C-terminal, el que, según el modelo tridimensional obtenido, establece una fuerte interacción con la subunidad contigua, a través de esta región de β hélice (Jin y col., 2005). También se ha demostrado que se establecen fuertes interacciones entre ambos dominios de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* entre sí, ya que luego de la co-expresión de los dominios N- y C-terminal, éstos se mantuvieron unidos a través de interacciones no covalentes, dando como resultado una enzima activa y regulable alostéricamente (Bejar y col., 2004). Esto conduce a postular que la presencia de una carga negativa adicional, debida al reemplazo de una Gly por un Asp, muy probablemente modifique las interacciones electrostáticas, tanto entre ambas subunidades, como entre los dominios C- y N-terminal de la misma subunidad. Entonces, este reacomodamiento debido a la carga, daría como resultado una conformación más activa, cuyo mecanismo de preactivación es relativamente independiente de la señal transmitida por los *loops* donde se encuentran los residuos Trp¹¹³ y Gln⁷⁴, siendo ésta una característica diferencial importante entre las enzimas preactivadas que surge de analizar las dobles mutantes derivadas de ambas enzimas.

Aunque previamente se postuló que las mutaciones en los residuos Trp¹¹³ y Gln⁷⁴ actúan esencialmente sobre la propagación de la señal de la FBP hacia el sitio activo, tal como se muestra en la Figuras 6.4-A y 6.4-B, esto no excluye que puedan también producirse cambios conformacionales a nivel de la estructura terciaria y cuaternaria conducentes a una mayor relajación de las interacciones entre los dominios N- y C- terminales y/o entre las subunidades.

6.1.3. Caracterización de la interacción de la enzima con el cofactor esencial, el ion magnesio. Importancia del residuo ácido aspártico 276

6.1.3.1. Introducción

Se ha demostrado que las ADP-Glc PPasas de diversos organismos requieren de un ion metálico, generalmente Mg^{2+} , para realizar su función catalítica (Iglesias y Preiss, 1992; Ballicora y col., 2003a; , 2004). Hasta el momento, ninguna de las ADP-Glc PPasas cristalizadas ha sido obtenida en presencia de este ion. Los investigadores (Jin y col., 2005) compararon el dominio catalítico de la enzima de tubérculo de papa con el de otras PPasas cristalizadas anteriormente y observaron que estructuralmente eran semejantes. Además, al realizar un alineamiento estructural de los sitios activos señalaron que los residuos ácidos Asp¹⁴⁵ y Asp²⁸⁰ en la enzima de tubérculo de papa, estaban espacialmente cercanos a los residuos que unen el metal en las enzimas comparadas. Los correspondientes residuos homólogos en la enzima de *E. coli* son los Asp¹⁴² y Asp²⁷⁶. La relevancia de este primer Asp como residuo catalítico había sido confirmada por estudios de mutagénesis dirigida, ya que la mutación por Asn del Asp¹⁴⁵ y del Asp¹⁴² en la enzima de tubérculo de papa y de *E. coli*, respectivamente, resultó en una disminución de cuatro órdenes de magnitud en la actividad catalítica (Frueauf y col., 2001; , 2003).

Con motivo de analizar la relevancia de estos residuos se decidió comparar la estructura tridimensional del modelo de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* obtenido por homología (inciso 5.26) con las de algunas nucleotidil transferasas cristalizadas en presencia de iones. Se observó en todas ellas la presencia de un Asp homólogo al Asp¹⁴² (Tabla 6.10). En muchas de estas enzimas se observó un residuo Asp homólogo al Asp²⁷⁶, como es el caso de las enzimas Glc1P timidilil transferasa de *E. coli* (Tabla 6.10 y Figura 6.19); Glc1P citidilil transferasa de *Salmonella typhi* y UDP-Glc PPasa de *Corynebacterium glutamicum*. En otras, en cambio, se encontró una Asn coordinando con el metal en posición similar al Asp²⁷⁶, como es el caso de las enzimas N-acetilglucosamina1P uridilil transferasa de *Streptococcus pneumoniae* y de *E. coli*. También se analizaron estructuras tridimensionales de enzimas que no fueron cristalizadas con metal, observándose que hay uno o dos residuos ácidos cercanos a los oxígenos de los grupos fosfato α y/o β de los nucleótidos di- o tri-fosfato. Uno de ellos es un Asp, presente

invariabilmente en la misma posición que ocupa el Asp¹⁴² en el modelo de la enzima de *E. coli*. El otro residuo ácido, que sería el homólogo al Asp²⁷⁶, se presenta como tal en las estructuras de las enzimas ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* (Tabla 6.11 y Figura 6.19), Glc1P timidilil transferasa de *E. coli* y de *Pseudomonas aeruginosa* y como Asn en la N-acetilglucosamina1P uridilil transferasa de *Haemophilus influenzae* (Tabla 6.11).

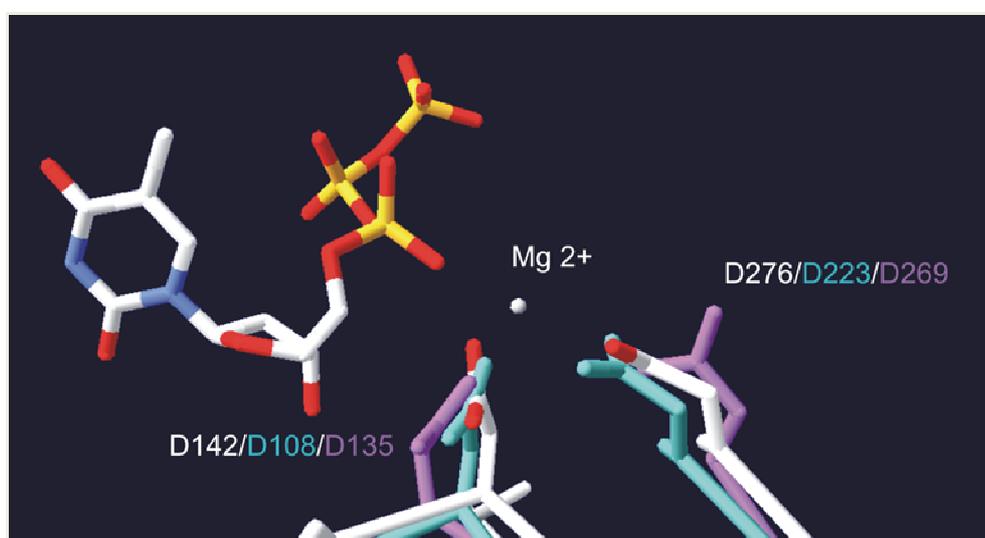


Figura 6.19. Superposición estructural de aminoácidos en el sitio de unión del Mg²⁺ en tres NDP-Glc PPasas. Se muestra el ion Mg²⁺ (esfera en blanco) y el dTTP que co-cristalizaron con la enzima Glc1P timidilil transferasa de *E. coli* (código PDB: 1MC3). En esta enzima el Mg²⁺ interactúa con el oxígeno del fosfato α , con dos residuos Asp (Asp¹⁰⁸ y Asp²²³, que se muestran en celeste, completando la esfera de coordinación con una molécula de agua (Sivaraman y col., 2002). Se muestran los residuos homólogos, los Asp¹⁴² y Asp²⁷⁶ en el modelo de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* (C: blanco, O: rojo) y Asp¹³⁵ y Asp²⁶⁹ en la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* (código PDB: 3BRK) que se muestran en violeta. Los átomos de la molécula de dTTP se colorean según su tipo, O: rojo, C: blanco, N: azul, y P: amarillo. Figura obtenida con el programa Deep view/Swiss PDB viewer v4.0.

Tabla 6.10. Residuos homólogos estructurales a los Asp¹⁴² y Asp²⁷⁶ de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli*, identificados como tal al superponer estructuras tridimensionales de enzimas nucleotidil transferasas cristalizadas en complejo con el ion metálico. Se utilizó el programa Swiss PDB Viewer. ⁽¹⁾ como en la estructura cristalina aparecen dos iones Mg²⁺, en la tabla se considera el que está ubicado en posición homóloga al de las demás enzimas cristalizadas con un solo ion.

Enzima	Residuo homólogo al Asp ¹⁴²	Residuo homólogo al Asp ²⁷⁶	Referencia
Glc1P timidilil transferasa de <i>E. coli</i>	Asp ¹⁰⁸	Asp ²²³	(Sivaraman y col., 2002)
Glc1P citidilil transferasa de <i>Salmonella typhi</i> ⁽¹⁾	Asp ¹³¹	Asp ²³⁶	(Koropatkin y col., 2005)
N-acetilglucosamina1P uridilil transferasa de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Asp ¹⁰²	Asn ²²⁷	(Kostrewa y col., 2001)
Glc1P uridilil transferasa de <i>Corynebacterium glutamicum</i> ⁽¹⁾	Asp ¹⁴²	Asp ²⁶⁶	(Thoden y Holden, 2007a)
N-acetilglucosamina1P uridilil transferasa de <i>E. coli</i>	Asp ¹⁰⁵	Asn ²²⁷	(Olsen y Roderick, 2001)

Tabla 6.11. Residuos homólogos a los Asp¹⁴² y Asp²⁷⁶ de la enzima de *E. coli*, identificados como tal al superponer alineamientos y estructuras de enzimas nucleotidil transferasas cristalizadas sin el ion metálico. El criterio que se tomó en este caso fue la ubicación de los residuos en una posición tal, que podrían estar interaccionando con el Mg²⁺ modelado a partir de otras nucleotidil transferasas.

Enzima	Residuo homólogo al Asp ¹⁴²	Residuo homólogo al Asp ²⁷⁶	Referencia
ADP-Glc PPasa de <i>A. tumefaciens</i>	Asp ¹³⁵	Asp ²⁶⁹	(Cupp-Vickery y col., 2008)
Glc1P timidilil transferasa de <i>E. coli</i>	Asp ¹¹¹	Asp ²²⁶	(Zuccotti y col., 2001)
Glc1P timidilil transferasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Asp ¹¹⁰	Asp ²²⁵	(Blankenfeldt y col., 2000)
N-acetilglucosamina1P uridilil transferasa de <i>Haemophilus influenzae</i>	Asp ¹⁰⁵	Asn ²²⁷	(Mochalkin y col., 2007)

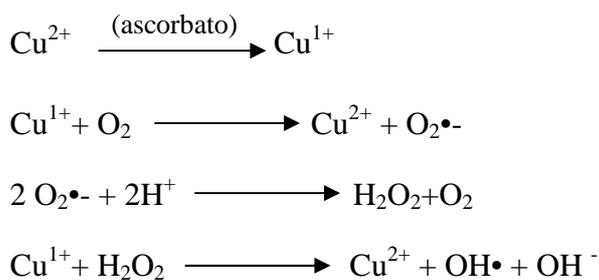
Al observar las Tablas 6.10 y 6.11 podemos suponer que ambos residuos, Asp¹⁴² y Asp²⁷⁶, estarían involucrados en la unión del metal. En particular, el Asp¹⁴² se conserva en una posición homóloga invariante en las enzimas analizadas, coordinando con el metal o cuando éste está ausente, en posición favorable de unir el ion, interaccionando con los oxígenos de los grupos fosfato del nucleótido. Las azúcarP nucleotidil transferasas analizadas presentan funciones similares, sustratos homólogos, residuos conservados, el plegamiento del sitio activo es semejante y además muestran un absoluto requerimiento de cationes divalentes para realizar la catálisis, en particular el Mg²⁺, lo que sugiere un mecanismo catalítico común (Sivaraman y col., 2002). Estudios previos sobre el mecanismo cinético de la enzima ADP-Glc PPasa de *Rhodospirillum rubrum* (Paule y Preiss, 1971) y trabajos más recientes con las enzimas relacionadas Glc1P timidilil transferasa de *E. coli* (Zuccotti y col., 2001; Sivaraman y col., 2002) y de *Salmonella enterica* (Barton y col., 2001) han demostrado, mediante análisis cinético y cristalográfico, que la reacción transcurre por un mecanismo secuencial de sustitución tipo S_N2. En el caso particular de la ADP-Glc PPasa el mecanismo es secuencial ordenado bi-bi, entrando primero el nucleótido en ambos sentidos de la reacción (Paule y Preiss, 1971; Haugen y Preiss, 1979).

En las enzimas que poseen funciones de transferasas, la mayoría de los iones metálicos actúan como estabilizadores electrostáticos y participan en la activación de sustratos mediante el aumento de la electrofilicidad del grupo fosfato escindible del nucleótido (Andreini y col., 2008). En concordancia con esto, en las estructuras tridimensionales de las azúcar1P nucleotidil transferasas, se observa que el metal coordina con los oxígenos de los grupos fosfatos α y/o β del nucleótido. (Sivaraman y col., 2002) propone que en las nucleotidil transferasas, el Mg²⁺ aumenta la catálisis por una combinación de neutralización de cargas de los sustratos, disminución de la electronegatividad del grupo α -fosforilo y correcto posicionamiento del grupo fosfato del segundo sustrato.

Por lo expuesto, como los residuos equivalentes al Asp²⁷⁶ en cuanto a posición y/o función de coordinación no están tan conservados como los correspondientes al Asp¹⁴², nuestro objetivo fue evaluar la relevancia de este último Asp como un segundo ligando de Mg²⁺ en la ADP-Glc PPasa de *E. coli*.

6.1.3.2. Cortes oxidativos de la cadena peptídica mediante la utilización de metales

Con el objetivo de investigar la importancia del Asp²⁷⁶ en la unión del Mg²⁺, se practicaron cortes oxidativos con iones metálicos sobre la enzima salvaje y sobre enzimas mutantes. La modificación que sufren las proteínas debida a oxidaciones catalizadas por metales es un fenómeno bien conocido (Stadtman y Berlett, 1991; Stadtman, 1993). La especificidad y el rendimiento de estos productos de oxidación permiten identificar el sitio de unión, ya que los residuos cercanos al sitio de unión del metal serán los blancos más probables de estas oxidaciones. Los sitios de unión del Mg²⁺ a distintas enzimas han sido identificados por cortes oxidativos utilizando Fe²⁺ (Farber y Levine, 1986; Wei y col., 1994; Godson y col., 2000) o Cu²⁺ (Chou y col., 1995; Tang y col., 1996). El mecanismo que proponen algunos autores (Chou y col., 1995; Tang y col., 1996) para el caso del Cu²⁺, sería el que a continuación se esquematiza:



En un primer momento, el Cu²⁺ se une a la enzima en el sitio de unión del Mg²⁺. Luego, el compuesto reductor (ascorbato) reduce el Cu²⁺ a Cu¹⁺, el cual, en presencia de moléculas de O₂ disueltas, genera especies reactivas del oxígeno a través de la llamada reacción de Fenton (Fenton 1984). Estos radicales interactúan con los residuos aminoacídicos susceptibles, cercanos al sitio de unión, causando inactivación enzimática. Se considera que el principal causante de esta inactivación es el radical hidroxilo (OH•), y debido a su alta reactividad, no difundirá demasiado lejos del sitio de generación. Finalmente, la enzima modificada sufre una ruptura de su cadena peptídica, generando fragmentos. Este corte estaría ocurriendo en residuos cercanos al sitio de generación de estos radicales libres, por lo que la posterior identificación de los residuos involucrados en este corte permite asignarles un rol en la unión del catión.

Estas reacciones oxidativas son estimuladas por cantidades sub-estequiométricas de varios

quelantes, como es el caso del EDTA, en cambio, si se agregan en cantidades mayores a las estequiométricas provocan inhibición. (Stadtman y Berlett, 1991). Por esta razón *in vitro*, estas reacciones generalmente se detienen con el agregado de EDTA.

Primeramente se establecieron las condiciones óptimas de ruptura para la ADP-Glc PPasa de *E. coli* con el sistema Cu^{2+} -ascorbato. Las concentraciones, tiempos y temperaturas seleccionados fueron los siguientes:

- Cu^{2+} : 40 μM , concentraciones menores producían menor proporción de fragmentos y concentraciones mayores producían agregados proteicos de elevada masa molecular.

-ascorbato: 40 mM, aunque su concentración no era crítica.

- H_2O_2 : 1 mM, concentraciones mayores producían desaparición de las bandas proteicas del gel de poliacrilamida, probablemente debido a oxidaciones más enérgicas seguidas de numerosas fragmentaciones de la proteína.

-tiempo de reacción: 4 min, tiempos más prolongados no aumentaban la proporción fragmentos peptídicos/proteína sin cortar. Para tiempos de incubación superiores a 15 min en la imagen del SDS-PAGE se tornaban, cada vez menos visibles, tanto los fragmentos mayoritarios, como la banda correspondiente al monómero. Esto podría deberse a posteriores oxidaciones y fragmentaciones de la secuencia peptídica.

-temperatura de incubación: 25 °C.

-buffer MOPS-NaOH 100 m M pH: 8,0 ya que es el buffer de conservación de la enzima y el utilizado para la determinación de actividad enzimática.

-EDTA: una concentración 25 mM fue suficiente para detener la reacción.

Luego de enfrentar la enzima salvaje al sistema Cu^{2+} -ascorbato, el análisis por SDS-PAGE mostró la aparición de dos fragmentos principales, de masas moleculares 29 y 21 kDa, respectivamente, junto con algunas bandas proteicas minoritarias (Figura 6.20).

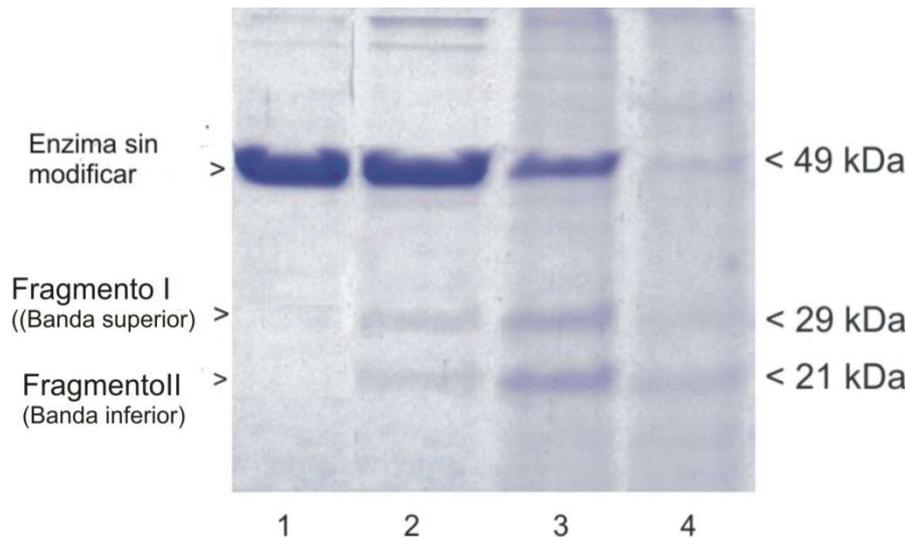


Figura 6.20. Análisis por SDS-PAGE de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje. Influencia de la concentración de Cu^{2+} y los tiempos de incubación en el corte de la enzima. Carril (1): control no tratado Carril (2-4): bandas obtenidas luego de someter a la enzima al tratamiento con Cu^{2+} -ascorbato. (2): $\text{Cu}^{2+} = 10 \mu\text{M}$, tiempo de incubación 4 min; (3) $\text{Cu}^{2+} = 40 \mu\text{M}$, tiempo de incubación 4min; (4) $\text{Cu}^{2+} = 40 \mu\text{M}$ la reacción se inhibió a las 24 horas. Condiciones: *buffer* MOPS-NaOH 100 mM pH 8,0, enzima 0,4 mg/ml, ascorbato 40 mM, H_2O_2 1 mM. Todas las incubaciones fueron a 25 °C. La reacción se detuvo con EDTA 25 mM pH 8,0. Las muestras se conservaron a 0 °C hasta su procesamiento.

La suma de las masas moleculares aparentes de los fragmentos principales se encuentra en el orden de la masa molecular del monómero (49 kDa), sugiriendo que provienen de un único corte principal. Cabe aclarar que las masas moleculares que se mencionan del monómero y de los fragmentos fueron calculadas mediante patrones según las imágenes del SDS- PAGE. Si la división se produjera en el Asp²⁷⁶ se obtendrían dos polipéptidos de 31,15 y 17,54 kDa, lo que coincide, aproximadamente, con la masa molecular de los fragmentos.

Como se observa en la Figura 6.20, la proporción de los fragmentos aumentó cuando la concentración de Cu^{2+} utilizada se incrementó de 10 a 40 μM . A tiempos de incubación más prolongados, muy probablemente la enzima se divide progresivamente en más de un sitio, dando fragmentos más pequeños que no se visualizan en el gel. Esto se deduce por la desaparición de las bandas correspondientes a los fragmentos y por la disminución en la intensidad de la banda de monómero (Figura 6.20, carril 4). En ausencia de Cu^{2+} o de ascorbato en la mezcla de incubación no se produjeron los cortes, indicando que existe cierta especificidad en la fragmentación (resultados no mostrados). Se observó también que

los iones magnesio en altas concentraciones y el Mg-ATP protegen a la enzima (Figura 6.21), lo que sugiere que este sitio de ruptura está en las cercanías del sitio de unión del Mg-ATP. El Cu^{2+} posee una mayor versatilidad en cuanto a número de coordinación, geometrías posibles y preferencia de donantes y es capaz de establecer interacciones de esfera interna más fuertes que el Mg^{2+} . Esto explicaría que la enzima esté protegida de la escisión por Cu^{2+} sólo a altas concentraciones de Mg^{2+} .

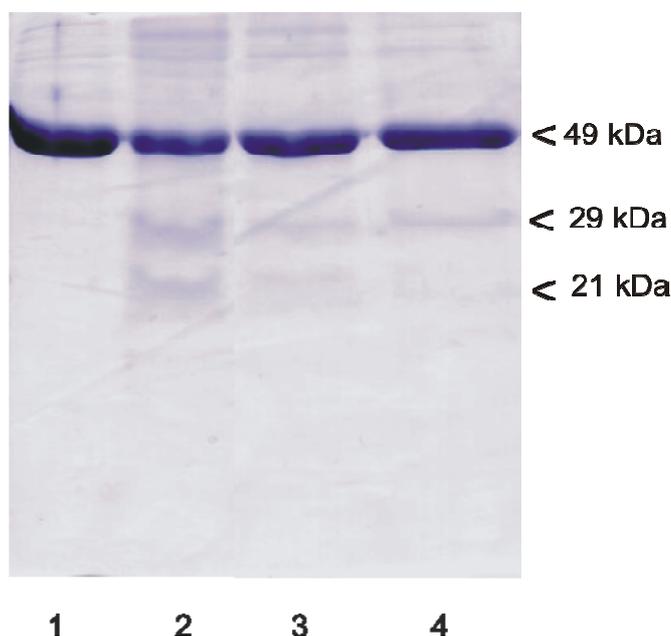


Figura 6.21. Protección del corte oxidativo por parte del Mg^{2+} y del Mg-ATP sobre la ADP-Glc PPasa de *E. coli*. Carril (1): enzima control, Carriles (2-4): corte con Cu^{2+} 40 μM , tiempos de incubación 4 min; (3): con agregado de Mg^{2+} 40 mM (4): adición de 40 mM de Mg^{2+} y 10 mM de ATP. Las demás condiciones son idénticas a las de la Figura 6.20.

Con el fin de identificar el punto de división, en un primer momento, se realizaron experiencias de modificación oxidativa sobre enzimas que presentaban alguna mutación, como la mutante de inserción Ec-ins117 (Bejar y col., 2004) y las mutantes puntuales del Asp^{276} , las ADP-Glc PPasas D276E y D276N (Bejar y col., 2006b). La enzima Ec-ins117 es una mutante activa, derivada de la co-expresión de dos polipéptidos que comprenden los residuos 1-323 (de masa molecular~37 kDa) y 328-431 (masa molecular~12 kDa) de la ADP-Glc PPasa *E. coli*, respectivamente, migrando como bandas separadas en el SDS-PAGE (Figura 6.22, carril 5). El análisis de la mutante tratada con el sistema

Cu^{2+} -ascorbato mostró la aparición de un polipéptido de 29 kDa que, aparentemente, proviene de un corte del fragmento de 37 kDa (Figura 6.22, carril 2). Como el fragmento de mayor masa molecular de la enzima salvaje tratada con Cu^{2+} migra a la misma distancia que esta tercera banda que aparece en la enzima mutante, se asume que este péptido, de masa molecular aparente de 29 kDa, corresponde a una secuencia entre los residuos 1-323. Esto sugiere además que la banda inferior de masa molecular aparente de 21 kDa observada en la enzima salvaje comprende el resto de la secuencia, comenzando en una región cercana al último tramo del dominio N-terminal. Esto es porque, si esta banda inferior fuese el resultado de un nuevo corte a partir del fragmento superior (del de 29 kDa), se debería observar también en la enzima mutante. En concordancia con esto, en la Figura 6.22 se observa, en el carril correspondiente al análisis de la mutante después de la escisión, una ampliación de la banda de ~12 kDa hacia la zona de menor masa molecular (carril 2 en comparación con el carril 5), debida probablemente a la co-migración de un fragmento de ~8 kDa que junto con el de ~29 kDa, resultaría de la escisión del polipéptido de ~37 kDa.

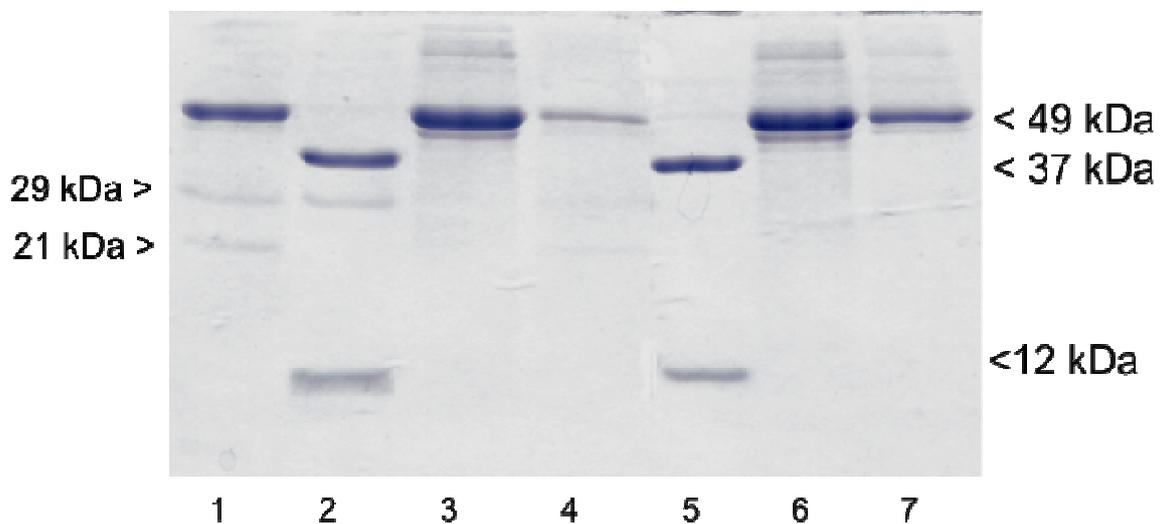


Figure 6.22. SDS-PAGE de la enzima de *E. coli* ADP-Glc PPasa salvaje y mutantes luego del tratamiento oxidativo con el sistema Cu^{2+} -ascorbato. Carril (1-4): enzimas tratadas con Cu^{2+} -ascorbato. Carril (5-7): enzimas no tratadas. (1): salvaje; (2) y (5): *Ec ins-117*; (3) y (6): mutante D276N; (4) y (7): D276E. Las demás condiciones son idénticas a las de la Figura 6.20.

El análisis mediante SDS-PAGE de la mutante D276N al ser tratada con el sistema Cu^{2+} -ascorbato no mostró fragmentos de corte visibles, aún con incubaciones a tiempos mayores a 4 min (Figura 6.22). Tampoco se observó disminución en la intensidad de la banda que corresponde a la enzima intacta, confirmando que no se produce corte de la cadena peptídica, de manera apreciable. La figura muestra que la enzima D276E experimenta una ruptura, pero la proporción de fragmentos obtenidos es visiblemente menor que en el caso de la enzima salvaje. Los tiempos de incubación para que este corte sea visible son mayores que los de la enzima salvaje (8 min de incubación en vez de 4). Estos resultados confirman la importancia del residuo Asp^{276} en la coordinación del metal, tanto en cuanto a la presencia de la carga negativa, como a la longitud de la cadena lateral de este residuo.

Al estudiarse el efecto del sistema Cu^{2+} -ascorbato sobre la actividad enzimática de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje, se observó que la enzima se inactiva rápidamente. La velocidad de inactivación dependía del tiempo de incubación y de la concentración del catión (Figura 6.23).

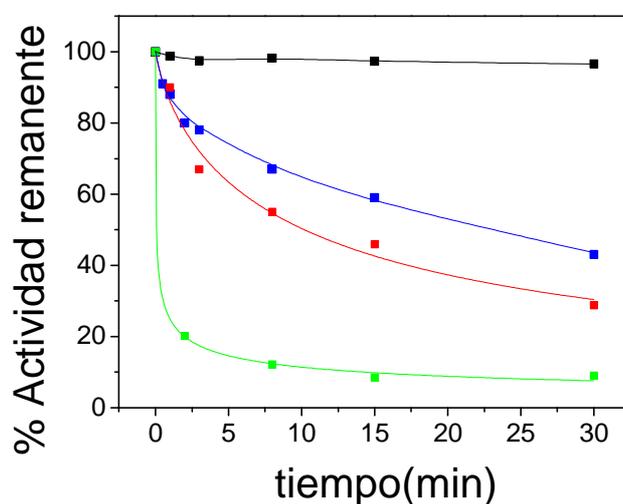


Figura 6.23. Inactivación de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje por Cu^{2+} -ascorbato a distintos tiempos y concentraciones de CuCl_2 . La mezcla de incubación contenía: ácido L-ascórbico 20 mM, H_2O_2 1 mM, MOPS-NaOH 50 mM, pH 8,0. Temperatura de incubación: 25°C. La concentración de la enzima fue de 0,4 mg/ml. La reacción control (■) se incubó en ausencia de Cu^{2+} mientras que en los otros casos, se adicionó CuCl_2 a la mezcla de incubación en la concentración indicada: Cu^{2+} 5 μM (■), Cu^{2+} 10 μM (■) y Cu^{2+} 15 μM (■).

Por otra parte, se observó que la presencia de ATP en el medio de incubación ejerce un efecto protector importante sobre la inactivación, mientras que no se observa protección al adicionar Mg^{2+} (Figura 6.24). Si el Cu^{2+} posee una capacidad de unión (afinidad) mucho mayor que el Mg^{2+} (por las características antes descritas de interacción del Cu^{2+}) el primero va a competir con mayor afinidad que el segundo. Todo esto contribuiría a que no se evidencie una protección de la actividad enzimática por parte del Mg^{2+} , aunque ambos iones posean el mismo sitio de unión

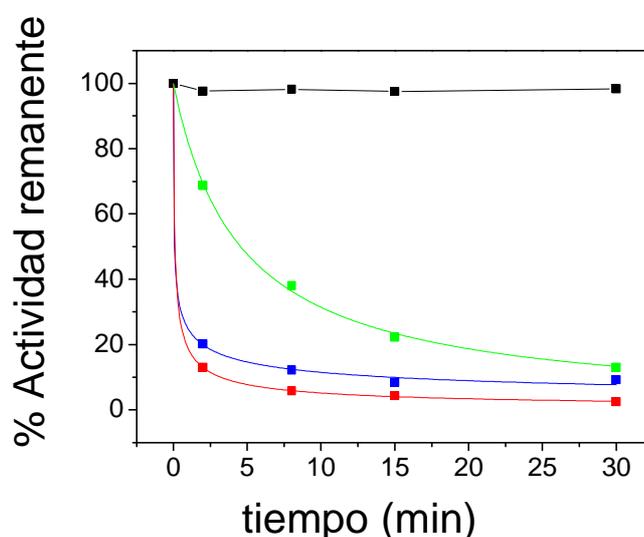


Figura 6.24. Efecto sobre la actividad de la ADP-Glc PPasa por la adición de ATP ó Mg^{2+} al medio de incubación con Cu^{2+} -ascorbato. La mezcla de incubación es la que se indica en la Figura 6.23, en presencia de una concentración $20 \mu M$ de Cu^{2+} . La actividad enzimática se determinó, con adición, alternativamente, de ATP $3 mM$ (■) y de Mg^{2+} $5 mM$ (■) en la mezcla de incubación y sin ningún agregado (■). Ensayo control sin Cu^{2+} (■).

Los productos de corte de la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje se analizaron por técnicas de espectrometría de masas para identificar el sitio de corte. Como se muestra en la Figura 6.25, en ninguno de los dos fragmentos mayoritarios se lograron identificar todos los residuos, pero los del fragmento de mayor masa pertenecen al extremo N-terminal y los identificados en el de menor masa, al C-terminal.

Los resultados de este análisis fueron coherentes con los obtenidos a partir de la mutante de inserción Ec-ins117 en relación a que el fragmento de mayor masa molecular ($29 kDa$)

pertenece al extremo N-terminal; pero, como se describe a continuación, no resultan concordantes con un único corte de la cadena peptídica que dé como resultado los dos fragmentos mayoritarios obtenidos como productos, ya que hay péptidos comunes identificados en ambos fragmentos. En el fragmento de 21 kDa, representando un 26% de la secuencia de la enzima salvaje, la secuencia identificada comienza en el Asp²⁷⁶ (el aminoácido anterior es una Arg, sitio de corte de la tripsina) y finaliza en el residuo 423.

```

1 MVSLEKNDHL MLARQLPLKS VALILAGGRG TRLKDLTNKR AKPAVHFGGK
51 FRIIDFALSN CINSGIRRMG VITQYQSHTL VQHIQRGWSF FNEEMNEFVD
101 LLPAQQRMKG ENWYRGTADA VTQNLDIIRR YKAEYVVILA GDHIYKQDYS
151 RMLIDHVEKG ARCTVACMPV PEEASAFGV MAVDENDKII EFVEKPANPP
201 SMPNDPSKSL ASHGIVVFDA DYLYELLEED DRDENSSHDF GKDLIPKITE
251 AGLAYAHPPP LSCVQSDPDA EPYWRDVGTL EAYWKAHLDL ASVVPEDMY
301 DRNWPVRTYN ESLPPAKFVQ DRSGSHGMTL NSLVSGGCVI SGSVVVQSVL
351 FSRVRVNSFC NIDSAVLLPE VVWGRSCLRL RCVDRACVI PEGMVIGENA
401 EEDARRFYRS EEGIVLVTRE MLRKLGHKQE R

```

(A)

```

1 MVSLEKNDHL MLARQLPLKS VALILAGGRG TRLKDLTNKR AKPAVHFGGK
51 FRIIDFALSN CINSGIRRMG VITQYQSHTL VQHIQRGWSF FNEEMNEFVD
101 LLPAQQRMKG ENWYRGTADA VTQNLDIIRR YKAEYVVILA GDHIYKQDYS
151 RMLIDHVEKG ARCTVACMPV PEEASAFGV MAVDENDKII EFVEKPANPP
201 SMPNDPSKSL ASHGIVVFDA DYLYELLEED DRDENSSHDF GKDLIPKITE
251 AGLAYAHPPP LSCVQSDPDA EPYWRDVGTL EAYWKAHLDL ASVVPEDMY
301 DRNWPVRTYN ESLPPAKFVQ DRSGSHGMTL NSLVSGGCVI SGSVVVQSVL
351 FSRVRVNSFC NIDSAVLLPE VVWGRSCLRL RCVDRACVI PEGMVIGENA
401 EEDARRFYRS EEGIVLVTRE MLRKLGHKQE R

```

(B)

Figura 6.25. Secuencias pertenecientes a la ADP-Glc PPasa de *E. coli* identificadas por espectrometría de masas correspondientes a los péptidos de 29 kDa (A) y de 21 kDa (B), obtenidos por corte oxidativo. En rojo se muestran los residuos identificados en relación a la secuencia completa de la enzima.

La secuencia a continuación (hasta finalizar en el residuo 431) presenta numerosos residuos de corte para la tripsina, lo que resultaría en péptidos cortos luego de la digestión con ésta. Curiosamente, aparece además un péptido correspondiente al N-terminal que abarca los residuos 131-146 que incluyen al Asp¹⁴². Por su parte, el análisis del fragmento de 29 kDa lo ubicó, en su mayoría, como perteneciente al extremo N-terminal, constituyendo, los péptidos identificados, un 40% de la secuencia total de la enzima salvaje. Se identificó desde el residuo 7 a partir del N-terminal, hasta el 208 (incluido el Asp¹⁴² dentro del fragmento 131-146). Nuevamente, llama la atención que en este

fragmento se logró identificar una secuencia perteneciente al C-terminal que contiene al Asp²⁷⁶ (desde el aminoácido 276 al 307), que también aparece en el fragmento de 21 kDa. Es decir que, por alguna razón, hay dos péptidos que están presentes en ambas bandas mayoritarias obtenidas como productos: una que comprende al Asp¹⁴² (aminoácidos 131 al 146) y la otra comienza en el Asp²⁷⁶ y continúa hasta el residuo 307. Para interpretar estos resultados se recurrió al modelo tridimensional obtenido para la ADP-Glc PPasa de *E. coli*, en el cual, se colorearon respectivamente con rojo y azul las secuencias identificadas en la banda de 29 y 21 kDa y en amarillo las secuencias en común que aparecen en ambas bandas (Figura 6.26). Estos resultados podrían seguir argumentando a favor de que el catión divalente (ya sea el Mg²⁺ o el Cu²⁺) se une a los dos Asp, ambos localizados en la región en amarillo de la estructura tridimensional. La razón por la cual ambos péptidos marcados en amarillo aparecen unidos alternativamente a residuos pertenecientes al N- o C-terminal podría obedecer a que, al producirse la unión del Cu²⁺ a esos dos ácidos aspártico, en presencia de ascorbato, además de producirse cortes en la cercanía se establecen uniones covalentes, preferentemente entre residuos aromáticos (Antos y Francis, 2006; Medinas y col., 2010) e incluso entre residuos de Tyr y el esqueleto peptídico (Person y col., 2001). Esto sería factible porque el péptido que contiene al Asp¹⁴² posee tres residuos de Tyr y uno de His y el péptido que comienza en el Asp²⁷⁶ posee dos Tyr y un Trp. Luego, durante el proceso de ionización y aceleración en el análisis por espectrometría de masas, algunos de estos enlaces pueden escindirse, dando los fragmentos independientes, lo que permite identificarlos como tales. Este fenómeno de ruptura del enlace entrecruzante durante el análisis por espectrometría de masas ha sido descrito para el caso de formación de di-Trp (Medinas y col., 2010).

Los resultados de la espectrometría de masa se basan en la comparación de los péptidos obtenidos luego de la digestión con tripsina con la secuencia conocida de la enzima de *E. coli*. Que no se haya logrado identificar algunas zonas de la secuencia puede deberse a que, probablemente, los residuos hayan sufrido numerosas modificaciones, debido a las condiciones poco controladas de la reacción de oxidación; esto impediría luego identificarlos según su masa sin modificar.

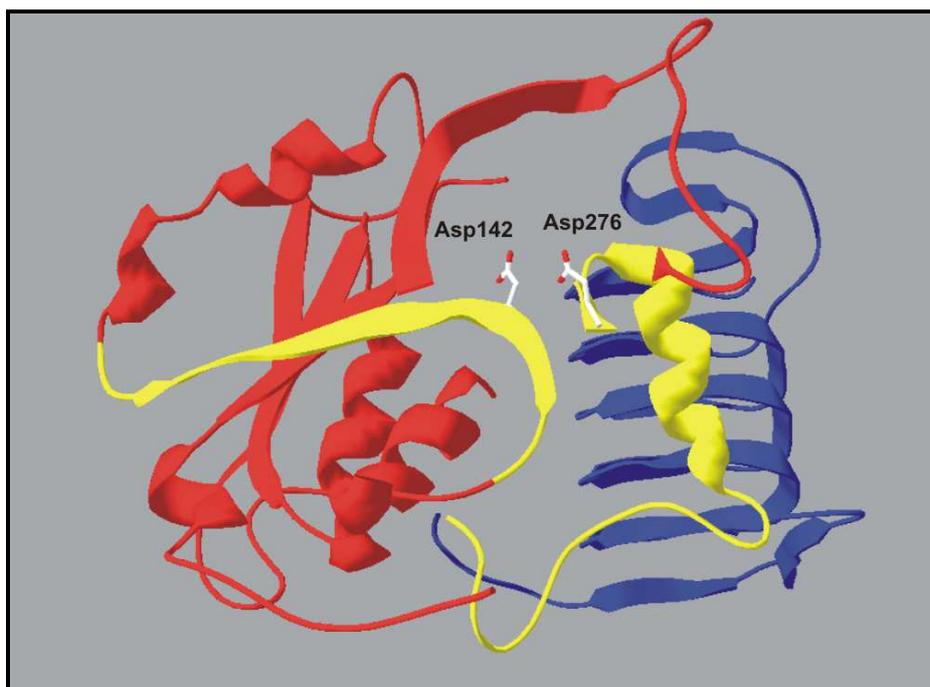


Figura 6.26. Modelo de la ADP-Glc PPasa de *E.coli*, donde se muestran las secuencias identificadas por espectrometría de masas pertenecientes a las bandas peptídicas obtenidas por corte con Cu^{2+} -ascorbato. En rojo y en azul se muestran los péptidos identificados, correspondientes a la banda de 29 y 21 kDa respectivamente, mientras que en amarillo se observan las secuencias comunes a ambas bandas. Se muestran los residuos Asp^{142} y Asp^{276} residuos que estarían en contacto con el ion, presentes en la zona donde se producen los cortes. Los átomos se colorean según su tipo: O: rojo, C: blanco. Figura obtenida con el programa Deep view/Swiss PDB viewer v4.0.

Por otro lado, para profundizar en la influencia que ejerce el Mg^{2+} sobre la cinética de la reacción, se realizaron experiencias donde se evaluó el efecto de un exceso del ion por sobre cantidades equimoleculares de ATP-Mg, siendo que previamente se había informado que ejercía un efecto activador adicional sobre la enzima de *E. coli* salvaje (Gentner y Preiss, 1968). Los ensayos se realizaron también con la enzima de *A. tumefaciens*, como para investigar lo que ocurría en otra ADP-Glc PPasa. Al observar los parámetros obtenidos (Tabla 6.12) podemos afirmar que en ambas ADP-Glc PPasas, el Mg^{2+} en exceso con respecto al ATP ejerce un efecto activador. En la enzima de *E. coli* el efecto se ejercería sobre la etapa catalítica ya que la V_{max} aumenta tres veces, en la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* no sólo aumenta la V_{max} , sino también la afinidad aparente hacia el sustrato ATP-Mg.

Tabla 6.12. Parámetros cinéticos para el ATP-Mg, de las ADP-Glc PPasas de *E. coli* y *A. tumefaciens*, determinados en condiciones equimoleculares y con un exceso 2 mM de Mg²⁺. La determinación de actividad se realizó en sentido de síntesis de ADP-Glc, método del Verde de Malaquita.

Condiciones	[ATP-Mg] equimolecular			Mg ²⁺ 2 mM en exceso		
	S _{0,5} (ATP-Mg) (mM)	V _{max} (U/mg)	n _H	S _{0,5} (ATP-Mg) (mM)	V _{max} (U/mg)	n _H
<i>E. coli</i>	4,8±0,40	2,85	2,6	6,0±0,35	9,6	2,1
<i>A. tumefaciens</i>	1,1±0,09	1,11	1,7	0,3±0,09	2,2	1,9

6.1.3.3. Discusión

Los resultados obtenidos mediante el clivaje de la enzima por el sistema metal-ascorbato respaldan la hipótesis de que el Asp²⁷⁶ de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* es un residuo que interviene en la unión del metal en el sitio activo. De la enzima salvaje se obtienen dos fragmentos principales, fenómeno que se observó con un rendimiento parcial o nulo cuando este Asp fue mutado hacia otro residuo ácido (Glu) o polar-neutro (Asn), respectivamente. La ausencia de corte en la mutante D276N sugiere que la carga negativa es primordial para la unión, pero también es importante el tamaño del aminoácido, ya que la mutante D276E requiere más tiempo que la enzima salvaje para fragmentarse y aún en estas condiciones, la proporción de fragmentos obtenidos es visiblemente inferior. Además este corte fue parcialmente protegido por altas concentraciones de Mg²⁺ y por ATP-Mg, confirmando la competencia que existe entre ellos y el Cu²⁺ por el sitio de unión del Mg²⁺.

Los residuos Asp¹⁴² y Asp²⁷⁶ de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* habían sido resaltados previamente como importantes en la unión del Mg²⁺ y al realizar la superposición del modelo obtenido para la enzima de *E. coli* con las estructuras cristalinas de NDP-azúcar PPasas relacionadas, se comprobó que estos residuos están ubicados, al igual que sus correspondientes homólogos, en una posición estructural favorable para quelar el metal, cerca del fosfato lábil, como para incrementar la electrofilia del grupo fosfato α y facilitar el ataque nucleofílico del azúcar 1P, tal como propone (Sivaraman y col., 2002). El Asp²⁷⁶ mostró una menor coincidencia que el Asp¹⁴² con los residuos homólogos estructurales de las NDP-azúcar PPasas relacionadas, principalmente con las

N-acetilglucosamina1P uridilil transferasas, donde hay una Asn como segundo ligando en coordinación con el metal, (Kostrewa y col., 2001; Olsen y Roderick, 2001; Mochalkin y col., 2007), pudiendo ser esta variación una diferencia importante entre estas últimas enzimas y las ADP-Glc PPasas. Estudios complementarios proponen que el rol del Asp²⁷⁶ va más allá que el de ser quelante del metal. (Bejar y col., 2006b) estudiaron cinéticamente las enzimas mutantes D276A, D276N y D276E, y además de una disminución de la afinidad aparente para el Mg²⁺ de 4 a 6 veces, observaron que se afectaba también la *k_{cat}* y la afinidad por los sustratos Glc1P y ATP y por el activador FBP. En base a estos resultados los autores postularon entonces, que este residuo estaría localizado en una región bisagra del sitio activo entre los subdominios del ATP y la Glc1P y que, además de interaccionar con el anillo de la Glc1P y con el Mg²⁺, también estaría en contacto con otros residuos pertenecientes a estructuras secundarias adyacentes, estableciendo una red de interacciones responsables de los cambios conformacionales que ocurren luego de la unión de los sustratos. En concordancia con esto, (Sivaraman y col., 2002) propone que, de los dos residuos de ácido aspártico involucrados en la unión del Mg²⁺, el homólogo al Asp²⁷⁶ sería el que desempeña una función más dinámica en el ciclo catalítico.

En lo que respecta al número de iones Mg²⁺ que interactúan durante el ciclo catalítico, debe considerarse tanto los estudios cinéticos como el análisis de las estructuras tridimensionales. El análisis cinético mostró que un exceso de Mg²⁺, por sobre la concentración de nucleótido, desempeña un papel activador extra en las dos ADP-Glc PPasas estudiadas (Tabla 6.12). Además el hecho de que dos azúcar1P nucleotidil transferasas (Tabla 6.10) hayan sido cristalizadas con dos Mg²⁺ unidos al sitio activo, apoyaría la hipótesis de que un segundo ion podría estar uniéndose de manera semejante en las ADP-Glc PPasas. En las estructuras tridimensionales de ambas enzimas, este segundo ion se ubica, con respecto al sustrato o producto, según el caso, del lado opuesto al del Mg²⁺ esencial (Koropatkin y col., 2005; Thoden y Holden, 2007a). Debido a la semejanza estructural que muestran las enzimas en esta región, podríamos especular que en la ADP-Glc PPasa de *E. coli* la ubicación de este segundo Mg²⁺ sería semejante.

6.2. Capítulo II: Estudios realizados sobre la enzima ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* en relación a su regulación alostérica.

6.2.1. Activación de la enzima por sus dos activadores principales, F6P y Pyr.

Tal como se dijo anteriormente en la Sección 3.3.1, la mayoría de las ADP-Glc PPasas son enzimas reguladas, cuya actividad es modulada por pequeñas moléculas efectoras, intermediarios claves de la vía principal de asimilación del carbono en el respectivo organismo (Ballicora y col., 2003a; , 2004). En *A. tumefaciens*, donde la Glc se metaboliza principalmente a través de la vía de Entner-Doudoroff, los activadores principales de la ADP-Glc PPasa son la F6P y el Pyr. Los estudios cinéticos (Eidels y col., 1970; Uttaro y col., 1998) han demostrado que ambos reguladores alostéricos afectan a esta enzima principalmente aumentando la V_{max} en un orden de magnitud; con un menor efecto sobre la afinidad hacia los sustratos, con valores de $S_{0,5}$ que disminuyen aproximadamente un 50 % en presencia de los activadores.

Las características regulatorias de la enzima de *A. tumefaciens* plantean dos cuestiones principales en lo que respecta a los mecanismos de acción de los activadores y a las relaciones entre los dominios estructurales de la proteína. Una primera cuestión se refiere a si ambos activadores se unen al mismo sitio en la enzima, interrogante que se ha resuelto parcialmente en estudios anteriores (Gomez-Casati y col., 2001; Ballicora y col., 2002) y apoyado por nuestras investigaciones realizadas con las enzimas mutantes W106A y Q67A que se especifican en la Sección 6.2.2. Todos estos estudios proponen la presencia de sitios separados en la enzima para la unión de estos dos activadores. Además, tal como se mencionó previamente, la caracterización de enzimas quiméricas demostró que la interacción entre los dominios N- y C-terminal es importante para la regulación general de la ADP-Glc PPasa pero también se estableció que es el dominio C-terminal el determinante de la especificidad por el Pyr (Ballicora y col., 2002), reafirmando las diferencias entre los sitios de unión. La segunda pregunta se refiere a si la F6P y el Pyr actúan de forma independiente o presentan efectos asociados en la unión y/o en la catálisis. Esto resulta de gran interés, ya que los sistemas que involucran a dos o más activadores simultáneos han sido poco explorados hasta el momento; a diferencia de los sistemas de inhibidores múltiples, que han sido ampliamente estudiados debido a sus aplicaciones en farmacología

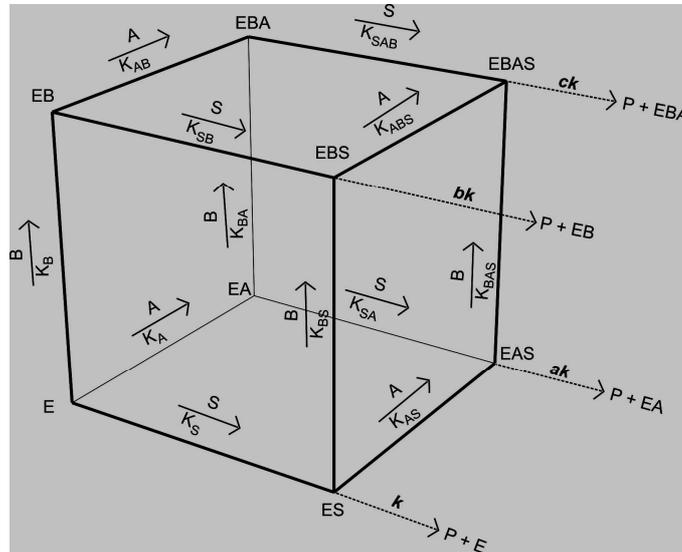
y toxicología (Chou, 2006; Schenker y Baici, 2009).

La enzima utilizada en este estudio fue la ADP-Glc PPasa recombinante de *A. tumefaciens* expresada en células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pETAT (Ballicora y col., 2002) (Sección 5.1). La enzima se purificó por fraccionamiento salino con sulfato de amonio, seguido de cromatografía de intercambio de aniones (Sección 5.14) y finalmente una cromatografía hidrofóbica (Sección 5.14.1). La enzima alcanzó una pureza de alrededor del 90% según el análisis por SDS-PAGE. La actividad enzimática se determinó en la dirección de síntesis de ADP-Glc por el método colorimétrico desarrollado por Fusari y col. (Fusari y col., 2006) (sección 5.19.1.1). Las concentraciones de sustrato utilizadas en los ensayos fueron 7,0 mM de MgCl₂, 1,0 mM de ATP y 1,0 mM de Glc1P.

6.2.1.1. Modelo de mecanismo cinético y ecuaciones de velocidad.

Se propone un modelo según el cual, el sustrato (S) o cada activador, siendo (A) la F6P y (B) el Pyr, puede unirse a la enzima libre o a la enzima combinada con otro/s ligando/s (Figura 6.27). Las constantes cinéticas k , ak , bk and ck que corresponden a la formación de producto a partir de los complejos enzimáticos ES, EAS, EBS y EABS, se suponen diferentes (esto se indica agregando los factores a , b y c al valor de k). Además, con el fin de considerar los posibles efectos mutuos entre los activadores, la constante de disociación de un activador en presencia del otro se supone diferente de la constantes de disociación de éste en ausencia del otro, o sea K_{AB} y K_{BA} , se suponen diferentes de K_A y K_B , respectivamente. Cabe aclarar que por simplicidad además, en este modelo los complejos enzima sustrato se plantean como un único complejo, sin explicitar los que se formarían con diferentes grados de saturación de los ligandos, lo que conduciría a ecuaciones de extrema complejidad en el número de parámetros a determinar. Esto implica una limitación del modelo, que podría no ser representativo en caso de que existieran fuertes efectos cooperativos en la unión sucesiva de los mismos. Los efectos cooperativos entre subunidades se verían reflejados en la desviación de un comportamiento hiperbólico en las curvas de saturación y en la necesidad de introducir coeficientes exponenciales (coeficientes de Hill) en las mismas. A juzgar por el adecuado ajuste de los datos

experimentales obtenidos en presencia de ambos, al modelo propuesto, como se muestra a continuación, para nuestro sistema se puede asumir esa simplificación.



$$K_S = \frac{([S])([E])}{[ES]} \quad K_{SA} = \frac{([S])([EA])}{[EAS]} \quad K_{SB} = \frac{([S])([EB])}{[EBS]} \quad K_{SAB} = \frac{([S])([EBA])}{[EBAS]}$$

$$K_A = \frac{([A])([E])}{[EA]} \quad K_{AB} = \frac{([A])([EB])}{[EBA]} \quad K_B = \frac{([B])([E])}{[EB]} \quad K_{BA} = \frac{([B])([EA])}{[EBA]}$$

Figura 6.27. Mecanismo cinético propuesto y definición de las constantes aparentes de disociación. Las constantes cinéticas que corresponden a la formación de producto se indican en minúsculas. Las constantes aparentes de disociación se presentan en letras mayúsculas, el primer símbolo en el subíndice identifica el componente que se disocia del correspondiente complejo enzimático; los símbolos siguientes representan los componentes que permanecen en el complejo (sin tener en cuenta el orden de adición).

De acuerdo al mecanismo cinético propuesto en la Figura 6.27 y teniendo en cuenta las constantes definidas, se obtiene la ecuación de velocidad en presencia de ambos activadores (donde $[E_T]$ es la concentración total de enzima)

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k \left\{ \left(\frac{[S]}{K_S} \right) + a \left(\frac{[S]}{K_{SA}} \right) \left(\frac{[A]}{K_A} \right) + b \left(\frac{[S]}{K_{SB}} \right) \left(\frac{[B]}{K_B} \right) + c \left(\frac{[S]}{K_{SAB}} \right) \left(\frac{[A]}{K_A} \right) \left(\frac{[B]}{K_{BA}} \right) \right\}}{1 + \left(\frac{[S]}{K_S} \right) + \left(\frac{[B]}{K_B} \right) \left(1 + \frac{[S]}{K_{SB}} \right) + \left(\frac{[A]}{K_A} \right) \left(1 + \frac{[S]}{K_{SA}} \right) + \left(\frac{[A]}{K_A} \right) \left(\frac{[B]}{K_{BA}} \right) \left(1 + \frac{[S]}{K_{SAB}} \right)} \quad (6.10)$$

Recientemente, Schenker y Baici (Schenker y Baici, 2009) desarrollaron una ecuación general de la velocidad, denominada ecuación modificadora general referida a enzimas que tienen dos modificadores alostéricos que se unen simultáneamente. Al comparar la ecuación obtenida por nosotros comprobamos que es equivalente a la correspondiente ecuación propuesta por los autores. A su vez, la ecuación puede ser reordenada sucesivamente para obtener la ecuación (6.11), a partir de la cual, bajo ciertas consideraciones, se obtiene la ecuación que podríamos denominar de Michaelis-Menten modificada, la ecuación (6.12). La obtención de una ecuación a partir de la otra y la definición de las constantes de disociación que aparecen en las ecuaciones (6.11) y (6.12), se muestran a continuación.

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k' + a'k \left(\frac{[A]}{K'_A} \right) + b'k \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) + c'k \left(\frac{[A]}{K_A} \right) \left(\frac{[B]}{K'_{BA}} \right)}{1 + \left(\frac{[A]}{K'_A} \right) + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) + \left(\frac{[A]}{K_A} \right) \left(\frac{[B]}{K'_{BA}} \right)} \quad (6.11)$$

$$v = v_0 + \frac{(V_{\max} - v_0)[A]}{(A_{0,5} + [A])} \quad (6.12)$$

En la ecuación (6.12), v_0 es la velocidad inicial en ausencia de (A) y en presencia de una concentración fija del otro activador, V_{\max} es la velocidad límite, que se alcanza para una proporción $([A]/A_{0,5}) \geq 100$. Como esta condición puede ser difícil de alcanzar, la relación para acercarse a la velocidad límite se puede disminuir a $([A]/A_{0,5}) \geq 10$, ya que cuando $([A]/A_{0,5}) = 10$, la velocidad inicial: $v \approx 0,1 v_0 + 0,9 V_{\max}$; es decir, se acerca a V_{\max}

Si la ecuación (6.12) se reordena en la ecuación (6.13), el miembro de la izquierda representa las veces de activación “neta” o “específica” y el factor entre paréntesis, en el miembro derecho, corresponde a la máxima activación neta. En esta ecuación, el valor de $A_{0,5}$ es la concentración del activador variable que produce la mitad de las veces de activación específicas.

$$\frac{v - v_0}{v_0} = \frac{\left(\frac{V_{\max} - v_0}{v_0} \right) [A]}{(A_{0,5} + [A])} \quad (6.13)$$

La ecuación (6.12) es una típica ecuación dosis-respuesta y resulta interesante destacar que se la obtiene a partir de la ecuación (6.10) lo que permite conocer el significado y la dependencia funcional de sus parámetros.

6.2.1.2. Equivalencia de ecuaciones

Para obtener la ecuación (6.11) a partir de la ecuación (6.10), suponiendo concentraciones de sustrato constantes, se definieron los siguientes parámetros:

$$k' = \frac{k[S]}{[S] + K_S} \quad (1) \qquad a' = \frac{a[S]}{[S] + K_{SA}} \quad (2)$$

$$b' = \frac{b[S]}{[S] + K_{SB}} \quad (3) \qquad c' = \frac{c[S]}{[S] + K_{SBA}} \quad (4)$$

$$K'_A = K_A \frac{([S] + K_S)K_{SA}}{([S] + K_{SA})K_S} \quad (5) \qquad K'_{AB} = K_{AB} \frac{([S] + K_S)K_{SBA}}{([S] + K_{SBA})K_S} \quad (6)$$

$$K'_B = K_B \frac{([S] + K_S)K_{SB}}{([S] + K_{SB})K_S} \quad (7) \qquad K'_{BA} = K_{BA} \frac{([S] + K_S)K_{SBA}}{([S] + K_{SBA})K_S} \quad (8)$$

Después de un reordenamiento de la ecuación (6.10), que permitió reemplazar los parámetros definidos, esta última se pudo reescribir como la ecuación (6.11), o en una forma equivalente, tal como se muestra en la ecuación (9) (téngase en cuenta que $K_A \cdot K'_{BA} = K_B \cdot K'_{AB}$). k' , a' , b' y c' son iguales, respectivamente, a: k , a , b y c , ya sea cuando la concentración de sustrato es elevada (condición de saturación) o en ausencia de interacciones sustrato-activador.

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k' + a'k \left(\frac{[A]}{K'_A} \right) + b'k \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) + c'k \left(\frac{[B]}{K_B} \right) \left(\frac{[A]}{K'_{AB}} \right)}{1 + \left(\frac{[A]}{K'_A} \right) + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) + \left(\frac{[B]}{K_B} \right) \left(\frac{[A]}{K'_{AB}} \right)} \quad (9)$$

Para obtener una ecuación equivalente a la ecuación de Michaelis-Menten modificada, la ecuación (6.11) puede ser reordenada, consecutivamente, tal como se muestra en las ecuaciones (10) y (11):

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k' + b'k \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) + [A]k \left(\frac{a'}{K'_A} + \frac{c'[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)}{1 + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) + [A] \left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)} \quad (10)$$

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{\frac{k' + b'k \left(\frac{[B]}{K'_B} \right)}{\left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)} + \frac{[A]^{n_A} \left(\frac{a'k + c'k[B]}{K'_A} + \frac{c'k[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)}{\left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)}}{\frac{\left(1 + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right)}{\left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)} + [A] \frac{\left(1 + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right)}{\left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)} + [A]}{\left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)} + [A]} \quad (11)$$

Siendo (A) el activador variable, los parámetros $A_{0,5}$ y V_{\max} , se definen como:

$$A_{0,5} = K'_A \frac{\left(1 + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right)}{\left(1 + \frac{[B]K'_A}{K'_{BA}K'_A} \right)} \quad (12) \quad V_{\max} = \frac{\left(\frac{a'k + c'k[B]}{K'_A} + \frac{c'k[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)}{\left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA}K'_A} \right)} \quad (13)$$

Y siendo B el activador variable:

$$A_{0,5} = K'_B \frac{\left(1 + \left(\frac{[A]}{K'_A} \right) \right)}{\left(1 + \frac{[A]K'_B}{K'_{AB}K'_B} \right)} \quad (14) \quad V_{\max} = \frac{\left(\frac{b'k + c'k[A]}{K'_B} + \frac{c'k[A]}{K'_{AB}K'_B} \right)}{\left(\frac{1}{K'_B} + \frac{[A]}{K'_{AB}K'_B} \right)} \quad (15)$$

Si el $A_{0,5}$ de la ecuación (12) se reemplaza en el denominador y la V_{\max} de la ecuación (13) en el numerador del segundo término en la ecuación (11), se obtiene:

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k' + b'k \left(\frac{[B]}{K'_B} \right)}{\left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA} K'_A} \right) A_{0,5} + [A]} + \frac{[A]V_{\max}}{A_{0,5} + [A]} \quad (16)$$

Luego de multiplicar y dividir el numerador del primer término por el factor $\left(1 + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right)$, se obtiene la ecuación (17).

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{\left(k' + b'k \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right) \left[1 + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right]}{\left[1 + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right] \left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA} K'_A} \right) A_{0,5} + [A]} + \frac{[A]V_{\max}}{A_{0,5} + [A]} \quad (17)$$

Si llamamos v_B a la velocidad en presencia de B (a concentración cero de A), sería:

$$v_B = \frac{\left(k' + b'k \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right)}{\left[1 + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right) \right]} \quad (18)$$

Teniendo en cuenta la definición de v_B y de $A_{0,5}$ según ecuación (12), el reemplazo de ambos en la ecuación (17) conduce a:

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{v_B A_{0,5}}{A_{0,5} + [A]} + \frac{[A]V_{\max}}{A_{0,5} + [A]} \quad (19)$$

El primer término de este segundo miembro, puede escribirse como:

$$\frac{v_B A_{0,5}}{A_{0,5} + [A]} = v_B \left(1 - \frac{[A]}{A_{0,5} + [A]} \right) \quad (20)$$

Al reemplazarlo en la ecuación (19), se obtiene la ecuación (21) o, alternativamente, la ecuación (22). La concentración total de enzima no se explicita dado que las velocidades experimentales son expresadas por unidad de masa de enzima ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de enzima).

$$v = v_B + \frac{(V_{\max} - v_B)[A]}{A_{0,5} + [A]} \quad (21) \qquad v = v_A + \frac{(V_{\max} - v_A)[B]}{A_{0,5} + [B]} \quad (22)$$

Las ecuaciones (21) y (22) pueden ser reformuladas, en forma general, como la ecuación (6.12).

6.2.1.3. Correlación entre los parámetros cinéticos de las ecuaciones

Se establecieron las correlaciones entre los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis–Menten modificada, ecuación (6.12), y la más completa y compleja ecuación (6.11), indicándose el significado y la dependencia de los parámetros v_0 , V_{\max} y $A_{0,5}$ para distintas situaciones (Tabla 6.13). El caso más simple (caso I Tabla 6.13) considera la presencia de un solo activador. Para el caso de dos activadores, se contemplan dos alternativas. En una de ellas, los activadores presentan unión simultánea, sin y con posibles efectos alostéricos (casos II-a y II-b Tabla 6.13, respectivamente). Otra supone que los dos activadores son mutuamente excluyentes entre sí (caso III Tabla 6.13). Para este último caso, según el mecanismo propuesto, los complejos EBA y EBAS no existirían en concentraciones significativas y por lo tanto, $c' = 0$, $K'_{BA} \rightarrow \infty$ y $K'_{AB} \rightarrow \infty$, por lo que en este modelo de interacción la ecuación (6.11) se reduce a:

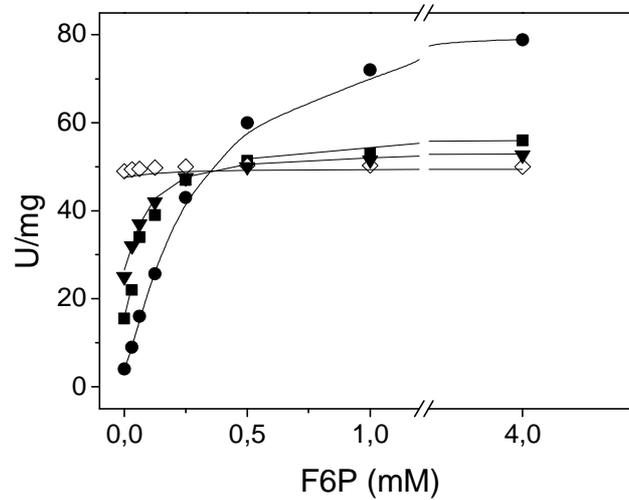
$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k' + a'k \left(\frac{[A]}{K'_A} \right) + b'k \left(\frac{[B]}{K'_B} \right)}{1 + \left(\frac{[A]}{K'_A} \right) + \left(\frac{[B]}{K'_B} \right)} \quad (6.14)$$

Tabla 6.13. Dependencia de los parámetros v_0 , V_{\max} y $A_{0,5}$ de la ecuación de Michaelis-Menten modificada en función de la concentración del activador que se mantiene fija y de los parámetros de la ecuación (6.11). Los parámetros son los correspondientes a (A) como el activador variable. Se indican los siguientes casos: Caso (I): presencia de un sólo activador que modifica a k' . Caso (II): dos activadores de unión simultánea (no mutuamente excluyentes) que modifican k' , tanto sin (caso II-a) como con (caso II-b) efectos de unión heterotrópicos activador-activador y activador-sustrato. Caso (III): dos activadores de unión mutuamente excluyentes modifican k' ($c = 0$; $K'_{AB} = K'_{BA} \rightarrow \infty$). En todos los sistemas se descartó la existencia de interacciones homotrópicas en los activadores (es decir se considera $n_H=1$ para ambos activadores).

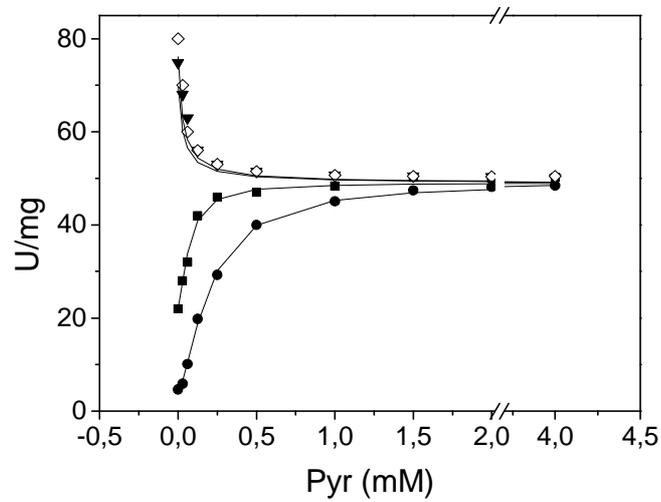
	v_0	V_{\max}	$A_{0,5}$
Caso I	k'	$a'k$	K'_A
Caso II-a	$k' + \frac{(b'k - k')[B]}{(K'_B + [B])}$	$\frac{\left(a'k + \frac{c'k[B]}{K_B}\right)}{\left(1 + \frac{[B]}{K_B}\right)}$	K_A
Caso II-b	$k' + \frac{(b'k - k')[B]}{(K'_B + [B])}$	$\frac{\left(\frac{a'k}{K'_A} + \frac{c'k[B]}{K'_{BA}K_A}\right)}{\left(\frac{1}{K'_A} + \frac{[B]}{K'_{BA}K_A}\right)}$	$K'_A \frac{\left(1 + \frac{[B]}{K'_B}\right)}{\left(1 + \frac{[B]K'_A}{K'_{BA}K_A}\right)}$
Caso III	$k' + \frac{(b'k - k')[B]}{(K'_B + [B])}$	$a'k$	$K'_A \left(1 + \frac{[B]}{K'_B}\right)$

6.2.1.4. Estudio experimental de la activación simultánea de la enzima por la F6P y el Pyr. Cálculo de los parámetros cinéticos.

El estudio experimental se basó en la determinación de la velocidad inicial en función de concentraciones crecientes de uno de los activadores, manteniendo constante la concentración del otro activador y demás condiciones. Las respuestas a la activación por parte de la F6P y del Pyr sobre la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* se ven mutuamente afectadas, tal como se ilustra en las curvas de saturación en la Figura 6.28.



(A)



(B)

Figura 6.28. Gráficos de saturación según velocidades experimentales y teóricas de activación. (A). Curvas de activación por F6P en presencia de Pyr: 0 mM (●); 0,1 mM (■); 0,2 mM (▼) y 2 mM (◇). (B). Curvas de activación por Pyr en presencia de F6P: 0 mM (●); 0,1 mM (■); 1 mM (▼) y 2 mM (◇). Los símbolos representan los datos experimentales. Las líneas representan las velocidades calculadas según la ecuación (6.11), reemplazando los parámetros por los correspondientes valores obtenidos (Tabla 6.16).

El cálculo de los parámetros se realizó según dos aproximaciones distintas, una utilizando la ecuación de Michaelis-Menten modificada y otra mediante la más completa ecuación (6.11).

Mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten modificada utilizando el programa Origin 7.0, se determinaron los parámetros cinéticos para la F6P y para el Pyr que se muestran en la Tabla 6.14 y Tabla 6.15.

Tabla 6.14. Parámetros cinéticos para la F6P calculados a partir del ajuste de datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten modificada. En la primera columna se indican las concentraciones de activador que se mantienen fijos. Los parámetros son la media de al menos tres conjuntos de datos independientes.

Parámetros para F6P		
Pyr (mM)	V_{\max} (U/mg)	$A_{0,5}$ (mM)
0	$84,8 \pm 2,0$	$0,260 \pm 0,031$
0,1	$56,8 \pm 0,8$	$0,087 \pm 0,012$
0,2	$53,3 \pm 0,3$	$0,078 \pm 0,011$
2,0	$50,3 \pm 0,1$	$0,068 \pm 0,020$

Tabla 6.15. Parámetros cinéticos para el Pyr calculados a partir del ajuste de datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten modificada. En la primera columna se indican las concentraciones de activador que se mantienen fijos. Los parámetros son la media de al menos tres conjuntos de datos independientes.

Parámetros para Pyr		
F6P (mM)	V_{\max} (U/mg)	$A_{0,5}$ (mM)
0,0	$52,0 \pm 0,9$	$0,200 \pm 0,022$
0,1	$51,1 \pm 0,8$	$0,077 \pm 0,010$
1,0	$49,2 \pm 0,5$	$0,058 \pm 0,007$
2,0	$49,5 \pm 0,6$	$0,039 \pm 0,006$

De las Figuras 6.28-A y 6.28-B y del ajuste de los datos a esta ecuación, podemos afirmar que, por separado, F6P y Pyr activan la enzima aproximadamente 22 y 14 veces respectivamente, en relación a una actividad enzimática de 3,61 U/mg en ausencia de ambos, y que muestran similares valores de $A_{0,5}$ (cerca de 0,25 mM). Se observa que la afinidad aparente de la enzima para un activador es mayor cuando ambos efectores interactúan simultáneamente, en comparación con la que exhibe cada compuesto actuando de forma individual (Tablas 6.14 y 6.15). Curiosamente, la presencia de concentraciones saturantes de Pyr restringió la activación ejercida por F6P, ya que en tal condición, la V_{\max} (~50 U/mg) alcanzada por la enzima está limitada al valor que se alcanza en presencia del cetó-ácido por sí solo (que es inferior a la que se alcanza con F6P a altas concentraciones y bajos niveles de Pyr). En concordancia con esto, en la Figura 6.28-B se observa que en presencia de una concentración constante y saturante de F6P (5 o 10 veces por encima del $A_{0,5}$), las curvas de saturación mostraron inhibición en lugar de activación por Pyr; y la enzima nuevamente alcanzó una actividad aproximada de 50 U/mg. Queda claro, a partir de esta figura, la dominancia del Pyr en la determinación de la velocidad máxima, y que a pesar del hecho de que la F6P produce mayores niveles de activación, este efecto es observable solo a bajas concentraciones de Pyr (o en su ausencia).

Por otro lado, la ecuación (6.11) permitió el cálculo de los parámetros $a'k$, $b'k$, $c'k$, K'_A , K'_B , K_A y K'_{BA} , mediante un ajuste no lineal de los datos experimentales, utilizándose una rutina del programa MATLAB Editor 7.0 (The MathWorks) generada especialmente para este modelo (gentileza del Dr. Gabriel Siano, departamento de Química Analítica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL). El programa realizó 1000 iteraciones utilizando el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Los valores calculados fueron coherentes con los correspondientes obtenidos mediante la ecuación de Michaelis-Menten modificada y el ajuste de las velocidades teóricas a las experimentales fue aceptable; no obstante, los intervalos de confianza con una $p < 0,05$ para los parámetros K_A y K'_{BA} (o K_B y K'_{AB} en la ecuación 9) fueron demasiado amplios. Esto es debido a que en la ecuación (6.11), tanto en el numerador como en el denominador, las constantes K_A y K'_{BA} (o K_B y K'_{AB}) aparecen relacionadas mediante un producto, de manera que si se introducen ambas como incógnitas habría infinitos pares de valores que podrían satisfacer la ecuación. Se estimó entonces, el valor de K'_A y de K'_B utilizando las ecuaciones (5) y (7). Para su cálculo se consideran

los valores de $K_S = 0,42 (\pm 0,05)$ mM, $K_{SA} = 0,24 (\pm 0,02)$ mM y $K_{SB} = 0,29 (\pm 0,03)$ mM con 1 mM de ATP [según (Uttaro y col., 1998) y en concordancia con nuestros resultados mostrados más adelante] después de lo cual $K_A = K'_A/0,65$ y $K_B = K'_B/0,76$. La sustitución de cada constante en la ecuación completa respectiva, permitió determinar K'_{BA} y K'_{AB} . Los resultados hallados para los parámetros cinéticos se detallan en la Tabla 6.16.

Tabla 6.16. Parámetros calculados con el ajuste de datos, utilizando el programa MatLab. Los intervalos de confianza ($p < 0,05$) se indican entre corchetes.

Constantes de disociación (mM)	Constantes cinéticas (U/mg)
$K'_A = 0,28 [0,26-0,31]$	$a'k = 88,4 [86,4-90,4]$
$K'_B = 0,24 [0,21-0,28]$	$b'k = 53,6 [52,0-55,3]$
$K'_{AB} = 0,037 [0,028-0,047]$	$c'k = 49,0 [48,5-50,1]$
$K'_{BA} = 0,027 [0,0216-0,0332]$	

Comparando las Tablas 6.14 y 6.15 con la Tabla 6.16 podemos observar que los parámetros cinéticos V_{max} y $A_{0,5}$ determinados en ausencia de otro activador, son respectivamente equivalentes a los parámetros correspondientes de la ecuación (6.11), $a'k$, K'_A (para F6P) y $b'k$, K'_B (para Pyr). Además, el valor de $c'k$ se ajusta al valor al que tiende la velocidad máxima en presencia de ambos activadores en concentraciones saturantes.

Introduciendo los parámetros de la Tabla 6.16 en la ecuación (6.11) se obtuvieron los valores teóricos de velocidades a concentraciones crecientes de un activador, en ausencia y en presencia de distintas concentraciones del segundo activador. Con los mismos se generó una gráfica continua que luego se comparó con los datos experimentales, comprobándose que las velocidades teóricas calculadas, en un amplio rango de concentraciones, se corresponden con los puntos obtenidos experimentalmente (Figura 6.28-A y 6.28-B),

corroborando que esta ecuación responde a los datos experimentales haciendo factible el modelo planteado.

Además, con las velocidades teóricas calculadas con la ecuación (6.11), se construyó una figura tridimensional y se observó que al graficar los datos experimentales sobre la misma, mostraban una correcta superposición (Figura 6.29-A). En contraposición al caso anterior, en la Figura 6.29-B se muestra que el ajuste de los datos experimentales a la figura tridimensional obtenida con la ecuación (6.14), correspondiente a un modelo mutuamente excluyente ($c' = 0$, $K'_{BA} \rightarrow \infty$), fue marcadamente pobre. Aún cuando en esta última condición las constantes cinéticas K'_A , K'_B , $a'k$ y $b'k$ fueron similares a aquellas obtenidas para el caso de unión simultánea (datos no mostrados), las velocidades teóricas fueron discordantes con los datos experimentales, particularmente a altas concentraciones de F6P.

Comparando las ecuaciones (6.11) y (6.12), la disminución en los valores de $A_{0,5}$ en presencia de ambos activadores (Tablas 6.14 y 6.15) está de acuerdo con las magnitudes relativas de las constantes de disociación aparente enzima-activador calculadas (Tabla 6.16), siendo $K'_{BA} < K'_B$, y $K'_{AB} < K'_A$. Teniendo en cuenta la equivalencia de los parámetros, la disminución en los valores obtenidos de $A_{0,5}$, confirmaría que los activadores se unen de manera simultánea, no mutuamente excluyente, con interacciones heterotrópicas activador-activador positivas entre ellos (casoII-b de Tabla 6.13). Estas características, indicativas de una unión no mutuamente excluyente de F6P y de Pyr a la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* apoyan al mecanismo propuesto en la Figura 6.26 para la interacción de la enzima con el sustrato y los activadores.

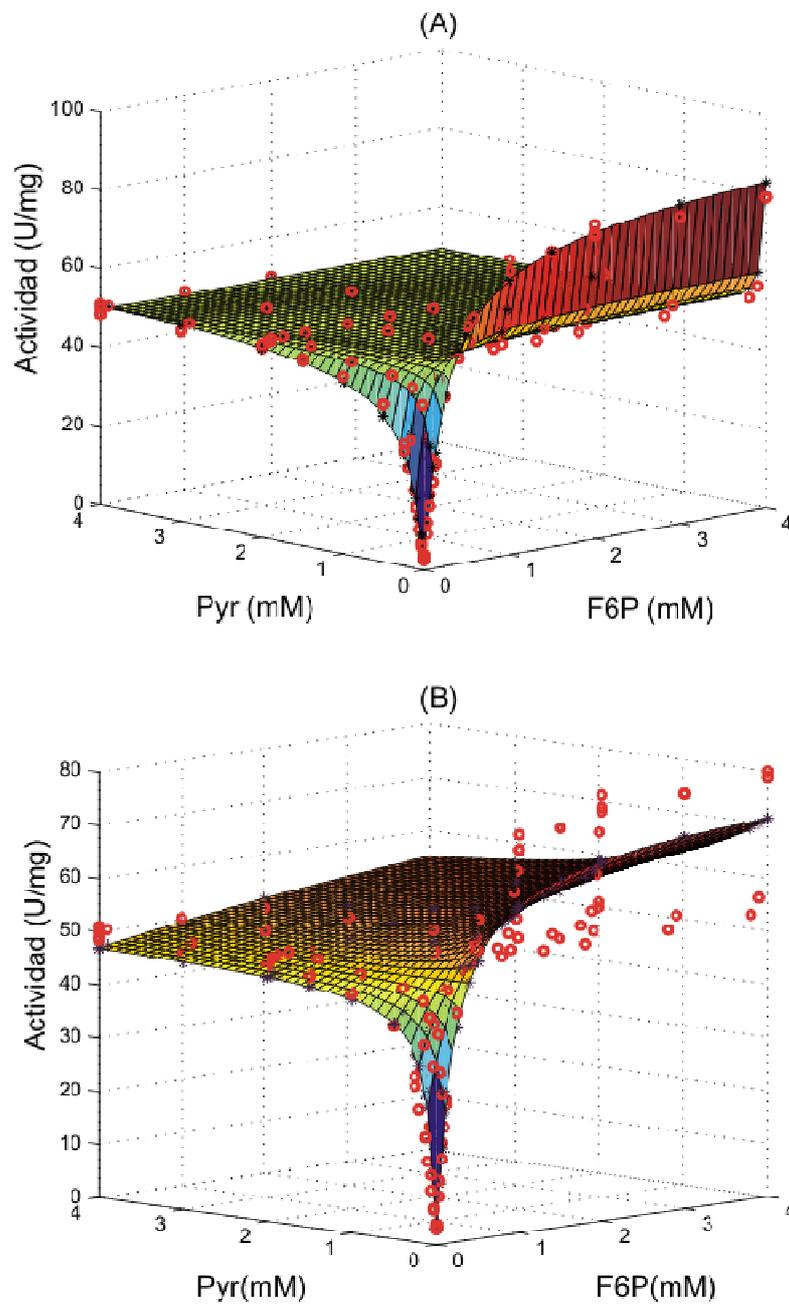


Figura 6.29. Diagrama tridimensional de las velocidades de reacción teóricas en función de las concentraciones de ambos activadores. (A): corresponde a unión simultánea, no competitiva y (B) unión competitiva (mutuamente excluyente); las velocidades teóricas en (A) y (B) se calcularon con la ecuación (6.11) o ecuación (6.14), respectivamente. Símbolos: los círculos rojos corresponden a los datos experimentales y los asteriscos azules a los valores teóricos correspondientes. Las figuras fueron generadas con el programa MatLAB.

6.2.1.1. Discusión

La activación simultánea de la ADP-Glc PPasa por F6P y Pyr presenta dos características: efectos alostéricos positivos mutuos en la etapa de unión y efectos no aditivos en la etapa catalítica. Si bien el comportamiento del Pyr en exceso muestra una correspondencia con un comportamiento aparentemente competitivo o mutuamente excluyente (V_{\max} tiende a $V_{\max \text{ Pyr}}$), esto no se cumplió cuando la concentración de F6P fue superior a la de Pyr (ya que V_{\max} tiende igualmente a $V_{\max \text{ Pyr}}$). Por lo tanto, ambas características, el efecto positivo en la unión (inverso a lo esperado si fueran mutuamente excluyentes) y la incapacidad de llegar a la velocidad máxima correspondiente a la F6P cuando este activador está en exceso respecto del Pyr, sugieren fuertemente que no son mutuamente excluyentes y por ende se unirían en forma simultánea. Estos resultados apoyan los estudios previos que sugieren que ambos activadores no se unen al mismo sitio (Gomez-Casati y col., 2001).

Las enzimas alostéricas, más aún las tetraméricas como la que es objeto de este estudio, son sistemas complejos, en los que la diversidad de modelos que se podrían plantear es numerosa. Por ese motivo, resulta difícil caracterizar en forma inequívoca el efecto acoplado entre ambos activadores, sobre la base del valor que adopta la velocidad límite en presencia de concentraciones saturantes de ambos. No obstante siguiendo el razonamiento de Reinhart (Reinhart, 2004), si se lo analiza desde un punto de vista termodinámico, en principio el efecto no es aditivo. O sea, la velocidad máxima en presencia de ambos efectores no se corresponde con una disminución aditiva de las energías de activación y por ende con un aumento de la velocidad proporcional al producto de las activaciones individuales, sino que es mucho menor que ese valor. Hasta el momento, no se conocen trabajos que le asignen un significado o denominación al efecto acoplado entre dos activadores cuando esa velocidad es menor que la esperada para efectos sumatorios, como es nuestro caso. Podría decirse que el efecto es o parcialmente aditivo o antagónico. Sin embargo, resulta notable que el valor de la velocidad límite que se alcanza en presencia de ambos coincida con la velocidad máxima del Pyr solo. Esto sugiere un fenómeno de “dominancia” de la señal alostérica inducida por el Pyr; a pesar de ser menos favorable para la catálisis que la promovida por la F6P.

Si bien no se pueden identificar en detalle los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno, como una primera aproximación y considerando publicaciones

relacionadas con los mecanismos moleculares de alosterismo (Traut, 2008; Tsai y col., 2008), la Figura 6.30 muestra un mecanismo posible del comportamiento experimental observado entre ambos activadores.

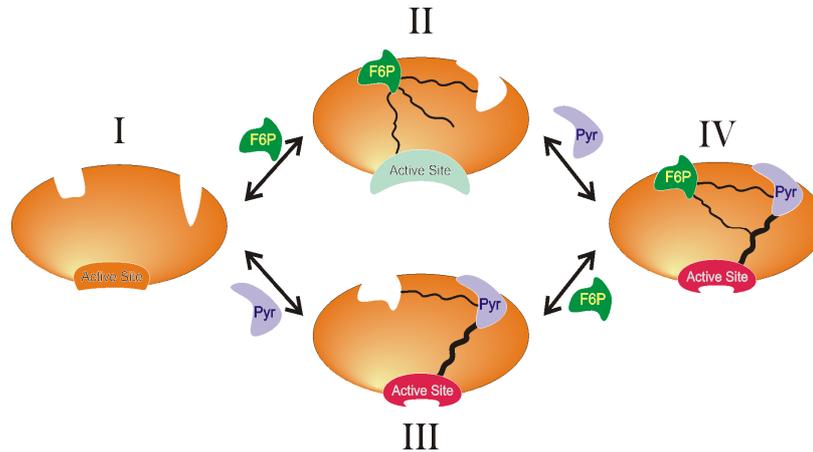


Figura 6.30. Modelo hipotético que describe los estados dinámico-conformacionales de los complejos entre la ADP-Glc PPasa y los activadores Pyr y F6P. I, II, III y IV representan, respectivamente, a los complejos: (ES), (ES-F6P), (ES-Pyr) y (ES-F6P-Pyr). Los efectos positivos en la unión conducen a una selección-modificación recíproca de los sitios de unión de activadores, por tanto, en II, III y IV se representan con formas similares entre sí y diferentes a las de I. Cada activador utiliza diferentes vías de propagación del efecto producido (representado por las líneas sinuosas) entre el sitio de unión alostérico y el sitio activo, con diferentes efectos finales sobre la catálisis: el estado dinámico-conformacional del sitio activo en I es diferente al de II, III y IV; en II (inducido por F6P) es diferente de III (inducido por Pyr) y de IV; mientras que en IV es el mismo que en III. En presencia de Pyr, la vía específica de F6P se interrumpe, y se establece una nueva en relación con la vía Pyr-específica.

En resumen, se puede suponer que los dos activadores, aunque se unen a diferentes sitios, seleccionan estados conformacionales similares, con mayor afinidad para ambos. Además, utilizan diferentes vías de transmisión o caminos químicos de la señal alostérica al sitio activo y aunque ambas son señales de activación, el efecto resultante no es exactamente el mismo. Cuando ambos activadores están unidos se prefiere la vía del Pyr, solo o en conexión con la vía de la F6P, siendo el primero el dominante para ejercer la activación.

6.2.2. Caracterización de la activación en base a resultados obtenidos con mutaciones sitio dirigidas.

6.2.2.1. Estudio de las mutantes Q67A y W106A de la enzima de *A. tumefaciens*, homólogas a las Q74A y W113A de la enzima de *E. coli*.

A partir del estudio de las mutantes Q74A y W113A de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* (Sección 6.1.1) se propuso un mecanismo probable de propagación de la señal de activación de la FBP (Figuroa y col., 2011). Se decidió estudiar las mutantes homólogas para evaluar si la enzima de *A. tumefaciens* posee un mecanismo de activación semejante. Del alineamiento de secuencias se observó que los residuos homólogos a Gln⁷⁴ y Trp¹¹³ de la enzima de *E. coli* eran Gln⁶⁷ y Trp¹⁰⁶, respectivamente (Figura 6.3). Se procedió entonces a expresar las proteínas mutantes Q67A y W106A en células de *E. coli* BL21(DE3), transformadas con los plásmidos correspondientes, [pETAT/Q67A] y [pETAT/W106A]. Las mutantes obtenidas se purificaron en forma similar a la enzima salvaje, realizando, consecutivamente, cromatografías de intercambio iónico (DEAE-*Sepharose*) seguida de una cromatografía de pseudoafinidad en 2'5' ADP-*Sepharose*. El grado de pureza alcanzado fue, en ambos casos, superior al 90 %, según las imágenes electroforéticas de SDS-PAGE. La actividad enzimática se determinó en la dirección de síntesis de ADP-Glc por el método colorimétrico del verde de malaquita (sección 5.19.1.1). Las concentraciones de sustrato utilizadas en los ensayos fueron 7,0 mM de MgCl₂, 1,0 mM de ATP y 1,0 mM de Glc1P. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Hill modificada, la ecuación (5.2).

La caracterización cinética de las enzimas mutantes Q67A y W106A mostró que, en ausencia de activadores, presentaban actividades enzimáticas comparables a las de la enzima salvaje, pero ambas habían perdido la capacidad de ser activadas por F6P (Tabla 6.17). Este comportamiento es semejante al observado en las mutantes homólogas de la enzima de *E. coli*. Cuando se analizó el efecto del Pyr, la mutante W106A mostró un nivel de activación similar al de la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens*, aunque el $A_{0,5}$ resultó ser 10 veces mayor. Sin embargo, la mutante Q67A resultó ser activada sólo 2,5 veces, con una afinidad algo mayor hacia el efector que la enzima salvaje (Tabla 6.17 y Figura 6.31).

Tabla 6.17. Caracterización cinética de la enzima ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* salvaje y mutantes Q67A y W106A con respecto a los activadores F6P y Pyr. La determinación de actividad se realizó en sentido de síntesis, método del Verde de Malaquita, nd: valor no determinado debido a la escasa o nula activación.

	sin activador	Con F6P			Con Pyr		
enzima	v_0 (U/mg)	V_{max} (U/mg)	Activación (veces)	$A_{0,5}$ (mM) (n_H)	V_{max} (U/mg)	Activación (veces)	$A_{0,5}$ (mM) (n_H)
salvaje	3,7	82,0	22	0,24±0,03 (1,3)	51,1	14	0,20±0,02 (1,4)
Q67A	3,3	4,3	1,3	nd	8,2	2,5	0,11±0,01 (1,1)
W106A	2,9	2,2	-	nd	43,3	15	1,58±0,12 (1,0)

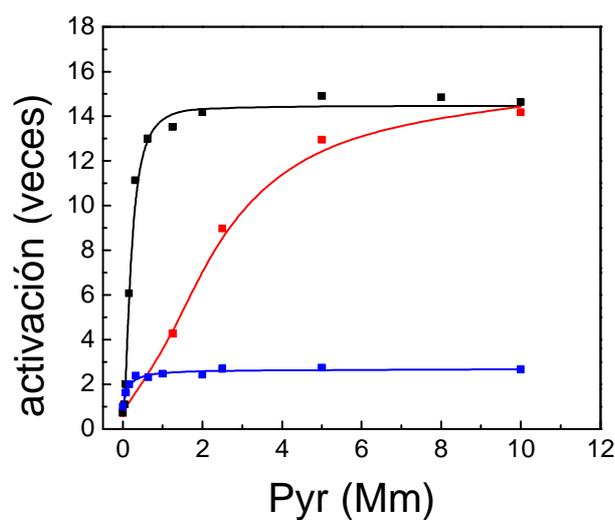


Figura 6.31. Respuesta diferencial al Pyr de las enzimas ADP-Glc PPasa salvaje y mutantes Q67A y W106A de *A. tumefaciens*. Referencias: enzima salvaje (■) mutante W106A (■) y mutante Q67A (■).

A los fines de analizar el efecto de las mutaciones en la afinidad aparente por los sustratos y a su vez caracterizar el efecto del Pyr sobre la misma, se determinaron los $S_{0,5}$ de los sustratos para ambas mutantes, en presencia y ausencia del activador. En la Tabla 6.18 se observa que los valores de $S_{0,5}$ y n_H para ATP, Glc1P y Mg^{2+} en ausencia de activador para

ambas mutantes no difieren significativamente respecto de los obtenidos para la enzima salvaje. Sólo en la mutante Q67A se observa una ligera modificación de la afinidad aparente hacia los sustratos, en particular aumenta el $S_{0,5}$ del ATP. Era de esperarse una modificación mayor, ya que cuando se modeló este sustrato en la estructura de la enzima de *A. tumefaciens*, la Gln⁶⁷ se encontraría a sólo 4 Å del ATP (Cupp-Vickery y col., 2008). O sea que a pesar de su proximidad, ese residuo no cumpliría una función esencial en la fijación del ATP. Podríamos afirmar entonces que, de manera semejante a lo que ocurre con la enzima salvaje de *A. tumefaciens* y con las enzimas mutantes homólogas de *E. coli*, la presencia de activador tampoco induce modificaciones significativas en los parámetros de los sustratos. Se observa también que, al igual que para la enzima salvaje, el efecto principal del Pyr en las enzimas mutantes, principalmente en la W106A que es la más activada, se ejerce sobre la etapa catalítica ya que aumenta la V_{max} sin modificación importante de la afinidad aparente por los sustratos.

Tabla 6.18. Parámetros cinéticos correspondientes a los sustratos y cofactor esencial de la ADP-Glc PPasa salvaje y mutantes W106A y Q74A. Método Verde de Malaquita, sentido de síntesis, concentración de Pyr 2 mM.

	Q67A		W106A		Enzima salvaje	
	$S_{0,5}$ (mM)	nH	$S_{0,5}$ (mM)	nH	$S_{0,5}$ (mM)	nH
ATP	0,74±0,01	1,2	0,22±0,01	1,5	0,39±0,03	1,5
ATP+Pyr	0,54±0,03	1,2	0,21±0,02	1,9	0,26±0,05	1,1
Glc1P	0,21±0,02	0,9	0,09±0,01	1,6	0,15±0,02	1,3
Glc1P+Pyr	0,09±0,01	1,3	0,10 ±0,01	1,9	0,08±0,01	1,3
Mg ²⁺	3,12±0,21	1,5	2,90±0,18	2,1	2,40±0,39	3,0
Mg ²⁺ +Pyr	2,51±0,24	2,4	3,10 ±0,30	3,6	2,10±0,22	2,3

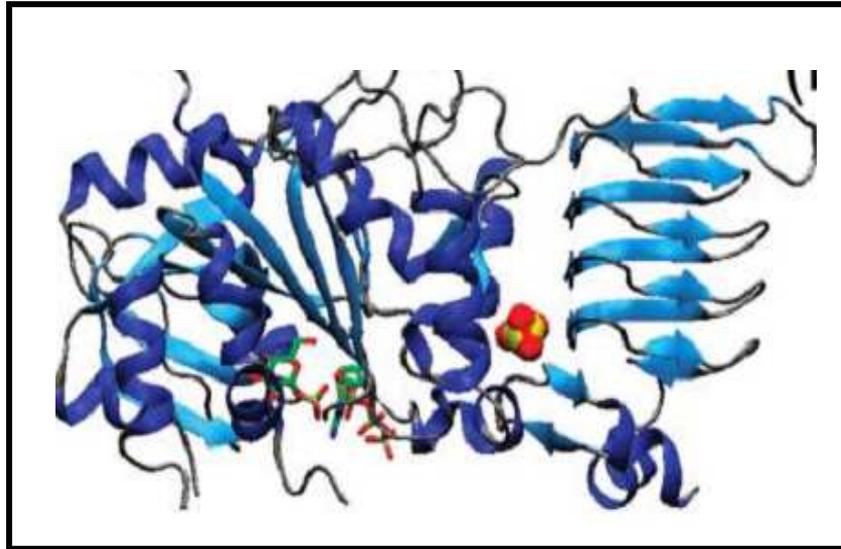
6.2.2.2. Estudio de la mutantes D378A de *A. tumefaciens* y su homólogo en *E. coli*, la D385A.

En las dos estructuras tridimensionales obtenidas para ADP-Glc PPasas, los investigadores (Jin y col., 2005; Cupp-Vickery y col., 2008) concuerdan en que la región comprendida entre los dominios N- y C-terminal es parte del sitio de unión de los activadores respectivos. Si se superponen ambas estructuras, en el sitio alostérico propuesto para *A. tumefaciens* se puede observar un sulfato ubicado en el surco comprendido entre ambos dominios, que se corresponde con un sulfato de la enzima de tubérculo de papa cristalizada. Los investigadores que cristalizaron la enzima de *A. tumefaciens* (Cupp-Vickery y col., 2008) modelaron la F6P en este sitio (Figura 6.32) y proponen que el parche de carga positiva conformado por los residuos básicos presentes en esta zona, atraen la carga negativa del grupo fosfato de la F6P, además de proporcionar probables enlaces de hidrógeno con los oxígenos del azúcar. Puede observarse en la figura, que sólo dos restos ácidos están cerca de este “bolsillo” asociado a la F6P, siendo uno de ellos el Asp³⁷⁸. Este residuo se encuentra muy conservado en diversas ADP-Glc PPasas (Cupp-Vickery y col., 2008) correspondiendo al Asp³⁸⁵ en *E. coli* y a los Asp⁴⁰³ y Asp⁴¹³ en la subunidades pequeña y grande de *S. tuberosum*, respectivamente. Además, en trabajos anteriores, se indicó que el Asp⁴¹³ es un residuo importante para la activación por 3PGA (Greene y col., 1996). Para conocer más sobre la importancia de esta región en la regulación alostérica, se realizó la mutagénesis sitio dirigida de este Asp en las enzimas de *A. tumefaciens* y *E. coli*, obteniéndose las mutantes D378A y D385A respectivamente.

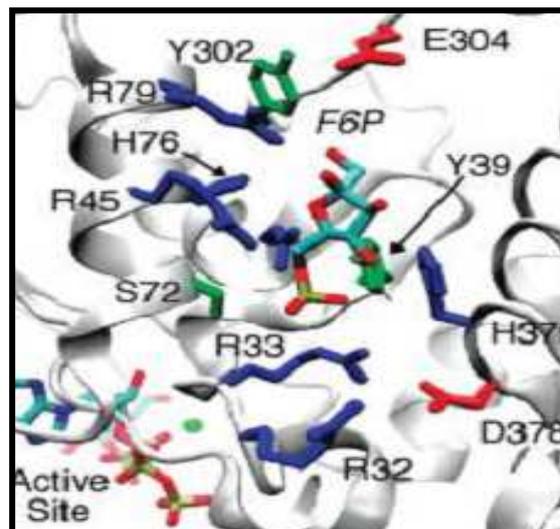
Los plásmidos mutantes de la enzima de *A. tumefaciens* [pETAT/D378A] y de *E. coli* [pETEC/D385A] se obtuvieron mediante la técnica de *QuikChange* (Sección 5.6). Las enzimas se expresaron en células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos mencionados y se purificaron mediante cromatografías consecutivas de DEAE-*Sepharose* y Green A (Sección 5.14).

Ambas mutantes se caracterizaron cinéticamente con respecto a los activadores principales, obteniéndose los resultados mostrados en las Figuras 6.33-A y 6.33-B, los datos se ajustaron a la ecuación 5.1 y los resultados se muestran en las Tablas 6.19 y 6.20. No se observaron cambios significativos en la actividad enzimática cuando se realizaron ensayos cruzados, es decir, la mutante de *A. tumefaciens* D378A con el activador FBP y la mutante de *E. coli* D385A con los activadores F6P y Pyr (resultados no mostrados), indicando que

estas mutaciones no provocan un cambio observable en la especificidad hacia los activadores respectivos ensayados.



(A)



(B)

Figura 6.32. Sitio probable de unión del activador F6P a la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* (A): modelo del monómero cristalizado de la enzima. Se muestra la cercanía entre el sitio activo, con los sustratos ATP y Glc1P que se modelaron a partir de la estructura de *S. tuberosum* y la zona comprendida entre los dominios N- y C-terminales donde se une el anión sulfato. (B): detalle de la zona del surco entre ambos dominios. Se muestran las cadenas laterales de los residuos que se encuentran cercanos al sulfato y por consiguiente, cercanos a la molécula de F6P modelada. Entre éstos se observan el Asp³⁷⁸ y la Arg³³. Las cadenas laterales están coloreadas según el residuo sea básico (color azul) o ácido (rojo). En el ángulo inferior izquierdo se observa parte de la molécula de ATP unida al sitio catalítico. Para (A) y (B): los átomos se colorean según su tipo: oxígeno: rojo, azufre: amarillo, carbono: verde en (A) y celeste en (B), nitrógeno: azul, fósforo: marrón claro. Figura obtenida de (Cupp-Vickery y col., 2008).

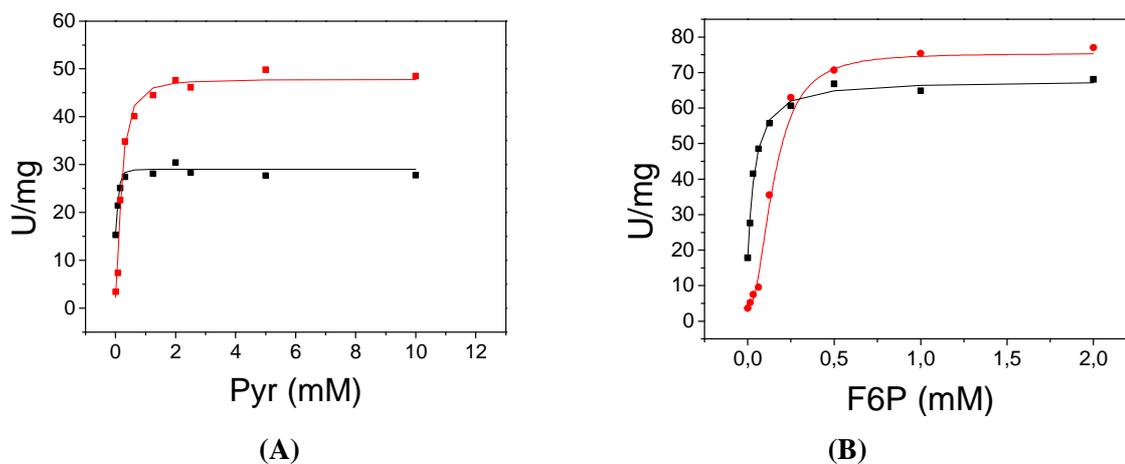


Figura 6.33. Respuesta de la enzima salvaje de *A. tumefaciens* (■) y mutante D378A (■) a la activación por Pyr (A) y por F6P (B). Sentido de síntesis de ADP-Glc, Las reacciones enzimáticas se realizaron según el Ensayo A, método verde de malaquita (Sección 5.19.1.1).

Tabla 6.19. Resultados obtenidos para la enzima ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* salvaje y mutante D378A en relación a los activadores F6P y Pyr.

Enzima	Sin efector	Con F6P			Con Pyr		
	v_0	V_{max}	Activación (veces)	$A_{0,5}$ (mM) (n_H)	V_{max}	Activación (veces)	$A_{0,5}$ (mM) (n_H)
<i>Atu</i> salvaje	3,7	82,0	22	0,24±0,03 (1,3)	51,1	14	0,20±0,02 (1,4)
D378A	15,3	67,7	4	0,04±0,02 (1,1)	29,0	2	0,09±0,05 (2,2)

Tabla 6.20. Resultados obtenidos para la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli* salvaje y mutante D385A en relación al activador FBP. Las reacciones enzimáticas se realizaron en sentido de síntesis.

Enzima	Sin efector	Con FBP		
	v_0	V_{max}	Activación (veces)	$A_{0,5}$ (mM) (n_H)
<i>Eco</i> salvaje	1,4	63,1	44	0,24 ±0,03 (2,0)
D385A	0,2	11,0	55	1,43±0,22 (2,3)

En ausencia de activadores las mutaciones afectan de forma diferente y opuesta a cada enzima ya que mientras la mutante de *A. tumefaciens* presenta mayor actividad que la enzima salvaje, es decir se encuentra preactivada (Figura 6.33 y Tabla 6.19), la mutante de *E. coli*, muestra una actividad menor que la enzima nativa correspondiente (Tabla 6.20). Por otro lado, ambas mutantes siguen respondiendo a sus activadores: la D378A alcanza velocidades cercanas al 80 y 60 % de las máximas alcanzadas por la enzima salvaje en presencia de F6P y Pyr respectivamente, mientras que la D385A, a pesar de activarse un número de veces semejante a la enzima nativa, llega aproximadamente al 20% de la velocidad límite que alcanza la ADP-Glc PPasa de *E. coli* en presencia de FBP.

6.2.2.1. Discusión:

De los resultados obtenidos con las mutantes Q67A y W106A podemos inferir que, de manera análoga a lo que sucede en la activación por la FBP para la enzima de *E. coli*, tanto la Gln⁶⁷ como el Trp¹⁰⁶ estarían involucrados en la transmisión de la señal inducida por la F6P en la enzima de *A. tumefaciens* ya que las mutaciones de esos residuos la tornan prácticamente insensible a ese activador. También la activación por Pyr se ve afectada negativamente por esas mutaciones, pero de manera diferente según sea la Gln⁶⁷ o el Trp¹⁰⁶ el residuo mutado. Si es la Gln⁶⁷, la activación por Pyr se afecta en forma semejante a la activación por F6P, ya que aunque en la mutante Q67A se observa activación, ésta es muy inferior a la que presenta la enzima salvaje. En cambio la mutante W106A llega a una activación semejante a la de la enzima salvaje, pero es necesaria una concentración mucho mayor de activador para lograrla.

Tal como se dijo anteriormente, la F6P y el Pyr se unen a distintos sitios, y esta repuesta diferencial de las enzimas mutantes se debería entonces a diferencias en los mecanismos de activación entre uno y otro efector, que utilizarían diferentes vías de transmisión de la señal alostérica al sitio activo (Sección 6.2.1.1).

Estos resultados sugieren mecanismos comunes, aunque no idénticos en la activación de las ADP-Glc PPasas de distinto origen y por distintos activadores. Respecto de las diferencias observadas entre los activadores, podría pensarse que un factor importante sería el número de átomos de carbono del activador. De este modo, las activaciones por FBP y

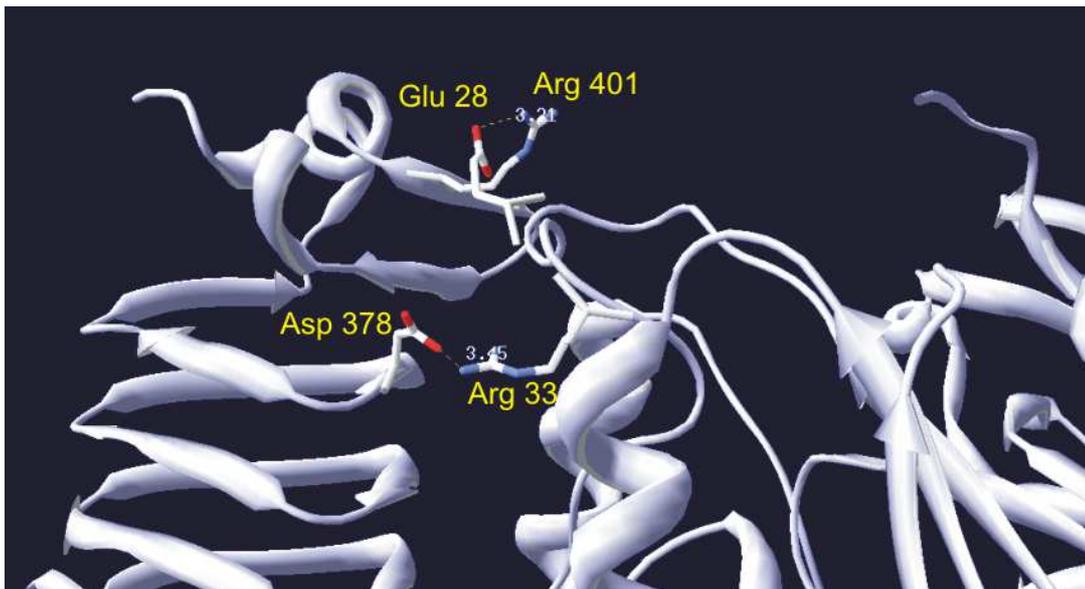
F6P, ambas de 6 átomos de carbono, se ven afectadas drásticamente y de idéntica manera por ambas mutaciones en las enzimas de *E. coli* y *A. tumefaciens* respectivamente; en cambio la activación por Pyr, de 3 carbonos, se ve menos afectada.

Para intentar comprender el origen estructural de los resultados producidos por las mutaciones de los Asp³⁷⁸ y Asp³⁸⁵ en las enzimas de *A. tumefaciens* y *E. coli*, es interesante destacar que en las estructuras tridimensionales de ambas, estos Asp se encuentran formando puentes salinos con las Arg³³ y Arg⁴¹, respectivamente, pertenecientes éstas al dominio N-terminal. En la enzima de *A. tumefaciens*, se puede concluir que el reemplazo del Asp³⁷⁸ por una Ala, interrumpe el puente salino con la Arg³³ y esto produce en esa enzima un efecto semejante al del activador. Es interesante destacar que los resultados obtenidos con esta mutante complementan y reafirman los de un trabajo anterior (Gomez-Casati y col., 2001) en el que se observó que la mutante R33A presenta mayor actividad enzimática que la ADP-Glc PPasa salvaje. Ambos resultados corroboran que la interrupción de ese puente salino es importante para la activación, ya que la mutación de cualquiera de estos dos residuos que forman el par iónico (Asp³⁷⁸ o Arg³³) produce un efecto activador similar. A su vez la ruptura de este puente por ausencia del Asp aumenta la afinidad aparente por ambos activadores ya que en la mutante D378A disminuyen los $A_{0,5}$ de ambos activadores. Lo mismo se observó para el $A_{0,5}$ del Pyr en la mutante R33A que en presencia de este activador, llega a una actividad casi idéntica a la de la enzima salvaje (Gomez-Casati y col., 2001). No obstante, de acuerdo a estos autores, la mutante R33A no se activa por F6P. Esto podría deberse a que en ausencia de este residuo no se produce la activación aunque la F6P se una a la enzima, o bien a que el activador no se una. Analizando el conjunto de estos resultados, la hipótesis más probable es que la F6P no se une en ausencia de la Arg³³, que a su vez permite concluir que este residuo es esencial para la unión de este activador, en ese sitio, pero no para la unión del Pyr. El sitio de unión de la F6P estaría tal como proponen los autores (Cupp-Vickery y col., 2008) muy próximo a estos residuos y en cambio el del Pyr, aún cuando se ubicaría también en el surco entre ambos dominios comprometería otros residuos.

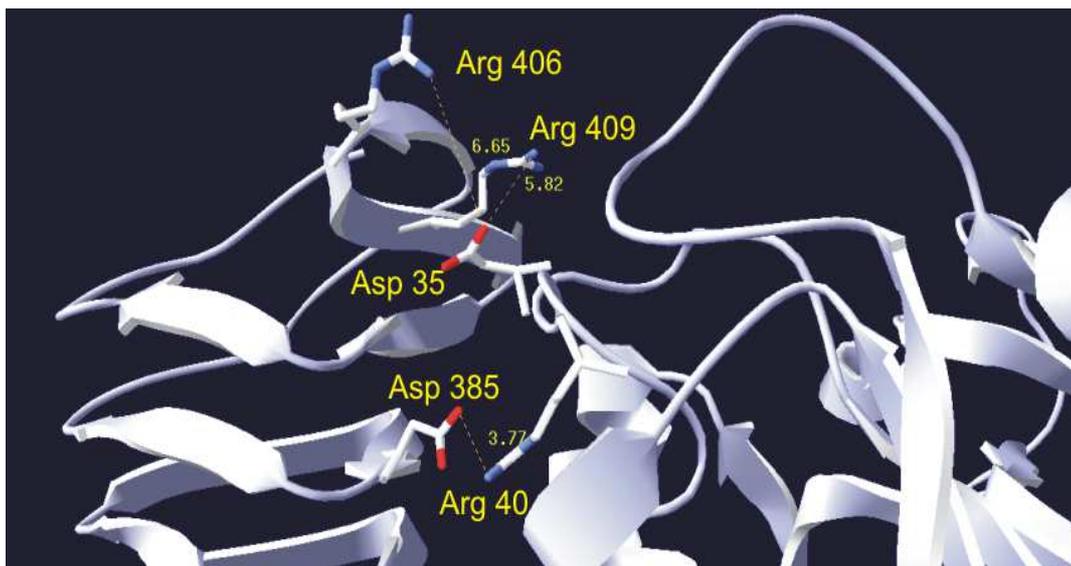
La enzima mutante de *E. coli*, en cambio, resulta en una estructura con menor actividad enzimática que la enzima salvaje, que muestra una elevada respuesta hacia la FBP aunque una menor afinidad hacia el activador y que no logra alcanzar la misma actividad de la

enzima salvaje en presencia de altas concentraciones del activador (Tabla 6.20). O sea que en este caso, la ruptura del puente salino no solo dificultaría la unión de la FBP sino que produciría un cambio conformacional desfavorable en el sitio activo. Las evidencias experimentales indican que el residuo al que se uniría la FBP en la enzima de *E. coli* es la Lys³⁹ (Gardiol y Preiss, 1990). O sea que en este caso el residuo implicado en el puente con el Asp³⁸⁵, la Arg⁴⁰, no sería directamente el residuo implicado en la unión del activador aunque sí contiguo a éste. La interacción entre ambos dominios se vería modificada en esa zona por el activador, pero las consecuencias que provocaría la ruptura de ese puente son diferentes. Si se analizan las estructuras tridimensionales superpuestas, se observa que en la enzima de *A. tumefaciens*, el Glu²⁸ se encuentra a una distancia de 3,21 Å de la Arg⁴⁰¹, lo que permite asumir que entre ellos se formaría un puente salino. Esto lleva a pensar que, además del D378-R33, habría un segundo puente salino en esta zona (Figura 6.34-A). El residuo homólogo al Glu²⁸ en *E. coli* es el Asp³⁵ y no formaría puente salino con residuos del dominio C-terminal ya que los residuos básicos más cercanos son la Arg⁴⁰⁹, que se encuentra a 5,82 Å y la Arg⁴⁰⁶ que se encuentra a 6,65 Å (Figura 6.34-B). Se propone entonces, que en el caso de la enzima de *E. coli*, la ruptura del puente D385-R40 podría inducir una apertura excesiva del surco entre ambos dominios, lo que sería desfavorable para la fijación del activador y conformación del sitio activo. Esta apertura estaría atenuada en *A. tumefaciens* ya que el otro puente, el E28-R401, mantendría la interacción.

Los resultados muestran una vez más que pequeñas diferencias en la estructura primaria de las enzimas, aún en residuos no involucrados directamente en la unión y/o catálisis, cambian el comportamiento y definen especificidades diferentes por los moduladores. Ambas enzimas presentan una elevada identidad y conservan residuos críticos en la unión y catálisis. Sin embargo, los activadores son diferentes e incluso una misma enzima es activada en forma semejante por dos activadores diferentes. Pequeñas modificaciones en los residuos de esta región son capaces de alterar la respuesta hacia el tipo de activador. Uno de los ejemplos más notables de esto es que la mutagénesis sitio-dirigida de la His³⁷⁹ de *A. tumefaciens* por una Arg, presente naturalmente en la enzima de *E. coli* hace que las mutantes muestren activación por la FBP (Cupp-Vickery y col., 2008).



(A)



(B)

Figura 6.34. Interacciones entre residuos aminoacídicos cercanos a la zona de unión de los activadores. En ambas figuras se indica el valor de las distancias medidas entre átomos, las que se representan mediante una línea de puntos. (A). Modelo de la estructura cristalográfica de la enzima de *A. tumefaciens*. Se muestran los aminoácidos involucrados en puentes salinos, el Asp³⁷⁸ con la Arg³³ y el Glu²⁸ con la Arg⁴⁰¹, con distancias mínimas de separación de 3,45 y 3,21 Å respectivamente. (B). Modelo de la enzima de *E. coli*. Se muestran los aminoácidos Asp³⁸⁵ y Arg⁴⁰ que estarían formando un puente salino. Las distancias entre el residuo Asp³⁵ y las Arg⁴⁰⁹ y Arg⁴⁰⁶ son 5,82 y 6,65 Å, respectivamente, lo que sugiere que no se establece interacción entre ellos. Los átomos se colorean según su tipo: oxígeno: rojo, nitrógeno: azul.

Lo anterior no se contrapone con la existencia de ciertos comportamientos alostéricos comunes. El conjunto de datos anteriores y los resultados de este trabajo indican que los activadores se unen en el surco entre los dominios C- y N- terminal. Y que desde ese lugar se transmite la señal al sitio activo. En la transmisión de esa señal también habría ciertos caminos químicos comunes en las ADP-Glc PPasas de distinto origen, en los que los residuos homólogos al Trp¹⁰⁶ y Gln⁶⁷ de *A. tumefaciens* jugarían un rol importante.

6.2.3. Regulación de la enzima ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* por nuevos efectores. Inferencia de estos hallazgos sobre el metabolismo de la bacteria.

Se investigó el efecto de diversos compuestos sobre la actividad de la enzima ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* en el sentido fisiológico de la reacción. Se eligieron metabolitos con un variado número de átomos de carbono en su estructura y según su intervención en los distintos ciclos del metabolismo. Se ensayaron en una concentración 2 mM y en dos condiciones diferentes en relación a la concentración de sustratos: de saturación y de semi-saturación para evaluar si el efecto era sobre la V_{\max} y/o sobre los $S_{0,5}$, respectivamente. Se probó el efecto de: etanol, acetato, oxalato, glicerol, gliceraldehído-3-fosfato (G3P), glicerato, fosfoenolpiruvato (PEP), 3PGA, alanina, lactato, butirato, aspartato, asparagina, fumarato, malato, oxalacetato, glutamato, glutamina, α -ceto glutarato, ribosa 5P (R5P), citrato, leucina, isoleucina, *cis*-aconitato, Glc6P, NADP, NADPH, NH_4Cl y trehalosa.

Los resultados mostraron que la R5P producía un efecto activador mientras que los compuestos PEP, 3PGA, el G3P, el NADPH, y en menor medida, el *cis*-aconitato, el fumarato y el NADP, producían un efecto de inhibición sobre la enzima (Tabla 6.21). Los demás compuestos no mostraron diferencias significativas en los valores de actividad respecto de aquellos obtenidos en las condiciones estándar de medida, en cualquiera de las condiciones probadas.

Se procedió entonces a caracterizar cinéticamente a algunos de estos efectores, en sentido de síntesis de ADP-Glc utilizando el método del Verde de Malaquita. Las concentraciones de sustratos fueron, para todos los casos, ATP 1,0 mM, MgCl_2 7 mM y Glc1P 1,0 mM. En el caso de los compuestos activadores, los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Hill modificada, ecuación (5.2) y para los inhibidores se aplicó la ecuación (5.4).

Cuando se analizaron conjuntamente dos efectores, las concentraciones utilizadas se eligieron teniendo en cuenta los valores de $A_{0,5}$ o $I_{0,5}$ correspondientes, en general, eligiéndose concentraciones por debajo y por encima de dicho valor.

Tabla 6.21. Actividad enzimática relativa (v/v_0) de la enzima de *A. tumefaciens* en presencia de una concentración 2 mM del efector correspondiente, concentraciones saturantes de sustrato. Siendo v y v_0 la actividad enzimática en presencia y ausencia del efector. Se consideró una v_0 de 3,7 U/mg.

Efector	Actividad relativa
ninguno	1,00
R5P	4,51
PEP	0,08
3PGA	0,40
NADPH	0,40
G3P	0,45
<i>cis</i> -aconitato	0,68
Fumarato	0,74
NADP	0,77

6.2.3.1. Efecto activador de la R5P.

Se había señalado previamente que este compuesto ejercía cierta acción activadora, pero no se disponía de un análisis detallado de la misma (Eidels y col., 1970). Al ensayar la actividad enzimática en presencia de concentraciones crecientes de R5P, se determinó el valor de $A_{0,5}$ en 1,75 mM y una activación máxima de ~7 veces. Este último dato, aunque inferior a las veces de activación de los ya caracterizados F6P y Pyr, representa un importante valor de activación. (Figura 6.35).

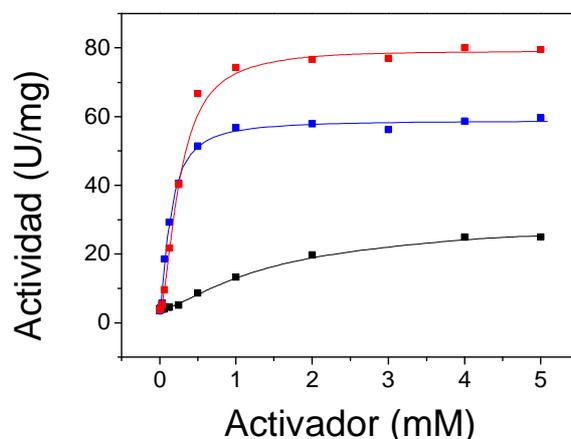


Figura 6.35. Respuesta diferencial de la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* a sus principales activadores F6P (■), Pyr (■) y R5P (■).

Para conocer si la R5P además de aumentar la V_{\max} de la enzima, aumentaba además la afinidad por los sustratos, se realizaron las experiencias cuyos resultados se muestran en la Tabla 6.22. Se observa entonces que, en lo que respecta a los sustratos, la R5P no modifica el $S_{0,5}$ del ATP ni de la Glc1P, lo que indica que este activador actúa principalmente sobre la etapa catalítica. Esto concuerda con los efectos principales de los activadores F6P y Pyr, ya que ambos aumentan la V_{\max} de manera importante, aunque a diferencia de la R5P, éstos también ejercen un efecto moderado sobre la afinidad aparente por los sustratos (Uttaro y col., 1998).

Tabla 6.22. Parámetros cinéticos de la ADP-Glc Pasa de *A. tumefaciens* en ausencia y en presencia de R5P 3 mM. Las determinaciones se realizaron en sentido de síntesis, método Verde de Malaquita.

	$S_{0,5}$ ATP (mM)	n_H	$S_{0,5}$ Glc1P (mM)	n_H
Sin efector	0,39±0,03	1,5	0,14±0,02	1,9
Con R5P	0,39±0,04	2,2	0,12±0,05	2,1

6.2.3.2. Efectos mutuos entre la R5P y los activadores F6P y Pyr.

Para investigar si existía alguna interacción entre este nuevo activador y los ya estudiados, se realizaron curvas de saturación de cada uno en presencia de dos o más concentraciones fijas del otro, elegidas según el valor de $A_{0,5}$ determinado. Las Figuras 6.36-A y 6.36-B muestran, respectivamente, las curvas de saturación de R5P en presencia de distintas concentraciones fijas de F6P o Pyr y en la Tabla 6.23 se consignan los parámetros respectivos. También se estudió el efecto de la R5P sobre las activaciones producidas por F6P y Pyr y los resultados se muestran en las Figuras 6.37-A y 6.37-B, y los parámetros obtenidos de las mismas se muestran en las Tablas 6.24 y 6.25, respectivamente. Aunque la información de los parámetros cinéticos se muestra en las tablas, se consideró útil mostrar además las figuras correspondientes porque su visualización permite una mejor y más rápida comprensión de los posibles efectos mutuos entre efectores. Esta aclaración vale también para los casos siguientes.

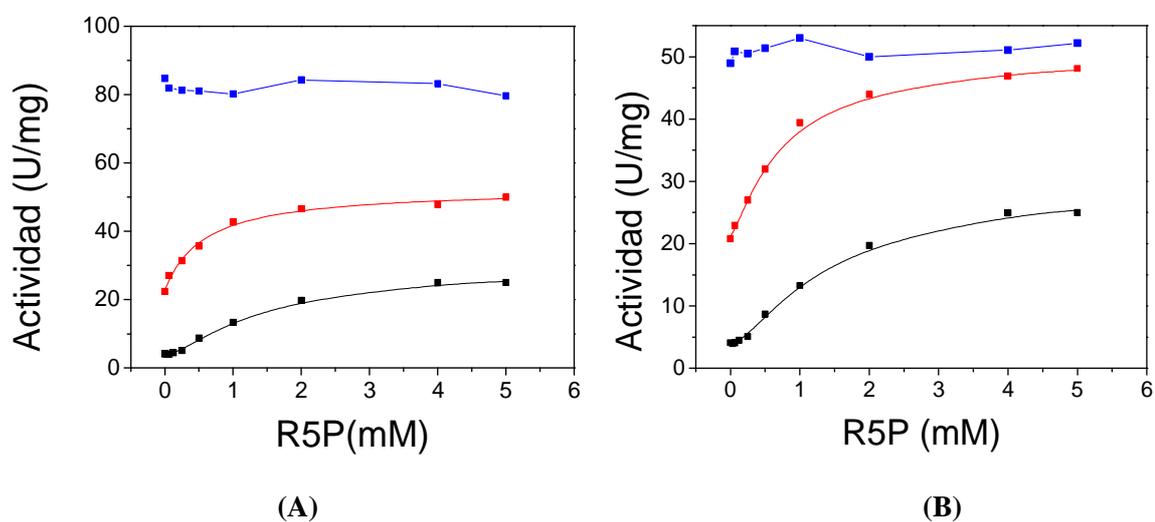


Figura 6.36. (A): efecto de la F6P sobre la activación ejercida por la R5P. Las condiciones fueron: ausencia del segundo efector (■), y en presencia de concentraciones 0,1(■) y 1 mM (■) de F6P. (B): efecto del Pyr sobre la activación ejercida por la R5P. Las condiciones fueron: ausencia del segundo efector (■) y en presencia de concentraciones 0,2 (■) y 2 mM (■) de Pyr.

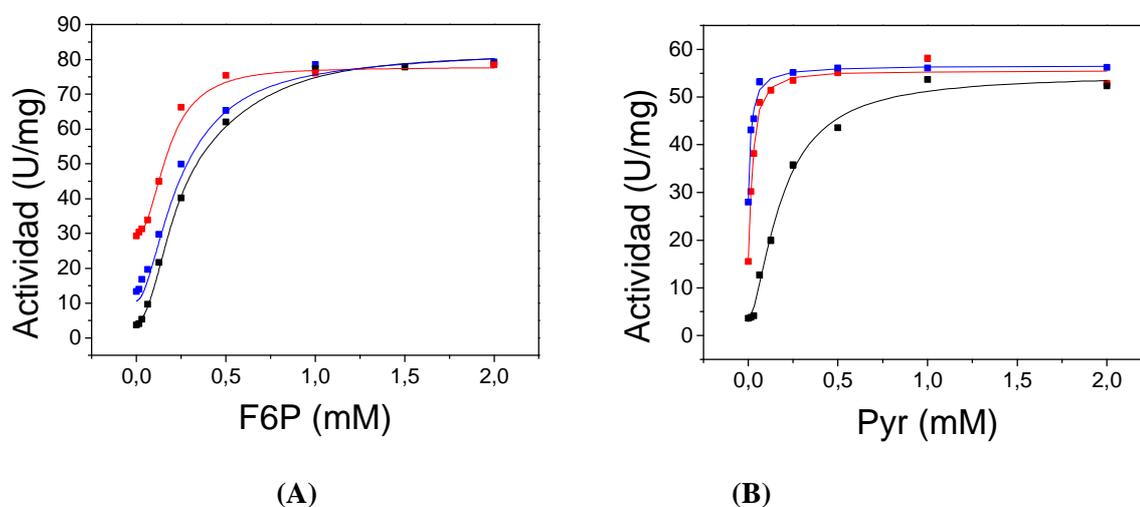


Figura 6.37. (A): efecto de la R5P sobre la activación ejercida por la F6P. Las condiciones fueron: ausencia del segundo efector (■) y en presencia de concentraciones 1 (■) y 5 mM (■) de R5P. (B): efecto de la R5P sobre la activación ejercida por el Pyr. Las condiciones fueron: ausencia del segundo efector (■) y en presencia de concentraciones 1 (■) y 5 mM (■) de R5P.

Tabla 6.23. Activación por R5P en presencia de F6P y Pyr. Las veces de activación se calcularon considerando un valor de actividad específica, en ausencia de efector, de 3,7 U/mg. En el caso de F6P 1 mM y Pyr 2mM, como la velocidad de reacción se mantiene casi constante, las V_{\max} que se informan, ^(a) y ^(b), son un promedio de los valores obtenidos.

Segundo efector	Concentración (mM)	$A_{0,5}$ R5P (mM)	n_H	V_{\max} (U/mg)	Activación (veces)
Ninguno		1,75±0,33	1,3	27,5±1,1	7
F6P	0,1	0,58±0,02	1,0	52,6±3,1	15
	1,0	n.d	n.d	82,8± 3,4 ^(a) (~ V_{\max} F6P)	22
Pyr	0,2	0,39±0,19	1,3	51,2±2,4	14
	2,0	n.d	n.d	53,0 ±2,7 ^(b) (~ V_{\max} Pyr)	14

Tabla 6.24. Efecto de la presencia de R5P sobre los parámetros cinéticos de la F6P.

Segundo efector	Concentración (mM)	$A_{0,5}$ F6P (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)	Activación (veces)
Ninguno		0,22 ±0,02	1,4	82,1±5,8	22
R5P	1	0,22±0,01	1,9	81,3±4,2	21
	5	0,17±0,02	2,7	78,1±5,1	22

Tabla 6.25. Efecto de la presencia de R5P sobre los parámetros cinéticos del Pyr.

Segundo efector	Concentración (mM)	$A_{0,5}$ Pyr (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)	Activación (veces)
Ninguno		0,19± 0,021	1,5	52,0±4,8	14
R5P	1	0,02±0,007	1,4	53,2±1,1	15
	5	0,01±0,005	1,6	54,2±1,0	15

Los resultados muestran que tanto la presencia de la F6P como del Pyr disminuyen el $A_{0,5}$ de la R5P y, recíprocamente, la presencia de R5P disminuye los $A_{0,5}$ de la F6P y el Pyr. Esto puede asociarse con un aumento de la afinidad aparente en presencia del otro activador, lo que indica efectos cooperativos positivos mutuos entre los mismos. Si el sistema obedece a un equilibrio rápido, las constantes de disociación deberían disminuir en la misma proporción en presencia del otro activador en relación a la que cada uno posee en ausencia del otro. Sin embargo, la magnitud del efecto sobre los $A_{0,5}$ no es cuantitativamente recíproca como debería serlo entre las constantes de disociación. Esto obedece a que si bien los $A_{0,5}$ están relacionados con las constantes de disociación aparentes dependen también de otras constantes y concentraciones, tal como se muestra en la ecuación (12A) (Sección 6.2.1.2). En un sistema complejo como el de estudio, este parámetro resulta una función de las concentraciones de los sustratos, del otro activador y diversas constantes de disociación. Si bien para ambos pares R5P-Pyr y R5P-F6P los efectos mutuos son en dirección a una disminución de los $A_{0,5}$, este efecto es muy marcado

en el par R5P–Pyr, ya que en presencia de R5P aún a concentraciones relativamente bajas (inferiores a su $A_{0,5}$) el $A_{0,5}$ del Pyr decrece diez veces y, recíprocamente, el de la R5P decrece unas 4,5 veces en presencia de Pyr. En cambio, los valores de $A_{0,5}$ de la F6P o R5P se ven menos afectados por la presencia del otro activador.

Los incrementos de afinidades aparentes de los activadores, particularmente entre Pyr y R5P, sugieren que no serían mutuamente excluyentes. Respecto de las velocidades máximas alcanzadas, es notable que de manera semejante a lo observado entre el Pyr y la F6P las velocidades máximas alcanzadas en presencia de la mayor concentración ensayada de R5P (5 mM) y concentraciones de Pyr y de F6P de 1 y 2 mM, tienden respectivamente al valor de las correspondientes a la del Pyr o F6P solas. A esas concentraciones se supone que la enzima se encuentra saturada con Pyr y F6P pero también cerca de la saturación con R5P ya que su $A_{0,5}$ disminuye en presencia de los otros activadores, particularmente con Pyr. Sin embargo, no se observa el aumento de la V_{\max} que se esperaría encontrar si ambos activadores actuaran con efectos aditivos, ni una disminución si compitieran por el mismo sitio. En ambos casos, las velocidades máximas tienden a la que se obtiene en presencia de un solo activador que actuaría como “dominante” del proceso: el Pyr, para el par Pyr-R5P y la F6P en el caso de encontrarse en presencia conjunta con la R5P.

6.2.3.3. Inhibición por PEP y 3PGA.

Se había informado previamente que el PEP ejercía una cierta inhibición sobre la enzima de *A. tumefaciens* (Eidels y col., 1970; Uttaro y col., 1998), aunque dicho efecto no había sido caracterizado en profundidad. Según nuestras experiencias, este compuesto ejerce una marcada inhibición, con un $I_{0,5}$ de 0,08 mM y una actividad remanente (v_i/v_0) de ~5 % para una concentración 2 mM de PEP (Figura 6.38). Al estudiarse el efecto inhibitor del 3PGA sobre la enzima de *A. tumefaciens* se observó un valor de $I_{0,5}$ de 1,27 mM con una actividad remanente que se aproxima al 25 % para las máximas concentraciones ensayadas (la curva de 3PGA se continuó hasta una concentración de 10 mM y se muestra completa en la Figura 6.40).

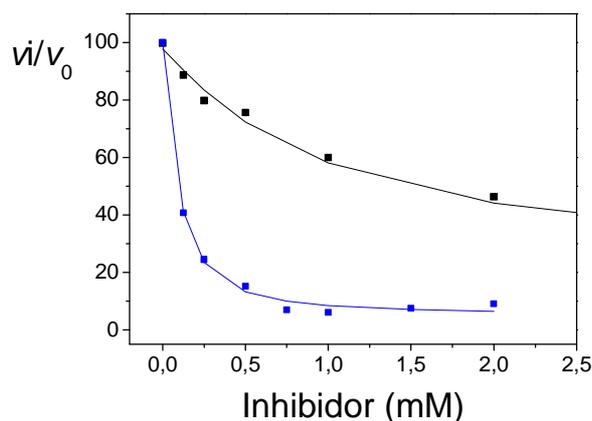


Figura 6.38. Efecto inhibitorio del PEP (■) y del 3PGA (■) sobre la enzima de *A. tumefaciens*. Los datos se ajustaron a la ecuación (5.4), sentido de síntesis de ADP-Glc.

6.2.3.4. Efectos mutuos entre los inhibidores PEP y 3PGA y el activador R5P,

Se investigó si estos efectores, no tan estudiados hasta el momento, mostraban algún efecto mutuo. Para tal fin se realizaron curvas de saturación de R5P en presencia de distintas concentraciones fijas de los inhibidores 3PGA y PEP, que se muestran en las Figuras 6.39-A y 6.39-B y en la Tabla 6.26 se indican los parámetros obtenidos. De manera recíproca, se estudió el efecto de la R5P sobre la inhibición producida por 3PGA y PEP. Los resultados se consignan en las Figuras 6.40-A y 6.40-B y Tablas 6.27 y 6.28, respectivamente.

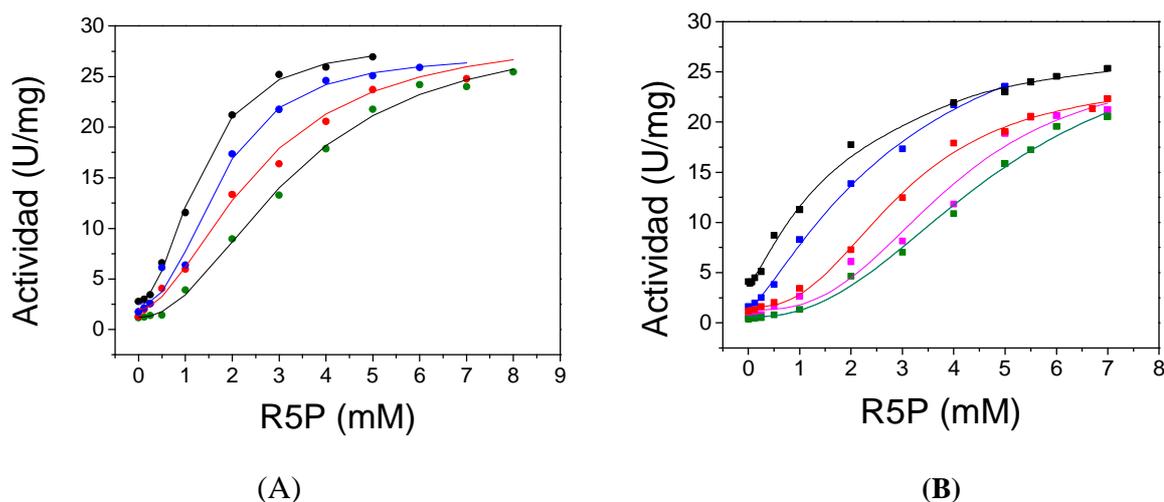


Figura 6.39. (A): efecto del 3PGA sobre la activación ejercida por la R5P. Las condiciones fueron: ausencia de 3PGA (■), y en presencia de concentraciones: 1,5 mM (■), 3,0 (■) y 9 mM (■) de éste. (B): efecto del PEP sobre la activación ejercida por la R5P. Las condiciones fueron: ausencia de PEP (■), y en presencia de concentraciones: 0,2 mM (■), 0,4 (■) 0,8 (■) y 1,2 mM (■) del mismo.

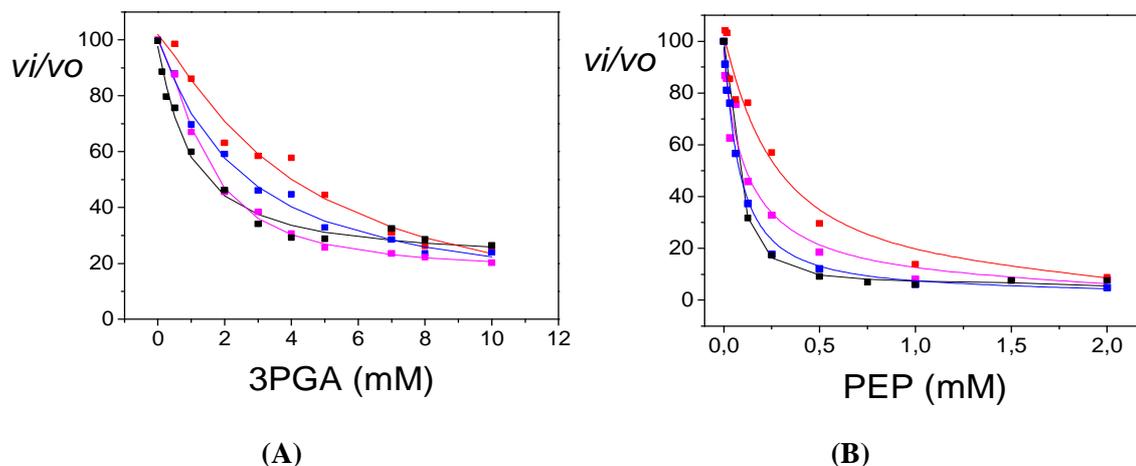


Figura 6.40. (A): efecto de la R5P sobre la inhibición ejercida por el 3PGA. Las condiciones fueron: ausencia de R5P (■), y en presencia de concentraciones 1 (■), 3 (■) y 5 mM (■) de ésta. (B): efecto de la R5P sobre la inhibición ejercida por el PEP. Las condiciones fueron: ausencia de R5P (■), y en presencia de concentraciones 1 (■), 2 (■) y 4 mM (■) de ésta.

Tabla 6.26. Activación por R5P en presencia de 3PGA y PEP. Las veces de activación se calcularon considerando un valor de actividad específica, en ausencia de efector, de 3,7 U/mg.

Segundo efector	Concentración (mM)	$A_{0,5}$ R5P (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)	Activación (veces)
Ninguno	-	$1,75 \pm 0,33$	1,3	$28,7 \pm 1,1$	7
3PGA	1,5	$2,11 \pm 0,18$	1,8	$27,5 \pm 2,9$	7
	3	$3,58 \pm 0,09$	1,5	$29,5 \pm 1,7$	7
	9	$4,60 \pm 0,39$	1,7	$28,9 \pm 2,6$	7
PEP	0,2	$3,17 \pm 0,22$	1,3	$32,0 \pm 2,0$	7
	0,4	$3,00 \pm 0,15$	2,5	$27,1 \pm 0,9$	6
	0,8	$3,9 \pm 0,44$	2,8	$26,0 \pm 1,5$	6
	1,2	$4,8 \pm 0,41$	2,4	$29,2 \pm 2,3$	7

Tabla 6.27. Efecto de la presencia de R5P sobre la inhibición del 3PGA.

Segundo efector	Concentración (mM)	$I_{0,5}$ 3PGA (mM)	n_H	Actividad remanente (%) a 10 mM de 3PGA
Ninguno		1,27 ±0,13	0,8	26
R5P	1	1,90 ±0,24	1,1	26
	3	2,70 ± 0,21	1,0	27
	5	3,87 ±0,35	1,2	28

Tabla 6.28. Efecto de la presencia de R5P sobre la inhibición del PEP.

Segundo efector	Concentración (mM)	$I_{0,5}$ PEP. (mM)	n_H	Actividad remanente (%) a 2 mM de PEP
Ninguno		0,08 ± 0,01	1,3	5
R5P	1	0,09 ±0,01	1,3	7
	2	0,13 ±0,02	1,2	5
	4	0,32±0,03	1,3	4

Se observa que ambos inhibidores aumentan el $A_{0,5}$ de la ADP-Glc PPasa por la R5P (Figuras 6.39-A y 6.39-B y Tabla 6.26), lo que lleva a postular que, de alguna manera, disminuyen la afinidad de la enzima por el activador. Sin embargo, a altas concentraciones de R5P se alcanzan las velocidades máximas correspondiente a la V_{max} de la R5P. Por otro lado, las Figuras 6.40-A y 6.40-B y las Tablas 6.27 y 6.28 muestran que la presencia de R5P aumenta el $I_{0,5}$ de ambos inhibidores aunque a altas concentraciones se alcanza la misma inhibición que en ausencia del activador. Por lo consiguado, el comportamiento entre la R5P y los inhibidores estudiados se correspondería con uno de tipo mutuamente excluyente (teniendo en cuenta la dependencia de los $A_{0,5}$ o $I_{0,5}$ con las K_D), o bien, si fueran efectores no mutuamente excluyentes, presentarían efectos acoplados negativos sólo

en la etapa de unión pero no en la etapa catalítica, ya que en todos los casos, se alcanzan los valores de V_{lim} correspondiente.

6.2.3.5. Efectos mutuos entre los activadores F6P y Pyr y el inhibidor PEP

De manera homóloga a los casos anteriores, se realizaron las curvas de inhibición del PEP en presencia de distintas concentraciones fijas de los activadores F6P y Pyr, que se muestran en las Figuras 6.41-A y 6.41-B y en la Tabla 6.29 se indican los parámetros obtenidos. Los resultados del efecto del PEP sobre la activación producida por F6P y Pyr se consignan en las Figuras 6.42-A y 6.42-B y Tablas 6.30 y 6.31, respectivamente.

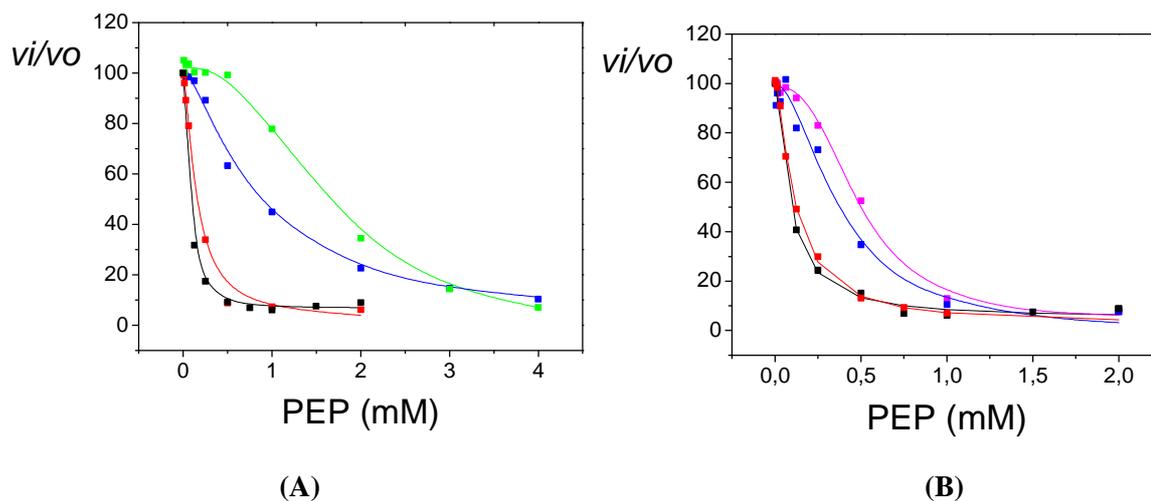


Figura 6.41. (A): efecto de la F6P sobre la inhibición que ejerce el PEP. Se utilizaron concentraciones de 0 (■), 0,2 (■), 1 (■) y 2 mM (■) de F6P. (B): Efecto del Pyr sobre la inhibición que ejerce el PEP. Se utilizaron concentraciones: 0 (■), 0,2 (■), 1 (■) y 2 mM (■) de Pyr.

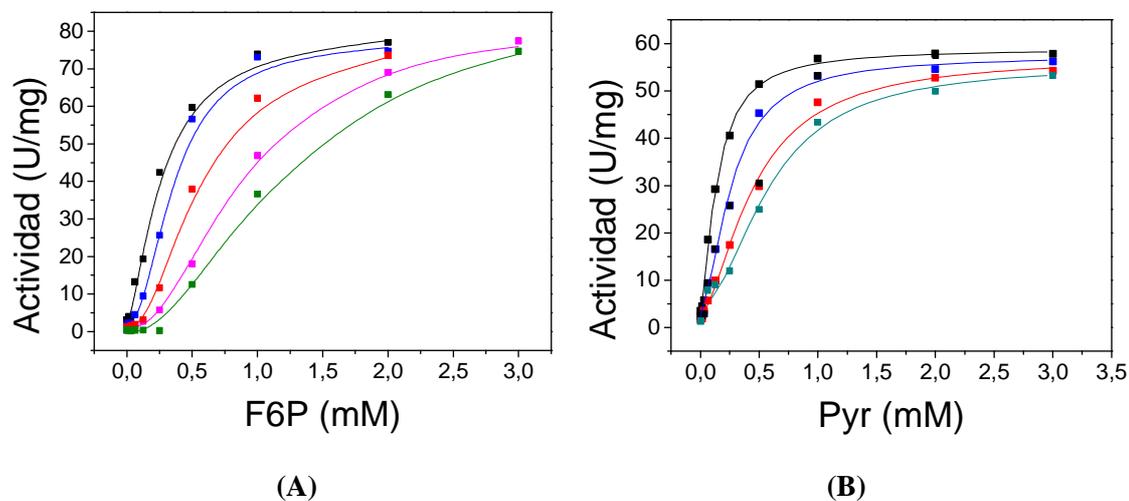


Figura 6.42. (A): Efecto del PEP sobre la activación que ejerce la F6P. Se utilizaron concentraciones: 0 (■), 0,15 (■), 0,4 (■), 0,6 (■) y 0,8 (■) mM de PEP. (B): Efecto del PEP sobre la activación que ejerce el Pyr. Se utilizaron concentraciones de 0 (■), 0,05 (■), 0,15 (■) y 0,3 mM (■) de PEP.

Tabla 6.29. Inhibición por PEP sobre la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens* en presencia de F6P y Pyr.

Segundo efector	Concentración (mM)	$I_{0,5}$ PEP (mM)	n_H	Actividad remanente (%) a 2 mM de PEP
Ninguno		$0,08 \pm 0,01$	1,3	5
F6P	0,2	$0,14 \pm 0,01$	1,5	5
	1	$0,77 \pm 0,06$	1,6	4
	2	$1,55 \pm 0,09$	2,7	5
Pyr	0,2	$0,11 \pm 0,01$	1,5	4
	1	$0,38 \pm 0,02$	1,8	6
	2	$0,49 \pm 0,02$	2,6	4

Tabla 6.30. Efecto de la presencia de PEP sobre los parámetros cinéticos de la F6P.

Segundo efector	Concentración (mM)	$A_{0,5}$ F6P (mM)	V_{max} (U/mg)	n_H	Activación (veces)
Ninguno		0,22 ±0,01	82,1±5,8	1,4	22
PEP	0,15	0,29±0,01	78,9±1,9	3,1	21
	0,40	0,54±0,03	80,2±5,9	2,2	22
	0,60	0,72±0,12	78,7±3,7	2,8	21
	0,80	0,91±0,17	77,7±3,2	2,8	21

Tabla 6.31. Efecto de la presencia de PEP sobre los parámetros cinéticos del Pyr.

Segundo efector	Concentración (mM)	$A_{0,5}$ Pyr (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)	Activación (veces)
Ninguno		0,19± 0,02	1,5	52,0±4,8	14
PEP	0,05	0,26±0,02	1,6	52,5±2,0	14
	0,15	0,46±0,06	1,6	51,3±4,2	14
	0,30	0,59±0,04	1,9	50,6±2,9	13,5

En la Tabla 6.29 se observa que el $I_{0,5}$ del PEP aumenta en presencia de ambos activadores. Es decir, estos últimos disminuirían la afinidad aparente de la enzima por el inhibidor. A pesar de la presencia de los activadores, a altas concentraciones de PEP se alcanza la misma inhibición que cuando este último se encuentra solo. La actividad remanente fue, en todos los casos, baja y semejante. A su vez el PEP aumenta el $A_{0,5}$ de la enzima hacia los activadores pero la V_{max} no se ve alterada cuando la concentración de los activadores es elevada (Tablas 6.30 y 6.31). La totalidad de los resultados sugiere que, entre cada uno de estos activadores y el PEP, podría existir un comportamiento de tipo mutuamente

excluyente. O bien, como se mencionara para la interacción con la R5P, si se unieran en forma no excluyente, solo mostrarían efectos cooperativos mutuos en la unión pero no en la etapa catalítica.

6.2.3.6. Efectos mutuos entre los activadores F6P y Pyr y el inhibidor 3PGA

Las curvas de inhibición por el 3PGA en presencia de distintas concentraciones fijas de los activadores F6P y Pyr se muestran en las Figuras 6.43-A y 6.43-B en la Tabla 6.32 se indican los parámetros obtenidos. Los resultados del efecto del 3PGA sobre la activación producida por F6P y Pyr se consiguen en las Figuras 6.44-A y 6.44-B y Tablas 6.33 y 6.34, respectivamente.

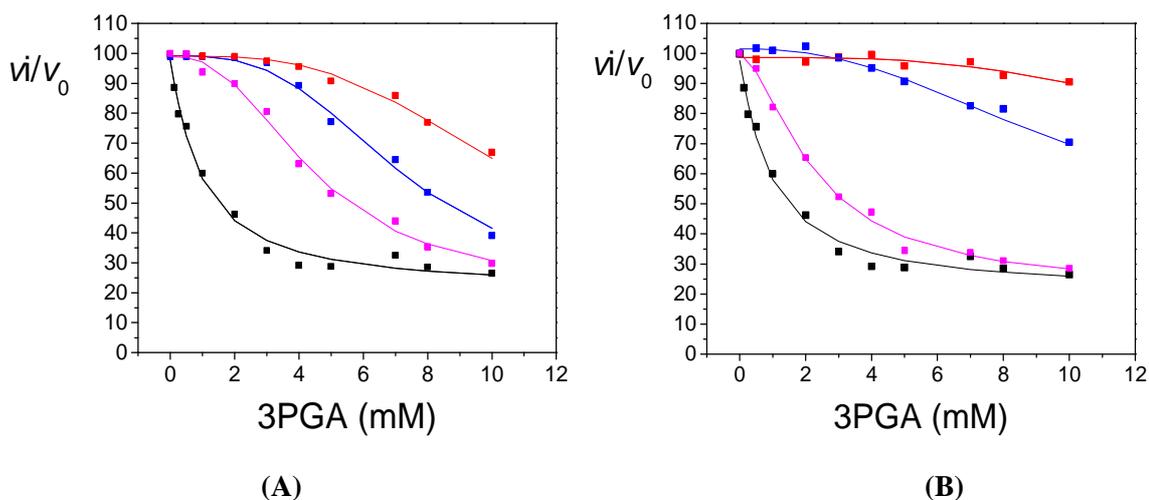


Figura 6.43. (A): curvas de inhibición del 3PGA a distintas concentraciones de F6P: ausencia (■), 0,1 mM (■), 1 mM (■) y 2 mM (■). (B): curvas de inhibición del 3PGA a distintas concentraciones de Pyr: ausencia (■), 0,2 mM (■), 1 mM (■) y 2 mM (■).

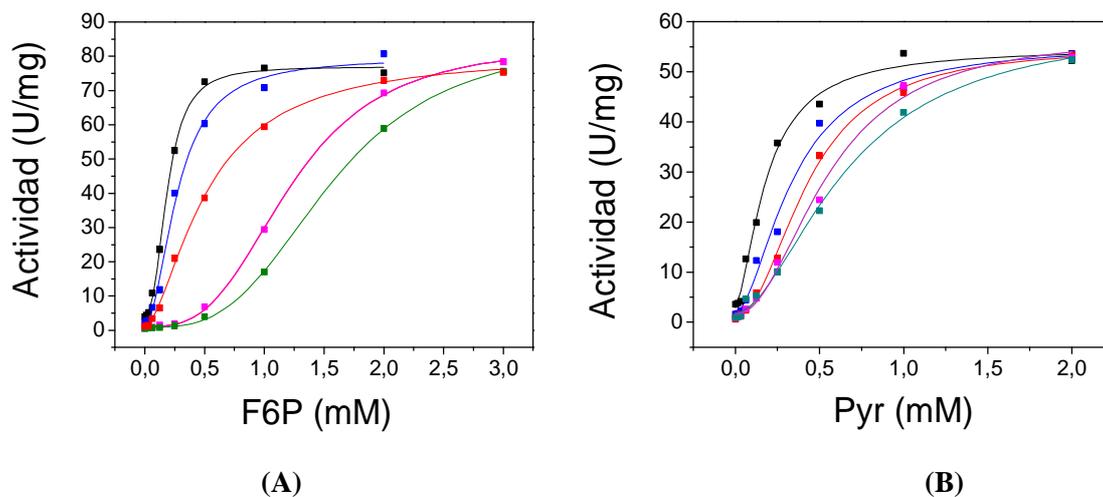


Figura 6.44. (A): efecto del 3PGA sobre la activación que ejerce la F6P. Se utilizaron concentraciones: 0 (■), 2,5 (■), 5 (■), 8 (■) y 10 mM (■) de 3PGA. (B): efecto del 3PGA sobre la activación que ejerce el Pyr. Se utilizaron concentraciones de 0 (■), 2 (■), 4 (■), 6 (■) y 8 mM (■) de 3PGA.

Tabla 6.32. Efecto de la presencia de F6P y Pyr sobre los parámetros cinéticos del 3PGA.

Segundo efector	Concentración (mM)	$I_{0,5}$ 3PGA (mM)	n_H	Actividad remanente (%) a 10 mM de 3PGA
Ninguno		$1,27 \pm 0,13$	0,8	26
F6P	0,1	$4,44 \pm 0,28$	2,4	30
	1	$7,15 \pm 0,50$	3,1	41
	2	$10,58 \pm 1,01$	3,3	67
Pyr	0,2	$2,26 \pm 0,21$	1,6	30
	1	$9,80 \pm 2,70$	2,4	70
	2	$12,15 \pm 3,61$	3,6	91

Tabla 6.33. Efecto de la presencia de 3PGA sobre los parámetros cinéticos de la F6P.

Segundo efector	Concentración (mM)	$A_{0,5}$ F6P (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)	Activación (veces)
Ninguno		0,22 ±0,01	1,4	82,1±5,8	22
3PGA	2,5	0,27±0,03	1,9	82,5±4,2	22
	5	0,52±0,02	1,6	78,5±2,2,	22
	8	1,22±0,02	3,0	87,1±3,5	23
	10	1,56±0,12	3,2	89,0±2,1	24

Tabla 6.34. Efecto de la presencia de 3PGA sobre los parámetros cinéticos del Pyr.

Segundo efector	Concentración (mM)	$A_{0,5}$ Pyr (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)	Activación (veces)
Ninguno		0,19± 0,02	1,5	52,0±4,8	14
3PGA	2	0,35±0,04	1,7	55,7	15
	4	0,43±0,03	2,1	54,9	15
	6	0,55±0,05	2,1	56,8	15
	8	0,67±0,04	1,8	57,0	15

En la Tabla 6.32 se observa que tanto la F6P como el Pyr aumentan el $I_{0,5}$ del 3PGA y se observa una diferencia significativa en la actividad enzimática remanente para una concentración 10 mM de 3PGA (máxima concentración de la curva) en presencia de F6P y Pyr, con respecto a su ausencia (Figuras 6.43-A y 6.43-B, respectivamente). A su vez, el 3PGA aumenta el $A_{0,5}$ de la F6P y del Pyr, pero la V_{max} no se ve alterada cuando la concentración de los activadores es elevada. Aunque no se haya determinado si en presencia de los activadores se alcanza finalmente la velocidad a la que tiende la reacción solo en presencia de 3PGA (ya que habría que hacer curvas de actividad

aumentando mucho más la concentración de éste, situación que no tendría ninguna significación fisiológica), la totalidad de los resultados sugiere que este comportamiento sería semejante al encontrado entre el PEP y los activadores.

6.2.3.7. Efectos cinéticos entre los inhibidores PEP y 3PGA

Se estudiaron los efectos recíprocos entre los inhibidores PEP y 3PGA entre sí y se calcularon los parámetros cinéticos correspondientes. Se observó que el PEP provoca un aumento del $I_{0,5}$ del 3PGA (Tabla 6.34), siendo éste un efecto recíproco (Tabla 6.35), aunque no en la misma magnitud. Tal como se expresó antes, esto puede obedecer a que si bien los $I_{0,5}$ están relacionados con las constantes de disociación aparentes, dependen también de otras constantes y concentraciones.

Tabla 6.34. Efecto de la presencia de 3PGA sobre los parámetros cinéticos del PEP

Segundo efector	concentración (mM)	$I_{0,5}$ PEP (mM)	n_H	Actividad remanente (%) a 2 mM de PEP
Ninguno		$0,08 \pm 0,01$	1,3	6
3PGA	2	$0,11 \pm 0,02$	1,1	11
	3	$0,13 \pm 0,01$	1,9	14

Tabla 6.35. Efecto de la presencia de PEP sobre los parámetros cinéticos del 3PGA.

Segundo efector	concentración (mM)	$I_{0,5}$ 3PGA (mM)	n_H	Actividad remanente (%) a 10 mM de 3PGA
Ninguno		1,27 ±0,13	0,8	25
PEP	0,025	1,24± 0,15	1,1	22
	0,050	2,19 ±0,18	1,7	24
	0,150	3,22 ±0,27	1,4	26

En la curva de 3PGA en presencia de PEP, para una concentración 10 mM del primero, la actividad remanente se mantiene en un valor aproximado del 25%, por lo que sería equivalente a aquella que se alcanza en presencia de sólo 3PGA. Por otro lado, la presencia de 3PGA en la curva de PEP, en lo que respecta a la actividad enzimática remanente, disminuye ligeramente la potente inhibición de este último. No se evaluó si a concentraciones mayores a 2 mM de PEP se lograba alcanzar la potente inhibición que éste último produce sobre la enzima, pero en función de los resultados obtenidos con el 3PGA, muy probablemente sea esto lo que ocurre. Podría postularse entonces que ambos inhibidores muestran un comportamiento tipo competitivo o mutuamente excluyente, ya que disminuyen la afinidad de la enzima por el otro y frente a concentraciones saturantes se alcanza la V_{lim} correspondiente.

6.2.3.8. Discusión

Se investigaron numerosos compuestos encontrándose que algunos de ellos actuaban como efectores de la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens*. Fueron estudiados con mayor profundidad aquellos que provocaban un efecto significativo sobre la enzima, como fue el caso de la R5P, el PEP y el 3PGA.

En lo que concierne a esta enzima las propiedades regulatorias se adecúan a la vía principal del catabolismo de la Glc, que en esta bacteria es la de Entner-Doudoroff (Eidels y col., 1970; Iglesias y Preiss, 1992). Se ha demostrado que la vía de Embden-Meyerhof-Parnas

no es funcional en este microorganismo (Arthur y col., 1973). Por otro lado, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos es muy activo y se sabe que el *A. tumefaciens* utiliza preferentemente estos intermediarios como fuente de carbono (Fuhrer y col., 2005). La actividad del ciclo de las pentosas fosfato en *A. tumefaciens* es mucho mayor que la que normalmente se encuentra en otras bacterias por lo que en este sentido, el organismo representa una categoría única y en cuanto a vías catabólicas de la Glc, es la que le sigue en importancia a la vía de Entner-Doudoroff (Arthur 1973). En la Figura 6.45 se muestra un esquema de las vías metabólicas mencionadas, para el caso particular del *A. tumefaciens*.

En lo que respecta al Pyr, el 86% del existente en la célula, en aquellas bacterias cultivadas con Glc como única fuente de carbono, proviene de la vía de Entner-Doudoroff (Fuhrer y col., 2005). Cuando la concentración de Glc6P en la célula es elevada, la concentración del Pyr que se obtiene como metabolito intermediario de esta vía, aumentaría también y su efecto activador se debería a la necesidad de desviar este alto contenido de carbono hacia su acumulación como glucógeno. Según nuestros resultados, el Pyr continúa siendo el activador que domina en cuanto a conformación resultante, ya que su V_{\max} es la que prevalece en presencia de F6P o de R5P.

El PEP y el 3PGA son también metabolitos intermediarios de esta vía (Figura 6.45). El 3PGA, aunque no se muestra explícitamente en la figura, está presente en el pasaje del G3P hacia PEP. Estos compuestos mostraron ser inhibidores de la enzima, con un efecto más o menos importante en cuanto a la inhibición, dependiendo de cual se trate. En el caso del 3PGA, su acción inhibitoria se ve disminuida, de manera notoria, por la presencia de Pyr y F6P. La inhibición ejercida por el PEP no se afecta demasiado por la presencia de los activadores mencionados y presenta un valor bajo de $I_{0.5}$, con lo cual, bajas concentraciones podrían ejercer un efecto inhibitorio significativo. Sin embargo, ambos inhibidores, de acuerdo a esta vía, se convierten finalmente en Pyr, mediante un flujo relativo importante según el ancho de la flecha correspondiente en la Figura 6.45. Por otro lado, es en el pasaje de PEP a Pyr donde se recupera la molécula de ATP utilizada previamente en el camino de Enter-Doudoroff, por lo que es recién luego de este paso donde hay más ATP. Siendo el ATP el sustrato de la ADP-Glc y, además, un indicador del nivel energético de la célula, sería lógico acumular Glc una vez obtenido el ATP, o sea cuando esta vía ha llegado hasta el Pyr y no antes.

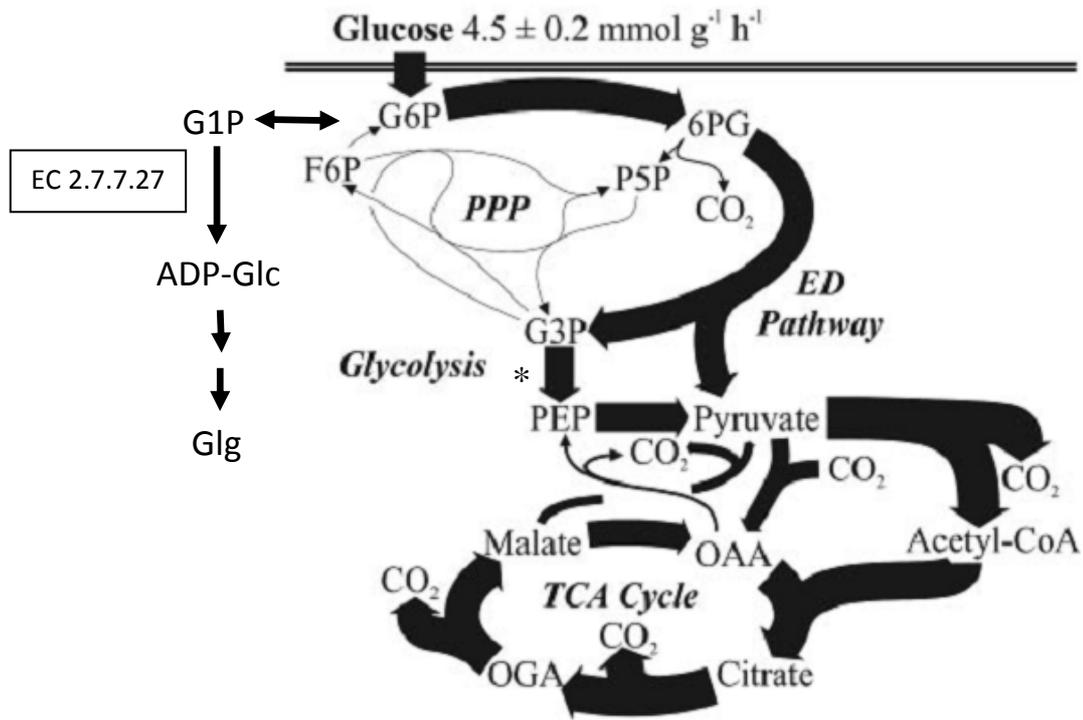


Figura 6.45. Distribución *in vivo* del flujo de carbono en *A. tumefaciens*, de células crecidas en presencia de Glc como única fuente de carbono. El ancho de las flechas representa el porcentaje relativo de los flujos con respecto a la velocidad de captación de Glc, la que se indica en la parte superior del esquema. Abreviaturas: PPP: ciclo de las pentosas fosfato, ED pathway: vía de Entner-Doudoroff. TCA cycle: ciclo de los ácidos tricarboxílicos, G6P: Glc6P, G1P: Glc1P, 6PG: 6-fosfogluconato, P5P: pentosa-5fosfato, G3P: gliceraldehído-3-fosfato, OAA: oxalacetato, PEP: fosfoenolpiruvato, OGA: 2-ceto glutarato. Por considerarlo pertinente a esta tesis, se adiciona a la figura original, la interconversión entre Glc6P y Glc1P y la derivación de esta última hacia la síntesis de glucógeno (Glg), previa conversión hacia ADP-Glc por la enzima ADP-Glc PPasa. (*): señala el paso metabólico donde se genera el 3PGA. Figura modificada de (Fuhrer y col., 2005)

La R5P es un metabolito intermediario de la vía de las pentosas fosfato (segunda vía que le sigue en importancia a la de Entner-Doudoroff) y los resultados experimentales muestran que produce un efecto activador importante, ejercido fundamentalmente en la etapa catalítica. Es de esperar entonces que el aumento de R5P, cuando esta vía está activa, estimule la actividad enzimática de la ADP-Glc PPasa con el consecuente desvío de las moléculas de Glc hacia su almacenamiento. Los inhibidores 3PGA y PEP disminuyen ligeramente la afinidad de la enzima por este activador.

Tal como se comentó en la Introducción (Sección 3.2.1), se ha descrito que en algunas bacterias, la acumulación de glucógeno se produce en condiciones de carencia de nutrientes esenciales como fósforo, nitrógeno o azufre (Preiss, 2006). En esta bacteria, al observar la Figura 6.45, se puede postular que, en estas condiciones, al no existir demanda de Pyr ni de los metabolitos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos para síntesis de aminoácidos, se produciría una acumulación y consiguiente aumento de la concentración de Pyr, que al activar la enzima, provocaría la acumulación de glucógeno.

El ciclo de las pentosas fosfato, muy activo en este microorganismo, rinde fundamentalmente F6P, además de G3P (Figura 6.45). Tal como se muestra en esta figura, la hexosa-P experimenta una conversión favorecida hacia Glc6P, a través de la enzima fosfoglucoisomerasa; es decir, estaría aumentado el nivel de Glc6P circulante a sus expensas, lo que explicaría porque su aumento estimula la ADP-Glc PPasa, promoviendo el almacenamiento de Glc en forma de glucógeno. Recordemos que esta hexosa-fosfato es el efector que provoca mayor activación de la enzima (~22 veces). La presencia de R5P haría aumentar la afinidad de la enzima por la F6P y a altas concentraciones de ambos activadores, muy probablemente, predomine el efecto o la conformación inducida por la F6P, ya que la actividad enzimática corresponde al valor de su V_{max} .

El análisis de estas relaciones entre activadores e inhibidores nos permite afirmar que la regulación de esta enzima es muy compleja, ya que la mayoría de estos efectores interaccionan entre sí. Según nuestros estudios los activadores principales de la enzima son los ya conocidos Pyr y F6P, seguidos por la R5P. Probablemente el PEP pueda agregarse a la lista de los inhibidores importantes, junto al Pi. Globalmente, puede visualizarse un escenario en *A. tumefaciens* donde la acumulación de glucógeno estaría gobernada por los niveles de intermediarios claves de la vía glucolítica de Entner-Doudoroff en conexión con la ruta de las pentosas fosfato.

7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados experimentales obtenidos en el presente Trabajo de Tesis, se pueden enunciar las siguientes conclusiones:

A)- Con respecto a la enzima ADP-Glc PPasa de *E. coli*:

- Mediante estudios de modelado se lograron dos modelos estructurales para la enzima salvaje, uno en forma “abierta” y otro en forma “cerrada”, a partir de estructuras sin y con ATP unido, respectivamente. Estos modelos estructurales mostraron que difieren entre sí, principalmente, en la región que incluye al *loop* que contiene a la Lys³⁹ (involucrada en la unión del activador) y en dos *loops* adyacentes donde están localizados los residuos altamente conservados Gln⁷⁴ y Trp¹¹³.

- Las enzimas mutantes en estos residuos, las Q74A y W113A, aún teniendo afinidades semejantes a las de la enzima salvaje para los sustratos, resultaron insensibles al activador FBP. Mostraron también una escasa inhibición por AMP en presencia de la FBP, lo que concuerda con la falta de respuesta al activador.

- Estudios de unión realizados mediante la técnica de electroforesis capilar de afinidad permitieron:

a- obtener las constantes de disociación aparentes, tanto de la enzima salvaje como de las enzimas mutantes W113A y Q74A, indicando que todas unen el activador FBP, lo que confirmó que estas mutaciones no alteran, de manera importante, el sitio de unión de este activador.

b- determinar que las enzimas mutantes podían unir en forma covalente el PLP a pesar de no presentar activación frente al mismo. Esto apoya firmemente el modelo en el cual las enzimas mutantes han alterado la traslación de la señal regulatoria ya que pueden ser modificadas covalentemente con PLP, al igual que la enzima salvaje, pero esta unión es ineficiente en términos de activación.

c- estimar el número de moléculas de FBP y PLP unidas por molécula de proteína, a partir del aumento relativo de movilidad electroforética. La concordancia entre los datos obtenidos en relación a información previa, mostró la utilidad de estos capilares, en los que no se evidencia flujo electroosmótico, para ser usados con esta finalidad.

En su conjunto, estos datos obtenidos por estudios cinéticos y por ECA apoyan la hipótesis de la participación de los *loops* donde se ubican los residuos de Gln⁷⁴ y Trp¹¹³ en la transmisión de la señal de activación desde el sitio de unión del activador hacia el sitio catalítico. La relevancia de este hallazgo es que permite plantear un modelo dinámico de unión del activador, donde, a semejanza de lo que ocurre cuando la enzima une el ATP, la estructura pasaría de un estado conformacional abierto a un estado más cerrado o compacto, promovido por el movimiento de estos dos *loops* que se acercarían más a ciertas zonas de la macromolécula, favoreciendo así la unión de sustratos y el proceso catalítico.

- Se diseñaron, construyeron, expresaron y caracterizaron enzimas con dos mutaciones a partir de simples mutantes que presentaban características particulares con respecto a la activación, dos que presentan preactivación, N-Δ15 y G336D, y dos que no responden al activador, las ya mencionadas Q74A y W113A, obteniéndose las combinaciones: Q74A+G336D, W113A+G336D, N-Δ15+Q74A, N-Δ15+W113A y N-Δ15+G336D.

- Los estudios cinéticos realizados con las dobles mutantes reafirmaron el papel fundamental de los residuos Trp¹¹³ y Gln⁷⁴ en la activación por FBP y la inhibición por AMP, ya que las dobles mutantes que carecen de cualquiera de ellos, casi no responden a estos efectores, a semejanza de lo que ocurre en las simples mutantes W113A y Q74A. Estos estudios mostraron que el mecanismo por el cual la enzima mutante N-Δ15 adquiere su preactivación sería más dependiente de la presencia de los residuos Gln⁷⁴ y Trp¹¹³ que para el caso de la enzima G336D, ya que la actividad específica de esta última se vio menos afectada en ausencia de cualquiera de ellos. Esto indicaría que la activación encontrada en la mutante G336D tiene un componente que escaparía al acomodamiento de los *loops* que se había puesto en evidencia al estudiar las mutantes Q74A y W113A. Todo esto sugiere que las conformaciones que adquieren cada una y por la cual presentan este estado de preactivación, son diferentes entre sí. Estudios de dicroísmo circular avalaron esta conclusión.

- Los estudios realizados en relación a la interacción de la enzima con el Mg²⁺ confirmaron la importancia del residuo Asp²⁷⁶ en la unión del ion metálico. Mediante cortes oxidativos de la cadena peptídica de la enzima salvaje se obtuvieron dos fragmentos principales que mostraron elevada especificidad. Experiencias semejantes realizadas sobre una enzima

mutante trunca permitieron identificar el extremo terminal al que podría corresponder cada fragmento. Además las enzimas mutantes D276N y D276E mostraron que la ausencia de este residuo impidió o disminuyó notablemente los cortes, respectivamente, evidenciándose así la importancia de este residuo en mayor medida debida a la influencia de la carga negativa y, en menor medida al tamaño. Los resultados de la espectrometría de masas de los fragmentos no permitieron establecer con precisión los sitios de corte, sin embargo, teniendo en cuenta el modelo de la enzima, se planteó una hipótesis que posibilita que estos cortes ocurran en las cercanías del Asp²⁷⁶ y del Asp¹⁴², el otro residuo propuesto para quelar el metal.

B)- En lo que respecta a la enzima ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens*.

- Se expresaron y se caracterizaron cinéticamente las enzimas mutantes Q67A y W106A. Los resultados mostraron que, al igual de lo que ocurría con las mutantes homólogas de la enzima de *E. coli* con respecto a la activación por FBP, ambas habían perdido la capacidad de ser activadas por F6P, indicando que ambos *loops* serían necesarios para que se produzca la activación que ejerce esta hexosa-fosfato. En cambio, se encontraron diferencias cuando se analizó el efecto del Pyr, ya que mientras la mutante Q67A resultó casi insensible, la mutante W106A mostró un nivel de activación similar al de la enzima salvaje. Esta diferencia observada en la enzima de *A. tumefaciens* respondería a la utilización de diferentes mecanismos de activación frente a diferentes efectores. Además, como el mecanismo por el cual cursa la activación por 3PGA en las ADP-Glc PPasas de *Anabaena* y de tubérculo de papa, resulta similar al observado para la FBP y la F6P en las enzimas de *E. coli* y *A. tumefaciens*, respectivamente, y a la vez, diferente al mecanismo por el cual el Pyr activa a la enzima de *A. tumefaciens*, se puede concluir que el tipo de activación no depende del número de átomos de carbono de la molécula efectora.

- Se estudió cinéticamente la activación simultánea que ejercían la F6P y el Pyr, sobre la enzima. Se observó que la afinidad de la enzima por el sustrato, con cada uno de los activadores, aumentaba en presencia del otro lo que reveló la existencia de efectos de unión heterotrópicos (cooperatividad positiva) entre los activadores. En cuanto a las velocidades límite alcanzadas, el comportamiento fue muy particular, ya que a altas

concentraciones de ambos activadores, éstas tienden al valor de la velocidad que se alcanza en presencia solamente del Pyr, por lo que puede decirse que sus efectos catalíticos no son aditivos y la conformación dominante en presencia de ambos activadores es la determinada por el Pyr.

- Se propuso un modelo de unión donde el sustrato y los activadores F6P y Pyr pueden unirse a la enzima libre o a la enzima combinada con el/los otro/s ligando/s. En función de este modelo se planteó una ecuación cuyas velocidades teóricas se adecúan perfectamente a los valores experimentales obtenidos para las distintas situaciones investigadas. Con algunas consideraciones, se estableció su equivalencia con una ecuación mucho más simple, ampliamente usada (la ecuación de Hill modificada), pudiéndose así establecer el real significado de los parámetros calculados con esta última.

- La enzima mutante de *A. tumefaciens* D378A permitió reafirmar el importante rol del surco comprendido entre los dominios N- y C-terminal, ya sea en la unión y/o activación, tanto de la F6P como del Pyr. Nuestros resultados, junto a otros obtenidos con la enzima mutante R33A, permiten afirmar que los sitios de unión de ambos activadores, aunque próximos entre sí, no son los mismos. El estudio comparativo con la mutante homóloga de *E. coli* sugiere que, aunque ambos activadores, F6P y FBP, se estarían uniendo en la misma zona, los sitios de unión tendrían una arquitectura diferente. Teniendo en consideración las estructuras tridimensionales de cada enzima se postuló que esta diferencia radica en el número de puentes salinos que se establecen entre los dominios N- y C-terminal.

- Se investigó el efecto de diversos metabolitos sobre la actividad enzimática y aquellos que ejercieron un efecto apreciable, se caracterizaron cinéticamente. En particular, como activador se estudió la R5P y como inhibidores el PEP y el 3PGA. También se estudió la interacción entre ellos y los activadores principales F6P y Pyr. Se encontró que en la mayoría de los casos estudiados existe cierta interacción llegando a ser muy importante en algunos casos, como en el 3PGA, donde el Pyr y la F6P disminuyen notablemente su acción inhibitoria. La interpretación de las interacciones entre estos nuevos efectores abre un escenario muy amplio y refuerza la idea de que la regulación de las ADP-Glc PPasas, en general, no es sencilla.

- El análisis de estos nuevos efectores en relación al metabolismo de la bacteria, permite ratificar que en *A. tumefaciens* la acumulación de glucógeno estaría gobernada por los niveles de intermediarios claves de la vía glucolítica de Entner-Doudoroff en conexión con la ruta de las pentosas fosfato, siendo ambas las rutas más importantes para el catabolismo de la Glc en este microorganismo.

8. REFERENCIAS

- Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Holliday, G.L. y Thornton, J.M. (2008) *Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles*. J Biol Inorg Chem 13: p. 1205-18.
- Antos, J.M. y Francis, M.B. (2006) *Transition metal catalyzed methods for site-selective protein modification*. Curr Opin Chem Biol 10: p. 253-62.
- Arthur, L.O.; Bulla, L.A., Jr.; Julian, G.S. y Nakamura, L.K. (1973) *Carbohydrate metabolism in Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 116: p. 304-13.
- Ball, K. y Preiss, J. (1994) *Allosteric sites of the large subunit of the spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase*. J Biol Chem 269: p. 24706-11.
- Ballicora, M.A.; Dubay, J.R.; Devillers, C.H. y Preiss, J. (2005) *Resurrecting the ancestral enzymatic role of a modulatory subunit*. J Biol Chem 280: p. 10189-95.
- Ballicora, M.A.; Erben, E.D.; Yazaki, T.; Bertolo, A.L.; Demonte, A.M.; Schmidt, J.R.; Aleanzi, M.; Bejar, C.M.; Figueroa, C.M.; Fusari, C.M.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2007) *Identification of regions critically affecting kinetics and allosteric regulation of the Escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase by modeling and pentapeptide-scanning mutagenesis*. J Bacteriol 189: p. 5325-33.
- Ballicora, M.A.; Frueauf, J.B.; Fu, Y.; Schurmann, P. y Preiss, J. (2000) *Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin*. J Biol Chem 275: p. 1315-20.
- Ballicora, M.A.; Fu, Y.; Nesbitt, N.M. y Preiss, J. (1998) *ADP-Glucose pyrophosphorylase from potato tubers. Site-directed mutagenesis studies of the regulatory sites*. Plant Physiol 118: p. 265-74.
- Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2003a) *ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis*. Microbiol Mol Biol Rev 67: p. 213-25.
- Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2003b) *ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67: p. 213-225, table of contents.
- Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2004) *ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis*. Photosynth Res 79: p. 1-24.

- Ballicora, M.A.; Laughlin, M.J.; Fu, Y.; Okita, T.W.; Barry, G.F. y Preiss, J. (1995) *Adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. Significance of the N terminus of the small subunit for catalytic properties and heat stability*. Plant Physiol 109: p. 245-51.
- Ballicora, M.A.; Sesma, J.I.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2002) *Characterization of chimeric ADPglucose pyrophosphorylases of Escherichia coli and Agrobacterium tumefaciens. Importance of the C-terminus on the selectivity for allosteric regulators*. Biochemistry 41: p. 9431-7.
- Barton, W.A.; Lesniak, J.; Biggins, J.B.; Jeffrey, P.D.; Jiang, J.; Rajashankar, K.R.; Thorson, J.S. y Nikolov, D.B. (2001) *Structure, mechanism and engineering of a nucleotidyltransferase as a first step toward glycorandomization*. Nat Struct Biol 8: p. 545-51.
- Bejar, C.M.; Ballicora, M.A.; Gomez-Casati, D.F.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2004) *The ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli comprises two tightly bound distinct domains*. FEBS Lett 573: p. 99-104.
- Bejar, C.M.; Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2006a) *ADPglucose pyrophosphorylase's N-terminus: structural role in allosteric regulation*. Biochem Biophys Res Commun 343: p. 216-21.
- Bejar, C.M.; Jin, X.; Ballicora, M.A. y Preiss, J. (2006b) *Molecular architecture of the glucose 1-phosphate site in ADP-glucose pyrophosphorylases*. J Biol Chem 281: p. 40473-84.
- Belanger, A.E. y Hatfull, G.F. (1999) *Exponential-phase glycogen recycling is essential for growth of Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol 181: p. 6670-8.
- Berg, J.; Tymoczko, J. y Stryer, L. (2002) *Biochemistry*. W.H. Freeman and company.
- Bisswanger, H. (2002) *Enzyme kinetics: principles and methods* Wiley-VCH, Weinheim
- Blankenfeldt, W.; Asuncion, M.; Lam, J.S. y Naismith, J.H. (2000) *The structural basis of the catalytic mechanism and regulation of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA)*. Embo J 19: p. 6652-63.
- Bonafonte, M.A.; Solano, C.; Sesma, B.; Alvarez, M.; Montuenga, L.; Garcia-Ros, D. y Gamazo, C. (2000) *The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in Salmonella enteritidis*. FEMS Microbiol Lett 191: p. 31-6.
- Bowie, J.U.; Luthy, R. y Eisenberg, D. (1991) *A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure*. Science 253: p. 164-70.

- Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72: p. 248-54.
- Brown, K.; Pompeo, F.; Dixon, S.; Mengin-Lecreulx, D.; Cambillau, C. y Bourne, Y. (1999) *Crystal structure of the bifunctional N-acetylglucosamine 1-phosphate uridylyltransferase from Escherichia coli: a paradigm for the related pyrophosphorylase superfamily*. Embo J 18: p. 4096-107.
- Crevillen, P.; Ballicora, M.A.; Merida, A.; Preiss, J. y Romero, J.M. (2003) *The different large subunit isoforms of Arabidopsis thaliana ADP-glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme*. J Biol Chem 278: p. 28508-15.
- Crevillen, P.; Ventriglia, T.; Pinto, F.; Orea, A.; Merida, A. y Romero, J.M. (2005) *Differential pattern of expression and sugar regulation of Arabidopsis thaliana ADP-glucose pyrophosphorylase-encoding genes*. J Biol Chem 280: p. 8143-9.
- Cupp-Vickery, J.R.; Igarashi, R.Y.; Perez, M.; Poland, M. y Meyer, C.R. (2008) *Structural analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase from the bacterium Agrobacterium tumefaciens*. Biochemistry 47: p. 4439-51.
- Charng, Y.Y.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (1994) *Structure-function relationships of cyanobacterial ADP-glucose pyrophosphorylase. Site-directed mutagenesis and chemical modification of the activator-binding sites of ADP-glucose pyrophosphorylase from Anabaena PCC 7120*. J Biol Chem 269: p. 24107-13.
- Chou, T.C. (2006) *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. Pharmacol Rev 58: p. 621-81.
- Chou, W.Y.; Tsai, W.P.; Lin, C.C. y Chang, G.G. (1995) *Selective oxidative modification and affinity cleavage of pigeon liver malic enzyme by the Cu(2+)-ascorbate system*. J Biol Chem 270: p. 25935-41.
- Dahlquist, F.W. (1978) *The meaning of Scatchard and Hill plots*. Methods Enzymol 48: p. 270-99.
- Datta, D.; Scheer, J.M.; Romanowski, M.J. y Wells, J.A. (2008) *An allosteric circuit in caspase-1*. J Mol Biol 381: p. 1157-67.
- del Sol, A.; Tsai, C.J.; Ma, B. y Nussinov, R. (2009) *The origin of allosteric functional modulation: multiple pre-existing pathways*. Structure 17: p. 1042-50.

- Devillers, C.H.; Piper, M.E.; Ballicora, M.A. y Preiss, J. (2003) *Characterization of the branching patterns of glycogen branching enzyme truncated on the N-terminus*. Arch Biochem Biophys 418: p. 34-8.
- Eidels, L.; Edelmann, P.L. y Preiss, J. (1970) *Biosynthesis of bacterial glycogen. 8. Activation and inhibition of the adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylase of Rhodospseudomonas capsulata and of Agrobacterium tumefaciens*. Arch Biochem Biophys 140: p. 60-74.
- Eidels, L. y Preiss, J. (1970) *Carbohydrate metabolism in Rhodospseudomonas capsulata: enzyme titers, glucose metabolism, and polyglucose polymer synthesis*. Arch Biochem Biophys 140: p. 75-89.
- Eisenberg, D.; Luthy, R. y Bowie, J.U. (1997) *VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Methods Enzymol 277: p. 396-404.
- Espada, J. (1962) *Enzymic Synthesis of Adenosine Diphosphate Glucose from Glucose 1-Phosphate and Adenosine Triphosphate* J Biol Chem 237: p. 3577-81.
- Farber, J.M. y Levine, R.L. (1986) *Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase*. J Biol Chem 261: p. 4574-8.
- Figuroa, C.M.; Esper, M.C.; Bertolo, A.; Demonte, A.M.; Aleanzi, M.; Iglesias, A.A. y Ballicora, M.A. (2011) *Understanding the allosteric trigger for the fructose-1,6-bisphosphate regulation of the ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. Biochimie 93: p. 1816-23.
- Frueauf, J.B.; Ballicora, M.A. y Preiss, J. (2001) *Aspartate residue 142 is important for catalysis by ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. J Biol Chem 276: p. 46319-25.
- Frueauf, J.B.; Ballicora, M.A. y Preiss, J. (2002) *Alteration of inhibitor selectivity by site-directed mutagenesis of Arg(294) in the ADP-glucose pyrophosphorylase from Anabaena PCC 7120*. Arch Biochem Biophys 400: p. 208-14.
- Frueauf, J.B.; Ballicora, M.A. y Preiss, J. (2003) *ADP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: site-directed mutagenesis of homologous aspartic acid residues in the small and large subunits*. Plant J 33: p. 503-11.
- Fu, Y.; Ballicora, M.A.; Leykam, J.F. y Preiss, J. (1998) *Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase*. J Biol Chem 273: p. 25045-52.

- Fuhrer, T.; Fischer, E. y Sauer, U. (2005) *Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species*. J Bacteriol 187: p. 1581-90.
- Fusari, C.; Demonte, A.M.; Figueroa, C.M.; Aleanzi, M. y Iglesias, A.A. (2006) *A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase*. Anal Biochem 352: p. 145-7.
- Gao, J.; Gomez, F.A.; Harter, R. y Whitesides, G.M. (1994) *Determination of the effective charge of a protein in solution by capillary electrophoresis*. Proc Natl Acad Sci U S A 91: p. 12027-30.
- Gardiol, A. y Preiss, J. (1990) *Escherichia coli E-39 ADPglucose synthetase has different activation kinetics from the wild-type allosteric enzyme*. Arch Biochem Biophys 280: p. 175-80.
- Gentner, N.; Greenberg, E. y Preiss, J. (1969) *TPNH and pyridoxal-5'-phosphate: activators of ADP-glucose pyrophosphorylase of Escherichia coli B1*. Biochem Biophys Res Commun 36: p. 373-80.
- Gentner, N. y Preiss, J. (1968) *Biosynthesis of bacterial glycogen. VI. Differences in the kinetic properties of the Escherichia coli B adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase depending on whether Mg⁺⁺ or Mn⁺⁺ serves as divalent cation*. J Biol Chem 243: p. 5882-91.
- Gibbons, R.J. y Kapsimalis, B. (1963) *Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by Streptococcus mitis*. Arch Oral Biol 8: p. 319-29.
- Godson, G.N.; Schoenich, J.; Sun, W. y Mustaev, A.A. (2000) *Identification of the magnesium ion binding site in the catalytic center of Escherichia coli primase by iron cleavage*. Biochemistry 39: p. 332-9.
- Gomez-Casati, D.F.; Igarashi, R.Y.; Berger, C.N.; Brandt, M.E.; Iglesias, A.A. y Meyer, C.R. (2001) *Identification of functionally important amino-terminal arginines of Agrobacterium tumefaciens ADP-glucose pyrophosphorylase by alanine scanning mutagenesis*. Biochemistry 40: p. 10169-78.
- Gomez-Casati, D.F. y Iglesias, A.A. (2002) *ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat endosperm. Purification and characterization of an enzyme with novel regulatory properties*. Planta 214: p. 428-34.
- Greene, T.W.; Woodbury, R.L. y Okita, T.W. (1996) *Aspartic acid 413 is important for the normal allosteric functioning of ADP-glucose pyrophosphorylase*. Plant Physiol 112: p. 1315-20.

- Guex, N. y Peitsch, M.C. (1997) *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis 18: p. 2714-23.
- Gutteridge, A. y Thornton, J. (2004) *Conformational change in substrate binding, catalysis and product release: an open and shut case?* FEBS Lett 567: p. 67-73.
- Gutteridge, A. y Thornton, J. (2005) *Conformational changes observed in enzyme crystal structures upon substrate binding*. J Mol Biol 346: p. 21-8.
- Haugen, T.; Ishaque, A. y Preiss, J. (1976) *ADPGlucose pyrophosphorylase: evidence for a lysine residue at the activator site of the Escherichia coli B enzyme*. Biochem Biophys Res Commun 69: p. 346-53.
- Haugen, T.H. y Preiss, J. (1979) *Biosynthesis of bacterial glycogen. The nature of the binding of substrates and effectors to ADP-glucose synthase*. J Biol Chem 254: p. 127-36.
- Heegaard, N.H.; Nilsson, S. y Guzman, N.A. (1998) *Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 715: p. 29-54.
- Hendriks, J.H.; Kolbe, A.; Gibon, Y.; Stitt, M. y Geigenberger, P. (2003) *ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species*. Plant Physiol 133: p. 838-49.
- Hill, M.A.; Kaufmann, K.; Otero, J. y Preiss, J. (1991) *Biosynthesis of bacterial glycogen. Mutagenesis of a catalytic site residue of ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. J Biol Chem 266: p. 12455-60.
- Hill, M.A. y Preiss, J. (1998) *Functional analysis of conserved histidines in ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun 244: p. 573-7.
- Iglesias, A.A.; Barry, G.F.; Meyer, C.; Bloksberg, L.; Nakata, P.A.; Greene, T.; Laughlin, M.J.; Okita, T.W.; Kishore, G.M. y Preiss, J. (1993) *Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in Escherichia coli*. J Biol Chem 268: p. 1081-6.
- Iglesias, A.A. y Preiss, J. (1992) *Bacterial glycogen and plant starch biosynthesis*. Biochemical Education 20: p. 196-203.
- Jin, X.; Ballicora, M.A.; Preiss, J. y Geiger, J.H. (2005) *Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase*. Embo J 24: p. 694-704.

- Kaddis, J.; Zurita, C.; Moran, J.; Borra, M.; Polder, N.; Meyer, C.R. y Gomez, F.A. (2004) *Estimation of binding constants for the substrate and activator of Rhodobacter sphaeroides adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase using affinity capillary electrophoresis*. Anal Biochem 327: p. 252-60.
- Kiel, J.A.; Boels, J.M.; Beldman, G. y Venema, G. (1994) *Glycogen in Bacillus subtilis: molecular characterization of an operon encoding enzymes involved in glycogen biosynthesis and degradation*. Mol Microbiol 11: p. 203-18.
- Kleczkowski, L.A.; Villand, P.; Luthi, E.; Olsen, O.A. y Preiss, J. (1993a) *Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation*. Plant Physiol 101: p. 179-86.
- Kleczkowski, L.A.; Villand, P.; Preiss, J. y Olsen, O.A. (1993b) *Kinetic mechanism and regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase from barley (Hordeum vulgare) leaves*. J Biol Chem 268: p. 6228-33.
- Koropatkin, N.M.; Cleland, W.W. y Holden, H.M. (2005) *Kinetic and structural analysis of alpha-D-Glucose-1-phosphate cytidyltransferase from Salmonella typhi*. J Biol Chem 280: p. 10774-80.
- Kostrewa, D.; D'Arcy, A.; Takacs, B. y Kamber, M. (2001) *Crystal structures of Streptococcus pneumoniae N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, GlmU, in apo form at 2.33 Å resolution and in complex with UDP-N-acetylglucosamine and Mg(2+) at 1.96 Å resolution*. J Mol Biol 305: p. 279-89.
- Kuhn, M.L.; Falaschetti, C.A. y Ballicora, M.A. (2009) *Ostreococcus tauri ADP-glucose pyrophosphorylase reveals alternative paths for the evolution of subunit roles*. J Biol Chem 284: p. 34092-102.
- Kumar, A.; Tanaka, T.; Lee, Y.M. y Preiss, J. (1988) *Biosynthesis of bacterial glycogen. Use of site-directed mutagenesis to probe the role of tyrosine 114 in the catalytic mechanism of ADP-glucose synthetase from Escherichia coli*. J Biol Chem 263: p. 14634-9.
- Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: p. 680-685.
- Lakowicz, J. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic Plenum Publishers Nueva York.

- Laughlin, M.J.; Chantler, S.E. y Okita, T.W. (1998) *N- and C-terminal peptide sequences are essential for enzyme assembly, allosteric, and/or catalytic properties of ADP-glucose pyrophosphorylase*. Plant J 14: p. 159-68.
- Lee, G.M. y Craik, C.S. (2009) *Trapping moving targets with small molecules*. Science 324: p. 213-5.
- Lee, Y.M.; Mukherjee, S. y Preiss, J. (1986) *Covalent modification of Escherichia coli ADPglucose synthetase with 8-azido substrate analogs*. Arch Biochem Biophys 244: p. 585-95.
- Lee, Y.M. y Preiss, J. (1986) *Covalent modification of substrate-binding sites of Escherichia coli ADP-glucose synthetase. Isolation and structural characterization of 8-azido-ADP-glucose-incorporated peptides*. J Biol Chem 261: p. 1058-64.
- Leloir, L.F. (1971) *Two decades of research on the biosynthesis of saccharides*. Science 172: p. 1299-303.
- Leloir, L.F.; De Fekete, M.A. y Cardini, C.E. (1961) *Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose*. J Biol Chem 236: p. 636-41.
- Leloir, L.F. y Goldemberg, S.H. (1960) *Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver*. J Biol Chem 235: p. 919-23.
- Leung, P.; Lee, Y.M.; Greenberg, E.; Esch, K.; Boylan, S. y Preiss, J. (1986) *Cloning and expression of the Escherichia coli glgC gene from a mutant containing an ADPglucose pyrophosphorylase with altered allosteric properties*. J Bacteriol 167: p. 82-8.
- Li, G.; Zhou, X.; Wang, Y.; El-Shafey, A.; Chiu, N.H. y Krull, I.S. (2004) *Capillary isoelectric focusing and affinity capillary electrophoresis approaches for the determination of binding constants for antibodies to the prion protein*. J Chromatogr A 1053: p. 253-62.
- Luthy, R.; Bowie, J.U. y Eisenberg, D. (1992) *Assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Nature 356: p. 83-5.
- Medinas, D.B.; Gozzo, F.C.; Santos, L.F.; Iglesias, A.H. y Augusto, O. (2010) *A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity*. Free Radic Biol Med 49: p. 1046-53.
- Melendez, R.; Melendez-Hevia, E. y Canela, E.I. (1999) *The fractal structure of glycogen: A clever solution to optimize cell metabolism*. Biophys J 77: p. 1327-32.

- Melendez, R.; Melendez-Hevia, E. y Cascante, M. (1997) *How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building*. J Mol Evol 45: p. 446-55.
- Melendez, R.; Melendez-Hevia, E.; Mas, F.; Mach, J. y Cascante, M. (1998) *Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach*. Biophys J 75: p. 106-14.
- Meyer, C.R.; Bork, J.A.; Nadler, S.; Yirsa, J. y Preiss, J. (1998a) *Site-directed mutagenesis of a regulatory site of Escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase: the role of residue 336 in allosteric behavior*. Arch Biochem Biophys 353: p. 152-9.
- Meyer, C.R.; Ghosh, P.; Nadler, S. y Preiss, J. (1993) *Cloning, expression, and sequence of an allosteric mutant ADPglucose pyrophosphorylase from Escherichia coli B*. Arch Biochem Biophys 302: p. 64-71.
- Meyer, C.R.; Yirsa, J.; Gott, B. y Preiss, J. (1998b) *A kinetic study of site-directed mutants of Escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase: the role of residue 295 in allosteric regulation*. Arch Biochem Biophys 352: p. 247-54.
- Mochalkin, I.; Lightle, S.; Zhu, Y.; Ohren, J.F.; Spessard, C.; Chirgadze, N.Y.; Banotai, C.; Melnick, M. y McDowell, L. (2007) *Characterization of substrate binding and catalysis in the potential antibacterial target N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (GlmU)*. Protein Sci 16: p. 2657-66.
- Monod, J.; Wyman, J. y Changeux, J.P. (1965) *On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model*. J Mol Biol 12: p. 88-118.
- Morell, M.; Bloom, M. y Preiss, J. (1988) *Affinity labeling of the allosteric activator site(s) of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase*. J Biol Chem 263: p. 633-7.
- Nelson, D.; Cox, M. y Lehninger, A. (2004) *Lehninger's Principles of Biochemistry*. WH Freeman.
- Olsen, L.R. y Roderick, S.L. (2001) *Structure of the Escherichia coli GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites*. Biochemistry 40: p. 1913-21.
- Parsons, T.F. y Preiss, J. (1978a) *Biosynthesis of bacterial glycogen. Incorporation of pyridoxal phosphate into the allosteric activator site and an ADP-glucose-protected pyridoxal phosphate binding site of Escherichia coli B ADP-glucose synthase*. J Biol Chem 253: p. 6197-202.
- Parsons, T.F. y Preiss, J. (1978b) *Biosynthesis of bacterial glycogen. Isolation and characterization of the pyridoxal-P allosteric activator site and the ADP-glucose-*

- protected pyridoxal-P binding site of Escherichia coli B ADP-glucose synthase. J Biol Chem* 253: p. 7638-45.
- Paule, M.R. y Preiss, J. (1971) *The kinetic mechanism of adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylase from Rhodospirillum rubrum. J Biol Chem* 246: p. 4602–4609.
- Person, M.D.; Brown, K.C.; Mahrus, S.; Craik, C.S. y Burlingame, A.L. (2001) *Novel inter-protein cross-link identified in the GGH-ecotin D137Y dimer. Protein Sci* 10: p. 1549-62.
- Plaxton, W.C. y Preiss, J. (1987) *Purification and Properties of Nonproteolytic Degraded ADPglucose Pyrophosphorylase from Maize Endosperm. Plant Physiol* 83: p. 105-112.
- Preiss, J. (1984) *Bacterial glycogen synthesis and its regulation. Annu Rev Microbiol* 38: p. 419-58.
- Preiss, J. (1996) *ADPglucose pyrophosphorylase: basic science and applications in biotechnology. Biotechnol Annu Rev* 2: p. 259-79.
- Preiss, J. (2006). *Bacterial Glycogen Inclusions: Enzymology and Regulation of Synthesis. Inclusions in Prokaryotes*. Shively, J.M., © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006.
- Preiss, J.; Ball, K.; Smith-White, B.; Iglesias, A.; Kakefuda, G. y Li, L. (1991) *Starch biosynthesis and its regulation. Biochem Soc Trans* 19: p. 539-47.
- Preiss, J. y Romeo, T. (1989) *Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. Adv Microb Physiol* 30: p. 183-238.
- Preiss, J. y Romeo, T. (1994) *Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 47: p. 299-329.
- Preiss, J.; Shen, L.; Greenberg, E. y Gentner, N. (1966) *Biosynthesis of bacterial glycogen. IV. Activation and inhibition of the adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase of Escherichia coli B. Biochemistry* 5: p. 1833-45.
- Raboni, S.; Bettati, S. y Mozzarelli, A. (2005) *Identification of the geometric requirements for allosteric communication between the alpha- and beta-subunits of tryptophan synthase. J Biol Chem* 280: p. 13450-6.
- Rasmussen, B.W. y Bjerrum, M.J. (2003) *Ca(2+) and Na(+) binding to high affinity sites of calcium-containing proteins measured by capillary electrophoresis. J Inorg Biochem* 95: p. 113-23.
- Recondo, E.; Dankert, M. y Leloir, L.F. (1963) *Isolation of adenosine diphosphate D-glucose from corn grains. Biochem Biophys Res Commun* 12: p. 204-7.

- Recondo, E. y Leloir, L.F. (1961) *Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis*. Biochem Biophys Res Commun 6: p. 85-8.
- Reinhart, G.D. (2004) *Quantitative analysis and interpretation of allosteric behavior*. Methods Enzymol 380: p. 187-203.
- Ribbons, D.W. y Dawes, E.A. (1963) *Environmental and growth conditions affecting the endogenous metabolism of bacteria*. Ann N Y Acad Sci 102: p. 564-86.
- Salamone, P.R.; Kavakli, I.H.; Slattery, C.J. y Okita, T.W. (2002) *Directed molecular evolution of ADP-glucose pyrophosphorylase*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: p. 1070-5.
- Sali, A. y Blundell, T.L. (1993) *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol 234: p. 779-815.
- Sambou, T.; Dinadayala, P.; Stadthagen, G.; Barilone, N.; Bordat, Y.; Constant, P.; Levillain, F.; Neyrolles, O.; Gicquel, B.; Lemassu, A.; Daffe, M. y Jackson, M. (2008) *Capsular glucan and intracellular glycogen of Mycobacterium tuberculosis: biosynthesis and impact on the persistence in mice*. Mol Microbiol 70: p. 762-74.
- Saraste, M.; Sibbald, P.R. y Wittinghofer, A. (1990) *The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins*. Trends Biochem Sci 15: p. 430-4.
- Schenker, P. y Baici, A. (2009) *Simultaneous interaction of enzymes with two modifiers: reappraisal of kinetic models and new paradigms*. J Theor Biol 261: p. 318-29.
- Segel, I. (1993) *Enzyme kinetics. Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady - state enzyme systems* John Wiley & Sons, New York.
- Sheng, J.; Charng, Y.Y. y Preiss, J. (1996) *Site-directed mutagenesis of lysine382, the activator-binding site, of ADP-glucose pyrophosphorylase from Anabaena PCC 7120*. Biochemistry 35: p. 3115-21.
- Sheng, J. y Preiss, J. (1997) *Arginine294 is essential for the inhibition of Anabaena PCC 7120 ADP-glucose pyrophosphorylase by phosphate*. Biochemistry 36: p. 13077-84.
- Sigal, N.; Cattaneo, J. y Segel, I.H. (1964) *Glycogen Accumulation by Wild-Type and Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase-Negative Strains of Escherichia Coli*. Arch Biochem Biophys 108: p. 440-51.
- Sivak, M. y Preiss, J. (1998) *Starch: basic science to biotechnology*. En: *Advances in Food and Nutrition Research*. (Eds: Taylor, S.L.). Academic Press, San Diego, p. 1-199.
- Sivaraman, J.; Sauve, V.; Matte, A. y Cygler, M. (2002) *Crystal structure of Escherichia coli glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RffH) complexed with dTTP and Mg²⁺*. J Biol Chem 277: p. 44214-9.

- Smock, R.G. y Gierasch, L.M. (2009) *Sending signals dynamically*. Science 324: p. 198-203.
- Spatafora, G.; Rohrer, K.; Barnard, D. y Michalek, S. (1995) *A Streptococcus mutans mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo*. Infect Immun 63: p. 2556-63.
- Stadtman, E.R. (1993) *Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions*. Annu Rev Biochem 62: p. 797-821.
- Stadtman, E.R. y Berlett, B.S. (1991) *Fenton chemistry. Amino acid oxidation*. J Biol Chem 266: p. 17201-11.
- Strange, R.E. (1968) *Bacterial "glycogen" and survival*. Nature 220: p. 606-7.
- Swain, J.F. y Gierasch, L.M. (2006) *The changing landscape of protein allostery*. Curr Opin Struct Biol 16: p. 102-8.
- Takata, H.; Takaha, T.; Okada, S.; Hizukuri, S.; Takagi, M. y Imanaka, T. (1996) *Structure of the cyclic glucan produced from amylopectin by Bacillus stearothermophilus branching enzyme*. Carbohydr Res 295: p. 91-101.
- Takata, H.; Takaha, T.; Okada, S.; Takagi, M. y Imanaka, T. (1997) *Characterization of a gene cluster for glycogen biosynthesis and a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase from Bacillus stearothermophilus*. J Bacteriol 179: p. 4689-98.
- Tanford, C. (1961) *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley & Sons Inc, New York-London.
- Tang, S.S.; Lin, C.C. y Chang, G.G. (1996) *Metal-catalyzed oxidation and cleavage of octopus glutathione transferase by the Cu(II)-ascorbate system*. Free Radic Biol Med 21: p. 955-64.
- Thoden, J.B. y Holden, H.M. (2007a) *Active site geometry of glucose-1-phosphate uridylyltransferase*. Protein Sci 16: p. 1379-88.
- Thoden, J.B. y Holden, H.M. (2007b) *The molecular architecture of glucose-1-phosphate uridylyltransferase*. Protein Sci 16: p. 432-40.
- Tokuriki, N. y Tawfik, D.S. (2009) *Protein dynamism and evolvability*. Science 324: p. 203-7.
- Traut, T. (2008) *Regulatory allosteric enzymes*. Springer Science+Business Media, NY.
- Tsai, C.J.; del Sol, A. y Nussinov, R. (2008) *Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play*. J Mol Biol 378: p. 1-11.

- Uttaro, A.D.; Ugalde, R.A.; Preiss, J. y Iglesias, A.A. (1998) *Cloning and expression of the *glgC* gene from *Agrobacterium tumefaciens*: purification and characterization of the ADPglucose synthetase*. Arch Biochem Biophys 357: p. 13-21.
- Valenzuela A, J. y Valenzuela S, E. (2009) *Trehalosa: el azúcar de la resurrección*. Ciencia y Desarrollo (CONACYT) 35: p. 58-65.
- Varenne, A.; Gareil, P.; Collic-Jouault, S. y Daniel, R. (2003) *Capillary electrophoresis determination of the binding affinity of bioactive sulfated polysaccharides to proteins: study of the binding properties of fucoidan to antithrombin*. Anal Biochem 315: p. 152-9.
- Ventriglia, T.; Kuhn, M.L.; Ruiz, M.T.; Ribeiro-Pedro, M.; Valverde, F.; Ballicora, M.A.; Preiss, J. y Romero, J.M. (2008) *Two Arabidopsis ADP-glucose pyrophosphorylase large subunits (APL1 and APL2) are catalytic*. Plant Physiol 148: p. 65-76.
- Verzola, B.; Gelfi, C. y Righetti, P.G. (2000) *Protein adsorption to the bare silica wall in capillary electrophoresis quantitative study on the chemical composition of the background electrolyte for minimising the phenomenon*. J Chromatogr A 868: p. 85-99.
- Vinson, V.J. (2009) *Proteins in motion. Introduction*. Science 324: p. 197.
- Voet, D. y Voet, J. (2006) *Bioquímica*. Editorial Panamericana.
- Wei, C.H.; Chou, W.Y.; Huang, S.M.; Lin, C.C. y Chang, G.G. (1994) *Affinity cleavage at the putative metal-binding site of pigeon liver malic enzyme by the Fe(2+)-ascorbate system*. Biochemistry 33: p. 7931-6.
- Yep, A.; Bejar, C.M.; Ballicora, M.A.; Dubay, J.R.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2004) *An assay for adenosine 5'-diphosphate (ADP)-glucose pyrophosphorylase that measures the synthesis of radioactive ADP-glucose with glycogen synthase*. Anal Biochem 324: p. 52-9.
- Zuccotti, S.; Zanardi, D.; Rosano, C.; Sturla, L.; Tonetti, M. y Bolognesi, M. (2001) *Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered bi bi catalytic mechanism for Escherichia coli glucose-1-phosphate thymidyltransferase*. J Mol Biol 313: p. 831-43.