

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mutaciones en la Fructosa-1,6-Bisfosfatasa de
los cloroplastos para modificar su afinidad por
metales y el pH óptimo de catálisis**

Autor: Alejandro Marcelo Senn

Director: Dr. Ricardo A. Wolosiuk

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires

Año 2007

Resumen

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) es una enzima que cataliza la hidrólisis de la fructosa 1,6-bisfosfato para dar fructosa 6 fosfato y fosfato inorgánico (EC 3.1.3.11). Pertenece a una familia de fosfomonoesterasas que se caracterizan por el requerimiento estricto de un metal bivalente (principalmente Mg^{2+}) que sirve como cofactor durante la catálisis. Además en mayor o menor medida todas son inhibidas por Li^+ .

En esta tesis se trabajó con la FBPasa de cloroplastos (CFBPasa) de colza que integra el ciclo de Benson-Calvin cuya función principal es la fijación del dióxido de carbono. La luz modula la actividad del ciclo en el estroma del cloroplasto mediante (a) procesos de óxido/reducción y (b) la variación de la concentración de iones y metabolitos (e.g. Mg^{2+} y pH). La CFBPasa es clave en este proceso de regulación pues su actividad resulta fuertemente modificada por todos los factores antes mencionados.

Nos propusimos investigar los mecanismos moleculares a través de los cuales la CFBPasa responde a las variaciones en las concentraciones de cationes y de pH. Para ello efectuamos dos ciclos de mutagénesis al azar y seleccionamos posteriormente las mutantes que exhibían un comportamiento diferente frente a la inhibición por Ca^{2+} . Previamente fue necesario desarrollar un nuevo método de screening de la actividad fosfatasa que se distinguiese de los métodos reportados anteriormente por utilizar el sustrato específico de la enzima.

Como resultado del screening funcional se obtuvieron principalmente tres mutantes, corroboradas por mutaciones sitio dirigida de la enzima nativa: 1) I271S: Presentó menor inhibición por Li^+ respecto a la enzima nativa y su pH óptimo de catálisis se desplazó hacia regiones más alcalinas, característica relevante en la forma oxidada de la enzima. 2) I271S/A107V: La incorporación de la mutación A107V revirtió el pH óptimo de catálisis al de la enzima nativa. 3) A107V: Esta mutante presentó una mayor afinidad por el Mg^{2+} mientras que las demás propiedades bioquímicas fueron similares a las de la enzima nativa.

El análisis de la posición estructural de las mutaciones y sus interacciones con el entorno nos llevó a postular fundamentalmente dos hipótesis: 1) Existe una hélice α que influye en el pKa del sitio activo. 2) Las interacciones hidrofóbicas de la Tyr305 (aminoácido que integra el motivo secuencial de las fosfomonoesterasas) son importantes para la regulación de la afinidad por metales.

Palabras clave: fosfomonoesterasas, fosfatasas, fructosa-1,6-bisfosfatasa, screening funcional, afinidad por metales, pH óptimo.

Abstract

Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of fructose 1,6-bisphosphate to fructose 6-phosphate and inorganic phosphate (EC 3.1.3.11). This enzyme belongs to a family of phosphomonoesterases that strictly require a bivalent metal (mainly Mg^{2+}) as a cofactor in catalysis. Moreover, all these enzymes are inhibited by Li^+ .

In the present study, we analyzed chloroplast rapeseed FBPase (CFBPase), a key enzyme of the Benson-Calvin cycle for the photosynthetic fixation of carbon dioxide. Light modulates the activity of the cycle in the chloroplast stroma through (a) redox processes and (b) changes in the concentration of ions and metabolites (e.g. Mg^{2+} and pH). CFBPase is critical in this process of regulation because its activity is modified by all the abovementioned factors.

We deemed it was desirable to investigate the molecular mechanisms involved in the response of CFBPase to variations in the concentrations of cations and pH. Therefore, we performed two cycles of random mutagenesis and selected variants that exhibited a different response to the inhibition by Ca^{2+} . To this end, we previously developed a novel method of screening for the phosphatase activity, distinguished from previously reported ones in the utilization of the enzyme's specific substrates.

As a result of the functional screening we obtained mainly three mutants, subsequently confirmed by site-directed mutagenesis of the native enzyme: 1) I271S: this variant was less inhibited by Li^+ than the native enzyme and its catalytic optimum pH shifted to more alkaline regions, a relevant feature in the context of the oxidized form of the enzyme 2) I271S/A107V: the incorporation of the mutation A107V reverted the catalytic optimum pH of the first mutation to that of the native enzyme 3) A107V: this mutant showed higher affinity for Mg^{2+} while other biochemical characteristics were similar to the native enzyme.

The analysis of the position and interactions of the mutated residues led us to postulate two main hypotheses: 1) an α -helix influences the pKa of the active site 2) the hydrophobic interactions of Tyr305 (an amino acid in the phosphomonoesterase motif) are important for the regulation of metal affinity.

Key words: phosphomonoesterases, phosphatases, fructose-1,6-bisphosphatase, functional screening, metal affinity, optimum pH.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Ricardo Wolosiuk quien me permitió ingresar a su laboratorio. Gracias a su trayectoria pudo crearse el espacio donde trabajé. Siempre tuve su apoyo para todas las iniciativas de trabajo que surgieron.

Mis compañeros de laboratorio también fueron algo fundamental. Roberto me dejó los materiales básicos y algunas sugerencias que resultaron determinantes para esta tesis. Paula me ayudó mucho durante los primeros tiempos en el laboratorio, aprendí de su energía y rectitud. Santiago me prestó gran ayuda fundamentalmente en la revisión de textos que tuve que presentar en inglés. Más allá de lo científico, sus comentarios sobre arte también resultaron enriquecedores. Fabiana con su presencia y buena disposición también hizo que ir al laboratorio resultara algo agradable. En lo cotidiano, con quienes más contacto tuve fue con Daniel y Martín. Con ellos no sólo aprendí de ciencia sino también de la vida en general. Compartir esto con todos mis compañeros llevó a construir lazos de afecto que ojalá permanezcan en el tiempo.

También compartí muchas cosas con otros becarios del Instituto durante los congresos y actividades diversas. Sería extenso nombrarlos a todos pero deben estar presentes en este agradecimiento.

El personal de mantenimiento y técnico del Instituto Leloir siempre tuvo la mejor disposición para resolver los problemas y hacer las tareas requeridas. Guillermo y Rodolfo asumieron gran prestancia a la hora de arreglar los materiales de trabajo. Marta realizó las secuenciaciones con mucha calidad y Gastón hizo que los trabajos en cromatografía resultaran fáciles con su conocimiento y humor habitual. Mónica y su equipo de la biblioteca siempre ofrecieron un servicio muy profesional para acceder a la bibliografía.

En lo económico debo agradecer a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por financiar el proyecto en general y al CONICET por otorgarme una beca para llevar a cabo el doctorado. La Fundación Instituto Leloir también fue fundamental por su apoyo económico y de infraestructura. Sin el aporte de todos estos organismos no se podría haber concluido la presente tesis.

Finalmente quiero mencionar a mi familia que ha sido un sostén durante todos estos años. Mis padres y mi hermana tienen gran influencia en lo que soy.

Índice

Resumen.....	III
Abstract.....	IV
Agradecimientos.....	V
Índice.....	VII
Abreviaturas.....	XI

Introducción

Función fisiológica de las FBPasas.....	3
Características funcionales y estructurales de las FBPasas.....	4
• Clasificación de las FBPasas.....	4
• Motivos estructurales en fosfomonoesterasas.....	6
• La estructura de la FBPasa de cerdo.....	8
Características generales.....	8
El sitio activo.....	11
Los sitios de inhibición.....	13
El loop dinámico 70.....	13
El loop N-terminal.....	14
Aspectos estructurales de la inhibición por AMP.....	15
Mecanismo de catálisis.....	16
• La estructura de la FBPasa de cloroplastos.....	18
Características generales.....	18
El sitio activo.....	19
El loop regulador 170.....	19
Aspectos estructurales de la regulación redox.....	20
• Comparación entre la regulación por AMP y la regulación redox.....	21
Bases para el análisis de la evolución dirigida de proteínas.....	21
• Introducción.....	21
• El paisaje de adaptación [64].....	24
• Descripción del paisaje de adaptación.....	25
• Exploración del paisaje de adaptación.....	27

Capítulo 1

Los metales como cofactores e inhibidores de la CFBPasa

Objetivo.....	33
Resultados.....	33
• Influencia del grado de purificación de la CFBPasa en sus propiedades bioquímicas.....	33
• Linealidad de la actividad CFBPasa en función del tiempo y de $[E]_t$	35
Linealidad en función del tiempo.....	36
Linealidad en función de $[E]_t$	37
Consecuencias prácticas.....	38
• Los metales bivalentes como cofactores de la CFBPasa.....	38
• Inhibición por Ca^{2+} y Li^+ de la CFBPasa.....	40
• El equilibrio entre FBP, Mg^{2+} y H^+	41
Consideraciones acerca de la aplicabilidad de las ecuaciones.....	42
Conclusiones.....	45

Capítulo 2

Nuevo método de screening de la actividad fosfatasa

Objetivo.....	49
Resultados.....	49
• Descripción del método de screening.....	49
A) Crecimiento de las bacterias.....	50
B) Inducción de la expresión proteica.....	50
C) Lavado.....	52
D) Catálisis.....	52
E) Revelado.....	54
• Utilización de distintas fosfatasas y sustratos.....	55
• Discriminación entre colonias que expresan la <i>phoA</i> y la CFBPasa.....	56
• Limitaciones del método para determinar las condiciones de catálisis.....	58
Conclusiones.....	59

Capítulo 3

Mutantes de CFBPasa obtenidas por técnicas de evolución dirigida

Objetivo.....	63
Resultados.....	63
• Ensayos preliminares para el experimento de evolución dirigida.....	63
1) Screening de la actividad CFBPasa en una biblioteca generada por mutaciones al azar.....	64
2) Análisis de la posición, la clase y la cantidad de mutaciones.....	67
• Generación de mutantes de CFBPasa más tolerantes a la inhibición por Ca^{2+}	69
A) Generación de mutaciones al azar.....	70
B) Transformación en <i>E. coli</i>	70
Primera generación de mutantes.....	70
C) Screening.....	71
D) Ensayos bioquímicos.....	72
E) Secuenciación.....	73
Segunda generación de mutantes.....	73
Identificación de la mutación relevante en MutCa.....	73
Construcción de distintas mutantes del sitio 271 y del sitio 270.....	73
Segundo ciclo de mutaciones al azar.....	74
A) Generación de mutaciones al azar.....	74
B) Transformación en <i>E. coli</i>	75
C) Screening.....	75
D) Ensayos bioquímicos.....	75
E) Secuenciación.....	75
Observaciones generales sobre la segunda generación de mutantes.....	77
Construcción de la mutante A107V.....	78
Conclusiones.....	79

Capítulo 4

Cambios en la afinidad por metales y pH en distintas mutantes de CFBPasa

Objetivo.....	83
Resultados.....	83
• “Inactivación” de distintas mutantes de CFBPasa por purificación a homogeneidad.....	83

• Termoestabilidad por dicroísmo circular.....	84
• Cambios en el pH óptimo de catálisis.....	85
Enzimas oxidadas.....	85
Enzimas reducidas.....	86
Explicación de la “inactivación” por purificación a homogeneidad.....	86
• Cambios en la afinidad por el FBP y el Mg ²⁺	87
Enzimas oxidadas.....	87
Enzimas reducidas.....	90
• La inhibición por Li ⁺	90
Inhibición a pH óptimo de catálisis.....	91
Inhibición a pH subóptimo de catálisis.....	93
Explicación de la dificultad para reducir I271S.....	93
Conclusiones.....	95
Discusión general	
• Ubicación de las mutaciones 107 y 271 en relación con el sitio activo.....	99
• Efectos estructurales de la mutación I271S.....	101
El dipolo de las hélices α y su efecto en el pKa de los aminoácidos.....	102
Interacción de la Ser271 con la región N-terminal de la hélice H7.....	102
• Efectos estructurales de la mutación A107V.....	104
Conservación de las hojas B1 y B3.....	104
El intercambio entre las hojas B1 y B2 en las CFBPasas.....	104
Interacción de la posición 107 con la Tyr305.....	105
Efecto de la mutación A107V en la afinidad por los metales.....	107
El sitio 107 en otras fosfomonoesterasas.....	108
• La conjunción de las mutaciones I271S y A107V.....	109
• Consideraciones finales.....	110
La inhibición por Li ⁺	110
El pH óptimo de catálisis.....	110
El fin de esta tesis.....	111
Materiales y Métodos	
Biología molecular.....	115
• Bibliografía general consultada.....	115
• El vector pTOTO1c.....	115
• Amplificación del ADN por PCR.....	116
• Mutagénesis sitio dirigida.....	116
• Introducción del vector en las bacterias.....	117
• Secuenciación del ADN.....	117
Bioquímica.....	118
• Expresión y extracción de la CFBPasa.....	118
• Purificación enzimática.....	118
Purificación parcial (columna DEAE)	118
Purificación completa (columna Superdex-.....	119
• Determinación de la concentración proteica.....	119
• Obtención de las formas oxidadas y reducidas de CFBPasa.....	119
• Medición de la actividad CFBPasa.....	120

Método con enzimas acopladas.....	120
Método de Chen.....	120
Adquisición de datos.....	121
Técnicas aplicadas a proteínas.....	121
• Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	121
• Detección inmunológica de proteínas inmovilizadas en membrana (Western Blot)	121
• Dicroísmo circular.....	121
• Screening de la actividad fosfatasa.....	122
• Modelado molecular.....	123
Direcciones de internet.....	124
Apéndice	
• Lista de Figuras.....	127
• Lista de Tablas.....	128
• Listado de las estructuras cristalográficas de la FBPassa.....	129
• Deducción de las ecuaciones que expresan las concentraciones de equilibrio entre FBPassa y Mg^{2+}	131
Referencias	
• Listado de las citas bibliográficas.....	141

Abreviaturas

2FP	fructosa 1,6-bisfosfato (forma lineal)
870	N-(7-(3-aminophenyl)-5-methoxy-1,3-benzoxazol-2-yl)-2,5-dichlorobenzenesulfonamide
A37	2,5-dichloro-N-(5-chloro-1,3-benzoxazol-2-yl)benzenesulfonamide
A74	2,5-dichloro-N-(5-methoxy-7-(6-methoxypyridin-3-yl)-1,3-benzoxazol-2-yl)benzenesulfonamide
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFP	alfa fructosa 1,6-bisfosfato
AHG	2,5-anhidroglucitol 1,6-bisfosfato
AHM	2,5-anhidromanitol 1,6-bisfosfato
AMP	adenosina monofosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BFP	beta fructosa 1,6-bisfosfato
CFBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos
CLI	3-(2-carboxy-ethyl)-4,6-dichloro-1H-indole-2-carboxylic acid
CPK	Corey, Pauling, Kulin
DEAE	diethylaminoethyl
dNTP	deoxirribonucleósidos trifosfato
DTT	ditiotreitól, reactivo de Cleland
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
F6P	fructosa 6 fosfato
FBP	fructosa 1,6-bisfosfato
FBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
FDP	fructosa 2,6-bisfosfato
IMPasa	inositol monofosfatasa
IPD	D-myo-inositol-1-phosphate
IPPasa	inositol polifosfato 1-fosfatasa
IPTG	isopropiltiogalactósido
LB	Luria-Bertani
MPD	2-Metil-2,4-Pentenediol
NBT	nitro blue tetrazolium
OII	3-(4-hydroxybenzyl)-2-(1-(((2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)amino)carbonyl)butyl)-4-oxo-3,6,11,11A-tetrahydro-4H-pyrazino(1,2-B)isoquinolin-2-ium-1-olate
PAPasa	3'-fosfoadenosina-5'-fosfatasa
PCR	polymerase chain reaction
PEP	fosfoenolpiruvato
PFE	(4-(3-(6,7-diethoxy-quinazolin-4-ylamino)-phenyl)-thiazol-2-yl)-methanol
phoA	fosfatasa alcalina
Pi	ortofosfato (PO_4^{3-})
PIPasa	3'-fosfoadenosina-5'-fosfatasa/inositol-1,4-bisfosfatasa
PNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
SDS	dodecilsulfato de sodio
pb	pares de bases
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Introducción

El estudio de las enzimas posee un interés especial porque abarca la frontera donde la biología limita con la física. La vida para poder expresarse depende de una compleja red de reacciones químicas catalizadas por enzimas específicas cuya modificación estructural causa profundas alteraciones en el organismo. Por otra parte, la característica de catalizador ha recibido gran atención de los físico-químicos por cuanto los precisos mecanismos de acción constituyen en sí mismo uno de los aspectos más fascinantes de la investigación científica.

La mayoría de las enzimas requiere frecuentemente iones metálicos como cofactores para reacciones catalíticas como hidrólisis, reducción-oxidación, isomerización. En particular, los elementos de transición (Fe, Cu, Mn) forman parte integral de las proteínas implicadas en procesos redox para la transferencia de electrones mientras que los iones alcalinos y alcalinos-térreos (Na(I), K(I), Ca(II)) participan en la transducción de señales que inicia las respuestas celulares. Además, los cationes divalentes (e.g. Mg(II), Ca(II), Zn(II)) estabilizan el plegamiento de las proteínas adecuando la conformación a un rol fisiológico. Claramente, los iones metálicos son requeridos para el crecimiento de todos los organismos vivos porque constituyen una parte integral e indispensable en una amplia variedad de funciones asociadas a los procesos vitales: respiración, fotosíntesis, reproducción, metabolismo intermedio.

Los mecanismos propuestos para la catálisis mediada por iones metálicos derivan fundamentalmente de los estudios cristalográficos de complejos ternarios proteína-ion-producto (sustrato) y fueron extendidos a una serie de enzimas carentes de estudios estructurales detallados. En consecuencia, la sustitución (eliminación) de residuos que participan en la catálisis suministra un material cuyo estudio dinámico revela la plausibilidad de las propuestas.

En compuestos orgánicos y proteínas, las metaloproteínas que transfieren o liberan grupos fosforilo o acilo requieren Mg(II), Ca(II) y/o Zn(II) como cofactor para hacer eficiente el proceso catalítico. En particular, las fosfatasas exhiben en su estructura varios sitios para los iones metálicos implicados en la escisión de la unión –O–P– de numerosos compuestos.

Función fisiológica de las FBPasas

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) cataliza la hidrólisis de la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) a fructosa 6 fosfato (F6P) y fosfato inorgánico (Pi) (EC 3.1.3.11) en una reacción que requiere estrictamente la presencia de un metal bivalente (e.g. Mg²⁺, Mn²⁺) (Figura 1).

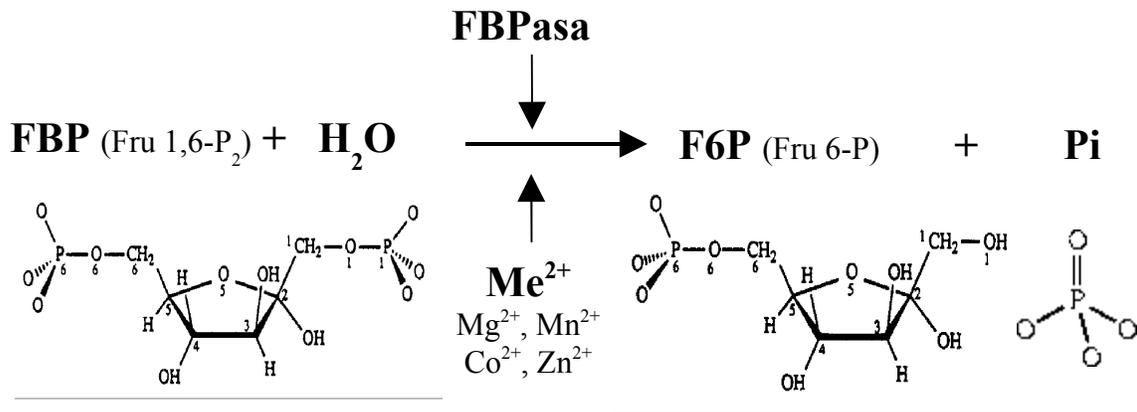


Figura 1. La reacción FBPasa.

Es una enzima clave en la gluconeogénesis. Se inhibe con AMP y FDP en un sitio alostérico y en el sitio activo respectivamente mientras que simultáneamente se activa su contraparte en la glicólisis, la fructosa-6-fosfato 1-quinasa [1].

Por otra parte, la FBPasa de cloroplastos (CFBPasa) participa en el ciclo de Benson-Calvin a través del cual se produce la asimilación fotosintética del dióxido de carbono. La CFBPasa, entre otras enzimas del ciclo, es clave en la regulación del mismo. Esta regulación se consigue principalmente a través de dos mecanismos, ambos vinculados con la luz [2, 3]:

a) Procesos de óxido/reducción. El sistema fotosintético captura la luz e inicia una serie de intercambios redox que finalmente, por el sistema Ferredoxina/Tiorredoxina, produce la reducción y consecuente activación de las correspondientes enzimas [4].

b) Concentración de iones y metabolitos. La iluminación de los cloroplastos genera gradientes iónicos con los consiguientes cambios en la concentración de iones y metabolitos. Dos eventos en el estroma, los incrementos del pH (7 → 8) [5] y la concentración de Mg²⁺ [6, 7], son factores determinantes para la actividad de la CFBPasa.

Características funcionales y estructurales de las FBPasas

Clasificación de las FBPasas

El análisis filogenético de las secuencias en distintos genomas permite clasificar las FBPasas en cinco grupos (Tabla 1). Aunque inicialmente se propuso la existencia de 3 grupos (FBPasa I, II y III) para el dominio Bacteria [8], se postuló posteriormente la existencia del grupo IV [9] y finalmente el V [10, 11].

FBPasa I: Agrupa principalmente a las bacterianas y eucarióticas que exhiben el típico plegamiento azúcar-fosfatasa con una estructura cuaternaria tetramérica. No tienen actividad IMPasa. En general, el monómero consiste de cinco capas alternantes de hélices α y hojas β formando una estructura $\alpha / \beta / \alpha / \beta / \alpha$. (Scop 56654 nivel “Fold”).

FBPasa II: Un representante de este grupo es la proteína producida por el gen *glpX* de *E. coli* [8] la cual fue cristalizada (1ni9). Aunque tiene el mismo plegamiento azúcar fosfatasa, ciertas diferencias menores y la estructura cuaternaria dimérica la ubican en una familia distinta (Scop 90087 nivel “Family”).

FBPasa III: El producto del gen *yydE* de *Bacillus subtilis* fue considerado el primer ortólogo de este grupo [14]. La ausencia del motivo estructural FBPasa (ver más adelante) en este grupo, y en las FBPasas II, sugiere que no existe relación filogenética con las FBPasas I.

FBPasa IV: Agrupa principalmente a las enzimas presentes en Archaea que tienen una doble actividad, IMPasa y FBPasa, y a las enzimas de bacterias hipertermófilas. Este grupo se usó inicialmente para buscar genes homólogos a las FBPasas típicas en el genoma de los organismos extremófilos. La búsqueda fue infructuosa hasta que una combinación de herramientas funcionales y estructurales identificó al gen MJ0109 de *Methanococcus jannaschii* cuyo producto, una enzima con doble actividad IMPasa/FBPasa, fue cristalizado (1DK4) [15]. La cristalización posterior de otra enzima con características parecidas (1LBZ; gen AF2372 de *Archaeoglobus fulgidus* [16]), reveló un plegamiento similar a las FBPasas tipo I.

Grupo	COG	Dominio	Monómero (kDa)	Oligomerización	Plegamiento (Scop)
I	0158	Bacteria, Eukarya	~38	Tetramero	Azúcar fosfatasa (56654)
II	1494	Bacteria	~36	Dímero	Azúcar fosfatasa (56654)
III		Bacteria	~76	Tetramero	
IV	0483	Archaea, Bacteria	~28	Dímero	Azúcar fosfatasa (56654)
V	1980	Archaea, Bacteria	~41	Octámero	Sulfolobus FBPasa (111248)

Tabla 1. Clasificación de las FBPasas. Se muestran los cinco grupos de FBPasas según la clasificación filogenética por Clusters of Orthologous Groups (COG) [12]. En la columna de Plegamiento se indica entre paréntesis el código en el nivel de clasificación “Fold” según la *Structural Classification of Proteins* (SCOP) [13] (para ambas clasificaciones ver direcciones de Internet en Materiales y Métodos). El Dominio y la Oligomerización corresponden a los principales miembros de cada grupo. Parte de la tabla fue tomada del trabajo de Verhees et al. [9].

FBPasa V: Actualmente se considera que las FBPasas *bona fide* de Archaea pertenecen a este grupo. Aunque la enzima de *Thermococcus kodakaraensis* (gen Tk-fbp) fue la primera FBPasa de Archaea identificada por su estricta especificidad por el sustrato [10], posteriormente fue cristalizado el producto del gen ortólogo de *Sulfolobus tokodaii* (1UMG). Estas proteínas, estructuralmente diferentes a las enzimas anteriores son representantes del nuevo plegamiento “Sulfolobus FBPasa” (Scop 111248 nivel “Fold”). Presentan una estructura cuaternaria octamérica y el plegamiento tiene 4 capas α - β - β - α . Sin embargo, el sitio activo revelaría un mecanismo de catálisis parecido al de las otras FBPasas [17].

Motivos estructurales en fosfomonoesterasas

Las estructuras cristalográficas de la FBPasa [18, 19], la IMPasa [20], la IPPasa [21] la PAPasa [22] y la PIPasa [23] revelan que el típico plegamiento azúcar fosfatasa es compartido por muchas fosfatasas. Estas fosfomonoesterasas tienen un bajo porcentaje de identidad en la estructura primaria pero presentan un motivo de secuencia común Asp-Pro-(Ile o Leu)-Asp-(Gly o Ser)-(Thr o Ser) (aminoácidos 118 a 123 en la FBPasa de riñón de cerdo). Las coordenadas de los carbonos α de estos seis aminoácidos fueron utilizadas como punto de partida para el alineamiento tridimensional de las fosfatasas antes mencionadas [24]. Como resultado se obtuvo un “core” estructural común formado por 5 hélices α y 11 hojas β lo que permitió además detectar la siguiente secuencia consenso:

**Asp(74)-Xaa₂₂₋₂₄-Glu(97)-Glu(98)-Xaa₁₅₋₂₃ o Xaa₆₈₋₇₂- Asp(118)-
Pro(119)-(Ile o Leu)(120)-Asp(121)-(Gly o Ser)(122)-(Thr o Ser)
(123)-Xaa₁₁₅₋₁₂₃ o Xaa₁₄₀₋₁₅₇)-(Trp o Tyr)(279)-(Asp o Glu)(280)-Xaa₁₁-
Gly(292)-Gly(293)**

donde Xaa representa una determinada cantidad de residuos y el número entre paréntesis la posición en la FBPasa de cerdo.

Es interesante observar la conservación del plegamiento a pesar de la gran divergencia en la secuencia aminoacídica. Aunque presentan especificidad por sustratos diferentes, estas enzimas tienen semejanzas en sus propiedades catalíticas pues necesitan estrictamente un metal bivalente (principalmente Mg^{2+}) para hidrolizar el fosfato y, además, son sensibles a la inhibición por Li^+ . Estas características sugieren que la conservación del “core” estructural se relaciona con la función catalítica mientras que los loops y las regiones fuera del mismo están

vinculados con los dominios regulatorios y de unión al sustrato. De esta forma, la mayor parte de los aminoácidos de la secuencia consenso forman los sitios de unión a metal o participan en el mecanismo de catálisis mientras que los restantes aminoácidos, que unen el sustrato o participan en la regulación enzimática, no están conservados. Por ello, ha sido sugerida la existencia de una familia de proteínas denominada “fosfomonoesterasas dependientes de Mg^{2+} e inhibibles por Li^+ ” [24]. En particular, la Figura 2 muestra el alineamiento tridimensional de cinco aminoácidos y dos iones metálicos del sitio activo de una FBPasa, una IMPasa y una IPPasa. Puede observarse que los residuos adoptan una conformación similar y coordinan a los iones metálicos de una manera parecida [25].

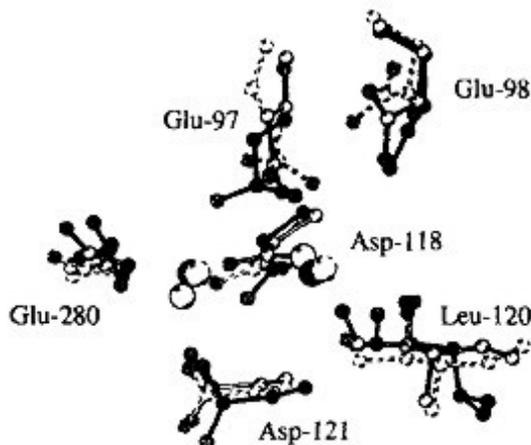


Figura 2. Superposición del sitio activo de una FBPasa, una IMPasa y una IPPasa [25]. Para la superposición se utilizaron las coordenadas de los carbonos \square de los aminoácidos del sitio activo que se muestran en la figura y las coordenadas de los dos metales. La numeración corresponde a los aminoácidos de la FBPasa de cerdo. Los átomos en negro son los de la FBPasa, en blanco los de la IMPasa y en líneas punteadas los de la IPPasa.

Más específicamente, existe un motivo estructural que identifica la actividad FBPasa. La secuencia consenso (PS00124), tomada de la base de datos Prosite, es la siguiente:

(Ala o Gly)-(Arg o Lys)-(Leu o Ile)-Xaa₁ o Xaa₂-(Leu o Ile o Val)-(Phe o Tyr)-Glu-Xaa₂-Pro-(Leu o Ile o Val o Met)-(Gly o Ser o Ala)

Este motivo se encuentra en las FBPasas de tipo I, que incluye a las eucariotas, pero no en el resto de las FBPasas. La Figura 3 ubica en la secuencia primaria de varias FBPasas eucariotas tanto al motivo fosfomonoesterasa como al motivo FBPasa.

La estructura de la FBPasa de cerdo

Características generales

Gran parte de las estructuras cristalográficas disponibles de FBPasas corresponden a las enzimas citoplasmáticas de riñón y de hígado de cerdo (*Sus scrofa*) (ver listado de las

estructuras cristalográficas de la FBPasa en el Apéndice). Ambas proteínas comparten la misma secuencia de aminoácidos aunque las correspondientes secuencias de nucleótidos presentan algunas diferencias [26].

La FBPasa de cerdo es una enzima homotetramérica de forma relativamente chata [27] en la cual el polipéptido contiene 337 aminoácidos (36,5 kDa) [28]. Cada subunidad se compone de un dominio regulador y un dominio catalítico. El dominio regulador, constituido por la primera capa de hélices α y la primera capa de hojas β , contiene un sitio alostérico de unión a AMP (inhibidor de la enzima) en la región del loop que une la hélice α 1 con la 2. El dominio catalítico contiene por su parte el sitio de unión al sustrato FBP ubicado relativamente lejos del sitio de AMP (ca. 30 Å) y en la cara opuesta de la molécula [29] (Figura 4A).

En la estructura tetramérica los monómeros se disponen estructural y funcionalmente como un dímero de dímeros. Las dos subunidades de un dímero están relacionadas por una rotación de 180° alrededor del eje molecular z. El sitio activo se encuentra en la interfase que une ambos monómeros y en caras opuestas de la molécula. Más aún, la Arg243 de un monómero se une al oxígeno del fosfato 6 del sustrato del monómero adyacente [32]. Estudios con desnaturalizantes probaron que el proceso de desplegamiento del tetrámero involucra varias etapas una de las cuales es la formación del dímero antes de la obtención del monómero desplegado [33] (Figura 4B).

Figura 3. Alineamiento estructural entre diferentes FBPasas. (página siguiente) Se usaron las secuencias de las formas maduras de las FBPasas del cloroplasto de colza (*Brassica napus*), espinaca (*Spinacia oleracea*), arveja (*Pisum sativum*) y la FBPasa citoplasmática de riñón de cerdo (*Sus scrofa*) (GenBank accession L15303, L76555, L34806 y M86347 respectivamente). El alineamiento de los residuos con estructura secundaria entre la FBPasa de espinaca y la de cerdo corresponde al informado por Villeret et al. [30]. Los aminoácidos que forman parte de hélices α (identificadas con una H) u hojas β (identificadas con una B) se encuentran recuadrados y son los mismos que se representan esquemáticamente en la Figura 4A. Se resaltan con colores los aminoácidos del sitio activo listados en la Tabla 2. El motivo FBPasa (PS00124) es el informado por la base de datos Prosite (ver dirección de Internet en Materiales y Métodos) [31]. Asimismo se indican los residuos que forman la secuencia consenso para la familia de fosfomonoesterasas "dependientes de Mg^{2+} e inhibibles por Li^+ " según lo propuesto por York et al. (motivo fosfomonoesterasa) [24].

	1		11		21		31		41						
			9		19		29		39						
			7		17		27		37						
					9	H1	19		H2 29						
Colza	AVAADATAAET	KPAAKKKSGY	ELQ	TLTSWLL	RQEMKG	EID	T	ELTIVMSSIA							
Espinaca	AAVGAAAT	QTKARTRSKY	EIE	TLTGWLL	KQPMAG	VID	A	ELTIVLSSIS							
Arveja	MAVKEA	TSETKKRSGY	EII	TLTSWLL	QQEQKG	IID	A	ELTIVLSSIS							
Cerdo		TDQAAFDT	NIV	TLTRFVM	EGRKA	RG	T	EMTQLLNSLC							
	51	61	71	81	91										
	49	59	69	79	89										
	47	57	67	77	87										
	39	49	59	69	79	H3									
Colza	MACKQIASLV	QRAGISNLTG	VQGAVNIQGE	DQK	KLDVVS	N	E	VFVSNCLRSS							
Espinaca	LACKQIASLV	QRAGISNLTG	IQGAVNIQGE	DQK	KLDVVS	N	E	VFVSNCLRSS							
Arveja	MACKQIASLV	QRANISNLTG	TQGAVNIQGE	DQK	KLDVIS	N	E	VFVSNCLRSS							
Cerdo	TAVKAISTAV	RKAGIAHLYG	IAGSTNVTG	D	QVK	KLDVLS	N	DLVINVLKSS							
	101	111	121	131	141										
	99	109	119	129	139										
	97	107	117	127	137										
	89	99	109	119	129	H4		B4							
Colza	GRT	GIIA	SEE	EDVP	VAVE	ES	YSGN	YVVVFD	PLDG	SSNIDA	AVS	TGSIFGI			
Espinaca	GRT	GIIA	SEE	EDVP	VAVE	ES	YSGN	YIVVFD	PLDG	SSNIDA	AVS	TGSIFGI			
Arveja	GRT	GIIA	SEE	EDVP	VAVE	ES	YSGN	YIVVFD	PLDG	SSNLDA	AVS	TGSIFGI			
Cerdo	FAT	CVLV	S	E	DKNA	IIVE	PE	KRKG	YVVC	D	P	LDG	SSNIDC	LVS	IGTIFGI
	151	161	168	178	188										
	149	159	168	178	188										
	147	157	167	177	187										
	139			152	162	H5		B5							B6
Colza	Y	SPNDECLPD	SDDTS...AL	GSEEE	RCIVN	VCQ	PGNLLA	AGYCMY	SSSV						
Espinaca	Y	SPNDECIVD	S.DHDD	ESQL	SABEE	QRCVVN	VCQ	PGD	NLLA	AGYCMY	SSSV				
Arveja	Y	SPNDECLPD	FGDDSD	DNTL	GTEE	QRCIVN	VCQ	PGS	NLLA	AGYCMY	SSSV				
Cerdo	Y	RKNSTDEPS		EKD	ALQ	PGR	NLVA	AGYALY	GSA	T				
	198	208	218	228	238										
	198	208	218	228	238										
	197	207	217	227	237										
	172	182	192	202	212										H6
Colza	IFVLT	LGKGV	FAFTLD	PMYG	EFVLTQEN	IE	IPKAG	KIYS	F	NEGNY	QMWD	E			
Espinaca	IFVLT	IGKGV	YAFTLD	PMYG	EFVLTSEK	IQ	IPKAG	KIYS	F	NEGNY	KMWP	D			
Arveja	IFVLT	IGKGV	FVFTLD	PLYG	EFVLTQEN	LQ	IPKSG	KIYS	F	NEGNY	KLWD	E			
Cerdo	MLVLA	MVNGV	NCFMLD	PAIG	EFILVDRD	VK	IKKKG	SIYS	I	NEG	YAKE	F	D		
	248	258	268	278	288										
	248	258	268	278	288										
	247	257	267	277	287										
	222	232	242	252	262										
Colza	NLKKYIDDLK	D	PGPSGKP	YS	ARYIG	SLVGD	FHRTLLY	G	GI	YGY	PRDAKSK				
Espinaca	KLKKYMDDLK	E	PGESQKP	YS	SRYIG	SLVGD	FHRTLLY	G	GI	YGY	PRDAKSK				
Arveja	NLKKYIDDLK	E	PGPSGKP	YS	ARYIG	SLVGD	FHRTLLY	G	GI	YGY	PRDKKSK				
Cerdo	AITEYIQRKK	F	PPDNSAP	YG	ARYVG	SMVAD	VHRTL	VY	G	GI	FMYP	PANKKSP			
	298	308	318	328	338										
	298	308	318	328	338										
	297	307	317	327	337										
	272	282	292	302	312										
Colza	NGKLRLL	YEC	APMSFIVEQA	GG	KGS	DGHHR	VLDIQPTEIH	QRVP	LYIG	S	K				
Espinaca	NGKLRLL	YEC	APMSFIVEQA	GG	KGS	DGHQR	ILDIQPTEIH	QRVP	LYIG	S	V				
Arveja	NGKLRLL	YEC	APMSFIVEQA	GG	KGS	DGHQR	VLDIQPTEIH	QRVP	LYIG	S	T				
Cerdo	KGKLRLL	YEC	NPMAYVMEKA	GG	LAT	TGKEA	VLDIVPTDIH	QRAP	IILG	S	P				
	348	348	347	322											
Colza	E	EVEKLEKYL	A												
Espinaca	E	EVEKLEKYL	A												
Arveja	E	EVEKVEKYL	A												
Cerdo	E	DVTELELEIY	Q	KHAAK											

	Unión al sustrato
	Unión al fosfato
	Unión a metal
	Motivo FBPasa
	Motivo fosfomonoesterasa

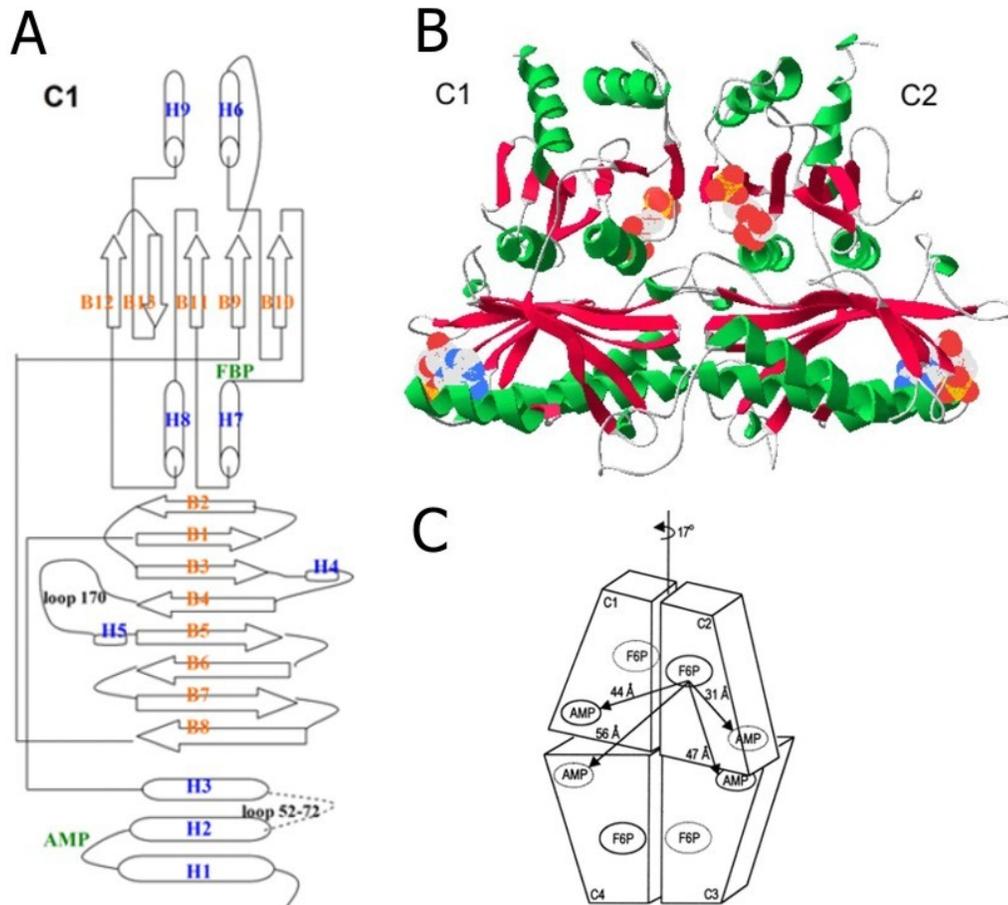


Figura 4. Estructura tridimensional de la FBPasa eucariota. (A) Monómero. Representación esquemática por capas estructurales. La numeración de las hélices \square (letra H) y de las hojas β (letra B) es la misma que se utiliza en la Figura 3. Se indican el sitio catalítico (FBP), el loop catalítico 52-72, el loop regulatorio 170 (sólo en la enzima de cloroplasto) y el sitio de inhibición alostérica (AMP, sólo en la enzima citoplasmática). **(B) Dímero.** Imagen generada con el programa Swiss-PdbViewer (v3.7) a partir de la estructura cristalográfica de una FBPasa de cerdo (PDB ID: 1EYK [29]). Las hélices \square se muestran en verde y las hojas β en rojo para destacar la estructura en capas $\square / \beta / \square / \beta / \square$ típica de las "fosfomonoesterasas dependientes de Mg^{2+} e inhibibles por Li^{+} ". La F6P (en el sitio catalítico) y el AMP se representan a través de sus superficies de Van der Waals usando los códigos de color CPK. **(C) Tetramero.** Esquema de la forma T tomado del trabajo de Choe et al. [29]. Los monómeros se numeran en el sentido de las agujas del reloj (C1, C2, C3 y C4). Se muestra la rotación (17°) del dímero C3C4 relativa al dímero C1C2 existente entre la forma T (inactiva) y R (activa). Las líneas punteadas representan los sitios de unión en la cara oculta de la molécula. Las distancias se miden entre el átomo C-2 de la F6P del monómero C2 y los átomos C-1' de las cuatro moléculas de AMP presentes en el tetramero.

El tetrámero formado por la unión de los dímeros a través de las hélices H1, H2 presenta una simetría D_2 . Por convención los monómeros se identifican como C1, C2, C3 y C4 en el sentido de las agujas del reloj en el cual C1C2 forman el dímero superior y C3C4 el inferior. Un aspecto importante de la estructura cuaternaria es el establecimiento de dos estados conformacionales, R y T, vinculados con la forma activa e inactiva de la enzima, respectivamente. El dímero inferior C3C4 de la forma T presenta una rotación de 17° respecto al dímero superior C1C2 [34] (Figura 4C).

El sitio activo

Las estructuras cristalográficas permitieron identificar los aminoácidos que forman el sitio activo. Para ello se ha cocrystalizado la FBPasa con análogos de sustrato {AHG (1FBC [35]), AHM (1FBF [35])}, el inhibidor fisiológico {FDP (1FPB [36], 1FRP [37])}, y los productos de catálisis F6P y Pi (1CNQ [32]). Los datos provenientes de la última estructura sirven de base para la descripción siguiente (Tabla 2).

El sitio activo puede dividirse en tres partes:

a) Región del fosfato 6: La mayor parte de los aminoácidos que unen al sustrato FBP (o al producto F6P) lo hacen a través de puentes de hidrógeno con oxígenos del fosfato 6 (Asn212, Tyr215, Arg243, Tyr244, Tyr264, Lys274).

b) Región del anillo furanosa: Los aminoácidos vinculados directamente con el anillo son: Asp121, Met248 y Lys274.

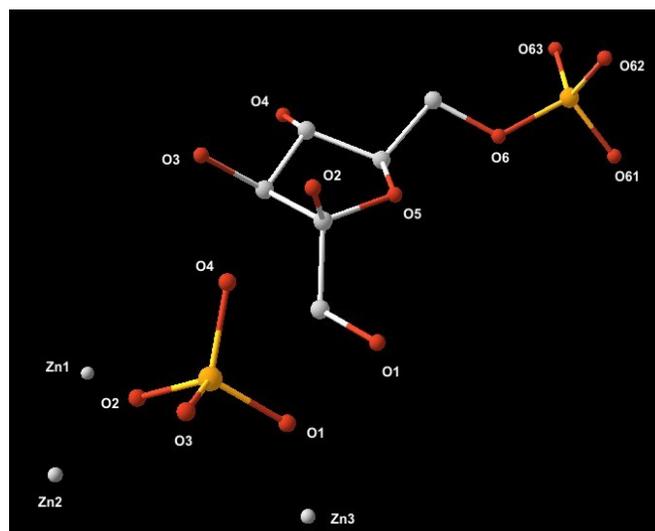
c) Región del fosfato 1 y de los metales: Aunque pueden distinguirse tres sitios de metal constituidos por aminoácidos diferentes, existen aminoácidos que son compartidos por dos sitios. Por ejemplo, los oxígenos del carboxilato del Asp118 participan en los sitios 1 y 2 y los del Glu97 hacen lo propio con los sitios 2 y 3. Al mismo tiempo el Pi (producto de la hidrólisis) participa en enlaces coordinados con los tres cationes y con los hidroxilos 1 y 2 de la F6P. Realmente los tres metales, los productos de reacción (F6P, Pi) y las cadenas laterales interactuantes de la FBPasa se encuentran vinculados por una intrincada red de puentes hidrógeno. La mayor parte de los aminoácidos vinculados con los sitios de metales tienen su contraparte en otras fosfomonoesterasas, lo cual sugiere ciertas analogías en el mecanismo de hidrólisis del fosfato mediado por metales bivalentes (ver el motivo fosfomonoesterasa en la Figura 3). En cambio, no ocurre lo mismo con los aminoácidos implicados con el sitio de FBP, dada la diferente especificidad de sustratos que presenta esta familia.

A

Ligando Contacto (Å)Zn²⁺(sitio 1)
 Asp118 OD1 2.04 Asp121 OD1 2.20
 Glu280 OE1 2.17 Pi O2 1.88 (sitio
 2)Glu97 OE1 2.13 Asp118 OD2 2.16
 Leu120 O 2.15 Pi O2 2.36 Pi O3 2.17
 (sitio 3)Asp68 OD2 2.19 Glu97 OE2
 2.32 Pi O1 1.97 Pi O3 2.57 Pi O1
 Arg276 NH2 2.79 Zn²⁺ (site 3) 1.97
 F6P O1 2.73 O2 Zn²⁺ (site 1) 1.88
 Zn²⁺ (site 2) 2.36 O3 Zn²⁺ (site 2)
 2.17 Zn²⁺ (site 3) 2.57 Wat 615 2.72
 O4 Gly122 N 2.86 Ser123 N 2.89 F6P
 O2 2.84 F6P O1 Pi O1 2.73 O2 Pi O4
 2.84 Wat 563 2.99 Wat 592 2.71 O3
 Asp121 OD1 2.71 Met248 N 2.91 O4
 Wat 538 2.74 O5 Lys274 NZ 3.05 O6
 Lys274 NZ 3.03 Wat 604 3.10 O61
 Tyr215 OH 2.64 Tyr264 OH 2.70 Wat
 576 2.87 O62 Arg243* NH2 2.82 Wat
 604 2.57 O63 Asn212 ND2 2.95
 Tyr244 OH 2.72

B

Aminoácido	
Cerdo	ColzaLigando
Glu80Zn ²⁺ (sitio 3)	Glu97 OE1 Glu109Zn ²⁺ (sitio 2)
	Glu97 OE2 Glu109Zn ²⁺ (sitio 3) Asp118 OD1
Asp130Zn ²⁺ (sitio 1)	Asp118 OD2 Asp130Zn ²⁺ (sitio 2)
	Leu120 O Leu132Zn ²⁺ (sitio 2) Asp121 OD1
	Asp133Zn ²⁺ (sitio 1) Asp121 OD1 Asp133FO3
Gly122 N	Gly134PiO4 Ser123 N Ser135PiO4Asn212
	ND2 Asn238FO63 Tyr215 OH Asn241FO61
	Arg243* NH2 Arg269FO62 Tyr244 OH
	Tyr270FO63Met248 N Leu274FO3Tyr264 OH
	Tyr290FO61Lys274 NZ Lys300FO5 Lys274 NZ
	Lys300FO6 Arg276 NH2 Arg302PiO1 Glu280 OE1
	Glu306Zn ²⁺ (sitio 1)

C

En contraposición, los aminoácidos Asp74 y Glu98 que aparecen en la secuencia consenso de estas fosfomonoesterasas no están coordinados directamente con ningún ligando de la FBPassa, pero son cruciales en el mecanismo de catálisis (ver más adelante).

Los sitios de inhibición

El AMP es el inhibidor más estudiado de la FBPassa gluconeogénica para el cual existe un sitio alostérico en la región del loop que conecta las hélices H1 y H2. Los residuos que coordinan al AMP están bien identificados [27, 38]. Otros compuestos de bajo peso molecular utilizan el mismo sitio del AMP para su acción inhibitoria: miembros de la familia de heteroaril fosfonatos [39] y ácidos dicarboxílicos indólicos [40] mientras que derivados de la benzoxazol benzenosulfonamida bloquean el sitio pero no lo ocupan completamente [41, 42].

Recientemente se ha descubierto un nuevo sitio de inhibición. Compuestos derivados de la anilinoquinazolina se unen a la interfase de los monómeros C1C2. Tiene especial relevancia la interacción π -stacking con la His55 y con la Lys50 lo cual perturba al loop 70 (ver más adelante) provocando la inhibición [43]. Posteriormente se encontraron otros inhibidores químicamente distintos pero que se unen al mismo sitio [44].

El loop dinámico 70

Esta estructura conecta las hélices H2 y H3 en la región que contacta los dímeros del tetramero (aminoácidos 52-72). Numerosos estudios cristalográficos establecieron la existencia de tres estados conformacionales estrechamente vinculados al proceso catalítico:

- a) **Conformación enganchada** (*engaged conformation*). Los productos de reacción y los metales, pero en ausencia de AMP, promueven la existencia de este estado conformacional. Su formación fue detectada en la estructura de la FBPassa cristalizada

Tabla 2. Lista de los aminoácidos que conforman el sitio activo de la FBPassa. (página anterior) Se muestra lo informado por Choe et al. [32] teniendo en cuenta los datos cristalográficos de la FBPassa de cerdo (PDB ID 1CNQ) **(A)** Listado de los átomos de contacto de los ligandos Zn^{2+} , fosfato (Pi) y F6F. "Wat" indica molécula de agua y Arg243* que corresponde al aminoácido del monómero adyacente. Se muestra en Å la distancia de contacto. **(B)** Listado en orden ascendente de los aminoácidos que conforman el sitio catalítico. En la segunda columna se muestran los correspondientes aminoácidos de la FBPassa de cloroplasto de colza según surge del alineamiento de secuencias (Figura 3). **(C)** Imagen de los ligandos generada con el programa Swiss-PdbViewer (v3.7) a partir de la misma estructura cristalográfica utilizando el código de colores CPK. Se muestran los 3 sitios de metal (ocupados por el Zn^{2+}), el Pi y la F6F. Asimismo cada átomo se rotula según la nomenclatura adoptada en las listas anteriores.

con F6P, Pi y Zn^{2+} (PDB ID 1CNQ) [32] mostrando que la Tyr57 permanece en un bolsillo hidrofóbico y el Asp68 participa en la formación del sitio 3 de unión a metales. Los estudios de fluorescencia en la mutante Tyr57Trp confirmaron la sensibilidad de los estados conformacionales del loop a distintas condiciones experimentales [45].

- b) **Conformación desenganchada** (*disengaged conformation*). Esta conformación característica de los complejos de la FBPasa con el AMP aleja el loop del sitio activo. En ella los residuos 52-60 interactúan con el loop 187-195 y los residuos 9-11 de la subunidad adyacente (interacción C1↔C2) pero los residuos 61-73 permanecen desordenados [29].
- c) **Conformación desordenada** (*disordered conformation*). Esta conformación se obtiene cristalizando las FBPasas en ausencia de metales [18, 19]. Incluye distintas conformaciones estrechamente relacionadas donde el loop interactúa débilmente con el resto de la enzima y los residuos 54-73 no muestran una clara densidad electrónica.

En todas las estructuras de la FBPasa reportadas hasta el momento, el loop dinámico se encuentra en la conformación enganchada o desordenada cuando la enzima está en el estado R (activo) y en la conformación desenganchada o desordenada cuando está en el estado T (inactivo).

Se ha postulado que la catálisis procede a pH neutro sólo si el loop dinámico cicla entre la conformación enganchada y la desordenada. Esta alternancia impide que la permanencia del loop en la conformación enganchada constituya un complejo *dead-end* mientras que si se encontrara siempre en la conformación desordenada mostraría una baja afinidad por los metales y poca o nula actividad a pH neutro. Por lo tanto, el estado R debe mantener una reducida diferencia entre las energías libres de ambas conformaciones. Por el contrario, el estado T estabiliza la conformación desenganchada despoblando las otras. En definitiva, los niveles de actividad de la enzima estarían vinculados con la diferencia de energía libre existente entre las conformaciones <enganchada / desordenada> y la <desenganchada> [46].

El loop N-terminal

En la FBPasa de cerdo, el loop N-terminal comprende los primeros 10 aminoácidos, constituye una región relativamente variable entre distintas FBPasas, y presenta muy poca

densidad electrónica en las estructuras cristalográficas. La remoción o mutación de la misma induce marcados cambios en las propiedades cinéticas de la enzima. Previsiblemente la delección de los 25 primeros aminoácidos (mutante 25DEL) elimina la inhibición por AMP debido a la destrucción de su sitio de unión [47].

En cambio, la remoción de los 10 primeros aminoácidos (mutante 10DEL) no afecta al sitio de unión a AMP ni su unión a la enzima pero reduce considerablemente la inhibición, indicando la alteración del mecanismo de inhibición alostérico. Congruente con esta idea, la mutante I10D (ver más adelante) revela que la Ile10 es un residuo importante en el mecanismo alostérico en tanto los primeros 6 aminoácidos no tendrían ningún rol funcional [46]. Además de baja inhibición por AMP, la mutante 10DEL presenta baja afinidad por Mg^{2+} , menor k_{cat} y su máximo de actividad está desplazado hacia un pH más alcalino. Estas características son parecidas a las de la FBPasa obtenida en purificaciones anteriores al año 1971, indicando que dichas preparaciones eran un “artefacto” producto de la proteólisis parcial durante la purificación. Confirmando esta idea, la proteólisis controlada transforma la forma “neutra” (pH máximo: 7,6) en “alcalina” (pH máximo: 8,4 - 9,4) [48, 49]. Recientemente esta región N-terminal de la hélice H1 ha sido propuesta como el sitio de unión de PEP en la FBPasa de *E. coli* [50]. Se postula que PEP es un regulador fisiológico que desbloquea la inhibición por AMP [51].

Aspectos estructurales de la inhibición por AMP

La incorporación del AMP en el sitio de inhibición alostérico de la forma R (forma activa, ausencia de rotación del dímero C1C2 respecto al dímero C3C4) produce la estabilización de la forma T (forma inactiva, el dímero C1C2 rota 17° respecto al dímero C3C4) (Figura 4).

Los eventos iniciales de la inhibición fueron estudiados con la mutante A54L por cuanto el C β de Ala54 localiza en el centro de un cluster hidrofóbico de cadenas laterales formado cuando el loop 52-72 se encuentra en la conformación desenganchada de la forma T. Por lo tanto, un residuo voluminoso en la posición 54 debería desestabilizar la conformación desenganchada pero no la conformación enganchada donde hay suficiente espacio [52]. Una de las estructuras cristalinas de esta mutante presenta la forma R a pesar de cocrystalizar con AMP. En ella se observa que la hélice H1 se mueve hacia el centro del tetrámero y remueve a Ile10 de un *pocket* hidrofóbico estabilizando así el estado T. Por el contrario la hélice H2 se

aparta del centro del tetrámero rompiendo los enlaces puente hidrógeno con el loop 187-195 de la subunidad adyacente (interacción C1-C4). Luego de estos eventos iniciales, el dímero C1C2 rota respecto al dímero C3C4 causando el cambio conformacional del loop dinámico. En este contexto, distintos modelos involucran los contactos entre la hélice H2 y el loop 187-195 de unidades C1C4 adyacentes con el torque que causa la rotación [52].

Por su parte Ile10, en el estado R, forma parte de una superficie hidrofóbica que bloquea la conformación desenganchada del loop dinámico y entonces al ser desplazado este aminoácido se promueve la conformación desenganchada. Esta conformación del loop actuaría como una significativa fuerza dinámica que conduce la transición cuaternaria hacia el estado T.

Mecanismo de catálisis

Se han postulado dos posibles mecanismos de catálisis a partir de distintas estructuras cristalográficas, el modelo disociativo y el modelo asociativo.

a) Modelo disociativo (Figura 5) [53]

Propone al metafosfato (PO_3^-) como intermediario de la reacción de hidrólisis. El modelo surge al detectar que la densidad electrónica en la región del fosfato 1 correspondía a un equilibrio entre P_i y $\text{PO}_3^-/\text{OH}^-$ cuando los cristales crecían con alta concentración de K^+ (1NUX) o en pH alcalino

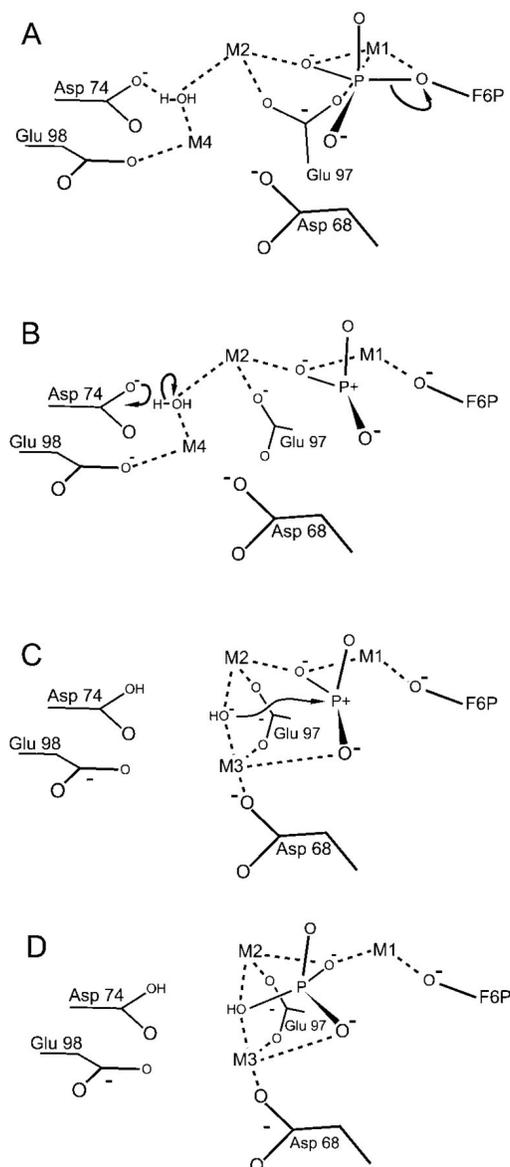


Figura 5. Mecanismo de reacción disociativo de la FBPasa [53]. (A) Mientras se forma el PO_3^- (metafosfato) se genera una carga negativa en el átomo O1 del FBP lo cual provoca que el Glu97 deje la esfera de coordinación de M1 (metal en el sitio 1). **(B)** En paralelo el Asp74 extrae un protón del agua coordinada con M4. PO_3^- ya está formado. **(C)** El metal del sitio 4 migra al sitio 3 (ayudado por el Glu97) conduciendo al hidroxilo hacia el ataque nucleofílico al metafosfato **(D)** Los productos en el final de la reacción tal como aparecen en las estructuras cristalográficas.

(1NUW). Al comenzar la reacción catalítica, el Mg^{2+} ocupa los sitios de metal 1,2 y 4 (la ocupación del sitio 4 es excluyente con el sitio 3 [54]). Por otra parte, el Asp74 activa la molécula de agua coordinada a los Mg^{2+} del sitio 2 y 4 extrayendo un protón. Paralelamente el fosfato 1 se disocia en metafosfato. La carga que se forma en el O1 del FBP, y por consiguiente en el Mg^{2+} del sitio 1, provoca que el Glu97 se aparte de la esfera de coordinación del sitio 1 y rote hacia el sitio 3. Esto permitiría la migración del Mg^{2+} del sitio 4 al sitio 3 llevando unido al hidroxilo encargado del ataque nucleofílico al metafosfato.

b) Modelo asociativo (Figura 6) [54]

El Asp74 extrae un protón de la molécula de agua coordinada (i) al Mg^{2+} del sitio 2 o (ii) al Mg^{2+} del sitio 3. El Glu98 también es un aceptor de protones y forma puentes hidrógeno con ambas moléculas de agua. En esta etapa, el hidroxilo resultante extrae un protón de una tercera molécula de agua vinculada a los metales de los sitios 2 y 3 generando un nuevo hidroxilo que se encuentra en línea con el fosfato 1 para un ataque nucleofílico. La disociación del fosfato se produce en forma simultánea al ataque. Esta doble transferencia de protones se plantea porque la lejanía de los residuos Asp74/Glu98 no permite establecer un puente hidrógeno con el agua encargada del ataque nucleofílico.

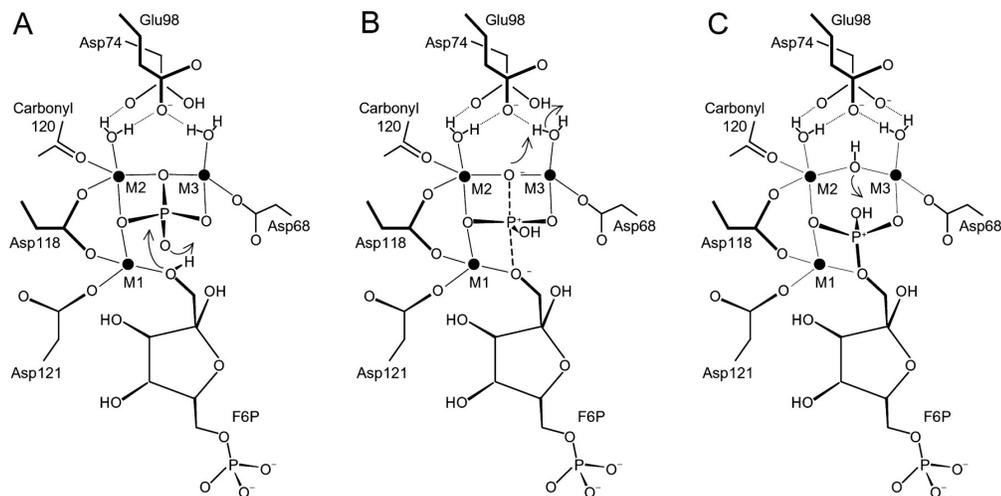


Figura 6. Mecanismo de reacción asociativo de la FBPasa [54]. El modelo es visto desde la reacción inversa. **(A)** Complejo inicial de productos. El átomo O1 de la F6P está coordinado con el sitio de metal 1 (M1) y es el nucleófilo atacante. Uno de los oxígenos del Pi extrae el protón del O1. **(B)** Estado de transición. El oxígeno saliente extrae un protón del agua coordinada a M3. A su vez, esta molécula de agua acepta un protón del Asp74. **(C)** Se transfiere el protón del fosfato 1 al hidróxido coordinado con M2 y M3 generando FBP y agua.

En ambos mecanismos los residuos 61-69 del loop 70 ciclan entre una conformación que estabiliza al Mg^{2+} en el sitio 3 a través del Asp68 y una conformación que permite el intercambio entre el sitio activo y el solvente. A pesar de las diferencias entre ambos modelos, el rol de los residuos esenciales para la catálisis y la unión de los cationes son los mismos. Las variaciones cinéticas debidas al pH o al cofactor provendrían de cambios en el camino de reacción (disociativo o asociativo) y/o de la modificación de la energía de activación en el paso limitante de la reacción. Por ejemplo, la pérdida de la cooperatividad del Mg^{2+} a pH 9,6 reflejaría el cambio del paso limitante en un mecanismo disociativo: a pH 7, la generación del hidroxilo requeriría la participación activa del Asp74 y de los metales en los sitios 2 y 4 mientras que a pH 9,6 la generación del hidroxilo podría ocurrir con menor participación del sitio activo. En este ejemplo, la formación del metafosfato limitaría la reacción a pH 9,6 mientras que la formación del hidroxilo (con la participación de los metales) sería el paso limitante a pH 7.

La estructura de la FBPasa de cloroplastos

Características generales

Aunque las FBPasas de cloroplastos (CFBPasa) representan un grupo particular por su respuesta a la iluminación, sólo se disponen de las estructuras cristalográficas de las enzimas de espinaca (*Spinacia oleracea*) (1SPI) [30] y arveja (*Pisum sativum*) (1D9Q, 1DBZ, 1DCU) [55]. Sin embargo, es posible alinear las secuencias de la FBPasa de cerdo y espinaca utilizando las estructuras secundarias de los datos cristalográficos de ambas enzimas [30]. La CFBPasa de colza, objeto de estudio de la presente tesis, no ha sido cristalizada pero su estructura tridimensional puede inferirse de las contrapartes de espinaca y arveja ya que la identidad de secuencia es alta (85,2 % y 87,6 %, respectivamente) y llega casi al 100 % en las estructuras secundarias definidas (Figura 3).

Las CFBPasas, al igual que las citoplasmáticas, son proteínas homotetraméricas (subunidad: ca. 160 kDa) [56, 57] que se disocian en dímeros a pH alcalino (pH 8,9) [56, 58]. Aunque este proceso implica tiempos relativamente largos (horas), la inactivación de la capacidad catalítica es rápida ($t_{0,5}$ 6 min) [58, 59]. La incubación de la enzima con FBP y Ca^{2+} restringe la inactivación inicial pero no previene la posterior conversión a la forma dimérica [58].

El sitio activo

Comparando las enzimas cloroplásticas (espinaca, arveja) con la citoplasmática (cerdo) [30, 55], puede observarse que ambas conservan todos los aminoácidos del sitio activo, excepto que la Tyr215 y la Met248 de las primeras fueron reemplazadas por Asp y Leu, respectivamente, en las segundas (Tabla 2B). Aunque no se han obtenido cristales de CFBPasas conteniendo ligandos, la mayor parte de los aminoácidos que unen la F6P a la enzima de cerdo (Asn212, Arg243, Tyr244, Tyr264, Lys274) superponen casi exactamente con sus contrapartes cloroplásticas mientras que los residuos que unen el fosfato 1 (Gly122, Ser123, Arg276) presentan solo un moderado desplazamiento. Las formas oxidadas de la enzima de cloroplasto muestran la mayor diferencia en el Glu97, un residuo crítico del sitio de unión de metales que se encuentra desplazado del sitio activo (ver más adelante).

El loop regulador 170

La mayor divergencia en la estructura primaria de las CFBPasas con las contrapartes citoplasmáticas reside en dos regiones: la N terminal y el loop 170 (residuos entre la hoja B4 y la hélice H5). Este último intrapéptido compuesto de 18-23 residuos contiene 3 de las 7 cisteínas conservadas en las CFBPasas (Cys153, Cys173, Cys178; enzima de arveja) mientras que las FBPasas de mamíferos, involucradas en la gluconeogénesis y reguladas por AMP, presentan un loop más corto y carecen de las cisteínas (Figura 3).

El loop 170 participa en la conversión de la forma oxidada (inactiva) a la forma reducida (activa) de la enzima. La Cys173 y la Cys178 están separadas por 4 aminoácidos que constituyen un motivo estructural común con otras enzimas conteniendo cisteínas redox-activas [60]. Sin embargo, dos estudios mostraron la necesidad incorporar la tercera cisteína en la consideración de la activación reductiva. Primero, la mutante Cys153Ser es constitutivamente activa (i.e. alta afinidad por Mg^{2+}) porque no requiere la incubación con un reductor [61, 62]. Segundo, los datos cristalográficos mostraron una clara densidad electrónica entre la Cys153 y la Cys173 indicando la presencia de un puente disulfuro en la forma oxidada [55].

Llamativamente, la estructura cristalográfica de la mutante C153S (1DBZ [55]) es prácticamente indistinguible de las formas oxidadas, presentando un sitio activo bloqueado. Una alternativa sería que existe un equilibrio entre las formas activas e inactivas que es

rápido desplazado hacia la forma activa en presencia del sustrato y los metales. Ello implica que el puente disulfuro estaría estabilizando más que promoviendo la conformación inactiva, la cual predominaría en ausencia de sustrato o metal más allá de la señal redox. Esta posibilidad sugiere que la tiorredoxina promueve la forma reducida de la CFBPasa a través de sucesivos ciclos de reducción para contrarrestar el ambiente oxidativo generado en las condiciones diurnas.

Aspectos estructurales de la regulación redox

El loop regulador adoptaría una conformación desordenada (estructura de la enzima de espinaca 1SPI [30]) cuando el puente disulfuro entre la Cys153 y la Cys173 está reducido. En cambio, cuando está oxidado, el loop se adosa contra las hojas B1 y B2 estabilizando la forma inactiva del sitio activo ubicado en el lado opuesto (20 Å) (estructura de la enzima de arveja 1D9Q, 1DCU [55]). Esta inactivación se debería a un desplazamiento de las hojas B1 y B2 hacia el centro del tetrámero en dirección al sitio catalítico acercando la Val109 (enzima de arveja) al primer y segundo sitio de unión de metal desplazando en consecuencia al Glu105 (Glu97 en la enzima de cerdo). La nueva conformación de ambos aminoácidos, ubicados en el loop que une las hojas B1 y B2, no permite que el Glu105 coordine con los sitios 2 y 3 de metal. Más aún, estaría en conflicto con el loop 70 en su conformación enganchada que también participaría, como en la enzima de cerdo, de la formación del sitio de metal 3 a través del Glu76 (Asp68 en la enzima de cerdo). Estas observaciones sugieren que el sitio activo de la CFBPasa, en la forma oxidada, no es compatible con la unión de los metales catalíticos (Figura 7).

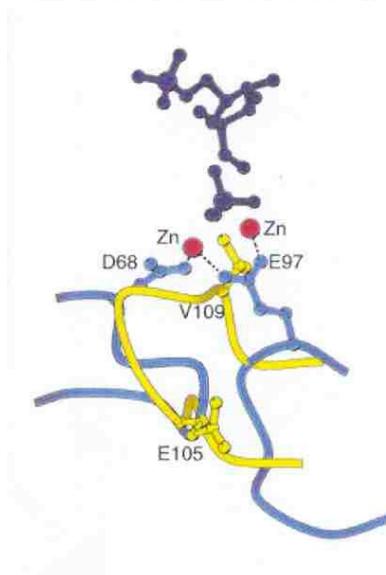


Figura 7. Superposición del sitio de metal de la FBPasa de cerdo (activa) y el de arveja (inactiva) [55]. La FBPasa de cerdo se muestra en azul, la de arveja en amarillo, los cationes en rojo y la F6P/Pi en negro. Puede observarse que la coordinación con los sitios de metal por el loop 70 (a través del Asp68) y por el loop entre las hojas B1 y B2 (a través del Glu109 o Glu97 en la enzima de cerdo) se encuentra interrumpida en la enzima de arveja oxidada (inactiva) debido a que la Val109 avanza sobre los sitios de metal.

Comparación entre la regulación por AMP y la regulación redox

El AMP promueve un gran cambio en la estructura cuaternaria de las FBPasas citosólicas, asociado con cambios menores en el sitio activo. El sitio de unión de AMP no existe en las CFBPasas, bloqueado por la Ile33 y el Asp35 (ubicado en la región de unión del fosfato del AMP). Además el loop regulador 170 se ubica en una posición cercana pero distinta a la región de unión de AMP y no presenta contactos con otras subunidades.

A diferencia de la unión del AMP, la regulación redox induce una mayor disrupción del sitio activo con un menor reordenamiento en la estructura cuaternaria. Tanto la estructura reducida como la oxidada semejan la forma T de la enzima citoplasmática. Sin embargo ambos mecanismos confluyen en un mismo resultado funcional que es la alteración del sitio de unión a metal por el desplazamiento del mismo glutamato (Glu97 enzima de cerdo).

El loop 70 se encuentra en la conformación desordenada de la CFBPasa reducida y en la conformación desenganchada de la CFBPasa oxidada. Aparentemente, la regulación redox modifica las estabildades de las conformaciones del loop en forma similar a la regulación mediada por AMP. En conjunto, estos datos sugieren la existencia de un mecanismo molecular común para la regulación de las actividades FBPasas cuya divergencia a lo largo de la evolución permite la respuesta a diferentes estímulos (luz en la fotosíntesis, estado energético en la gluconeogénesis) [46].

Bases para el análisis de la evolución dirigida de proteínas

En esta tesis, dos ciclos consecutivos de mutagénesis al azar con un screening funcional de la CFBPasa de colza fueron utilizados para caracterizar enzimas con propiedades deseadas (Capítulo 3). Aunque el procedimiento utilizado no llega a ser una “evolución dirigida”, los conceptos básicos de dicha metodología fueron aplicadas en nuestro trabajo.

Introducción

La inmutabilidad del mundo biológico era un concepto que predominó hasta el siglo XIX.. La publicación de “*The origin of species*” por Darwin en 1859 marcó un cambio radical en este tema por cuanto introdujo el factor tiempo en la transformación de las formas biológicas.

Los siguientes puntos constituyen el núcleo de la teoría de Darwin: a) *Supervivencia*. Los organismos biológicos tienen más descendencia de la que puede sobrevivir. b) *Herencia*. Numerosos caracteres de los organismos biológicos provienen de sus ancestros y son transmitidos posteriormente a su descendencia. c) *Variabilidad*. Algunos de estos caracteres varían al ser heredados. d) *Adaptación diferencial*. Algunos de los caracteres heredados son más ventajosos que otros para sobrevivir. Sobre estas bases, la teoría establece que la evolución procede porque el ambiente selecciona naturalmente los organismos que tienen las características más ventajosas para sobrevivir en un determinado nicho ecológico. Más de 100 años después de publicada esta teoría, conceptos similares son utilizados experimentalmente para la obtención de nuevas proteínas por medio de la “evolución dirigida”.

En esta clase de experimentos es fundamental primero generar una variabilidad en la población y luego la capacidad para seleccionar las características buscadas entre todas las variantes generadas. Un ciclo en el proceso de evolución dirigida tiene etapas bien definidas (Figura 8) [63]. Inicialmente, las técnicas de mutagénesis al azar y de recombinación genómica permiten la preparación de variantes. Generada la biblioteca de genes

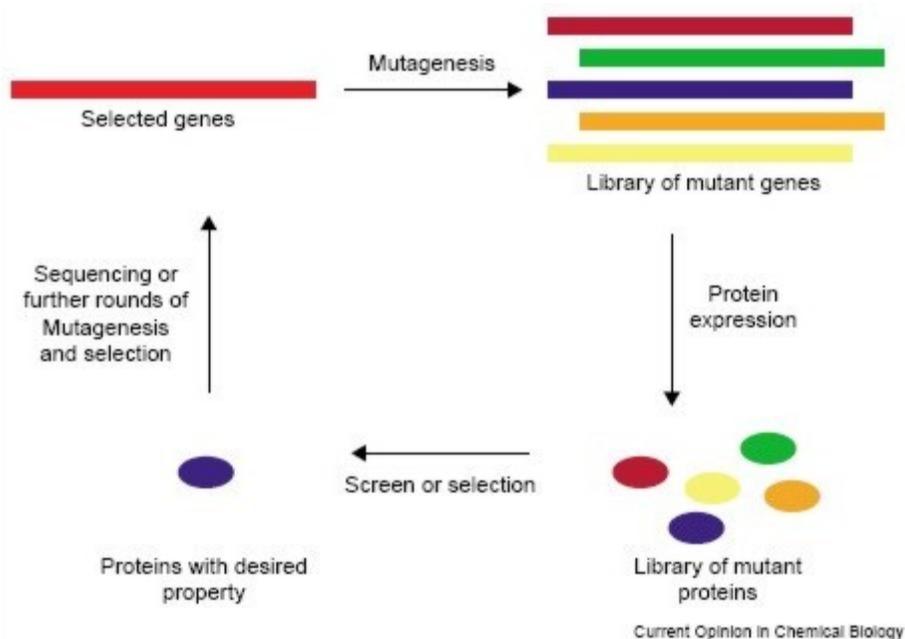


Figura 8. Etapas en un ciclo de evolución dirigida [63]. A partir del gen de interés y usando técnicas de mutagénesis al azar, se obtiene una biblioteca de genes mutantes. Luego, se expresan las proteínas lo cual resulta en la correspondiente biblioteca de proteínas mutantes. Sobre esta biblioteca se hace un screening para seleccionar las variantes que mejor expresan una determinada propiedad. Finalmente se secuencian los correspondientes genes y el ciclo puede volver a comenzar.

mutagenizados es necesario expresar las correspondientes proteínas de manera aislada e independiente, lo cual generalmente se logra a través de bacterias. Posteriormente, un método de screening o selección permite aislar las variantes en las cuales la propiedad buscada ha sido incrementada. En general, esta última etapa es crítica porque determina el éxito o fracaso de todo el experimento. La dificultad experimental reside en el diseño y adaptación de un método de screening/selección específico para cada situación. La mayor parte de los screenings buscan y por lo tanto “ven” la actividad enzimática de la proteína. Sin embargo, los métodos para detectar una actividad enzimática son muy particulares y muchas veces es imposible su aplicación en los contextos de expresión proteica que impone el diseño de la evolución dirigida. Esta dificultad para estimar la función enzimática contrasta con los métodos de detección génica o proteica mediante sondas de ADN o anticuerpos, respectivamente, ya que existen procedimientos generales y estándares para tales fines. Finalmente, los genes de las variantes seleccionadas pueden tomarse como base para nuevos ciclos de mutación/selección.

La evolución es “dirigida” porque el propósito humano impone las restricciones para que algunas formas predominen y otras desaparezcan. En contraposición, es interesante observar que la teoría de Darwin no sugiere un “objetivo final” dirigiendo la evolución, de manera que carece de una dirección predeterminada y depende de factores relacionados con el ambiente local.

Actualmente, los experimentos de evolución dirigida tienen como propósito obtener, a partir de proteínas naturales, enzimas útiles para la industria, la medicina y la investigación. Las enzimas naturales participan en complejas redes bioquímicas dentro de las células por lo cual adaptaron sus funciones biológicas al contexto del organismo vivo. Sin embargo, la inhibición por sus sustratos y productos limita su productividad en procesos biocatalíticos. En biotecnología se necesitan enzimas estables que sean activas

- 1) por largos períodos de tiempo (lo que contrasta con la necesidad de un rápido *turnover* de la proteína dentro de la célula),
- 2) en solventes no acuosos para permitir la síntesis de determinados compuestos químicos (característica no requerida por la mayoría de los sistemas biológicos)
- 3) con sustratos no naturales.

Modificar una proteína en determinada dirección también puede tener como objetivo el conocimiento de la relación estructura/función en las proteínas. Este propósito requiere

métodos adecuados de screening/selección para seleccionar las enzimas en función de su respuesta catalítica específica. Por ejemplo, seleccionar enzimas mutantes que muestren, respecto a la enzima nativa, una respuesta diferente ante los efectores de la reacción catalítica (e.g. inhibidores, activadores etc.). Una vez obtenidas dichas mutantes funcionales, se analizan las modificaciones introducidas para establecer los cambios estructurales que provocaron la modificación del comportamiento catalítico. Este es el enfoque dado al tema en esta tesis.

El paisaje de adaptación [64]

El paisaje de adaptación es un concepto abstracto desarrollado para dar una base teórica a la técnica de evolución dirigida y de esta manera predecir el comportamiento de variables experimentales. Para entenderlo es necesario definir los conceptos *espacio de secuencia*, *adaptabilidad* y *función de adaptabilidad*.

El espacio de secuencia. Está formado por todos los puntos que representan, cada uno, una única secuencia de aminoácidos. Un punto está directamente conectado con otro si y sólo si difieren en una sola mutación. La distancia entre dos puntos (distancia Hamming) es la mínima cantidad de mutaciones simples necesarias para pasar de una secuencia a otra.

Esta definición implica que el espacio de secuencia es astronómicamente grande. Cada dimensión del espacio representa una posición en la secuencia de las proteínas. La cantidad total de puntos es A^N , donde A son los aminoácidos y N es el número de residuos que constituyen la proteína. Además, la red de puntos está altamente interconectada ya que cada punto tiene $(A-1) \times N$ vecinos. Sin embargo, la máxima distancia Hamming existente entre dos puntos es de solamente N pasos. Por ejemplo, para proteínas de 100 residuos existen en el espacio de secuencia 20^{100} puntos, cada punto tiene 1900 vecinos y la máxima distancia entre dos puntos es de sólo 100 pasos. Esto nos dice que, aunque el espacio de secuencia es muy grande también está muy interconectado, por lo cual el pasaje de una secuencia al azar hasta otra es, al menos en teoría, experimentalmente posible.

La mayor parte del espacio de secuencia codifica para proteínas que no tienen ningún “sentido”. Es interesante observar que esto también ocurre con los sistemas de signos en general. Por ejemplo, si escribiéramos un párrafo colocando letras y espacios al azar, difícilmente encontraríamos alguna palabra coherente. Las palabras con un sentido para

nosotros constituyen un conjunto muy pequeño dentro de las casi infinitas posibilidades de combinar los signos (cf. La biblioteca de Babel- J.L.Borges [65]).

Adaptabilidad. Es la capacidad que tiene una proteína para ejecutar la función que se encuentra bajo la presión de selección.

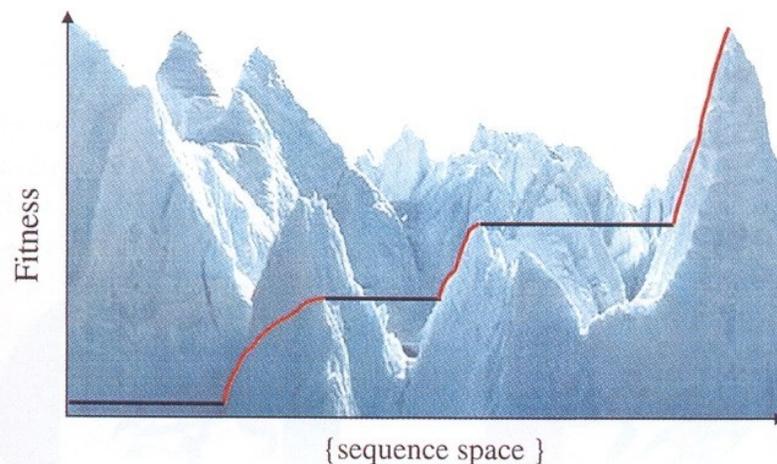
La función de adaptabilidad. Es la función que asigna la adaptabilidad a una propiedad determinada a cada punto del espacio de secuencia. Esta función describe el paisaje de adaptación. Aunque no se ha podido determinar experimentalmente debido a las limitaciones prácticas, se han desarrollado funciones teóricas que describen distintos tipos de paisajes con el objetivo de entender sus características.

Si se grafica la adaptabilidad en función del espacio de secuencia proyectado a dos dimensiones, se obtiene una interesante analogía con un paisaje montañoso (Figura 9). En esta representación el objetivo de la evolución dirigida sería llegar al pico de la montaña más alta (i.e. maximizar la propiedad de una proteína).

Descripción del paisaje de adaptación

Varios parámetros caracterizan un paisaje de adaptación: la tolerancia, la correlación y el grado de isotropía. Estos conceptos se relacionan, a su vez, con los tipos de mutaciones que pueden introducirse en una determinada secuencia (mutaciones con efectos aditivos, acoplados o neutros).

aditivas y
Se dice que
mutaciones
cuando el
dos
es igual a la
efectos de las



Mutaciones acopladas.
dos
son aditivas
efecto de las
mutaciones
suma de los
mutaciones

Figura 9. Paisaje de adaptación [64]. Es la función que relaciona cada secuencia con su rendimiento respecto a una determinada propiedad. Aquí se ilustra simplícidamente el concepto proyectando el espacio de secuencia a dos dimensiones. Existe una evolución adaptativa (línea roja) y una neutral (línea negra). En la evolución dirigida, la evolución neutral es más difícil de lograr pues no implica mejoras aparentes en una propiedad. Sin embargo este tipo de evolución es necesaria para salir de la "trampa" en los máximos locales.

individuales. Por otro lado, las mutaciones están acopladas cuando la suma de las mutaciones anulan o potencian el efecto de las mutaciones individuales.

Efectos aditivos en las mutaciones pueden observarse en las zonas de interacción proteína-proteína o ADN-proteína. La termoestabilidad es otra función que suele ser aditiva en cuanto a las mutaciones. Muchas veces determinadas regiones de la proteína con gran accesibilidad del solvente (residuos de la superficie o loops) presentan aditividad para la estabilidad estructural por cuanto el solvente disminuye la interacción entre los residuos y previene el acoplamiento de los efectos. Por otra parte, son típicos los acoplamientos entre pares de residuos en las interacciones por puente salino o por puente de hidrógeno y en las interacciones estéricas que alteran las energías de van der Waals. En estos casos, la mutación en uno de los residuos puede llevar a una desestabilización de la proteína. Las mutaciones en el sitio catalítico de una enzima también suelen estar altamente acopladas por cuanto las interacciones implican múltiples residuos y la alteración de uno de ellos anula la actividad catalítica.

Tolerancia. La tolerancia es la capacidad de una enzima para mantener sus funciones luego de las mutaciones. Para ello es necesario definir inicialmente la función bajo análisis. Es común en los estudios con proteínas, considerar la tolerancia funcional y la estructural. Maximizar u optimizar ambas propiedades simultáneamente es difícil ya que no existe una intersección exacta entre las mutaciones que mejoran a ambas. Además, si consideramos a P_A como la probabilidad de que una mutación mejore una función y a P_B como la probabilidad de que una mutación mantenga la estabilidad estructural, el producto $P_{A+B} = P_A \times P_B$ es la probabilidad de que una mutación mejore una función sin perder estabilidad estructural. Claramente, el producto de dos números menores a 1 genera una probabilidad aún menor. Por esto, cuando una proteína muestra tolerancia estructural, el espacio de secuencia funcional puede ser explorado con mayor intensidad.

La tolerancia está relacionada con las propiedades de acoplamiento y aditividad. Las zonas de una proteína donde predominan las propiedades aditivas tienen tendencia a ser tolerantes mientras lo inverso ocurre en las zonas altamente acopladas. Por ello, los residuos ubicados en las superficies y en los loops suelen ser tolerantes a mutaciones pero no los que componen los sitios catalíticos.

Correlación. La correlación de un paisaje estima la similitud de una propiedad entre una secuencia y sus vecinas. La correlación es una forma de determinar estadísticamente la “rugosidad” de un paisaje. En paisajes suaves, el cambio en una propiedad es lento y por lo tanto se dice que el paisaje está correlacionado. En paisajes “escarpados”, las propiedades cambian abruptamente a medida que aumenta la distancia Hamming por lo que el paisaje no está correlacionado. Distancia de correlación es aquella más allá de la cual dos secuencias están esencialmente no correlacionadas. Esta distancia está muy vinculada a la tolerancia del paisaje. Una distancia de correlación corta implica que las mutaciones tienen un gran efecto sobre una propiedad y, en consecuencia, aumenta la probabilidad de los efectos deletéreos. Ello implica que esa secuencia es poco tolerante a las mutaciones.

Isotropía. Un paisaje es isotrópico si las propiedades del mismo son parecidas independientemente de la secuencia de partida. Lo contrario ocurre en un paisaje anisotrópico donde hay una gran variabilidad en la distancia de correlación dependiendo de la secuencia considerada. Los parámetros de correlación y de isotropía ayudan a definir el rango de secuencias locales. En un experimento de evolución dirigida esto sirve para establecer si los datos obtenidos son representativos de características globales o locales en el paisaje.

Exploración del paisaje de adaptación

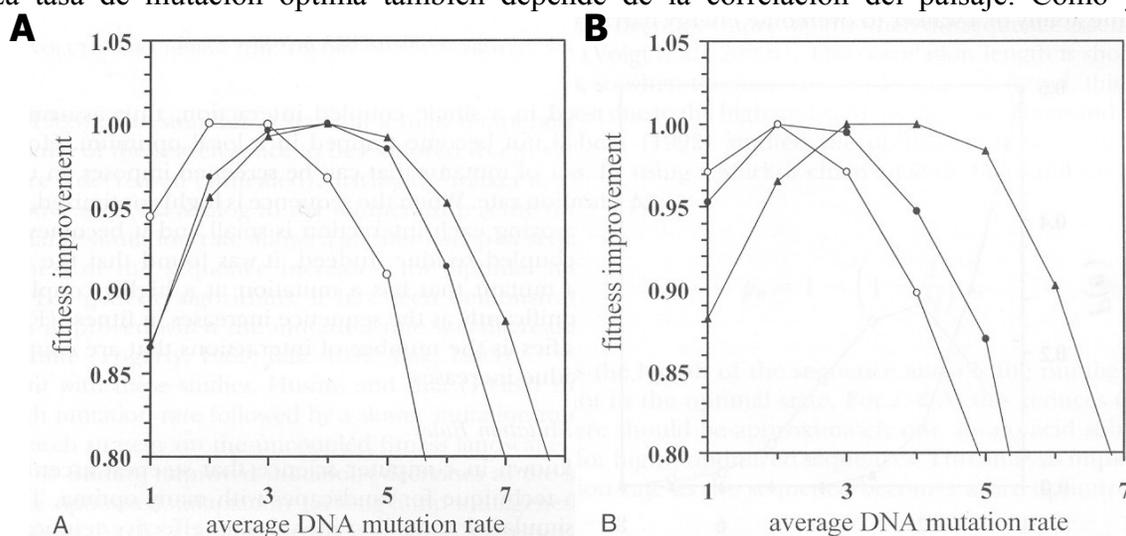
El proceso de evolución dirigida implica moverse en un paisaje de adaptación con una determinada orientación. Esto se efectúa a través de caminos que dependen de las características del paisaje mismo y de distintos factores experimentales como ser la tasa de mutación, el tamaño de la biblioteca de mutantes generada y la capacidad de screening para dicha biblioteca. Para diseñar correctamente un experimento de evolución dirigida hay que relacionar todos estos factores con el objetivo de encontrar el mejor camino.

La tasa de mutación es un parámetro experimental que mide la cantidad promedio de mutaciones introducidas en un gen durante una generación. El camino para mejorar una propiedad puede ser “empinado” o no, dependiendo de la tasa de mutación, de la cantidad de mutantes que es posible analizar y de la correlación del paisaje. Cuanto menos correlacionado esté un paisaje (escarpado), tanto menor será la cantidad de mutaciones que lleven a una mejoría en una propiedad y por lo tanto habrá menos caminos. Sin embargo, si el tamaño de la biblioteca analizada es lo suficientemente grande como para estimar todas las posibles

permutaciones introducidas por una determinada tasa de mutación entonces es posible encontrar el camino más “empinado”. Estos conceptos están estrechamente relacionados con la reproducibilidad del experimento de evolución dirigida. Si no se tiene la capacidad de encontrar el camino más empinado entonces la reproducibilidad del experimento es baja, o sea que se puede partir de una misma secuencia y llegar a una secuencia óptima por diferentes caminos o incluso llegar a secuencias óptimas diferentes.

Para cada situación existe una tasa de mutación óptima (Figura 10). Cuando una determinada propiedad es modificada al azar, las mutaciones deletéreas tienen una probabilidad mucho mayor que las beneficiosas. Por esto, la proporción de mutaciones negativas aumenta respecto a las positivas al incrementar la tasa de mutación. Este problema desaparece cuando el tamaño de la biblioteca generada es lo suficientemente grande y la capacidad de screening permite caracterizar la mayor parte de las variantes generadas. De lo contrario, encontrar una mutante mejorada sería poco probable. En conclusión, cuanto menos mutantes se puedan analizar, menor será la tasa de mutación óptima y viceversa (Figura 10A).

La tasa de mutación óptima también depende de la correlación del paisaje. Como ya se



mencionó, cuanto menos correlacionado está un paisaje, más rugoso es y menor es la

Figura 10. Tasa de mutación óptima [64]. Se han desarrollado modelos matemáticos teóricos para simular los paisajes de adaptación y los procesos de evolución dirigida. En este caso se considera un $N=50$ proteínas y el máximo mejoramiento en una propiedad se obtiene del promedio de unos 10.000 paisajes. **(A)** La cantidad de mutantes en el screening es de $M = 1000$ (○), 10.000 (●) y 50.000 (▲). La tasa de mutación óptima aumenta con la mayor capacidad de screening. **(B)** El número de interacciones acopladas es de $K = 75$ (○), 25 (●) y 0 (▲). La tasa de mutación óptima aumenta al disminuir la "rugosidad" del paisaje (disminución de interacciones acopladas).

proporción de mutaciones vecinas que muestran una mejoría en una determinada propiedad. Por lo tanto, la tasa de mutación óptima disminuye al disminuir la correlación del paisaje (Figura 10B).

El análisis de estos temas nos hace tomar mayor conciencia de que a pesar de la gran cantidad de proteínas existentes, el número de secuencias “sin sentido” es vastísimamente mayor. Un concepto similar expone Carl Sagan en su libro “Cosmos”:

“El único lugar normal es el vacío vasto, frío y universal, la noche perpetua del espacio intergaláctico...Si nos soltaran al azar dentro del Cosmos la probabilidad de que nos encontráramos sobre un planeta o cerca de él sería inferior a una parte entre mil millones de billones de billones (10^{33} ...). En la vida diaria una probabilidad así se considera nula. Los mundos son algo precioso.” [66]

De la misma forma, difícilmente podríamos explorar los mundos de las secuencias proteicas si previamente la naturaleza no nos hubiese depositado sobre ellos.

Capítulo 1

**Los metales como cofactores e inhibidores de la
CFBPasa**

Objetivo

Analizar las condiciones básicas para medir con exactitud y precisión la actividad CFBPasa. Este propósito requiere establecer:

- el grado de purificación necesario.
- la linealidad de la actividad enzimática respecto al tiempo y la concentración de proteína.
- el comportamiento de la enzima con distintos cofactores e inhibidores metálicos.
- las especies reactivas y las concentraciones emergentes del equilibrio entre el cofactor (Mg^{2+}) y el sustrato (FBP).

Resultados

Influencia del grado de purificación de la CFBPasa en sus propiedades bioquímicas

En los protocolos tradicionales para la purificación de la CFBPasa se hace uso intensivo de las columnas de intercambio aniónico (e.g. DEAE) ya que la enzima, incluso a un pH relativamente bajo, se une fuertemente a este tipo de resinas. Así, en un solo paso de purificación se puede alcanzar un alto grado de pureza eliminando gran parte de las demás proteínas. Sin embargo en estas condiciones compuestos no proteicos copurifican con la enzima influyendo en sus propiedades bioquímicas. Para separar dichos compuestos es

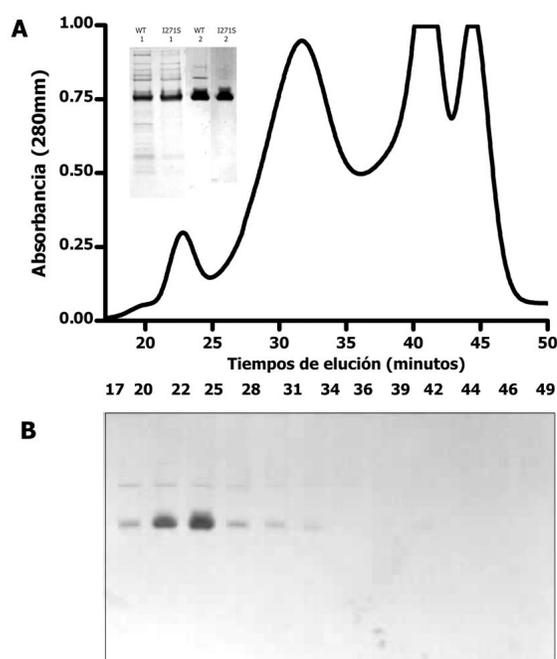


Figura 11. Purificación de la CFBPasa por una columna Superdex-200. Se muestra el perfil de elución (**A**) y las correspondientes fracciones corridas en un SDS-PAGE (**B**). La muestra provino de la sobre expresión en *E. coli* de la CFBPasa recombinante con una posterior purificación por columna DEAE. Las condiciones de corrida se detallan en Materiales y Métodos. En la figura interna se muestra otro gel SDS-PAGE con la CFBPasa nativa después de la columna DEAE (WT 1) y después de la columna Superdex-200 (WT 2). Lo mismo se hizo con la mutante I271S de la enzima (I271S 1, I271S 2).

necesario agregar por lo menos un paso más de purificación con una columna de exclusión (e.g. Superdex-200).

En la Figura 11 se muestra el perfil de elución de una columna Superdex-200 con una muestra de CFBPasa recombinante que previamente fue sometida a una columna DEAE. Siguiendo las fracciones por SDS-PAGE pudo observarse que la enzima eluyó entre los 21 y 25 min y que el resto de los picos que absorbieron fuertemente a 280 nm no correspondieron a proteínas. Sin embargo, este paso de purificación resultó muy importante para la caracterización bioquímica de la enzima según se describe a continuación.

Medimos la actividad de una muestra de CFBPasa antes (DEAE) y después (S-200) de la columna Superdex-200 realizando una preincubación a pH ácido (NaAcO) y a pH básico (Tris-HCl) (Figura 12). Todo el proceso de purificación se llevó a cabo con el buffer NaAcO (pH 5,2) por lo tanto en la Figura 12A la preincubación en ese medio puede tomarse como referencia. Observamos que la actividad de la muestra DEAE disminuyó significativamente cuando se preincubó en

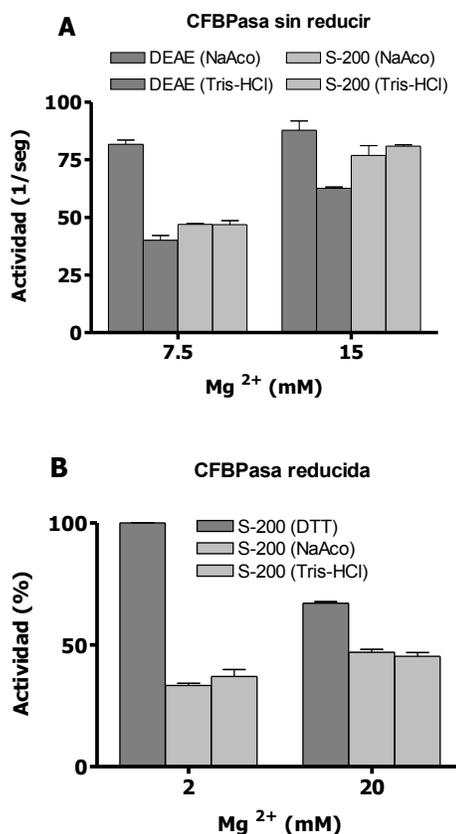


Figura 12. Actividad de la CFBPasa dependiente de la purificación y la preincubación. En cada caso se indica si la enzima fue purificada solamente con una columna de intercambio aniónico (**DEAE**) o si además se purificó con una columna Superdex-200 (**S-200**). Entre paréntesis se indica el componente principal de la preincubación que se realizó a pH 5,2 (**NaAcO** 75 mM) o a pH 7,9 (**Tris-HCl** 75 mM) y a 25 °C. Las mediciones de actividad se llevaron a cabo, luego de la preincubación, con dos concentraciones de Mg²⁺ según se indica y en presencia de la CFBPasa 0,4 µg/ml, Tris-HCl 50 mM (pH 7,9) y FBP 1,5 mM. El tiempo de catálisis fue 4 min y se trabajó por duplicado. **(A)** Se utilizó la enzima tal como se obtuvo de las correspondientes purificaciones. La solución de preincubación tuvo a la CFBPasa 17 µg/ml, el buffer indicado y NaCl 100 mM. El tiempo de preincubación fue 10 min. **(B)** La CFBPasa fue reducida según se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente la preincubación se efectuó diluyendo 100 veces la muestra (CFBPasa 4,5 µg/ml). Se efectuaron tres preincubaciones distintas, en una se mantuvieron las concentraciones de los compuestos usados en la preincubación (**DTT**, Ca²⁺, FBP) y en las otras dos sólo se adicionaron los buffers indicados. El tiempo de preincubación fue 1,5 h.

medio alcalino, sobre todo a bajas concentraciones de Mg^{2+} . Por el contrario, la muestra S-200 mantuvo la misma actividad independientemente del tipo de preincubación y de la concentración de Mg^{2+} en catálisis.

Para analizar estos resultados recordamos que una de las principales diferencias, desde el punto de vista bioquímico, que existen entre la CFBPasa reducida y la oxidada es que la primera forma tiene una mayor afinidad por el cofactor Mg^{2+} . En este sentido, comparando la actividad con las dos concentraciones del cofactor, vimos que la muestra S-200 presentó una menor afinidad por el Mg^{2+} que la muestra DEAE preincubada en el mismo buffer de la purificación. Adicionalmente esta última preparación también disminuyó dicha afinidad al preincubarse en medio alcalino (Figura 12A). Estos hechos nos hicieron suponer que la muestra DEAE estuvo parcial o totalmente reducida (y pudo oxidarse en preincubación alcalina) mientras que la muestra S-200 estuvo oxidada. Congruente con estas suposiciones, la presencia del reductor fue requerida para que la muestra S-200 reducida no perdiera la alta afinidad por el Mg^{2+} . Para ello después de reducir la enzima simplemente diluimos unas 100 veces la solución en tres tipos de medios: un medio ácido, otro alcalino y otro en el que se mantuvieron los componentes usados para la reducción (control) (Figura 12B). Comprobamos así que tanto en medio alcalino como en medio ácido la falta de suficiente reductor provocó la misma disminución en la afinidad por el Mg^{2+} indicando indirectamente una oxidación.

Todo lo anterior nos permitió suponer que la purificación de la CFBPasa con la columna Superdex-200 separó un compuesto que en medio ácido mantenía a la enzima en su forma reducida y que su ausencia permitía la oxidación espontánea de la misma. Estos resultados fueron relevantes para los experimentos reportados en los capítulos 3 y 4.

Linealidad de la actividad CFBPasa en función del tiempo y de $[E]_t$

Para medir con precisión la actividad CFBPasa decidimos comprobar hasta qué punto dicha actividad era lineal respecto al tiempo y a la concentración de enzima. Para ello utilizamos dos métodos de medición diferentes basados en la cuantificación del (i) fosfato liberado (método de Chen) y (ii) F6P utilizando un sistema de enzimas acopladas para medir continuamente la formación de NADPH (ver Materiales y Métodos).

Linealidad en función del tiempo

Para el experimento se eligió la CFBPasa oxidada y una solución de catálisis compuesta por Mg^{2+} 10 mM, FBP 2 mM, pH 7,9. En estas condiciones con el método de las enzimas acopladas se observó claramente un retardo inicial en la actividad (*lag*) debido probablemente en parte al sistema mismo de medición. Sin embargo a tiempos mayores ambos métodos mostraron que la actividad (medida por absorbancia) era lineal en función del tiempo (Figura 13 paneles superiores). Esto pudo corroborarse con los altos coeficientes de correlación R^2 (Tabla 3).

El análisis de la ordenada al origen de la parte recta en un gráfico de actividad en función del tiempo también pudo dar un indicio del tipo de histéresis existente. Se restó el blanco de reacción a cada ordenada al origen y se asumió que el número resultante si era negativo indicaba un *lag* en la reacción, esto es una baja actividad inicial que va aumentando hasta estabilizarse en una actividad mayor. Por el contrario, un número positivo indicaba un *burst* en la reacción, o sea una alta actividad inicial que se estabilizaba en una menor.

En las condiciones de catálisis mencionadas ambos métodos dieron números negativos confirmando así el ya mencionado *lag* en la actividad (Tabla 3). También se observó que al ir aumentando la concentración de enzima la ordenada al origen fue disminuyendo (número más negativo) lo cual lo atribuimos al aumento de la pendiente y no a un incremento del *lag*. Cabe mencionar que a través de otros experimentos se comprobó que la ordenada al origen no sólo variaba en función de la concentración de enzima sino también en función de las condiciones de catálisis. En este sentido con la CFBPasa reducida se observaron rectas que por lo general dieron ordenadas al origen mayores al blanco indicando un posible *burst* en la actividad. Para estos análisis se consideró que la medición con el método de Chen a varios tiempos era más exacta que con el sistema de las enzimas acopladas por ser este último un método indirecto

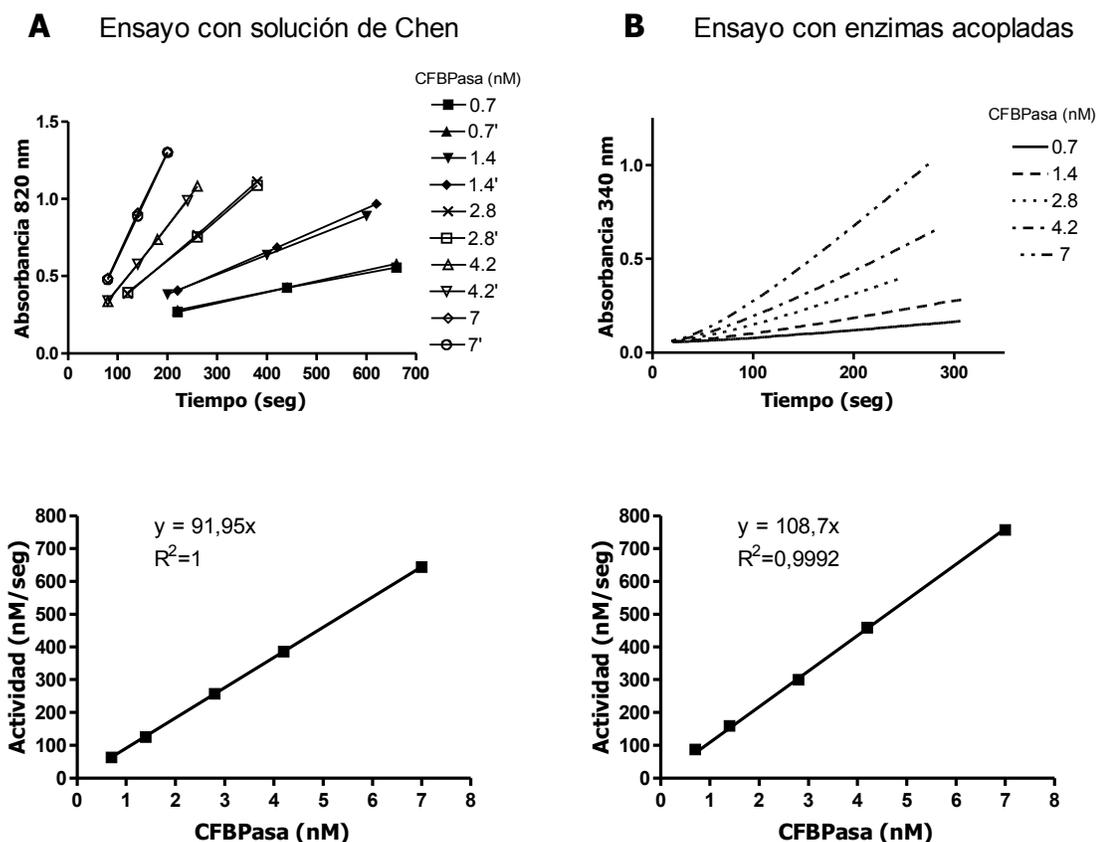
E.(nM)	E.Chen		E.Acoplado	
	R ²	Ord	R ²	Ord
0,7	0,9998	-0,014	0,9999	-0,042
1,4	1,0000	-0,043	0,9996	-0,049
2,8	0,9994	-0,070	0,9994	-0,082
4,2	0,9998	-0,127	0,9996	-0,140
7	1,0000	-0,211	0,9997	-0,239

Tabla 3. Valores estadísticos de la actividad CFBPasa en función del tiempo. Los datos corresponden a las curvas graficadas en la Figura 13 panel superior para cada concentración de enzima (**E. (nM)**) y para cada método de medición: ensayo con solución de Chen (**E.Chen**) o ensayo con enzimas acopladas (**E.Acoplado**). En el primer caso sólo se muestran los valores de los duplicados (concentración prima). Para cada curva se informa el coeficiente de correlación (**R²**) y la ordenada al origen restado el blanco de reacción (**Ord**).

con otras dos enzimas involucradas lo cual puede influir en la histéresis global de la reacción hasta alcanzar el estado estacionario.

Linealidad en función de [E],

Con los datos del experimento anterior se graficó la actividad en función de la



concentración de enzima. En la medición con el método de Chen se obtuvo una recta que pasó por el origen con un coeficiente de correlación perfecto mientras que con el método de las

Figura 13. Medición de la actividad CFBPasa en función del tiempo y de [E]_i. Se utilizó la CFBPasa oxidada purificada a homogeneidad (con columnas DEAE y Superdex-200). La reacción fue iniciada agregando a la solución de catálisis distintos volúmenes de una única dilución de la CFBPasa. Las condiciones de catálisis fueron Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), FBP 2 mM y MgCl₂ 10 mM. Se utilizaron dos métodos de medición (ver Materiales y Métodos para más detalles): **(A) Ensayo con solución de Chen.** Cada concentración de enzima se ensayó por duplicado y se tomaron muestras a tres tiempos diferentes cuantificándose el Pi liberado con la solución de Chen. **(B) Ensayo con enzimas acopladas.** Se cuantificó la aparición del producto F6P. La catálisis fue seguida en tiempo real tomando valores de absorbancia cada 2 seg. En ambos casos sendas curvas de calibración permitieron transformar los valores de absorbancia en concentraciones de los productos Pi o F6P (relación estequiométrica de reacción 1:1) y calcular las pendientes de las curvas del panel superior. De esta manera se pudo graficar la actividad, medida con la formación de producto (nM) por segundo, en función de la concentración de enzima (panel inferior). En el caso del método con enzimas acopladas para el cálculo de las pendientes sólo se tomaron en cuenta los puntos a partir de los 120 seg.

enzimas acopladas el coeficiente de correlación fue también bueno aunque la pendiente de la recta dio algo diferente (Figura 13 paneles inferiores).

Es importante mencionar que estas mediciones se realizaron iniciando la catálisis con distintos volúmenes tomados de una *única* dilución de la CFBPasa que estaba purificada a homogeneidad. Cuando se realizó el mismo experimento con diluciones seriadas de la enzima parcialmente purificada (columna DEAE) la actividad en función de la concentración resultó lineal sólo a altas concentraciones y la ordenada al origen fue negativa (distinta de cero). Estos resultados sugirieron la presencia de compuestos que interfieren con la actividad enzimática y/o un proceso de absorción de la proteína a la superficie de los tubos (Eppendorf) utilizados para la dilución.

Consecuencias prácticas

Como conclusión de todo lo anterior comprobamos la importancia de realizar las mediciones de actividad luego de un cierto intervalo inicial de tiempo para poder evitar así la zona de histéresis. Dos minutos fueron suficientes, en general, para las mediciones reportadas en esta tesis. Además se eligió continuar las mediciones con el método de Chen porque mostró ser más preciso, más económico y más práctico cuando es necesario medir gran cantidad de puntos (ver Materiales y Métodos para su implementación). Aunque optamos por medir a tres tiempos de reacción para establecer la pendiente de la recta (la velocidad de reacción), también realizamos mediciones más simples a un solo tiempo restando el blanco y tomando el origen de coordenadas como el otro punto para establecer la pendiente. Este procedimiento no es exacto debido a la histéresis enzimática pero el error disminuye cuando las mediciones resultan altas comparadas con el blanco y se realizan comparaciones.

Los metales bivalentes como cofactores de la CFBPasa

Además del Mg^{2+} se conocen otros metales bivalentes que sirven como cofactores de las FBPasas. En particular, analizamos el comportamiento del Co^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} con la CFBPasa. Para ello elegimos una única condición de catálisis (pH 7,9, FBP 1,5 mM) y medimos la actividad a distintas concentraciones de los metales, con la enzima oxidada y reducida. Los valores de las constantes cinéticas obtenidas se resumen en la Tabla 4. El Zn^{2+} presentó un efecto diferente a los otros metales por lo cual se analiza por separado.

En	CFBPasa oxidada			CFBPasa reducida			
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	
general se observó que la CFBPasa reducida tuvo una mayor actividad máxima que la forma oxidada (comparar las k_{cat}) y una mayor	Mg^{2+}	3500	78	0,02	600	255	0,42
	Co^{2+}	200	29	0,14	30	114	3,81
	Mn^{2+}	30	35	1,17	6	46	7,58
	Zn^{2+}	500	17	0,03	500	13	0,03

Tabla 4. Constantes cinéticas para la catálisis con distintos cofactores de la CFBPasa. Las soluciones de catálisis tuvieron distintas concentraciones de los metales indicados más Tris-HCl 50 mM (pH 7,9) y FBP 1,5 mM. La concentración de la CFBPasa fue 1 μ g/ml y estuvo purificada a homogeneidad. En cada caso se indica la K_m en unidades μ M (concentración del metal con la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima) y la k_{cat} en unidades seg^{-1} (definida como $V_{m\acute{a}x} / [E]_t$).

afinidad por el metal (comparar las K_m). Sin embargo los valores fueron diferentes según el cofactor presente. La actividad máxima varió en el sentido: $Mg^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$ y la afinidad por el metal varió en el sentido exactamente opuesto. De esta manera, la catálisis con Mn^{2+} necesitó 100 veces menos cantidad de metal que la catálisis con Mg^{2+} , independientemente del estado de óxido/reducción de la enzima. Esta gran diferencia hizo también que la eficiencia catalítica respecto a la concentración del metal fuese mayor con Mn^{2+} que con Mg^{2+} a pesar de presentar una menor velocidad de catálisis (comparar k_{cat}/K_m). El Co^{2+} tuvo un comportamiento intermedio.

La actividad CFBPasa con el Zn^{2+} como cofactor fue diferente ya que no se observaron mayores diferencias entre las curvas de actividad de la forma oxidada y reducida de la enzima, por lo menos en las condiciones ensayadas. Igualmente las actividades medidas con este cofactor fueron relativamente bajas. Más adelante mostraremos que el efecto particular y distintivo del Zn^{2+} como cofactor también se produce cuando la enzima es sometida a inhibidores.

Inhibición por Ca^{2+} y Li^+ de la CFBPasa

El Ca^{2+} y el Li^+ son conocidos inhibidores de las FBPasas. En particular, la sensibilidad al segundo ayuda a definir un grupo de fosfomonoesterasas. Además también mencionamos la acción dual del Ca^{2+} que actúa como activador en la preincubación para la reducción de la CFBPasa y como inhibidor en la catálisis.

Decidimos probar este efecto inhibitorio cuando la catálisis se llevaba a cabo con distintos cofactores y la enzima oxidada. Aunque la capacidad catalítica fue diferente cuando el cofactor era Mg^{2+} , Co^{2+} o Mn^{2+} , la actividad cayó de manera muy parecida en presencia de concentraciones crecientes de Ca^{2+} ($I_{0,5}$ ca. 100 μM) (Figura 14A). Por otro lado, el Li^+ resultó ser un inhibidor menos potente cuando se ensayó con Mg^{2+} como cofactor ($I_{0,5} = 2$ mM) (Figura 14B).

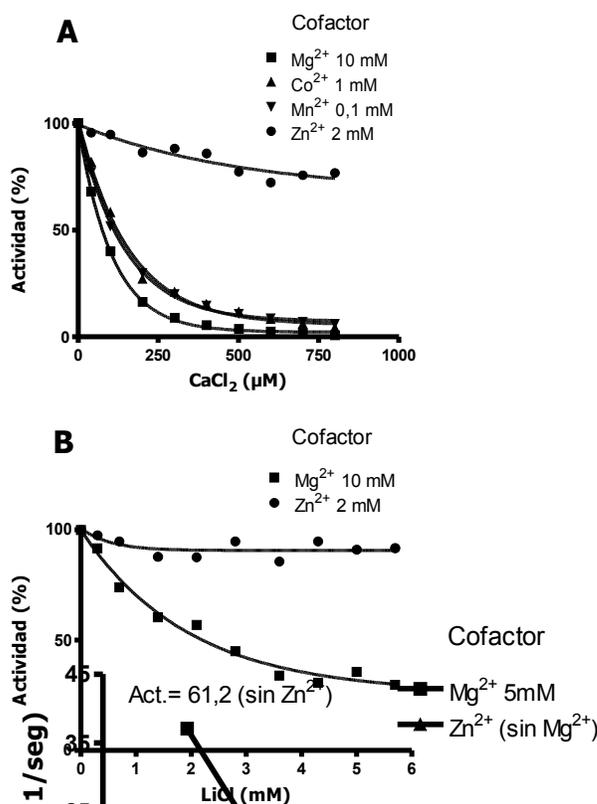


Figura 14. Inhibición de la CFBPasa con Ca^{2+} y Li^+ usando diferentes cofactores. En todos los casos se utilizó la CFBPasa oxidada (2 $\mu g/ml$ en catálisis) y purificada a homogeneidad. La solución de catálisis también tuvo Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), FBP 1 mM y el cofactor en las concentraciones indicadas en los gráficos. Se consideró 100 % de actividad a la que se midió sin inhibidor. La fuente de los cofactores fueron los correspondientes cloruros salvo en el caso del Zn^{2+} que fue el sulfato.

$ZnSO_4$ (μM)

Figura 15. Efecto dual del Zn^{2+} como inhibidor y cofactor. Las condiciones de catálisis fueron las mismas que se describen en la leyenda de la Figura 14 con excepción de que las concentraciones de enzima y FBP fueron 1,5 $\mu g/ml$ y 1,5 mM respectivamente. El eje x está en escala logarítmica.

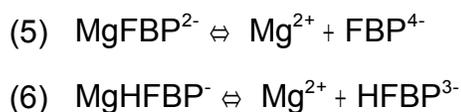
El equilibrio entre FBP, Mg²⁺ y H⁺

Para que la CFBPasa pueda llevar a cabo su actividad catalítica ya mencionamos que se requiere la presencia de tres factores indispensables: el sustrato (FBP), el cofactor (un metal bivalente como el Mg²⁺ que es considerado el fisiológico) y el pH que debe estar alrededor de 8 para alcanzar una actividad óptima. En solución estos tres compuestos (FBP, Mg²⁺ y H⁺) no se encuentran aislados y libres sino que se interrelacionan entre sí a través de varios equilibrios químicos formando distintos complejos.

En este sentido el FBP y los H⁺ están relacionados por cuatro equilibrios de disociación ácida:



Por otro lado, en las condiciones aplicadas en esta tesis, el FBP interactúa con el Mg²⁺ principalmente a través de los siguientes equilibrios:



Para analizar la actividad CFBPasa es importante conocer las concentraciones de las especies reactivas. De esta manera, teniendo en cuenta los equilibrios planteados arriba, dedujimos las ecuaciones que expresan dichas concentraciones en función de las cantidades totales de FBP, Mg²⁺ y H⁺.

Para ello tuvimos en cuenta que la CFBPasa funciona a pH alcalino por lo que no resulta relevante tener en cuenta los dos primeros equilibrios de disociación ácida del FBP. Por lo tanto los equilibrios considerados fueron el 3, 4, 5 y 6 y los compuestos cuyas concentraciones calculamos fueron seis: H₂FBP²⁻, HFBP³⁻, FBP⁴⁻, MgHFBP⁻, MgFBP²⁻ y Mg²⁺ libre. Si a las cuatro ecuaciones mencionadas sumamos las dos ecuaciones de masa para FBP y Mg²⁺ tenemos entonces seis ecuaciones y seis incógnitas con lo cual el problema puede ser resuelto.

En la Tabla 5 se muestran las ecuaciones que resuelven el problema planteado y en el Apéndice se desarrolla la deducción de las mismas. La mayor dificultad de la deducción reside en el cálculo de las raíces de un polinomio de grado 3. Una vez copiadas las ecuaciones de la Tabla 5 en una hoja de cálculo resulta sencillo obtener las concentraciones en el equilibrio de los distintos compuestos a partir de las concentraciones totales de FBP, Mg²⁺ y el pH.

Consideraciones acerca de la aplicabilidad de las ecuaciones

Dado que las ecuaciones de equilibrio iónico definen relaciones entre las *actividades* de distintos compuestos, igualar las actividades con las concentraciones es una simplificación que no siempre resulta correcta. Para evitar las complicaciones relacionadas con los coeficientes de actividad, generalmente se trabaja a una fuerza iónica constante.

Teniendo en cuenta estas limitaciones podemos decir que: dado un compuesto A con dos constantes de acidez y un compuesto M con dos constantes de disociación con las dos formas más cargadas de A, nuestro procedimiento resolvió el cálculo de las concentraciones de los compuestos resultantes en el equilibrio. En nuestro caso $A = \text{FBP}$ y $M = \text{Mg}^{2+}$, pero la aplicabilidad de las ecuaciones es más amplia. Se pueden utilizar para calcular las concentraciones de los compuestos en una preparación quelante-metal ($A = \text{EDTA/EGTA}$ y $M = \text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) o nucleótidos y metales ($A = \text{ATP}$, $M = \text{Mg}^{2+}$). En particular el cálculo de las concentraciones de MgATP^{2-} es importante en los estudios cinéticos de muchas enzimas ATP-dependientes ya que es considerado el verdadero sustrato.

En la literatura este problema se aborda de varias maneras de las cuales sólo mencionaremos dos:

a) Se consideran todos los equilibrios de disociación ácida de A pero solamente el equilibrio de M con la forma más cargada de A. De esta manera el cálculo de las concentraciones se simplifica considerablemente aunque tiene un rango de aplicabilidad más limitado [68].

b) Se tienen en cuenta todos los equilibrios (los aquí planteados más otros adicionales) realizándose los cálculos a través de un proceso de iteración [69].

En general los estudios cinéticos con la FBPasa consideran al FBP libre como sustrato y minimizan la existencia del complejo $MgFBP^{2-}$ [70]. En esta tesis los estudios cinéticos no requieren precisión extrema en las concentraciones por lo que siempre se informan

Concentraciones iniciales de FBP y metal. (Solo mencionaremos que en todas las condiciones de trabajo (pH ca. 8 y concentración total de FBP ca. 2 mM) la concentración total de Mg^{2+} determina si la especie predominante en solución es FBP^{4-} o $MgFBP^{2-}$. Según las ecuaciones aquí expuestas predomina la forma $MgFBP^{2-}$ (88 % del FBP total) cuando la concentración

total de Mg^{2+} es 20 mM. Este aspecto adquiere importancia para análisis más detallados.

Constantes de disociación	D10	k1 (mM)	0,000174
	D11	k2 (mM)	0,0011
	D12	k3 (mM)	2
	D13	k4 (mM)	7,59
Corroboración de las ecuaciones	D14	[FBP]t	=D4+D5+D6+D7+D8
	D15	[Mg]t	=D7+D8+D9
	D16	k1 (mM)	=D4*D20/D5
	D17	k2 (mM)	=D5*D20/D6
	D18	k3 (mM)	=D4*D9/D7
	D19	k4 (mM)	=D5*D9/D8
Variables internas para el cálculo	D20	[H ⁺]	=10 [^] (-D3)*1000
	D21	a1	=1+D20/D10+D20 ² /D10/D11
	D22	a2	=1+D12/D10/D13*D20
	D23	a3	=D20+D10*D13/D12
	D24	b0	=D12*D10*D13
	D25	b1	=D22*D10*D13+D12*D23
	D26	b2	=D22*D23
	D27	c0	=-D24*D1
	D28	c1	=D21*D24+D10*D13*D2+D12*D2*D20-D25*D1
	D29	c2	=D21*D25+D23*D2+D22*D2*D20-D26*D1
D30	c3	=D21*D26	
D31	x'	=-2*D29 ³ +9*D28*D29*D30-27*D27*D30 ²	
D32	y'	=(-(-4*(3*D28*D30-D29 ²) ³ +(-2*D29 ³ +9*D28*D29*D30-27*D27*D30 ²) ²)) ^(1/2)	
D33	x	=(D32 ² +D31 ²) ^(1/6) *COS(ATAN2(D31;D32)/3)	
D34	y	=(D32 ² +D31 ²) ^(1/6) *SENO(ATAN2(D31;D32)/3)	

Tabla 5. Ecuaciones para el cálculo de las concentraciones en el equilibrio de FBP y Mg^{2+} . Los cálculos sirven para condiciones alcalinas ($pH \geq 7$) ya que no se consideran los compuestos de FBP que predominan a pH ácido (H_4FBP y H_3FBP^-). Todas las concentraciones se expresan en unidades mM. Las 34 ecuaciones (D1 a D34) se definen y se deducen en el Apéndice. Para el cálculo automático de los valores toda la tabla puede ser copiada en una hoja de cálculo Excel a partir de la celda A1, de tal manera que las ecuaciones queden en la columna 4 (columna "D") a partir de la fila 1. Si se dispone de la versión en inglés del programa se debe reemplazar "SENO" por "SIN" en la ecuación D34.

Conclusiones

Para medir la actividad CFBPasa se requiere definir con precisión los factores básicos: estado de óxido/reducción de la enzima, sustrato (FBP), cofactor y pH. Los experimentos en este capítulo buscaron en parte mostrar algunos aspectos de dichos factores y cómo se relacionan entre sí.

La enzima recombinante expresada en bacteria y purificada sólo con una columna de intercambio aniónico DEAE presentó una afinidad relativamente alta por el cofactor Mg^{2+} revelando indirectamente que se encontraba reducida. La forma oxidada se obtuvo espontáneamente cuando se realizó una purificación adicional con una columna de exclusión Superdex-200 lo cual posiblemente eliminó un compuesto no proteico que evitaba la oxidación. Con esta preparación, las mediciones más precisas fueron realizadas luego de iniciada la catálisis y estimando el producto formado a varios tiempos sin recurrir al blanco de reacción, pues este no coincide con la ordenada al origen. Teniendo en cuenta estos factores, la actividad en función de la concentración de enzima fue perfectamente lineal. Dicha linealidad desaparecía trabajando con la CFBPasa parcialmente purificada (sólo con una columna DEAE) y con diluciones seriadas de la enzima.

La forma reducida tuvo mayor afinidad por el cofactor y mayor velocidad de catálisis respecto a la forma oxidada cuando se utilizó Mg^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} pero no mostró grandes diferencias con Zn^{2+} como cofactor. El Mn^{2+} fue el catión que tuvo mayor afinidad por la enzima siendo por ello el mejor en términos de eficiencia catalítica a pesar de catalizar a una velocidad relativamente menor.

Cuando se utilizó Mg^{2+} , Co^{2+} o Mn^{2+} como cofactor de la enzima oxidada, la inhibición con Ca^{2+} fue similar. mientras que el Li^{+} presentó una inhibición menos potente que el Ca^{2+} . En este contexto, la catálisis con Zn^{2+} se diferenció pues fue muy poco sensible a la inhibición por ambos cationes. En línea con estas diferencias cinéticas, el Zn^{2+} exhibió una acción dual sobre la enzima, a bajas concentraciones actuó como inhibidor y a altas concentraciones como cofactor.

Finalmente se dedujeron las ecuaciones para calcular las concentraciones de los distintos compuestos que surgen del equilibrio entre los principales participantes de la catálisis, esto es el sustrato, el cofactor y el pH del medio.

Los resultados suministraron las bases para los experimentos informados en los capítulos 3 y 4. En particular las mediciones reportadas en el capítulo 4 fueron más precisas pues se usó la enzima purificada a homogeneidad y se aplicó la técnica de medición a varios tiempos. Además analizamos con mayor profundidad al factor pH, uno de los aspectos relevantes de esta tesis.

Capítulo 2

**Nuevo método de screening de la actividad
fosfatasa**

Objetivo

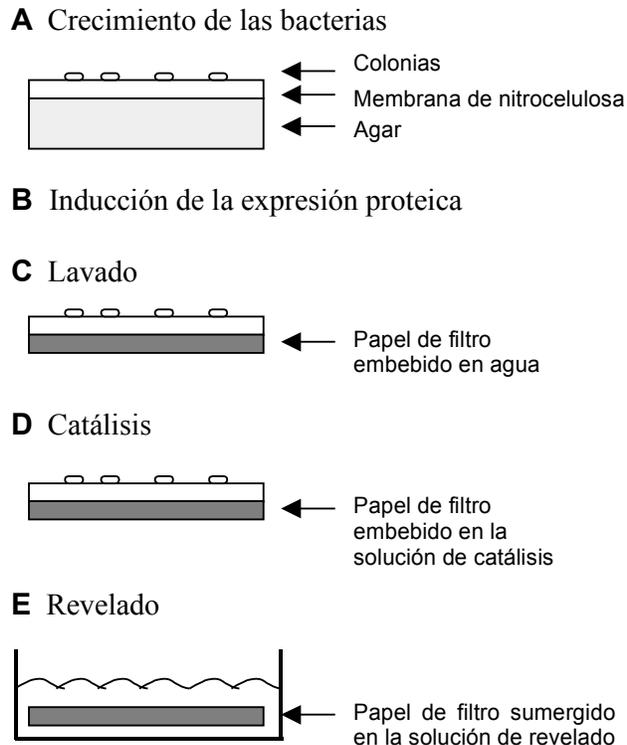
Desarrollar un nuevo método de screening de actividad fosfatasa en bacterias que permita el uso de sustratos naturales y que sirva como herramienta para encarar experimentos de evolución dirigida. Determinar sus potencialidades y limitaciones.

Resultados

Descripción del método de screening

La técnica de screening puede dividirse en cinco etapas: A) Crecimiento de las bacterias B) Inducción de la expresión proteica C) Lavado D) Catálisis E) Revelado. La Figura 16 muestra el esquema del método para detectar una actividad catalítica en general. En ese contexto describimos a continuación aspectos experimentales relevantes de las etapas aplicadas a la detección de la actividad fosfatasa.

Figura 16. Esquema del procedimiento de screening de actividad catalítica. (A) Las bacterias son plaqueadas directamente sobre la membrana de nitrocelulosa colocada sobre la superficie del agar. Se deja crecer hasta que las colonias alcanzan un diámetro de aproximadamente 1mm. **(B)** Se agrega el inductor apropiado en el agar, si es requerido. **(C)** La membrana de nitrocelulosa se coloca, con las colonias hacia arriba, sobre un papel de filtro embebido en agua. Esta etapa de lavado debe ser repetida hasta que todos los interferentes con la reacción de revelado hayan sido removidos. **(D)** La membrana de nitrocelulosa se coloca sobre un papel de filtro embebido en la solución de catálisis. **(E)** Finalmente, este papel de filtro es rápidamente sumergido en la solución usada para revelar la presencia de los productos de reacción. Luego se lo coloca sobre papel absorbente para remover el exceso de líquido y se deja hasta que se desarrolle el color.



A) Crecimiento de las bacterias

Las bacterias fueron plaqueadas sobre membranas de nitrocelulosa depositadas a su vez sobre un medio de cultivo semisólido conteniendo el antibiótico adecuado. La densidad de plaqueo debía ser lo suficientemente baja para que las colonias alcancen un diámetro adecuado para el screening (aproximadamente 1 mm) y lo suficientemente alta para trabajar con un adecuado número de colonias.

El crecimiento de las colonias sobre las membranas de nitrocelulosa fue más lento que plaqueadas directamente sobre el medio de cultivo. En las condiciones usadas en esta tesis (ver materiales y métodos), las colonias tardaron aproximadamente 24 h hasta llegar al diámetro adecuado para el screening, mientras que sin la nitrocelulosa el tiempo se acorta a 12 h. A pesar de este inconveniente, el plaqueo sobre la nitrocelulosa evitó tener que replicar la placa, dado que las bacterias permanecen viables durante el screening.

Otro factor que afectó la velocidad de crecimiento fue la nitrocelulosa usada. En los experimentos se utilizó una nitrocelulosa con “soporte” lo cual hace la membrana menos quebradiza y más manejable. Sin embargo, cuando se usó una membrana de nitrocelulosa sin “soporte” el crecimiento de las bacterias fue más rápido y el revelado del screening más intenso por lo que sería una alternativa válida.

El tamaño promedio del poro de las membranas de nitrocelulosa usadas ($0,2 \mu\text{m}$) fue más pequeño que la célula de *E. coli* (típicamente $0,5 \times 2 \mu\text{m}$) (Figura 17). Esto explica por qué durante el crecimiento, las colonias no contaminaron el medio de cultivo pero fue posible el pasaje libre no sólo de los nutrientes y el antibiótico sino también posteriormente de los sustratos y productos que intervienen en la técnica de screening.

B) Inducción de la expresión proteica

Se retiró la membrana de nitrocelulosa con las colonias de la placa y se esparció el inductor sobre el medio de cultivo semisólido para reincorporar la membrana sobre la placa. De esta manera el inductor difundió desde el medio de cultivo hacia las bacterias a través de la

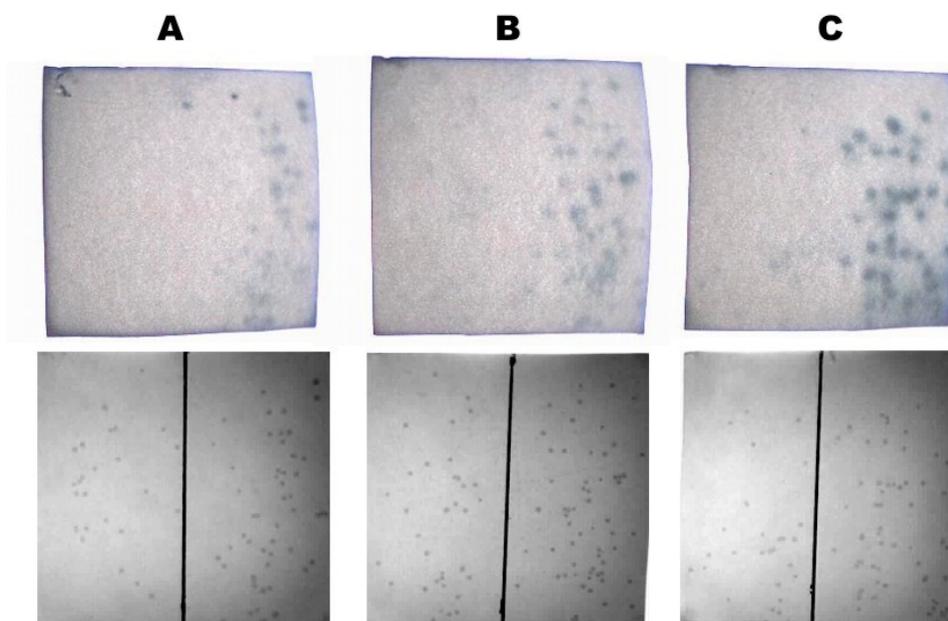


Figura 17. Célula de *E. coli*. La bacteria es visualizada con luz transmitida [71]. La porosidad de la membrana de nitrocelulosa usada en los screenings (diámetro de poro promedio $0,2 \mu\text{m}$) permite el libre pasaje de nutrientes, antibiótico, sustratos y productos pero retiene a la bacteria.

membrana.

La inducción no siempre fue necesaria y dependía del sistema de expresión utilizado. Para analizar este hecho se expresó la CFBPasa en la cepa JM109(DE3) con el vector pET 22 b(+) que tiene un promotor fuerte de expresión (promotor T7). En estas condiciones no se vieron diferencias en el revelado de actividad entre las colonias no inducidas y las inducidas con IPTG (experimento en paralelo). Por lo tanto, en este caso, la expresión basal de la proteína alcanzó para saturar la señal.

Distinto fue el resultado cuando se expresó *phoA* en la cepa JM109(DE3) con el vector pBAD (Figura 18). Los vectores pBAD tienen un promotor, llamado P_{BAD}, que es activado en presencia de arabinosa. En ausencia del inductor, el nivel de transcripción es muy bajo el cual puede reducirse aún más creciendo las bacterias en presencia de glucosa [72]. De esta manera, el revelado de actividad fue más intenso aplicando el inductor arabinosa (Figura 18C) que en



su ausencia (Figura 18B) o agregando el inhibidor glucosa (Figura 18A). Sin embargo, estos dos últimos casos detectaron una actividad fosfatasa (aunque no en todas las colonias) que no es atribuible a fosfatasas endógenas de *E. coli* ya que el control con el vector de expresión vacío (mitad izquierda de las placas) no reveló ninguna actividad.

Figura 18. Inducción de la expresión proteica. Fila inferior: se muestran las membranas de nitrocelulosa con las colonias de *E. coli* que poseen el vector vacío pET 22 b(+) (mitad izquierda de las membranas) y la *phoA* clonada en el mismo vector (mitad derecha de las membranas). Fila superior: Papeles de filtro correspondientes utilizados para revelar la actividad fosfatasa con la solución de Chen. La catálisis se llevó a cabo con una solución 100 mM Tris-HCl (pH 7,9) y 3 mM PNPP durante 10 min. **(A)** Se esparció 0,2 ml de glucosa 10 % (P/V) (inhibidor de la expresión) en el medio de cultivo previamente al plaqueo de las bacterias. **(B)** Las bacterias crecieron sin inductor ni inhibidor de expresión. **(C)** Se esparció 0,2 ml de arabinosa 10 % (P/V) (inductor de la expresión) en el medio de cultivo luego de 24 h de crecimiento y 2 h previo a la catálisis.

Por lo tanto, la actividad basal (sin inducción) de las enzimas, utilizando los vectores de expresión pET y pBAD, fue cualitativamente mayor a la actividad basal detectada al inducir la expresión proteica en medios líquidos.

C) Lavado

El lavado de la membrana de nitrocelulosa, y de las colonias en ella contenida, fue necesario para evitar el posterior revelado inespecífico de actividad. Para ello colocamos la membrana de nitrocelulosa sobre papel de filtro previamente embebido en agua durante unos 10 min. Es mejor usar papeles de filtro con buena absorbencia, como el papel de filtro Whatman. Además, las colonias siempre quedaron hacia arriba, nunca en contacto directo con los papeles de filtro. Esta operación fue repetida varias veces hasta que el papel de filtro, producto del lavado, no desarrolló color con la solución usada para revelar catálisis.

El lavado de la membrana de nitrocelulosa fue realizado en dos situaciones:

a) *Al retirar la membrana de la placa de cultivo, antes de efectuar la catálisis.* En esta etapa observamos en el primer papel de filtro usado en el lavado y revelado con la solución de Chen un fondo azul con zonas de color más intensas correspondientes a las colonias. Esto muestra que lavamos el medio de cultivo adherido a la membrana y compuestos asociados a las colonias. Luego de varios lavados logramos la completa remoción de estos interferentes (el papel de filtro del lavado no exhibió color azul característico de la coloración con la solución de Chen).

b) *Luego de efectuar la catálisis, antes de usar nuevamente la misma membrana para catalizar.* Este aspecto se analiza a continuación.

D) Catálisis

La membrana de nitrocelulosa fue colocada, con las colonias hacia arriba, sobre un papel de filtro embebido con la solución de catálisis. En este caso también fue preciso que el papel de filtro tenga buena absorbencia. Después de catalizar entre 5 y 10 min, los productos de la reacción fueron detectados en el papel de filtro mientras que la membrana de nitrocelulosa fue lavada para una nueva catálisis.

Expresamos la *phoA* y usamos como sustrato el PNPP para analizar visualmente algunos aspectos de esta etapa del método (Figura 19). Previsiblemente, durante la catálisis las colonias se pusieron amarillas evidenciando la formación del producto de hidrólisis p-nitrofenol sobre la membrana de nitrocelulosa (Figura 19A). En cambio, cuando se reveló con la solución de Chen, los puntos azules en el papel de filtro mostraron el producto fosfato bajo la membrana de nitrocelulosa (Figura 19C). Igualmente, antes del revelado también se habían observado manchas amarillas de p-nitrofenol en el papel de filtro.

Posteriormente, durante el lavado se detectó la gradual desaparición del p-nitrofenol en las colonias y del fosfato en los papeles de filtro (Figura 19C) observándose finalmente la total

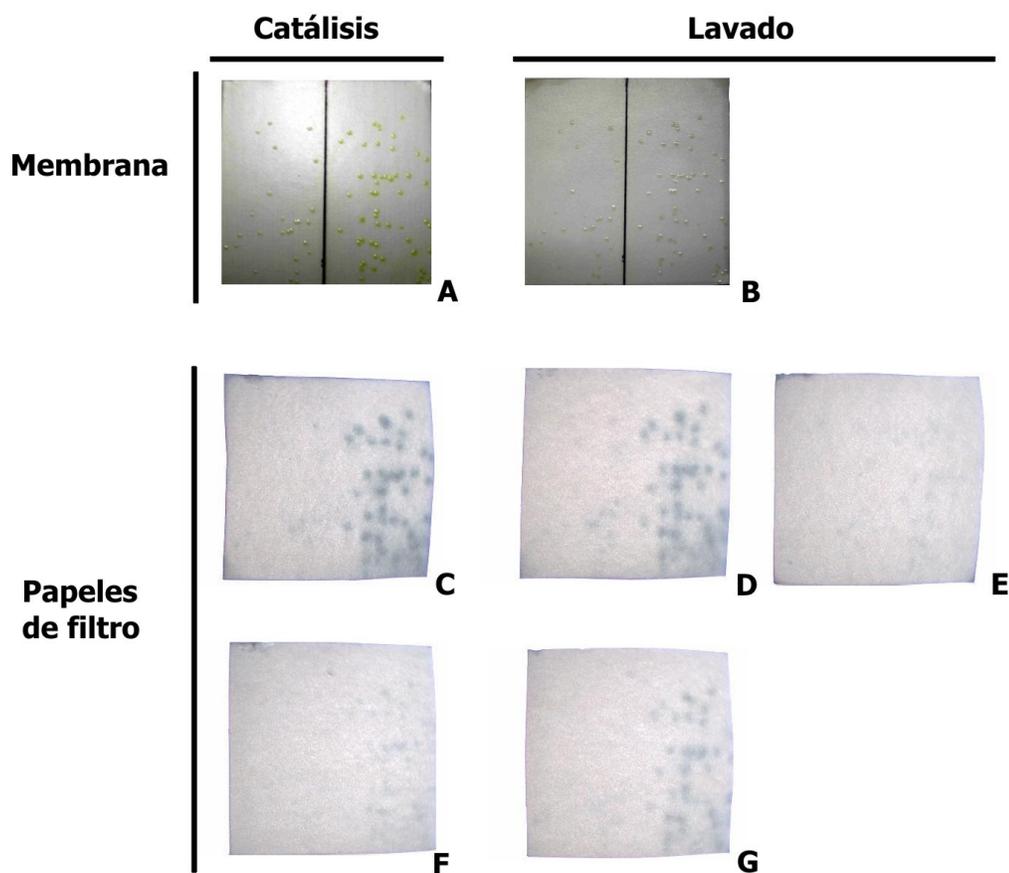


Figura 19. Catálisis y lavado. Se plaquearon células de *E. coli* con el plásmido pET 22b(+) vacío (mitad izquierda de la membrana) y con la *phoA* clonada en el mismo plásmido (mitad derecha de la membrana). **(A)** y **(C)** La inducción de la expresión, catálisis (10 min) y revelado se hizo tal como se describe en la Figura 18. **(D)** Revelado del papel de filtro utilizado en el primer lavado de 10 min de la membrana **(B)** y **(E)** Membrana y revelado del papel de filtro después de 4 lavados de 10 min cada uno. **(F)** La catálisis se efectuó nuevamente igual que en C, con la misma membrana, pero sólo por 2,5 min. **(G)** Papel de filtro del primer lavado luego de la catálisis en F.

remoción de dichos productos tanto en las colonias (Figura 19B) como en los papeles de filtro (Figura 19E).

Para determinar si la reacción se estaba produciendo sobre la membrana o bajo la membrana, se llevó a cabo una nueva catálisis pero a un tiempo muy corto (2,5 min). En este caso, el papel de filtro usado para la catálisis no reveló al producto de reacción (Figura 19F), mientras que el papel de filtro aplicado posteriormente, en el lavado, sí lo hizo (Figura 19G). En conjunto, la lenta difusión de los productos hacia el papel de filtro en la primera etapa y la aparición del producto en la segunda son congruentes con la hidrólisis del compuesto fosforilado en las colonias.

Generalizando estos resultados podemos decir que inicialmente los sustratos difunden, a través de la membrana de nitrocelulosa, desde el papel de filtro hasta las colonias. Allí se produce la catálisis y luego los productos de reacción difunden de vuelta hacia el papel de filtro donde finalmente son detectados. Por otra parte, los posteriores lavados son necesarios para remover completamente el producto de reacción de las colonias.

E) Revelado

El revelado del producto de reacción fue realizado sobre el papel de filtro utilizado para la catálisis. Luego de sumergirlo rápidamente (unos 2 seg) en la solución de Chen, que reacciona con el fosfato hidrolizado formando un complejo de color azul [73], aparecieron manchas azules en las zonas del papel que estuvieron en contacto con las colonias activas. Estas colonias fueron identificadas superponiendo la imagen de la membrana con la del papel revelado.

Al sumergir el papel de filtro en la solución de Chen parte del producto se solubiliza lo cual disminuye un poco la sensibilidad. Sin embargo, luego de varias pruebas, fue la forma más efectiva y simple que encontramos para revelar la actividad fosfatasa. Si se usan otros reveladores para detectar una actividad enzimática diferente a la fosfatasa, podría probarse la aplicación en forma de spray como una alternativa de revelado.

Utilización de distintas fosfatasas y sustratos

Los métodos de screening de actividad fosfatasa existentes hasta el momento se basan en el color o la fluorescencia que se desarrolla al hidrolizar el fosfato de un determinado compuesto químico. Normalmente este compuesto es no fisiológico por lo que sólo es posible detectar fosfatasas con baja especificidad por el sustrato. Por el contrario, el método de screening aquí descrito permite utilizar los sustratos naturales de las enzimas. De esta manera, para establecer hasta qué punto es posible generalizar el procedimiento, probamos distintas fosfatasas y sustratos.

Pudimos detectar la actividad tanto de una fosfatasa ácida (*agp*) como de otras fosfatasas alcalinas (*phoA* y *CFBPasa*) utilizando sustratos fisiológicos (Tabla 6). Sin embargo, la sensibilidad de detección no siempre fue la misma. Esto se debió a que en determinadas situaciones las bacterias clonadas con el vector vacío exhibieron una señal, evidenciando una actividad fosfatasa endógena (columna “pET” en la Tabla 6). Por ello, fue perfectamente detectable la actividad fosfatasa de la *phoA* y de la *CFBPasa* usando los sustratos PNPP y FBP respectivamente, un poco más dificultosa la detección de la actividad de la *agp* sobre la glucosa 1-P y la fructosa 1-P y prácticamente imposible la detección de la *phoA* con glucosa 1-P.

Sustrato	Buffer	pET	agp	phoA	CFBPasa
PNPP	Tris-HCl, pH 8	-	n.d.	++	-
	Na-formiato, pH 3.46	++	n.d.	n.d.	n.d.
Glucosa 1-P	Tris-HCl, pH 8	++	n.d.	++	n.d.
	Na-acetato, pH 4.6	+	++	n.d.	n.d.
FBP	Tris-HCl, pH 8	-	n.d.	++	++
	Na-formiato, pH 3.46	++	n.d.	n.d.	n.d.
Fructosa 6-P	Tris-HCl, pH 8	+	n.d.	++	n.d.
	Na-acetato, pH 4.6	+	++	n.d.	n.d.
Fructosa 1-P	Tris-HCl, pH 8	+	n.d.	++	n.d.

Tabla 6. Detección de actividad fosfatasa utilizando distintas enzimas y sustratos. La intensidad de las manchas azules fue estimada en los papeles de filtro. Se utilizó la cepa *E. coli* JM109(DE3) expresando las fosfatasas **agp**, **phoA** y **CFBPasa**. Bacterias transformadas con el vector pET 22b(+) vacío fueron tomadas como control (**pET**). La concentración de los sustratos fue de 3 mM y la de los buffers de 50 mM. En el ensayo de la *CFBPasa* se adicionó 10 mM de $MgCl_2$. - sin intensidad; +, baja intensidad; ++, alta intensidad; n.d., no determinado.

Esta actividad fosfatasa endógena dependía, sin embargo, del pH de la solución de catálisis. Es así que no detectamos la hidrólisis al emplear el PNPP y el FBP en medio alcalino pero sí en medio ácido. Por el contrario, con glucosa 1-P la actividad endógena fue leve en medio ácido e intensa en medio alcalino.

Cabe destacar que en estos experimentos se utilizó una enzima altamente específica por el sustrato (la CFBPasa) cuya detección no hubiese sido posible empleando los métodos de screening disponibles actualmente. Consecuentemente, la CFBPasa sólo fue detectada con FBP como sustrato y no con PNPP (como se vio en la introducción, éste es un sustrato común para hacer screening de actividad fosfatasa pero no es hidrolizado por la CFBPasa).

Discriminación entre colonias que expresan la *phoA* y la CFBPasa

Decidimos probar la capacidad del método para distinguir la fosfatasa expresada por cada colonia, característica que no tienen otros procedimientos. Para ello, mezclamos medios de cultivo líquido de bacterias clonadas con la *phoA*, la CFBPasa y el vector vacío pET para luego plaquear sobre nitrocelulosa (Figura 20). Se ensayó la actividad, primero con FBP y, luego de lavar, con PNPP. El FBP fue hidrolizado tanto por la CFBPasa como por la *phoA* mientras que el PNPP fue hidrolizado solamente por la *phoA*. Por lo tanto era lógico que el segundo papel de filtro (Figura 20C) presentara un subconjunto de los puntos azules que aparecieron en el primero (Figura 20B). Analizamos toda esta información en una sola imagen utilizando un software para transformar el color azul a amarillo en el segundo papel de filtro y para superponerlo con el primer papel de filtro y con las colonias (Figura 20D). De esta manera distinguimos las bacterias que tenían el vector vacío (aparecen sin color) de las que expresaban la CFBPasa (color azul) y la *phoA* (color verde que resulta de la superimposición del azul con el amarillo). Seleccionamos al azar 2 colonias de cada tipo y confirmamos lo anterior con un análisis de restricción (Figura 20E).

Este experimento demostró también que es posible usar una misma membrana para catalizar más de una vez y con sustratos diferentes. Los lavados intermedios remueven los productos de reacción y permiten ensayar con nuevos sustratos la actividad catalítica de las colonias. Este hecho se observó también con otras fosfatasas las cuales, además, mantuvieron su funcionalidad intacta a lo largo de los primeros ciclos de catálisis/lavado.

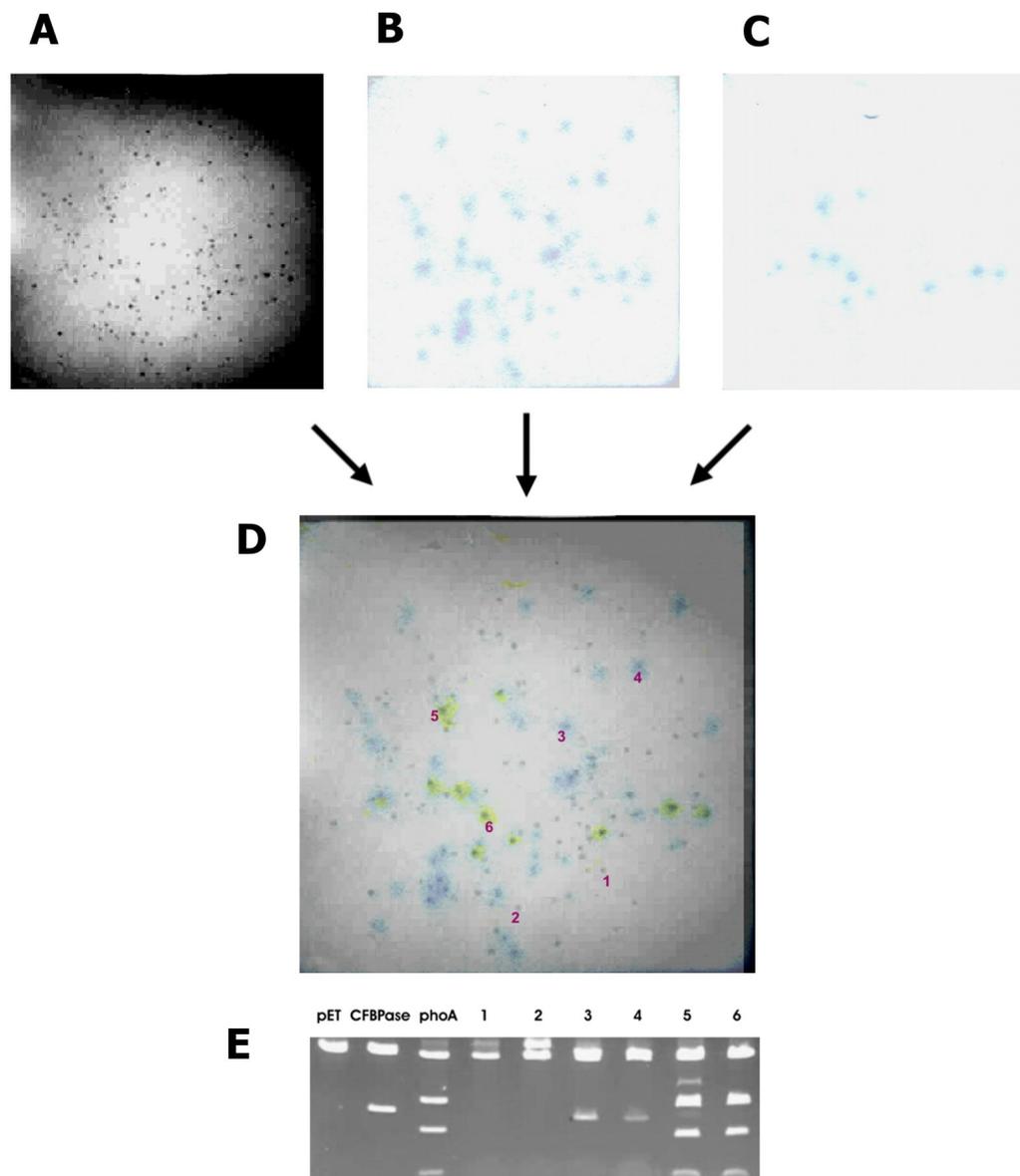


Figura 20. Diferenciación entre la actividad CFBPase y la phoA. Bacterias con el gen de la CFBPase, la phoA y el vector vacío pET 22b(+) fueron mezcladas y plaqueadas sobre una membrana de nitrocelulosa. Luego de inducir con IPTG (ver materiales y métodos) la catálisis fue llevada a cabo con Tris-HCl 100 mM (pH 7,9), MgCl₂ 10 mM y FBP 3 mM durante 10 min. Se lavó la membrana tres veces y se volvió a catalizar pero con Tris-HCl 100 mM (pH 7,9) y PNPP 3 mM durante el mismo tiempo. Se aislaron plásmidos de 6 colonias para ser digeridos con las enzimas EcoRI y XbaI. La restricción fue analizada en un gel de agarosa 1 %. **(A)** Membrana de nitrocelulosa con las bacterias. **(B)** Papel de filtro revelando la actividad con FBP. **(C)** Papel de filtro revelando la actividad con PNPP. **(D)** Superposición de las tres imágenes anteriores. Previamente, el color azul en C fue transformado a amarillo. Se indican las 6 colonias seleccionadas. **(E)** Gel de agarosa mostrando la restricción de los plásmidos correspondientes.

Limitaciones del método para determinar las condiciones de catálisis

Nos planteamos hasta qué punto este método de screening reproducía las condiciones *in vitro* de catálisis.

Como ya se sabe, la CFBPasa requiere un metal bivalente como cofactor para llevar a cabo la catálisis. Congruentemente, el procedimiento de screening no reveló actividad CFBPasa cuando se usó una solución de catálisis sin metal. Al agregar 10 mM de MgCl₂ (concentración usada *in vitro* para medir la actividad de la enzima oxidada) la actividad CFBPasa pudo ser detectada. Por lo tanto, en este caso, la bacteria no pudo suplir el cofactor y el comportamiento catalítico fue similar al observado *in vitro*.

No ocurrió lo mismo cuando se probó el efecto del Ca²⁺. En los ensayos *in vitro*, la actividad de la CFBPasa es inhibida completamente en presencia de CaCl₂ 0,4 mM. Sin embargo, en estas condiciones, prácticamente no se observó inhibición usando el procedimiento de screening. Sólo se obtuvo una inhibición parcial (nunca total) cuando se usó una solución de catálisis con CaCl₂ 4 mM. Este hecho tuvo influencia en los resultados que se describen en el capítulo siguiente de esta tesis.

Anteriormente, señalamos el efecto que tuvo el pH para modular la actividad fosfatasa endógena de las bacterias (columna “pET” en la Tabla 6). De esta forma, algunos sustratos vieron favorecida su hidrólisis en medio ácido y otros en medio alcalino. Además, fue posible detectar la actividad tanto de fosfatasas alcalinas como ácidas. Por lo tanto, concluimos que es posible fijar el pH de catálisis a través del buffer utilizado en el procedimiento.

La razón por la cual algunas variables catalíticas pueden ser fijadas y otras no, no es muy clara. Cabe mencionar que la CFBPasa fue clonada en el vector pET sin ningún péptido señal, por lo que asumimos que se expresó en el citoplasma. Sin embargo, su actividad fue determinada y detectada en el medio externo. Una posible explicación es que la actividad catalítica correspondió a la enzima liberada por la lisis espontánea de bacterias, que se da fundamentalmente en el centro de las colonias. Este hecho no fue probado.

Conclusiones

Desarrollamos un método de screening para detectar actividad fosfatasa en colonias de bacterias. La diferencia fundamental con otros procedimientos de screening reside en la posibilidad de utilizar los sustratos naturales y realizar ensayos catalíticos diferentes con las mismas colonias. Otros métodos reportados utilizan distintos sustratos no específicos como por ejemplo PNPP [75], *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* [76], *phenolphthalein diphosphate/methyl green* [77] y *2-(5'-chloro-2'-phosphoryloxyphenyl)-4-[3H]-quinazolinone* [78].

La técnica desarrollada permitió separar las colonias de los productos de reacción por medio de una membrana de nitrocelulosa durante el proceso de catálisis. De esta manera fue posible revelar dichos productos sin tener a las bacterias como interferentes. Relacionado con este aspecto, experimentos preliminares intentaron revelar la presencia del fosfato liberado poniendo las bacterias en contacto directo con la solución de Chen. Como resultado todas las colonias se pusieron azules, independientemente de la expresión o no de fosfatasas, mostrando una reacción inespecífica con componentes celulares.

El procedimiento fue probado no sólo expresando varias fosfatasas y utilizando distintos sustratos y pH sino también detectando la actividad fosfatasa endógena de las bacterias. Dado que este último aspecto puede interferir con los estudios de fosfatasas clonadas, se debería recurrir a cepas especiales de bacterias o a sustratos alternativos.

Con ciertas limitaciones fue posible reproducir algunas características bioquímicas de la CFBPasa, observadas *in vitro*. Este hallazgo abrió la posibilidad de realizar screenings sobre bibliotecas constituidas por mutantes al azar con el objeto de encontrar variantes expresando características bioquímicas determinadas.

Además de la actividad fosfatasa el método puede ser adaptado para otras actividades enzimáticas. Para ello es necesario contar con una forma adecuada para detectar el producto de la reacción catalítica en cuestión. Particularmente, el fosfato liberado durante la hidrólisis pudo ser detectado satisfactoriamente en el papel de filtro Whatman debido a que su difusión resultó mínima en este soporte. Con otros productos de reacción puede ser útil probar otras clases de papeles o materiales.

Capítulo 3

**Mutantes de CFBPasa obtenidas por técnicas de
evolución dirigida**

Objetivo

Obtener mutantes de CFBPasa que presenten una menor sensibilidad a la inhibición por Ca^{2+} . Aplicar para ello la técnica de evolución dirigida usando como herramienta principal el método de screening descrito en el capítulo 2. Determinar cuáles son las mutaciones puntuales en la secuencia primaria causantes del cambio en las propiedades bioquímicas para que sirvan como base de estudios estructura/función.

Resultados

Ensayos preliminares para el experimento de evolución dirigida

Un ciclo en un experimento de evolución dirigida consta de varias etapas (Figura 8 en la introducción). La generación de las mutaciones al azar y el screening son las más críticas. Esto se debe a que el tamaño de la biblioteca de mutantes generadas debe ser adecuado a la capacidad de screening. Es difícil encontrar una mutante que presente el cambio de propiedad buscado si la biblioteca es demasiado grande en relación a la capacidad de screening. Por otro lado, si la biblioteca es demasiado pequeña es improbable que dicha mutante se genere (ver introducción para más detalles).

El método de screening que usamos fue descrito en el capítulo anterior. Las condiciones implementadas (placas cuadradas de 10 cm x 10 cm) tienen la capacidad para analizar unas 1000 colonias por placa. Esta densidad de plaqueo está en el límite para que las colonias de bacterias tengan un buen crecimiento, sin superposiciones que impidan el correcto revelado del producto de catálisis. El número de placas que manejamos por experimento fue de alrededor de 10 por lo que en nuestras manos la capacidad total de análisis del método de screening estuvo en el orden de las 10.000 colonias.

Fijada entonces la capacidad de screening tuvimos que regular la tasa de mutaciones, el otro factor crítico. Como técnica de mutagénesis al azar elegimos una que se basa en la PCR (PCR *error-prone*). Optamos por la variante que agrega Mn^{2+} a la reacción de polimerización lo que provoca que la enzima Taq polimerasa incremente su tasa de error natural en el reconocimiento de los dNTP [79]. La cantidad de mutaciones por molécula de ADN puede regularse, hasta cierto punto, con las condiciones de reacción.

Aunque todas las mutaciones de aminoácidos deben estar representadas con la misma probabilidad en una biblioteca ideal, en la práctica existen diferentes sesgos que van en contra de ello. El primer sesgo insalvable proviene de la codificación de los aminoácidos en el ADN. Para mutar un aminoácido en otro son necesarias entre una y tres mutaciones puntuales en el correspondiente codón. Esto conduce a que determinadas sustituciones de aminoácidos sean más comunes que otras. Otro sesgo inherente a la PCR *error-prone* es la tendencia que tiene esta técnica de favorecer las transiciones (sustituciones entre los nucleótidos purínicos adenina/guanina, o entre los nucleótidos pirimidínicos citosina/timidina) en detrimento de las transversiones (sustituciones de una purina por una pirimidina o viceversa). Finalmente también podemos mencionar el sesgo por “amplificación”. En este caso, una mutación producida en los primeros ciclos de polimerización estará más representada que otras mutaciones generadas en ciclos posteriores. Existen diversas formas de morigerar este sesgo como por ejemplo disminuir el número de ciclos y combinar varios productos de PCR generados por separado [80].

Por todo lo expuesto anteriormente, para evaluar la calidad de las mutaciones producidas al azar no sólo es importante tener en cuenta la tasa de mutación sino también el tipo de mutaciones obtenidas y su distribución a lo largo del gen de interés.

Con el objetivo de verificar la incidencia de estos factores y ajustar los parámetros en la reacción de PCR realizamos un ensayo preliminar que consistió en 1) Screening de la actividad CFBPasa en una biblioteca generada por mutaciones al azar 2) Análisis de la posición, la clase y la cantidad de mutaciones.

1) Screening de la actividad CFBPasa en una biblioteca generada por mutaciones al azar

Se generó una biblioteca de mutantes al azar de la CFBPasa de colza agregando Mn^{2+} 230 μM en la reacción de PCR (ver Materiales y Métodos). Esta biblioteca fue introducida en *E. coli*. y se plaquearon las bacterias transformadas. Una de las placas fue sometida al método de screening de actividad fosfatasa usando el sustrato natural de la CFBPasa y su cofactor (Figura 21).

Se confirmó de esta manera que el proceso de mutagénesis se había llevado a cabo porque parte de las colonias de bacterias no mostraron actividad fosfatasa evidenciando formas inactivas de la CFBPasa. Sin embargo la tasa de mutación tampoco fue tan grande ya que alrededor de la mitad de las colonias expresaron la actividad fosfatasa. Al incrementar la tasa

de mutación se favorecen proporcionalmente las mutaciones que provocan pérdida o disminución de actividad llegando un punto en que el screening es inviable. En este sentido el experimento mostró una adecuada proporción de colonias activas.

Para corroborar *in vitro* la actividad o inactividad de las distintas CFBPasa y para un posterior análisis de las secuencias, seleccionamos al azar once colonias de la misma placa que

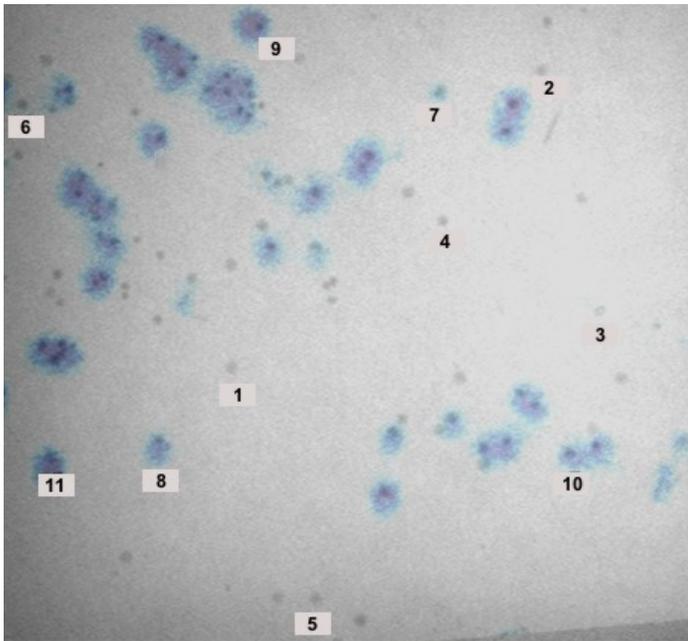
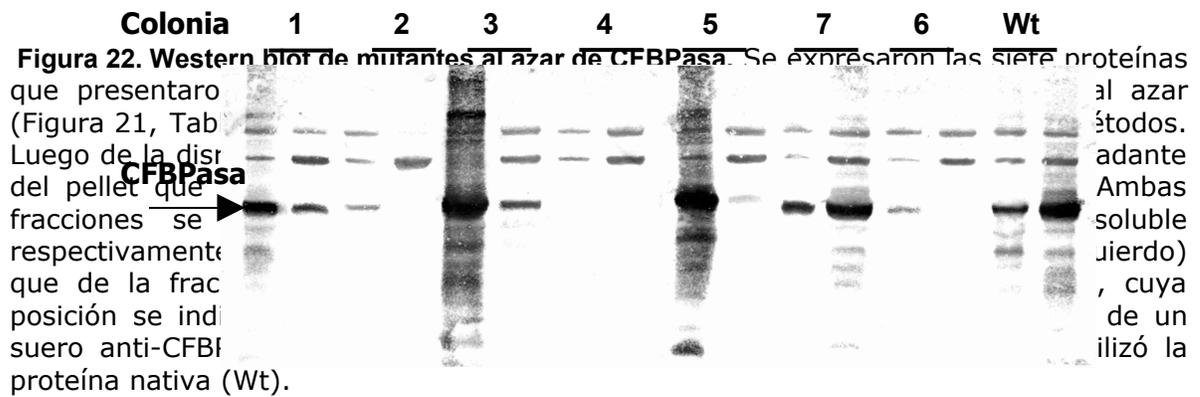


Figura 21. Screening preliminar de la actividad CFBPasa. Se muestra una superposición de imágenes entre las colonias de bacterias y el papel de filtro revelando la actividad fosfatasa según el método de screening. Las bacterias fueron transformadas con una biblioteca de mutantes al azar de la CFBPasa de colza según se describe en Materiales y Métodos. La foto de la placa fue tomada en un transiluminador. Las condiciones de catálisis fueron Tris-HCl 20 mM, (pH 7,9), FBP 3 mM y MgCl₂ 10 mM por 10 min. Se indican las once colonias que se seleccionaron al azar para el análisis de secuencia (el orden en la numeración fue elegido según la actividad).

se usó para el screening (Figura 21). De las once colonias seis resultaron inactivas según el método de screening (colonias 1 a 6) mientras que cinco resultaron activas (colonias 7 a 11). Las correspondientes enzimas fueron expresadas *in vitro* y se midió la actividad catalítica en condiciones estándares. Los resultados coincidieron con los obtenidos por la técnica de screening (Tabla 7).

Finalmente se determinó en cada caso el nivel de expresión de las proteínas expresadas *in vitro* tanto en la fracción soluble como en la fracción precipitada (cuerpos de inclusión). Para ello se utilizó la técnica de Western blot con las proteínas que presentaban alguna mutación (colonias 1 a 7) (Figura 22). De esta manera se determinó que las colonias inactivas tenían muy baja o ninguna expresión (colonias 2, 4 y 6) o se expresaban mayormente en cuerpos de inclusión (colonias 1, 3 y 5). La proteína expresada por la colonia 7 a pesar de tener cinco mutaciones tuvo un patrón de actividad y de expresión parecido a la enzima salvaje.

En resumen este ensayo preliminar, además de confirmar el proceso de mutagénesis al azar, permitió confirmar la utilidad del método de screening para detectar si las colonias de bacterias expresan formas activas o inactivas de la CFBPasa en condiciones estándar de catálisis.



Colonia	Cantidad de sustituciones	Mutaciones de aminoácidos	Expresión proteica	Actividad fosfatasa ^a
1	8	D81N, F199L, E218G, S267T, R292L	Alta. Insoluble	1,70
2	7	T43A, F93Y, C157W, L283S, P291R, K352E	Baja- Indetectable	1,07
3	2	G345R	Alta. Insoluble	0,30
4	3	C96STOP, S152G	Indetectable	0,67
5	12	T7S, I38L, M46T, Q82P, E111G, F148Y, I150T, S161Y, L303H, E335D	Alta. Insoluble	0,93
6	10	C96G, Y125H, Y216N, K257E, C307S	Baja- Indetectable	0
7	8	D81E, A140G, E156A, T164I, D330G	Alta. Soluble	11,23
8	2	Ninguna		
9	0	Ninguna		
10	0	Ninguna		
11	0	Ninguna		
Wt	0	Ninguna	Alta. Soluble	11,44

Tabla 7. Análisis de once mutantes al azar de CFBPasa. Se analizaron las proteínas expresadas por las colonias indicadas en la Figura 21. En cada caso se informa el número total de sustituciones de nucleótidos y las correspondientes mutaciones de aminoácidos. La cantidad de proteína soluble e insoluble fue estimada cualitativamente con la técnica de Western Blot (Figura 22). La enzima nativa (Wt) se muestra como control. ^a Actividad específica medida en unidades de $\mu\text{mol Pi liberado (min mg proteína)}^{-1}$. La solución de catálisis contuvo Tris-HCl 50 mM (pH 8), FBP 1 mM, MgCl_2 10 mM. Para las mediciones se utilizó la fracción soluble (ver leyenda de la Figura 22) sin purificar.

2) Análisis de la posición, la clase y la cantidad de mutaciones.

Para poder avanzar en el experimento de evolución dirigida no sólo fue necesario confirmar el proceso de mutación al azar sino también el tipo de mutaciones producidas. Para ello se secuenciaron los once clones de CFBPasa obtenidos en el experimento anterior. Hay que recordar que estos clones habían sido elegidos al azar (Tabla 7).

Distribución: En total se detectaron 52 mutaciones de nucleótidos distribuidos lo largo del gen de la CFBPasa (Figura 23). En principio, es posible limitar el proceso de mutagénesis al azar para afectar una determinada región del gen y de esta manera disminuir el tamaño de la biblioteca generada. Sin embargo, nuestro objetivo era generar una enzima que presente una

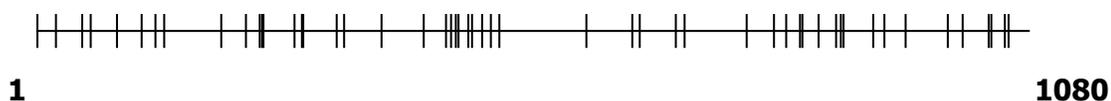


Figura 23. Distribución en el gen de la CFBPasa de mutaciones generadas al azar. Se secuenciaron once clones de CFBPasa generados por mutagénesis al azar (Figura 21, Tabla 7). En total se detectaron 52 sustituciones de nucleótidos. La posición de los mismos se representa esquemáticamente a lo largo del gen de la CFBPasa constituido por 1080 nucleótidos.

menor
inhibición
por Ca^{2+} por
lo que las
mutaciones

probablemente debieran ocurrir en la región del sitio activo y de unión al metal. Como los aminoácidos involucrados en estos sitios están distribuidos por toda la secuencia primaria de la enzima (Figura 3 de la introducción), no seleccionamos ninguna región en particular. El resultado de la secuenciación confirmó que no hubo zonas preferenciales de mutagénesis.

Clase: En total existen doce (4×3) posibles sustituciones entre nucleótidos. Cuatro son transiciones y ocho son transversiones. La secuenciación de los once clones reveló que el proceso de mutagénesis al azar generó las doce posibles sustituciones (Figura 24). Sin embargo se observó una mayor proporción de transiciones respecto a las transversiones lo cual constituye una característica de la PCR *error-prone*. De todas maneras el sesgo no fue tan acentuado como para perjudicar un experimento de screening funcional ya que todas las posibles sustituciones estuvieron claramente presentes.

Cantidad: Otro factor importante es la cantidad de sustituciones que se producen por clon. La secuenciación reveló que esta cantidad fue demasiado grande ya que cinco de los once

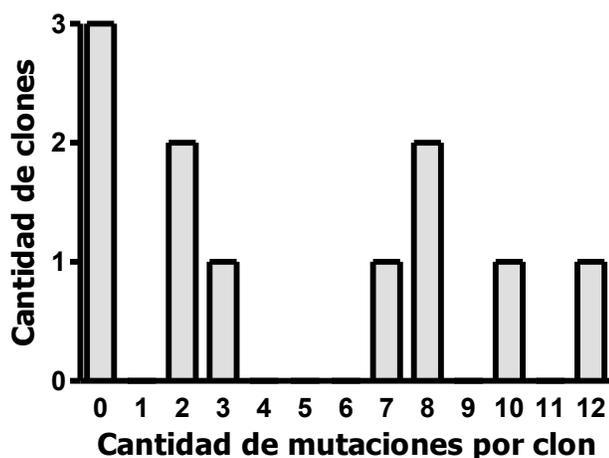


Figura 24. Sustituciones generadas por mutagénesis al azar. Se muestra la cantidad de mutaciones obtenidas al azar (Figura 21, Tabla 7) para cada una de las doce sustituciones posibles.

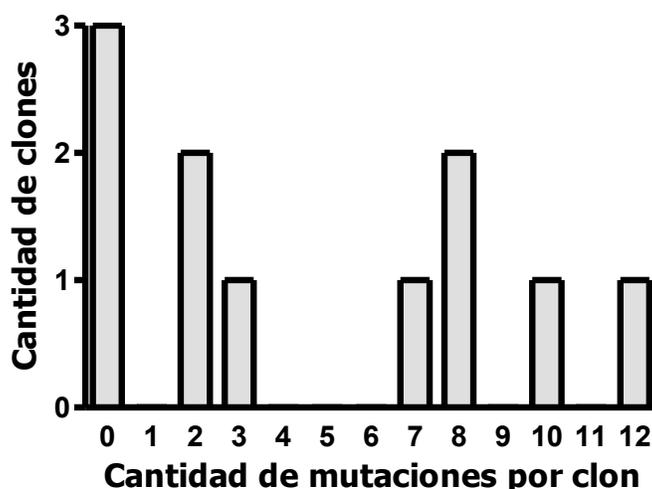


Figura 25. Cantidad de sustituciones por clon generadas por mutagénesis al azar. Se muestra la cantidad de mutaciones de nucleótidos que tuvo cada uno de los once clones secuenciados (Figura 21, Tabla 7).

clones presentaron más de seis mutaciones cada uno cuando lo ideal es que se produzcan entre dos y tres mutaciones. Sólo tres clones cumplieron con esta condición mientras que los tres restantes no presentaron mutación alguna (Figura 25). Congruente con la elevada cantidad de mutaciones por clon, de los ocho clones que presentaron sustituciones, seis expresaron formas inactivas de la CFBPasa, otro no tuvo mutaciones de aminoácidos (clon 8) y sólo el restante mantuvo actividad a pesar de la gran cantidad de sustituciones (clon 7) (Tabla 7). Este último resultado nos indicó la necesidad de disminuir la tasa de mutación mediante la disminución de la concentración de Mn^{2+} en la reacción de PCR para encarar posteriormente el experimento de evolución dirigida.

Generación de mutantes de CFBPasa más tolerantes a la inhibición por Ca^{2+}

El proceso que aplicamos para la obtención de mutantes de CFBPasa con menor sensibilidad a la inhibición por Ca^{2+} se detalla en la Figura 26. En este esquema se indican las cinco etapas fundamentales que conformaron un ciclo de evolución dirigida y que culminaron con la generación de mutantes que a su vez sirvieron para el siguiente ciclo. Mediante dos ciclos obtuvimos dos generaciones de mutantes.

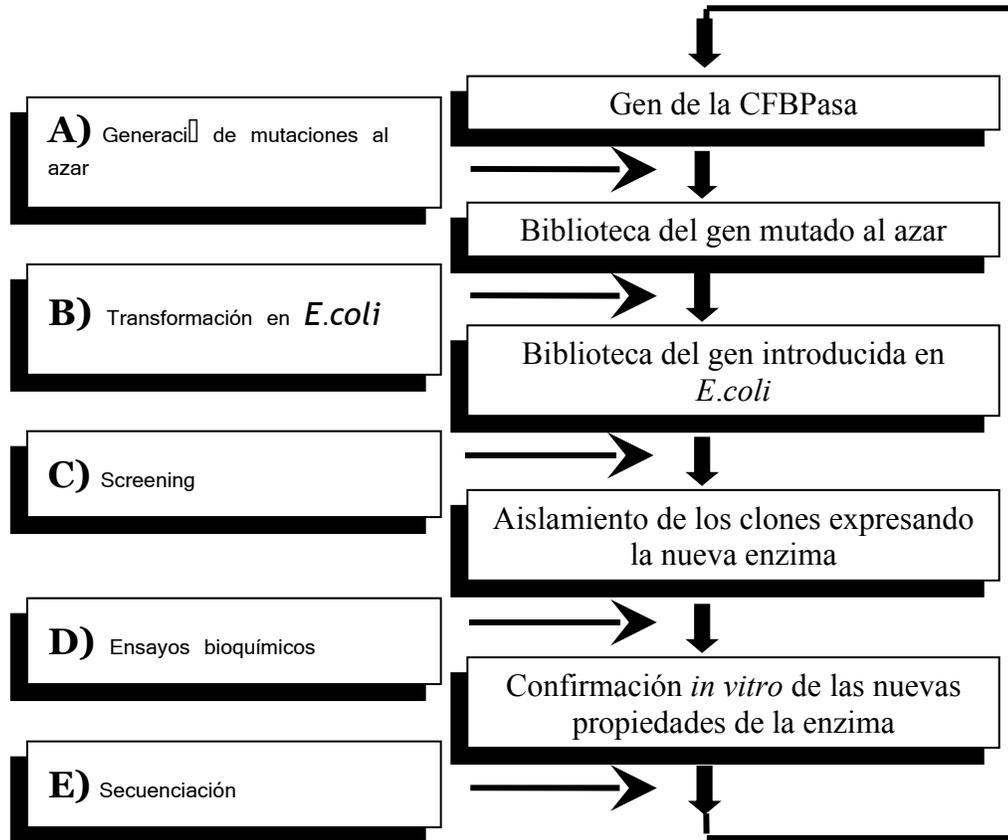


Figura 26. Esquema del proceso de evolución dirigida. Se indican las cinco etapas fundamentales del proceso aplicado y descrito en la presente tesis.

Primera generación de mutantes

A) Generación de mutaciones al azar

Como ya se mencionó, se utilizó la técnica de PCR *error-prone* utilizando como molde el gen de la CFBPasa nativa. Teniendo en cuenta el resultado de los experimentos preliminares que evidenciaron una tasa de mutación demasiado alta, disminuimos la concentración de Mn^{2+} (100 μM) en la reacción de PCR. Además decidimos no volver a verificar por secuenciación la tasa de mutación y continuamos con el procedimiento en base a los resultados funcionales.

B) Transformación en *E. coli*

La biblioteca de mutantes al azar se introdujo en células de *E. coli* por electroporación.

C) Screening

Se utilizó el método de screening ya descrito (Capítulo 2). Para ello se plaquearon sobre papel de nitrocelulosa unas 5000 colonias provenientes de la biblioteca generada en la etapa anterior. Luego de la inducción las colonias fueron sometidas a dos soluciones de catálisis diferentes y sucesivas. Con la primera solución se ensayó la actividad catalítica en condiciones estándar (pH 8, FBP 1 mM, Mg^{2+} 10 mM) y con la segunda fue estimada la inhibición agregando Ca^{2+} a la solución estándar. Esto fue factible pues una de las características de la técnica utilizada es la posibilidad de aplicar distintas soluciones catalíticas a una misma placa con la única necesidad de efectuar un lavado entre los ensayos (Capítulo 2).

La concentración de Ca^{2+} utilizada fue relativamente alta (3,75 mM) comparada con la constante de inhibición $I_{0,5}$ medida *in vitro* (0,1 mM) (Capítulo 1). Esta concentración fue requerida para registrar una disminución de intensidad entre los revelados provenientes de la catálisis con y sin el inhibidor en ensayos preliminares con colonias que expresaban la CFBPasa nativa. Por lo tanto, aunque la técnica de screening sirve muy bien para detectar colonias catalíticamente activas o inactivas, no refleja cuantitativamente las propiedades de catálisis *in vitro*. Sin embargo cualitativamente es útil. En este sentido, otros ensayos preliminares revelaron la necesidad de agregar el cofactor a la solución de catálisis para poder observar una adecuada actividad en el screening.

La razón por la cual se efectuó el ensayo de catálisis en condiciones estándar en vez de hacer solamente el screening con el inhibidor se debe a esta dificultad en la cuantificación. La intensidad de las manchas de revelado

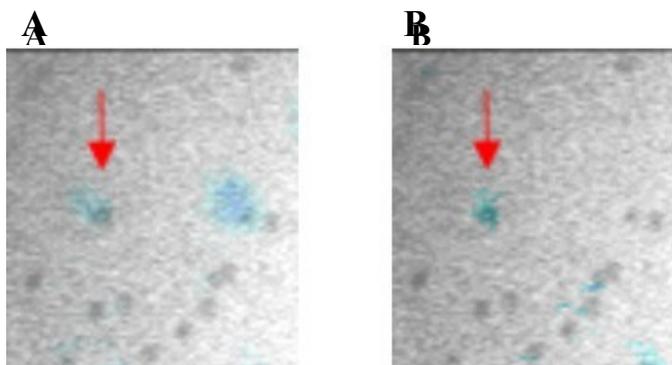


Figura 27. Detección de una colonia expresando una CFBPasa menos inhibible por Ca^{2+} . La biblioteca de mutantes clonada en *E. coli* en el primer ciclo de mutagénesis al azar fue plaqueada en 5 placas de 10x10 cm. conteniendo cada una alrededor de 1000 colonias. Las imágenes corresponden a la misma sección de la foto de una placa tomada en un transiluminador superpuesta con la foto del revelado de actividad en papel de filtro obtenido a partir del método de screening ya descrito **(A)** Se usa una solución de catálisis compuesta por Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), FBP 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM **(B)** La incubación se efectúa con la misma solución de catálisis anterior agregando el inhibidor $CaCl_2$ 3,75 mM. Las flechas señalan una colonia de *E. coli* expresando una mutante de CFBPasa (MutCa) que mantiene su actividad en presencia del inhibidor.

no sólo dependía de la CFBPasa expresada sino también del tamaño de la colonia y seguramente del grado de lisis bacteriana. Es por ello que la comparación cuantitativa entre colonias resulta dificultosa. El problema fue resuelto comparando la intensidad de revelado proveniente de una misma colonia sometida a distintas condiciones de catálisis.

De esta manera se comparó la catálisis con y sin el inhibidor ponderando visualmente las manchas producidas en ambas condiciones por las 5000 colonias del screening. Fue posible así detectar un clon que mostraba las características buscadas (Figura 27). Si bien esta colonia presentó una actividad relativamente menor a otras colonias en el screening con la solución sin inhibidor su actividad se mantuvo al ensayarla con el inhibidor. En lo sucesivo llamaremos MutCa a la CFBPasa mutante expresada por dicha colonia. Como contrapartida puede observarse en la Figura 27 una colonia cercana que pierde su actividad con el inhibidor comportándose entonces como si expresara a la enzima salvaje.

D) Ensayos bioquímicos

Con el propósito de corroborar *in vitro* los resultados del paso anterior, la proteína MutCa fue parcialmente purificada mediante una columna de intercambio aniónico (DEAE) y la inhibición por Ca^{2+} fue estimada junto con la enzima nativa purificada de idéntica manera (Figura 28). Corroboramos así que MutCa presenta una menor inhibición por Ca^{2+} en estas condiciones ya que el $I_{0,5}$ (350 μM) fue superior al de la enzima nativa (100 μM). Hay que destacar que estos valores varían según el grado de purificación de la enzima y según el pH de la solución de catálisis. Un estudio más detallado de este fenómeno se desarrolla en el capítulo 4.

E) Secuenciación

La secuenciación de MutCa reveló tres mutaciones: N154Y, P159T, I271T; de las cuales las dos primeras se encuentran en el loop regulador 170 y la tercera está adyacente a un

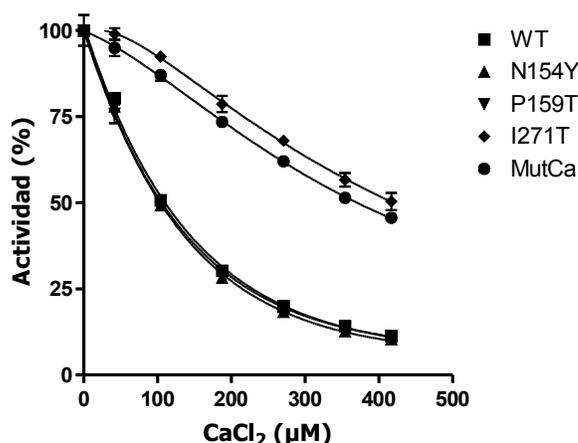


Figura 28. Inhibición por Ca^{2+} de mutantes de CFBPasa obtenidas a partir del primer screening. La purificación de las mutantes indicadas y la medición de la actividad se efectuaron como se describe en la leyenda de la Tabla 8 con la diferencia que se midió con cantidades variables de Ca^{2+} , por triplicado y en placas de microtitulación. En cada caso se consideró 100 % de actividad a la que se registró en ausencia del inhibidor.

aminoácido que coordina con el fosfato 6 del sustrato FBP (Tyr270) (Figura 3). Fueron

necesarios otros estudios para determinar cuál de las tres mutaciones era la responsable del cambio en las propiedades bioquímicas observadas.

Segunda generación de mutantes

Identificación de la mutación relevante en MutCa

A continuación tuvimos que seleccionar las variantes de CFBPasa que servirían como base para el segundo ciclo de mutaciones al azar. La primera generación de mutantes tuvo como único representante a MutCa. Por ello como primera medida decidimos identificar cuál de sus tres mutaciones era la relevante.

Por mutación sitio dirigida obtuvimos las simples mutantes N154Y, P159T y I271T. Estas proteínas fueron parcialmente purificadas con el mismo protocolo que se había usado para MutCa y posteriormente se midió la inhibición por Ca^{2+} (Figura 28). De manera muy clara y precisa constatamos que las mutantes N154Y y P159T se comportaron como la enzima nativa mientras que I271T lo hizo como MutCa. Por lo tanto concluimos que esta mutación cercana al sitio activo, y no las otras dos en el loop regulador 170, causó el cambio bioquímico observado en MutCa.

Construcción de distintas mutantes del sitio 271 y del sitio 270

Para determinar el efecto que otras sustituciones en la posición 271 tenían sobre la catálisis generamos diferentes mutantes sitio dirigidas. Por otro lado, decidimos analizar si la modificación del aminoácido Tyr270 que coordina al fosfato 6 del FBP causaba un efecto similar. Para ello construimos la mutante Y270F, sustitución conservadora que sólo elimina el hidroxilo que participa en el puente hidrógeno.

Dichas mutantes fueron parcialmente purificadas y su actividad estimada en ausencia y en presencia de Ca^{2+} 250 μM (Tabla 8). Estos datos sirvieron como guía para seleccionar los genes que fueron la base para el segundo ciclo de mutaciones al azar. Estos valores sirvieron para comparaciones relativas, ya que provienen de proteínas parcialmente purificadas. Estimaciones más precisas y reproducibles se informan en el capítulo 4.

	Actividad sin inhib.	Actividad con inhib.	Actividad %
WT	44.5	8.8	19.8
I271E	6.0	7.5	125.6
I271F	29.2	8.0	27.5
I271H	14.1	10.9	77.6
I271S	16.0	16.4	102.6
I271T	29.8	19.3	64.9
I271V	20.5	4.3	21.0
I271Y	5.8	4.1	70.4
Y270F	11.4	11.5	101.1

Tabla 8. Inhibición por Ca^{2+} de distintas mutantes del sitio 271 y del sitio 270. Las variantes de CFBPasa indicadas fueron parcialmente purificadas con una columna de intercambio aniónico (DEAE). La actividad fue medida en dos condiciones: A) Sin inhibidor en una solución Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), FBP 1 mM y MgCl_2 10 mM (columna "Actividad sin inhibidor" y B) Con inhibidor (misma solución agregando Ca^{2+} 250 μM , columna "Actividad con inhibidor"). Se midió la liberación de Pi en un único tiempo (3 min), por duplicado y en tubos de ensayo. Se informa la actividad específica en $\mu\text{mol Pi liberado (min mg proteína)}^{-1}$. En la columna tercera se indica el porcentaje de "actividad con inhibidor" referida a la "actividad sin inhibidor".

El aminoácido Ile271 está conservado en las CFBPasas de colza, espinaca y arveja pero está sustituido por una valina en la FBPasa de cerdo (Figura 3). Tal vez por esta sustitución conservadora, la CFBPasa I271V mostró un comportamiento similar a la enzima nativa.

Para la segunda generación elegimos cuatro genes parentales. Las enzimas codificadas por dos de ellos; I271S y Y270F, tenían una actividad específica relativamente alta y toleraban la inhibición por Ca^{2+} . El gen I271E fue elegido aunque la enzima respectiva tenía una actividad específica baja porque el Ca^{2+} pareció estimular la actividad en vez de inhibirla. Finalmente también se incluyó a I271T por ser el resultado de la primera generación.

Segundo ciclo de mutaciones al azar

A) Generación de mutaciones al azar

Como molde de la PCR *error-prone* se utilizó una mezcla equimolar de los genes I271E, I271S, I271T y Y270F por las razones que se dieron anteriormente. Además, la concentración de Mn^{2+} (50 μM) fue reducida para disminuir la tasa de mutación ya que la proporción de formas inactivas de la CFBPasa en el primer ciclo había sido relativamente alta.

B) Transformación en *E. coli*

C) Screening

Se trabajó con aproximadamente 12.000 colonias. Un número bastante mayor al del primer ciclo. La estrategia del screening fue la misma y consistió en realizar la catálisis primero sin el inhibidor y luego con Ca^{2+} 6 mM, una concentración que también fue mayor respecto a la del primer ciclo.

La selección de las colonias fue más minuciosa ya que tuvimos en cuenta los siguientes criterios para el análisis de las intensidades del revelado: 1) La intensidad correspondiente a la catálisis sin el inhibidor fue relativamente mayor respecto a las demás colonias de la misma placa (columna “A”) 2) Similar criterio fue aplicado al revelado con el inhibidor (columna “B”) 3) La intensidad fue mayor o igual en presencia del inhibidor que en ausencia del mismo (Tabla 9, columna “B/A”).

El propósito del último criterio fue encontrar mutantes que acentuaran la menor inhibición por Ca^{2+} . Los otros dos criterios procuraron identificar colonias expresando variantes de CFBPasa con una actividad específica relativamente mayor al resto. De esta manera se seleccionaron 40 colonias para posteriores análisis.

D) Ensayos bioquímicos

Las mutantes de CFBPasa expresadas por estas 40 colonias fueron parcialmente purificadas en cinco tandas de ocho clones cada una. Se midió actividad sin inhibidor y con Ca^{2+} 250 μM (ver más adelante y la Tabla 9).

E) Secuenciación

Sólo algunos de los 40 clones fueron secuenciados (Tabla 9). Se puede destacar que casi todos tuvieron como gen parental a I271S o a I271T, sólo un clon tuvo como base a I271E (colonia 19) y ninguno a Y270F seguramente debido a la relativamente menor actividad específica que confieren estas mutaciones.

Dos colonias (la 2 y la 31) no presentaron mutaciones extras por lo que se consideran falsos positivos. Por otro lado la sustitución A166S apareció en numerosas secuencias, indicando que fue una mutación producida en los primeros ciclos de la PCR. Esto está relacionado con el sesgo por “amplificación” mencionado al comienzo del capítulo y que no

pudo ser neutralizado a pesar de mezclar cuatro productos de PCR generados independientemente. Como curiosidad también se puede señalar que dicha sustitución estuvo asociada al gen parental I271T, salvo en la colonia 3 donde estuvo asociada a I271S. Dado que resulta improbable que la misma mutación surja dos veces durante la PCR, suponemos que

Colonia	Screening			Actividad <i>in vitro</i>			Mutaciones
	A	B	B/A	A'	B'	B'/A'	
1	+	=	-	21.90	15.63	71.3	
2	+	=	-	3.16	11.56	366.1	I271S
3	+	=	-	4.55	13.50	296.8	A166S, N177D, I271S, K355E
4	=	+	=	3.10	10.43	336.4	A166S, A268V, I271T
5	=	+	=	0.54	5.98	1104.6	
6	=	+	+	3.76	13.40	356.8	
7	=	-	-	15.46	18.46	119.4	
8	+	=	-	43.50	20.14	46.3	A107V, I271S
9	+	=	-	25.40	25.82	101.6	E170G, I271T
10	+	=	-	10.99	19.83	180.4	A166S, I2T1T
11↓				0.00	0.00		
12↓				0.00	0.00		
13	-	=	+	14.27	15.77	110.6	S122P, S161P, G168V, K251E, I271T
14	-	=	+?	0.00	0.00		
15	+	+	=	14.49	25.68	177.2	
16	+	+	=	10.59	20.04	189.2	
17	=	=	=	6.21	13.82	222.7	
18	+	+	=	1.05	2.84	271.0	
19	-	=	+	0.06	1.33	2283.3	E119G, S161P, I271E
20↑				0.00	0.00		
21	+	=	=	12.07	9.41	78.0	
22	+?	-	-	0.00	0.00		
23	++	+	=	5.10	15.03	294.6	V2I, I106L, I271S
24	++	+	=	13.72	9.91	72.2	
25	+	=	-	55.13	28.49	51.7	L158P, A166S, I271T
26↓				0.00	0.00		
27	=	+	+	28.17	17.86	63.4	M215L, I271S
28	-	=	+	0.19	1.19	624.1	
29	+	-	-	30.86	16.44	53.3	
30	+	+	=	29.44	21.94	74.5	A3V, A166S, I271T
31	+	-	-	9.71	15.21	156.6	I271T
32	+	-	-	28.25	14.12	50.0	
33	+	-	-	46.21	24.84	53.8	P12Q, D162G, I271T
34	+	=	-	38.49	11.75	30.5	
35	+	=	-	6.44	3.66	56.7	
36	+	=	-	32.28	13.80	42.7	
37	+	=	-	53.79	22.06	41.0	A166S, I271T
38	+	=	-	38.81	20.36	52.4	
39	+	=	-	38.55	20.49	53.1	
40	++	-	-	13.74	5.74	41.8	

originalmente la sustitución se produjo en el gen I271T y luego de amplificarse se recombinó con el molde proveniente de I271S. En este sentido, un método de recombinación *in vitro* llamado “*staggered extension process*”, se basa en ciclos de PCR extremadamente cortos [81]. Cabe señalar que los ciclos utilizados para la PCR *error-prone* fueron relativamente cortos (ver Materiales y Métodos).

Observaciones generales sobre la segunda generación de mutantes

Lo primero que destaca la Tabla 9 es que no existió una gran correlación entre lo observado en el screening y lo estimado *in vitro*. Parte de la explicación puede atribuirse a la dificultad que presenta el método de screening para determinar cuantitativamente diferencias en la actividad enzimática, algo que ya se mencionó previamente. Además, las actividades fueron ensayadas *in vitro* con proteínas parcialmente purificadas, las cuales exhiben un nivel de actividad variable probablemente debido a distintas proporciones de la forma oxidada y reducida (Capítulo 1). Esta variabilidad puede verse claramente con las proteínas expresadas por las colonias 10 y 37 que, a pesar de tener las mismas sustituciones, sus actividades *in vitro* fueron muy diferentes. Cabe destacar que en este caso el patrón en el screening fue el mismo (columnas “A”, “B” y “B/A”). Adicionalmente debemos señalar que las variantes I271S y I271T, preparadas a partir de las colonias 2 y 31 respectivamente, presentaron una actividad diferente a la reportada en la Tabla 8, sobre todo en ausencia del inhibidor.

En general también puede observarse que cuando las actividades medidas son relativamente grandes la inhibición por Ca^{2+} se hace más fuerte. Respecto a lo primero

Tabla 9. Colonias seleccionadas en el segundo ciclo de mutagénesis al azar. (página anterior)
El screening de las colonias se llevó a cabo en dos condiciones sucesivas: **A)** Se indica cualitativamente la intensidad del revelado sin inhibidor (Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), FBP 1,5 mM, MgCl_2 10 mM) relativa al *background* general conformado por las demás colonias de la misma placa **B)** Ídem pero referido al revelado con inhibidor (misma solución más Ca^{2+} 6 mM) **B/A)** Intensidad del revelado con inhibidor respecto al revelado sin inhibidor. La purificación de las correspondientes proteínas y la medición de la actividad *in vitro* sin inhibidor (**A'**) con inhibidor (**B'**) y el porcentaje del segundo referido al primero (**B'/A'**) se efectuaron tal y como se indica en la leyenda de la Tabla 8. Asimismo se muestran las **mutaciones** de aminoácidos de las proteínas cuyo ADN fue secuenciado. Las purificaciones se efectuaron en cinco tandas de ocho colonias cada una las cuales se separan con una raya. Las flechas ($\uparrow\downarrow$) en la primera columna señalan a la colonia que verdaderamente tuvo actividad cuando el área de revelado incluyó dos o tres colonias. El signo de interrogación (?) se asignó a manchas dudosas en el revelado que posteriormente se confirmaron como falsas cuando se midió la actividad *in vitro*.

pensamos que en muchos casos la mayor actividad no se debe a las mutaciones de la enzima sino a una mayor proporción de la forma reducida por sobre la oxidada. Respecto a la inhibición por Ca^{2+} descubrimos luego que es mayor cuando se produce en condiciones óptimas de catálisis lo cual no sólo depende de las concentraciones de los reactivos sino también del estado de óxido/reducción de la CFBPasa (Capítulo 4). Sirven de ejemplo las ya mencionadas colonias 10 y 37 ya que a pesar de haber expresado la misma proteína en el último caso la purificación dio una enzima con actividad específica alta e inhibible por Ca^{2+} mientras que en el primer caso la actividad fue baja pero aumentó al agregarse Ca^{2+} . El mismo patrón se observa con las diferencias de actividad de I271S y I271T reportadas en la Tabla 8 y en la Tabla 9.

La purificación a homogeneidad elimina esta variabilidad entre distintas preparaciones. Por eso algunas de las mutantes de CFBPasa mencionadas en este capítulo fueron purificadas a homogeneidad y su actividad estimada en forma consistente y reproducible lo cual permitió explicar dichas diferencias y no atribuir las a errores experimentales (Capítulo 4).

Construcción de la mutante A107V

De todas las proteínas obtenidas en la segunda generación, elegimos a la mutante A107V / I271S para seguir trabajando (colonia 8). En este caso los resultados obtenidos en el screening fueron concordantes con los obtenidos *in vitro*. Catalizando sin el inhibidor su actividad fue significativamente mayor al resto pero cayó bastante en presencia del mismo. Estas características fueron similares a las de la enzima nativa por lo que la sustitución A107V pareció revertir las consecuencias de la sustitución I271S. Consecuentemente construimos por mutación sitio dirigida la simple mutante A107V y analizamos el efecto que tenía esta única sustitución (Capítulo 4).

Conclusiones

El análisis de las mutantes de una proteína es una de las herramientas que facilita el estudio de la relación entre función y estructura a nivel molecular. Una de las ventajas de la técnica de evolución dirigida de proteínas aplicada al estudio de enzimas es que permite obtener mutantes con propiedades bioquímicas distintas sin requerir información previa. Aunque las mutaciones sitio dirigida con el mismo objetivo necesitan conocimientos previos acerca de la enzima en cuestión (secuencia, datos cristalográficos), la falta de información en algunos casos hace muy difícil encarar el estudio desde este punto de vista racional. En este capítulo describimos el procedimiento para obtener las principales mutantes con las que se trabajó en la presente tesis. Para ello combinamos las técnicas de evolución dirigida y de mutaciones sitio dirigida.

Antes de comenzar el experimento de evolución dirigida se comprobó la buena capacidad del método de screening, descrito en el capítulo 3, para detectar colonias expresando formas activas e inactivas de la CFBPasa. Asimismo se secuenciaron once clones generados por mutagénesis al azar y se confirmó la aparición de las doce posibles sustituciones distribuidas a todo lo largo del gen. La tasa de mutación fue elevada y se intentó ajustarla a través de la concentración de Mn^{2+} en la reacción de PCR *error-prone*.

Con el objetivo de encontrar mutantes de CFBPasa que presentaran un comportamiento diferente al de la enzima nativa frente a la inhibición por Ca^{2+} realizamos dos ciclos de mutagénesis al azar. En el primer ciclo se obtuvo la mutante MutCa que tuvo una menor sensibilidad a la inhibición por Ca^{2+} . A partir de la misma se identificó a la sustitución I271T como la causa de dicho comportamiento. Esta mutación se encuentra contigua al aminoácido Y270 que es uno de los que coordinan al fosfato 6 del sustrato FBP. Con esta información se construyeron distintas mutantes sitio dirigidas al sitio 271 y al 270.

El segundo ciclo de mutagénesis al azar se hizo a partir de algunas de las mutantes antes mencionadas. Necesariamente debimos aumentar la concentración de Ca^{2+} en el screening y la cantidad de colonias evaluadas. Se buscaron colonias que presentaran una actividad relativamente mayor al resto o que acentuaran su menor inhibición por Ca^{2+} . De esta manera se aislaron 40 colonias que constituyeron la segunda generación de mutantes, algunas de las cuales fueron secuenciadas.

En muchos casos no hubo una buena correlación entre lo observado en el screening y lo medido *in vitro*. Esto se atribuyó en parte a la dificultad intrínseca del método para detectar diferencias cuantitativas de actividad y por otro lado a que las proteínas fueron solamente parcialmente purificadas por lo que existió una gran variabilidad entre las preparaciones. Sin embargo se seleccionó para posteriores experimentos a la doble mutante A107V / I271S que pareció revertir el efecto de la sustitución I271S. Por eso también se construyó la simple mutante A107V.

Muchas de las mutantes descritas en este capítulo fueron posteriormente purificadas a homogeneidad y sus propiedades bioquímicas medidas de manera consistente lo cual se informa en el capítulo 4. En dicho capítulo también se analizan las verdaderas causas (según nuestro actual entender) de la inhibición aquí descrita.

Capítulo 4

**Cambios en la afinidad por metales y pH en
distintas mutantes de CFBPasa**

Objetivo

Analizar las distintas mutantes de CFBPasa cuya obtención se describe en el capítulo 3. Investigar las verdaderas causas del particular comportamiento frente a la inhibición por Ca^{2+} y Li^+ respecto a la enzima nativa.

Resultados

“Inactivación” de distintas mutantes de CFBPasa por purificación a homogeneidad

Durante el proceso de evolución dirigida descrito en el capítulo 3, las mutantes que se iban obteniendo se purificaron solamente con una única columna DEAE debido a la gran cantidad de variantes enzimáticas que existían para confirmar los resultados del screening. Según se describe en el capítulo 1 este paso de purificación elimina gran parte de los contaminantes proteicos aunque permanecen otros compuestos que absorben fuertemente a 280 nm.

Cuando se purificaron a homogeneidad agregando una cromatografía en columna de exclusión (Superdex-200), las mutantes surgidas del primer ciclo de evolución dirigida (e.g. I271T, I271S) sorprendentemente perdieron su actividad catalítica. El paso adicional de purificación no es agresivo para las proteínas y, en consecuencia, no justificaba la inactivación observada. Además las mutantes detectadas en geles de poliacrilamida presentaron un patrón de corrida normal.

La posición Ile271 (que se modifica en la mutante I271T) está contigua a la Tyr270, uno de los aminoácidos que coordinan con el fosfato 6 del sustrato FBP conjuntamente con Asn238, Asn241, Arg269, Tyr290 y Lys300 (ver Tabla 2 en la Introducción). Sobre estas bases, decidimos construir las mutantes sitio dirigidas N238L, N241L, Y270F y Y290F, las cuales también presentaron el efecto de “inactivación por purificación”.

Si bien la actividad de la CFBPasa nativa también cambió según el grado de purificación, lo cual es descrito en el capítulo 1, en ningún caso se observó inactivación de la misma. Evidentemente el problema con las mutantes era distinto. Por ello, decidimos investigar la estabilidad estructural por medio de la técnica de difracción circular.

Termoestabilidad por dicroísmo circular

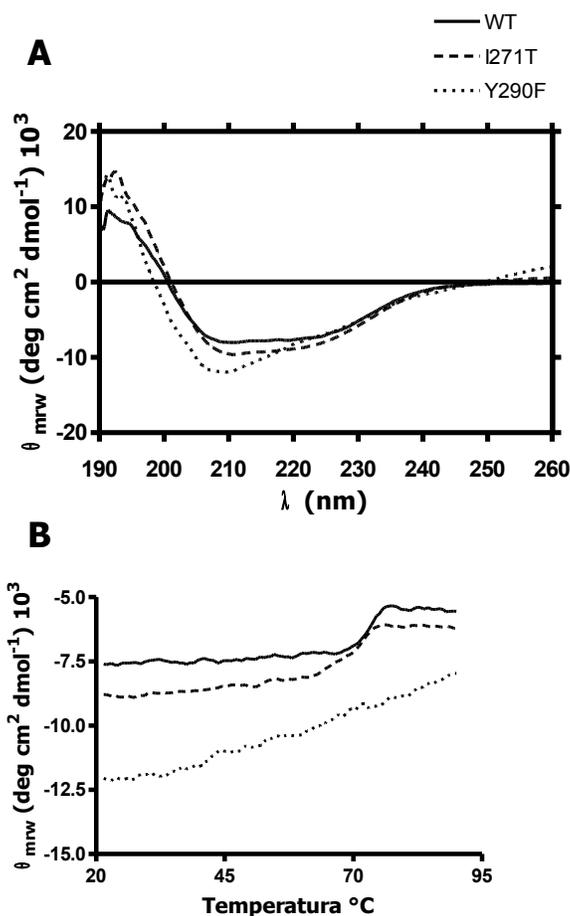


Figura 29. Dicroísmo circular y termoestabilidad. Las enzimas indicadas (oxidadas) fueron purificadas a homogeneidad y desaladas. Las mediciones se llevaron a cabo en una solución Tris-HCl 10 mM (pH 7,9). **(A)** Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano registrado a 20 °C. **(B)** Curva de termodesnaturalización. La intensidad de la señal dicroica se siguió a 222 nm (WT y I271T) y a 210 nm (Y290F).

Se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la CFBPasa nativa (WT) y de las mutantes I271T y Y290F purificadas a homogeneidad (Figura 29A). La enzima WT y la variante I271T no presentaron grandes diferencias, exhibiendo perfiles que combinan estructuras de hélices α y hojas β lo cual era esperado para la enzima nativa. Sin embargo la mutante Y290F presentó un espectro diferente, desplazado hacia una menor longitud de onda, lo cual sugirió una pérdida de estructura. También se siguieron los cambios en la estructura secundaria cuando se aplicó un gradiente de temperatura (Figura 29B). Nuevamente el comportamiento de la enzima nativa y de la CFBPasa I271T fue similar mostrando un cambio cooperativo alrededor de los 70 °C, mientras que la variante Y290F presentó un cambio lineal

de la señal con la temperatura, lo cual, además de falta de cooperatividad, volvió a indicar falta de estructura. En conclusión, los cambios en el comportamiento bioquímico de la mutante I271T y el efecto de “inactivación por purificación” no se debieron a modificaciones importantes en la estructura secundaria. En cambio, la pérdida de la estructura secundaria y la menor estabilidad térmica de la CFBPasa Y290F relativiza las interpretaciones sobre cambios en sus propiedades catalíticas.

Cambios en el pH óptimo de catálisis

La diferencia fundamental entre la CFBPasa nativa y las mutantes obtenidas después del primer ciclo de evolución dirigida fue el pH óptimo de catálisis (Figura 30).

Enzimas oxidadas

La enzima nativa oxidada alcanzó su máxima actividad alrededor del pH 7,9 mientras que la mutante I271S oxidada lo hizo alrededor del pH 8,5 (Figura 30A). Por otra parte la doble mutante I271S/A107V oxidada, que fue seleccionada en el segundo ciclo de evolución dirigida porque parecía revertir el efecto de la mutación simple I271S, efectivamente presentó máxima actividad a un pH similar al de la enzima nativa. Asimismo, el perfil de actividad en

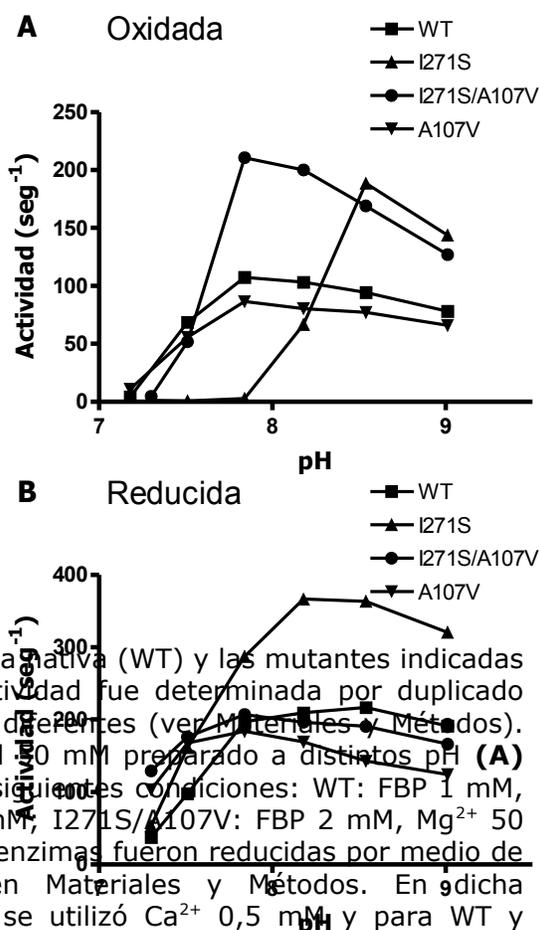


Figura 30. Actividad a distintos pH. La CFBPasa nativa (WT) y las mutantes indicadas fueron purificadas a homogeneidad. La actividad fue determinada por duplicado midiendo la liberación de Pi a tres tiempos diferentes (ver Materiales y Métodos). En todos los casos se usó el buffer Tris-HCl 50 mM preparado a distintos pH (**A**) Las enzimas oxidadas se ensayaron en las siguientes condiciones: WT: FBP 1 mM, Mg^{2+} 40 mM; I271S: FBP 2 mM, Mg^{2+} 50 mM; I271S/A107V: FBP 2 mM, Mg^{2+} 50 mM; A107V: FBP 1 mM Mg^{2+} 7 mM (**B**) Las enzimas fueron reducidas por medio de una preincubación según se describe en Materiales y Métodos. En dicha preincubación para I271S y I271S/A107V se utilizó Ca^{2+} 0,5 mM y para WT y A107V Ca^{2+} 0,05 mM. La solución de catálisis contuvo: WT: FBP 0,8 mM, Mg^{2+} 1 mM; I271S: FBP 0,8 mM, Mg^{2+} 8 mM; I271S/A107V: FBP 0,8 mM, Mg^{2+} 8 mM; A107V: FBP 0,8 mM Mg^{2+} 1 mM.

función del pH de la mutante simple A107V oxidada fue similar al de la enzima nativa incluso teniendo en cuenta los valores absolutos de las actividades específicas.

La actividad específica de la CFBPasa I271S oxidada, medida al pH óptimo de catálisis, fue sensiblemente mayor al de la enzima nativa. Este comportamiento resultó llamativo porque en general una mutación disminuye la actividad específica o tiene un efecto neutro. En este sentido la CFBPasa A107V oxidada no mostró mayores cambios en la actividad específica. Por su parte, la mutante doble I271S/A107V revirtió el cambio del pH óptimo de catálisis producido por la mutante simple I271S, aunque conservó la alta actividad específica de la CFBPasa I271S.

Enzimas reducidas

La enzima nativa reducida no presentó un cambio significativo respecto a la forma oxidada en el perfil de la actividad en función del pH aunque en general la actividad específica resultó ser aproximadamente el doble lo cual permitió detectarla a pH más ácidos. Esto mismo sucedió de manera notoria con la mutante I271S reducida que incluso alcanzó un máximo de actividad a un pH más ácido que la forma oxidada (pH 8,2) manteniendo una actividad específica mayor a la de la enzima nativa (Figura 30B).

La variante A107V reducida también mantuvo el pH óptimo de catálisis (7,9) aunque la actividad aumentó proporcionalmente más a pH ácidos. De esta manera el pH al cual se obtuvo la mitad de la actividad máxima fue más ácido que el de la enzima nativa. Esta vez la mutante doble I271S/A107V reducida se comportó de manera similar a la mutante simple A107V no sólo en el perfil de la actividad en función del pH sino también en las actividades específicas absolutas.

Explicación de la “inactivación” por purificación a homogeneidad

Anteriormente se señaló la aparente inactivación de las mutantes provenientes de la purificación a homogeneidad del primer ciclo de evolución dirigida. Los resultados recién mostrados explican este hecho:

En el capítulo 1 se informó que la enzima nativa luego de pasar por una columna de intercambio aniónico (DEAE) estaba al menos parcialmente reducida. Además, la posterior elución de una columna de exclusión (Superdex-200, purificación a homogeneidad) probablemente eliminó un compuesto que la mantenía reducida y produjo la oxidación

espontánea de la enzima. Evidentemente esto mismo ocurrió con las mutantes (e.g. I271T, I271S). Según lo informado, el pH óptimo de catálisis de I271S está desplazado a regiones más alcalinas y al oxidarse su actividad a pH 7,9 (pH óptimo de catálisis para la enzima nativa) es casi nula. Por otro lado la forma reducida de I271S posee gran actividad a pH 7,9 aunque ésta no es máxima. De allí que cuando se purificó sólo con una columna DEAE la enzima haya presentado actividad a dicho pH.

Cambios en la afinidad por el FBP y el Mg^{2+}

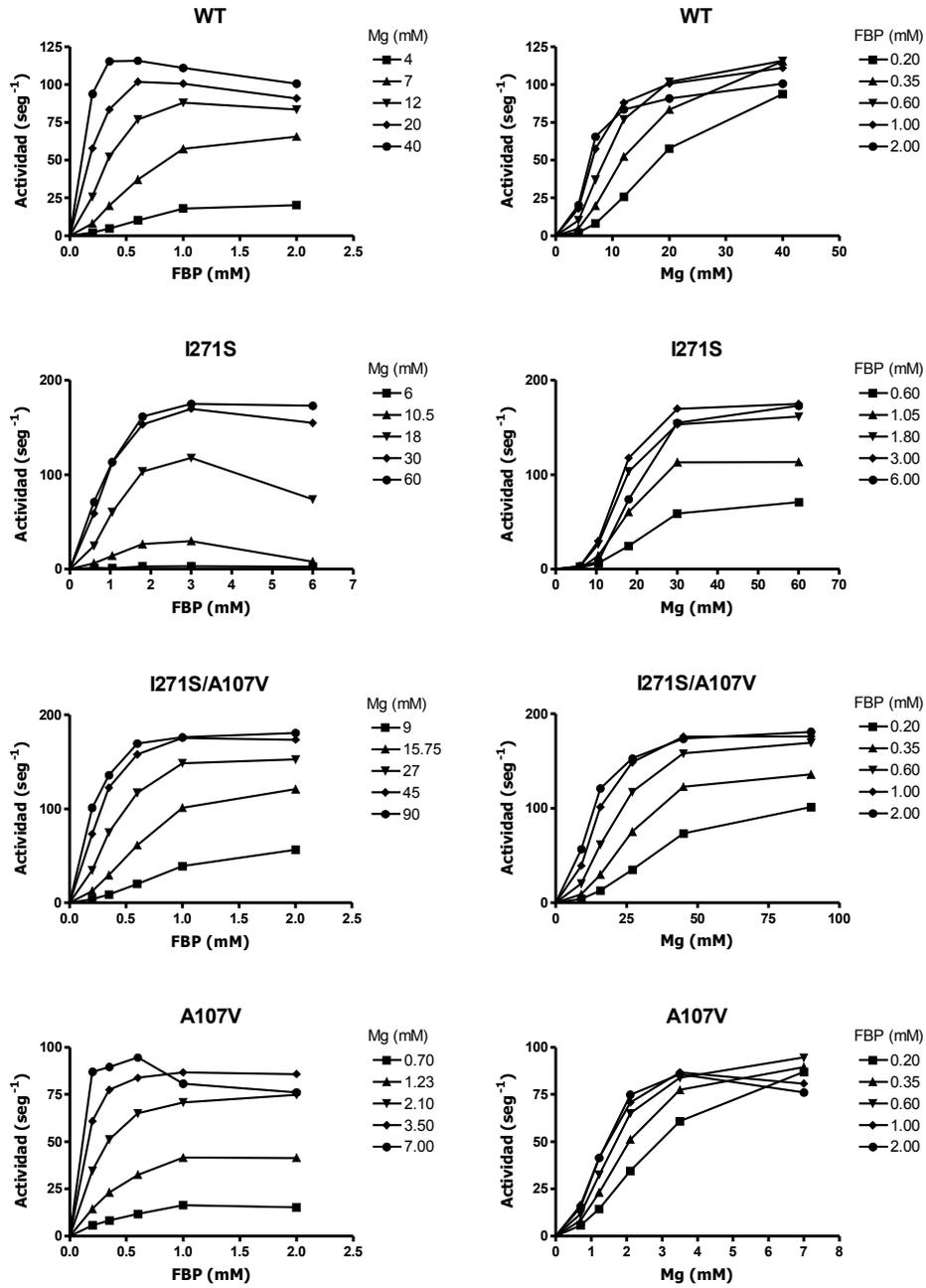
Vimos que el principal cambio producido en las mutantes del primer ciclo de evolución dirigida (I271T, I271S) fue el pH óptimo de catálisis. Por otra parte la mutante doble I271S/A107V fue seleccionada en el segundo ciclo de evolución dirigida por revertir el efecto de la mutante simple I271S. Ahora mostraremos que la CFBPasa A107V cambia fundamentalmente la afinidad por el FBP y el Mg^{2+} . Para ello medimos la velocidad de reacción tanto de las formas oxidadas como reducidas usando cinco concentraciones diferentes de FBP y Mg^{2+} . Las 25 velocidades resultantes, graficadas en función de la concentración de FBP y de Mg^{2+} (Figura 31), exhibieron las constantes cinéticas que se resumen en la Tabla 10. Cabe aclarar que cuando nos referimos a las concentraciones con las cuales se obtuvo la mitad de la actividad máxima (K_m , $pH_{0,5}$) las dos variables restantes de las tres básicas ($[FBP]$, $[Mg^{2+}]$, pH) estuvieron en concentraciones óptimas de catálisis.

Enzimas oxidadas

La enzima nativa oxidada, en presencia de bajas concentraciones de Mg^{2+} necesitó una mayor concentración de FBP para alcanzar la velocidad máxima lo cual se tradujo en una menor afinidad por el sustrato. Algo parecido se observó con la mutante A107V. Es por ello que las constantes de afinidad K_m para el FBP y para el Mg^{2+} informadas en la Tabla 10 corresponden a las curvas donde el Mg^{2+} o el FBP, respectivamente, se encontraban en una concentración óptima. A partir de dicha concentración no se observaron grandes cambios en la actividad.

Por el contrario, las mutantes I271S (cuya actividad fue medida a su pH óptimo de catálisis 8,5) y I271S/A170V perdieron en parte esta dependencia entre las concentraciones de sustrato y cofactor ya que alcanzaron los máximos de actividad casi independientemente una de la otra.

CFBPasa oxidada



CFBPasa reducida

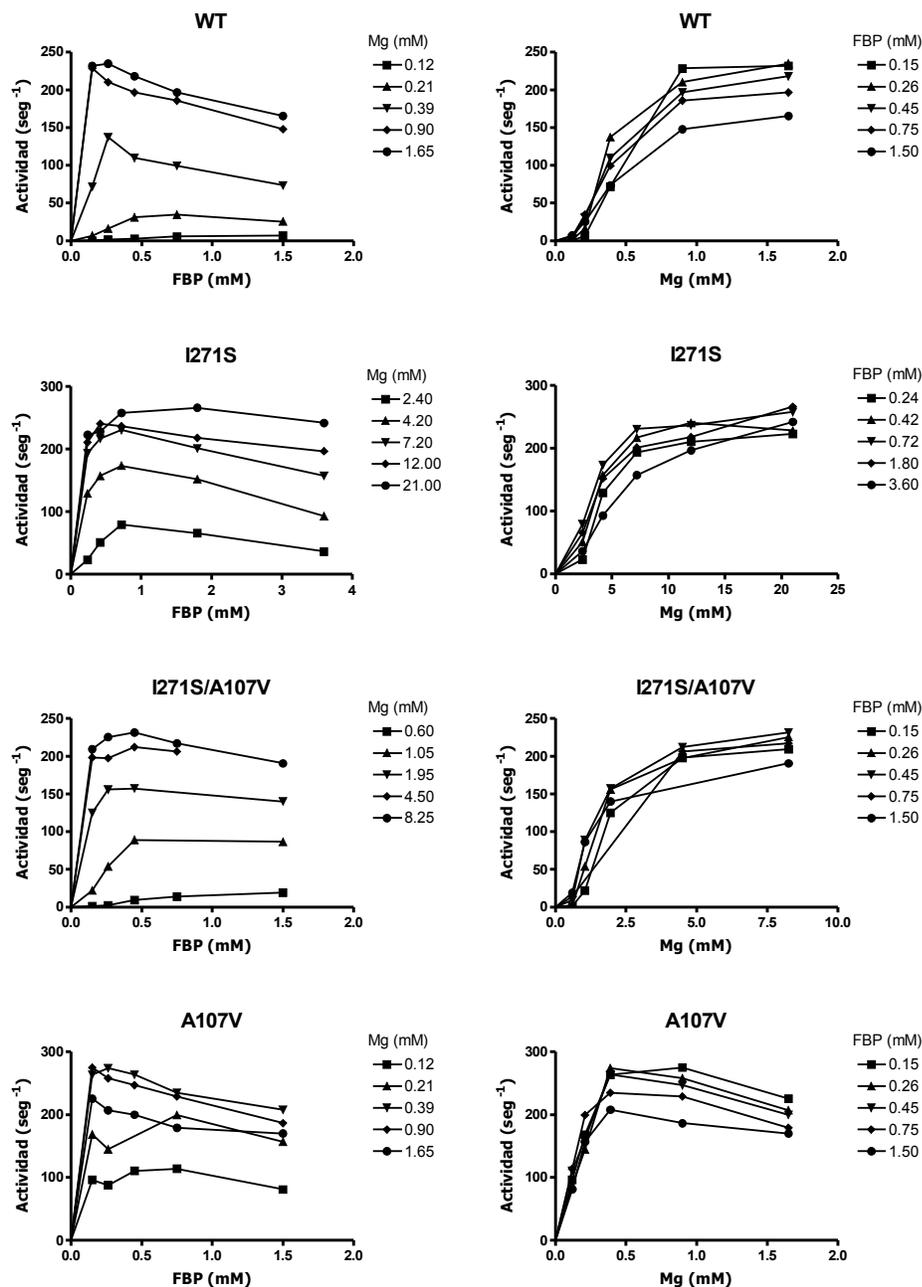


Figura 31. Actividad en función de la concentración de sustrato (FBP) y de cofactor (Mg²⁺). La obtención de las enzimas y sus formas oxidadas/reducidas se describen en la leyenda de la Figura 30. Las mediciones se hicieron a tres tiempos pero sin duplicados. Todas las mediciones se llevaron a cabo en Tris-HCl 50 mM (pH 7,9) salvo en el caso de I271S oxidada que se midió a pH 8,54. En los paneles de la izquierda se muestra la actividad en función de la concentración de FBP para distintas concentraciones de Mg²⁺. En los paneles de la derecha las mismas actividades son regráficas en función de la concentración de Mg²⁺.

Lo importante para resaltar aquí es que la afinidad por el Mg^{2+} de la CFBPasa A107V oxidada fue significativamente mayor que en la enzima nativa mientras que la afinidad por el FBP se mantuvo casi igual. Por el contrario la mutante I271S presentó una menor afinidad por el FBP respecto a la enzima nativa pero mantuvo la afinidad por el Mg^{2+} . La doble mutante I271S/A107V anuló en parte los efectos de las mutaciones simples presentando valores de afinidad parecidos a la enzima nativa tanto para el sustrato como para el cofactor.

Enzimas reducidas

En todos los casos se observó que las formas reducidas exhibían un aumento en la afinidad por el Mg^{2+} y por el FBP respecto a las formas oxidadas. Este rasgo conocido para la enzima nativa es una de las principales características bioquímicas que se utiliza para distinguir la forma oxidada de la forma reducida (sobre todo la afinidad por el Mg^{2+}).

La afinidad por el FBP no se pudo determinar con precisión para las formas reducidas ya que hubiese requerido medir el producto a concentraciones muy bajas que escapan al rango de detección de la técnica de cuantificación. En general fue muy marcado el efecto inhibitorio del FBP a medida que aumentó su concentración.

La afinidad por el Mg^{2+} volvió a ser mayor para la mutante A107V respecto a la enzima nativa. Por el contrario la CFBPasa I271S reducida presentó una menor afinidad por el Mg^{2+} . Nuevamente la mutante doble I271S/A107V CFBPasa compensó los efectos de ambas mutaciones simples presentando valores de afinidad más parecidos a la enzima nativa.

Es necesario señalar también que las actividades específicas máximas fueron parecidas entre la enzima nativa y las mutantes siendo mayores para las formas reducidas como ya fue indicado.

La inhibición por Li^+

Finalmente trataremos la inhibición por metales. En definitiva, las distintas mutantes aquí presentadas fueron seleccionadas por su mayor o menor respuesta a la inhibición por Ca^{2+} , tal como se describe en el capítulo 3, y no por modificaciones en el pH óptimo de catálisis o por la distinta afinidad hacia el sustrato y cofactor. Sin embargo, según veremos, la capacidad de inhibición está relacionada con estas variables.

La inhibición por Li^+ , una de las características que distingue a esta familia de fosfomonoesterasas (ver introducción), es parte del tratamiento que se da a personas con el

síndrome maníaco depresivo. Para estimar el grado de dependencia entre las variables antes mencionadas las combinamos de tal manera que obtuvimos curvas de inhibición por Li^+ en condiciones óptimas y subóptimas de pH y de concentración de FBP y Mg^{2+} (Figura 32).

Inhibición a pH óptimo de catálisis

La concentración inhibitoria de Li^+ reportada, que disminuye la actividad a la mitad de su máximo valor ($I_{0,5}$), fue medida a una concentración óptima de sustrato (“Alto FBP” en la Figura 32), una concentración del cofactor cercana a su K_m (Mg^{2+} 14 mM para la enzima WT y 19 mM para la variante I271S) y un pH igual al óptimo (7,9 para la enzima WT, 8,5 para la variante I271S). En estas condiciones pudimos confirmar que la CFBPasa I271S oxidada presentó una menor inhibición por Li^+ ($I_{0,5} = 50$ mM) (Figura 32D) que la enzima nativa ($I_{0,5} = 2,5$ mM) (Figura 32B). Estudios similares revelaron que la CFBPasa A107V ($I_{0,5} = 2,8$ mM) exhibió un comportamiento similar a la enzima nativa mientras que la doble mutante I271S/A107V ($I_{0,5} = 20$ mM) tuvo un comportamiento intermedio (Tabla 10).

En estas mismas condiciones, cuando la concentración de Mg^{2+} era menor que su K_m , la inhibición por Li^+ sobre la enzima nativa oxidada fue cada vez menor hasta comportarse como un activador a muy bajas actividades catalíticas (Figura 32B).

Por otro lado, cuando disminuimos la concentración de sustrato alrededor de su K_m (“Bajo FBP” en la Figura 32) este efecto activador del Li^+ fue mucho más marcado tanto para la enzima nativa (Figura 32A) como para I271S (Figura 32C).

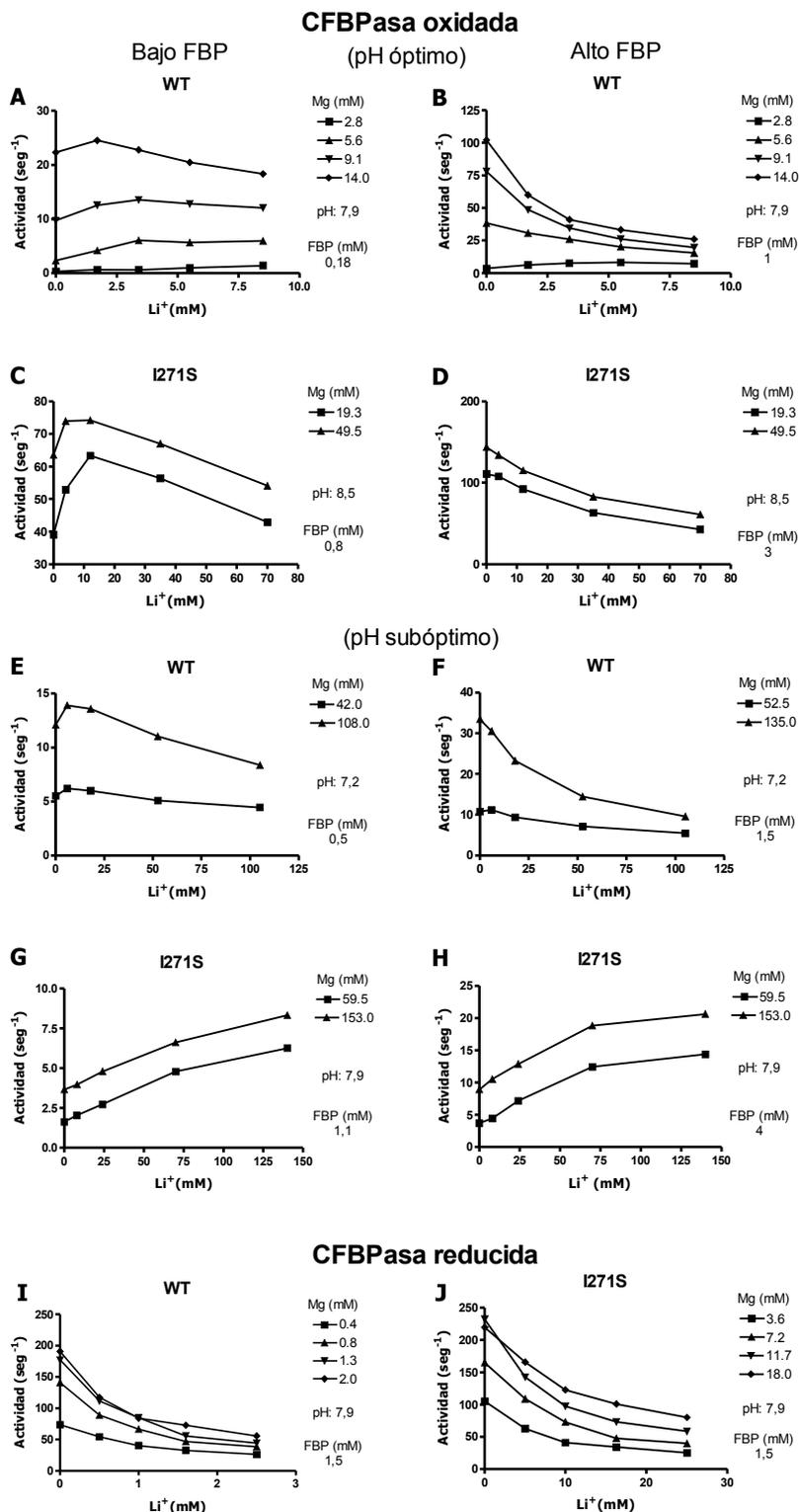


Figura 32. Inhibición por Li⁺. Se grafica la actividad en función de la concentración de Li⁺ en condiciones óptimas y subóptimas de pH para distintas concentraciones de Mg²⁺ y FBP (dos concentraciones, una "baja" y otra "alta"). La forma de medición fue como se describe en la leyenda de la Figura 31.

Inhibición a pH subóptimo de catálisis

Acabamos de mostrar que en ciertas condiciones (bajas concentraciones de sustrato o cofactor) el Li^+ pasa de inhibidor a activador ¿qué ocurre cuando es el pH el que no está en un nivel óptimo?

En este caso, la activación por Li^+ de la CFBPasa I271S oxidada fue incluso más sorprendente ya que, independientemente de las cantidades de FBP y Mg^{2+} ensayadas, concentraciones de Li^+ tan altas como 150 mM fueron activadoras (Figura 32G y H) sin indicios de inhibición. La enzima nativa no presentó este efecto de manera tan marcada (quizás no se ensayó en un pH suficientemente bajo), aunque claramente la inhibición también fue menor (mayor $I_{0,5}$ Figura 32E y F).

Cabe señalar que al disminuir el pH por debajo del óptimo, la afinidad por el FBP y el Mg^{2+} también disminuye por lo que utilizamos concentraciones mayores de los mismos.

Explicación de la dificultad para reducir I271S

Al principio del capítulo se mostró que las mutantes derivadas del primer ciclo de evolución dirigida (e.g. variante I271S) cuando eran purificadas a homogeneidad presentaban una actividad muy baja a pH 7,9 (pH óptimo de catálisis para la enzima nativa). Estas mutantes tampoco pudieron ser reducidas como se hacía con la enzima nativa hasta que se descubrió la causa.

La reducción de la enzima nativa siempre se llevó a cabo en una etapa previa y separada de la catálisis según protocolos ya conocidos (ver Materiales y Métodos). En esta preincubación la reducción se efectúa no sólo en presencia del reductor (DTT) sino también de FBP y Ca^{2+} a pH 7,9. Es por eso que en la literatura se menciona la acción dual del Ca^{2+} como inhibidor en la catálisis y activador en la reducción.

Sin embargo en estas condiciones la CFBPasa I271S no pudo ser reducida. A la luz de los resultados mostrados anteriormente la explicación parece ser clara: la afinidad por el Ca^{2+} en el pH de preincubación utilizado (7,9) fue muy baja para la mutante I271S y no se produjo la interacción necesaria con la enzima. Este hecho fue corroborado de dos maneras: a) aumentando diez veces la concentración de Ca^{2+} a pH 7,9 y b) subiendo el pH de preincubación a 8,5 y manteniendo la concentración de Ca^{2+} utilizada para la enzima nativa.

En ambos casos se consiguió la reducción de la variante I271S y las características de esta forma reducida son las que se informan en este capítulo.

Finalmente diremos que la reducción tanto de la enzima nativa como de las mutantes no sólo aumentó la afinidad por el FBP y el Mg^{2+} según lo ya visto, sino también por el Li^+ lo cual produjo un mayor poder de inhibición (menor $I_{0,5}$, Figura 32 I y J, Tabla 10).

	WT	I271S	I271S/ A107V	A107V	
oxidada	FBP (mM)	0,4	3	1	0,3
	FBP K_m	0,12	0,8	0,22	0,1
	Mg^{2+} (mM)	50	40	50	8
	Mg^{2+} K_m (mM)	15	18	12	1,6
	Li^+ $I_{0,5}$ (mM)	2,5	50	20	2,8
	pH	7,9	8,5	7,9	7,9
	$pH_{0,5}$	7,4	8,3	7,65	7,4
	k_{cat} (seg^{-1})	120	180	180	100
	Reducida	FBP (mM)	0,15	0,3	0,3
FBP K_m		< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Mg^{2+} (mM)		1,7	20	6	0,5
Mg^{2+} K_m (mM)		0,6	3	1,5	0,15
Li^+ $I_{0,5}$ (mM)		1	7	n.d.	n.d.
pH		7,9	8,2	7,9	7,9
$pH_{0,5}$		7,5	7,6	7,2	7,2
k_{cat} (seg^{-1})		250	350	250	250

Tabla 10. Constantes cinéticas básicas de la CFBPasa nativa y de distintas mutantes. En gris se resaltan las condiciones óptimas para obtener la máxima actividad específica. k_{cat} : $V_{m\acute{a}x}/[E]_t$; K_m / $I_{0,5}$ / $pH_{0,5}$: concentraciones con las que se obtiene la mitad de la actividad máxima medida en condiciones óptimas con excepción de los valores de $I_{0,5}$ del Li^+ que se reportan para una concentración de Mg^{2+} igual a su K_m . Los valores se extrajeron a partir de los gráficos presentados en la Figura 30 (pH), en la Figura 31 (FBP y Mg^{2+}) y en la Figura 32 (Li^+). **n.d.**: no determinado.

Conclusiones

Este capítulo detalla los experimentos bioquímicos referidos principalmente a tres mutantes cuya obtención fue descrita en el capítulo anterior: 1) Mutante I271S, construida luego de obtener la CFBPasa I271T que mostró una menor inhibición frente al Ca^{2+} en el primer ciclo de evolución dirigida 2) Mutante I271S/A107V, obtenida en el segundo ciclo de evolución dirigida por revertir el efecto de I271S ya que presentó mayor inhibición por Ca^{2+} y mayor actividad en ausencia del mismo 3) Mutante A107V, construida con posterioridad a la mutante anterior para conocer el efecto intrínseco de esta sustitución. Si bien los experimentos *in vitro* corroboraron estos resultados las causas del comportamiento diferente frente a la inhibición fueron inesperadas.

Esencialmente la variante I271S presentó un corrimiento del pH óptimo de catálisis hacia regiones más alcalinas respecto de la enzima nativa. Por ello esta mutante oxidada prácticamente no presentó actividad en el pH óptimo de catálisis de la enzima nativa (7,9). En general, la inhibición por Li^+ fue menor cuando la catálisis de la CFBPasa se llevó a cabo por debajo del pH óptimo. Esto explica la escasa inhibición (e incluso activación) que presentó la CFBPasa I271S frente al Li^+ a pH alrededor de 8. Igualmente, el $I_{0,5}$ de la forma oxidada (50 mM) en su pH óptimo de catálisis (8,5) fue también mayor al de la enzima nativa (2,5 mM), pero no se observó el efecto de activación.

Todas las formas de CFBPasa aquí mencionadas al ser reducidas aumentaron sensiblemente su actividad a pH más ácido, en particular las mutantes. De esta manera la variante I271S reducida presentó gran actividad a pH 7,9 aunque no fue máxima. Además su inhibición por Li^+ aumentó al igual que para la enzima nativa reducida.

Estudios estructurales y de termoestabilidad mediante dicroísmo circular revelaron que la mutante I271T presenta un patrón similar al de la enzima nativa. Por otra parte era esperable que la variante I271S no mostrara pérdida de estructura ya que tanto su forma oxidada como reducida tuvieron en general igual o incluso mayor actividad específica que la enzima nativa.

Cuando analizamos la mutante doble I271S/A107V en relación a la mutante simple I271S comprobamos que (1) revirtió el desplazamiento del pH óptimo de catálisis a un valor parecido al de la enzima nativa y (2) presentó una mayor inhibición por Li^+ ($I_{0,5}$ 20 mM vs. 50 mM, respectivamente) aunque siguió siendo menor a la de la enzima nativa.

La principal característica de la mutante A107V fue una mayor afinidad por el cofactor respecto de la enzima nativa. Por el contrario la afinidad por el sustrato, el pH óptimo de catálisis, la inhibición por Li^+ y su actividad máxima no mostraron grandes cambios. Sin embargo esta mutación logró atenuar en la doble mutante I271S/A107V los principales cambios que confiere el reemplazo I271S: i.e. el pH óptimo de catálisis, menor afinidad por el sustrato y menor inhibición por Li^+ .

La posición Ile271 se encuentra adyacente a la Tyr270 que coordina al sustrato. Mayores detalles sobre esta posición y las posibles implicancias a nivel molecular de las distintas mutaciones pueden encontrarse en la sección “*Discusión general*”.

En algunos casos pudo observarse que cuando una de las tres principales variables en la catálisis (concentración de sustrato, cofactor o pH) se encontraba en condiciones subóptimas provocaba una menor afinidad de la enzima por las otras. Por ejemplo la catálisis a un pH menor que el óptimo requirió mayor cantidad de Mg^{2+} mientras que con bajas concentraciones de Mg^{2+} necesitó mayor cantidad de FBP para alcanzar una actividad máxima. Aunque los efectos de muy bajas concentraciones de FBP no pudieron ser bien estudiados debido a los límites de detección del ensayo es evidente que los valores de afinidad (o constantes de inhibición) dependen fuertemente de las demás variables experimentales.

Para obtener las enzimas en su forma oxidada se requirió una purificación a homogeneidad. En el capítulo anterior los experimentos *in vitro* fueron efectuados con enzimas parcialmente purificadas. Como vimos el estado de óxido/reducción de la enzima influye grandemente en sus distintas afinidades y constantes de inhibición. Por lo tanto las diferencias cuantitativas de los experimentos *in vitro* allí informados pueden deberse a distintos niveles de óxido/reducción que presentaron las muestras.

Discusión general

Ubicación de las mutaciones 107 y 271 en relación con el sitio activo

En la introducción de esta tesis se mencionó que la FBPasa pertenece a una familia de fosfomonoesterasas que requieren necesariamente de un metal bivalente como el Mg^{2+} para la hidrólisis de la FBP y, además, son inhibibles por Li^+ . Aunque la secuencia primaria está muy poco conservada entre estas enzimas, se ha establecido un motivo secuencial y una estructura terciaria común [24] (ver introducción). Mediante distintas mutaciones y estructuras cristalográficas se ha comprobado que la mayor parte de los aminoácidos que constituyen dicho motivo secuencial, directa o indirectamente, participan en la hidrólisis del fosfato orgánico por medio de un mecanismo de catálisis que sería similar en la IMPasa [20], la PAPasa [82], la PIPasa [83] y la FBPasa [35, 53, 54]. El mecanismo de la FBPasa ha sido descrito con cierto detalle en la introducción. Los aminoácidos y los metales que participan en la catálisis ocupan una posición espacial similar conformando un sitio activo común a todas estas enzimas (Figura 33). En general, el sitio activo contiene una gran cantidad de aminoácidos ácidos que están vinculados entre sí a través de puentes de hidrógeno y de enlaces de coordinación con los metales.

Aunque es materia de discusión si dos o tres metales intervienen en la catálisis y cuál es la función exacta de cada uno, existe consenso sobre la participación de los sitios 1 y 2 en la unión del sustrato mediante la coordinación con el fosfato que es hidrolizado. La geometría de coordinación octaédrica de los metales (coordinan con 6 oxígenos) implica no sólo participación del grupo fosfato sino también de los residuos ácidos de la proteína (destacados en la Figura 33), los carbonilos del *backbone* y las moléculas de agua.

Patel *et al* [82] asignan distintas funciones a los metales durante las sucesivas etapas de la catálisis: a) *Activación de la molécula de agua nucleofílica*. El metal en el sitio 2 contribuye a dicha activación. b) *Hidrólisis del enlace fosfoester*. El metal en el sitio 1 estabiliza la carga negativa formada en el oxígeno del grupo saliente y, simultáneamente, coordina con la molécula de agua que provee un protón al grupo saliente. c) *Liberación del producto*. Producida la hidrólisis, existe un exceso de carga negativa en el sitio 1 que el metal no compensa. De manera que el hidroxilo, proveniente del agua que aportó el protón, y el Asp133 se apartan de la esfera de coordinación del metal. La disminución del número de coordinación

de seis a cuatro desestabilizarían al metal en el sitio 1 y, en consecuencia, liberaría los productos.

Como puede observarse en la Figura 33, ninguno de los participantes de este proceso catalítico están directamente vinculados con las mutaciones en los sitios 107 y 271 que se describen en esta tesis. Sin embargo la posición 107 se encuentra en la hoja B1 y la posición 271 está relacionada con la hélice H7, estructuras secundarias conservadas en las distintas fosfomonoesterasas y que “desembocan” en el sitio activo. A continuación exponemos las hipótesis que explican a nivel molecular el comportamiento bioquímico observado para que sirvan de base a futuros experimentos.

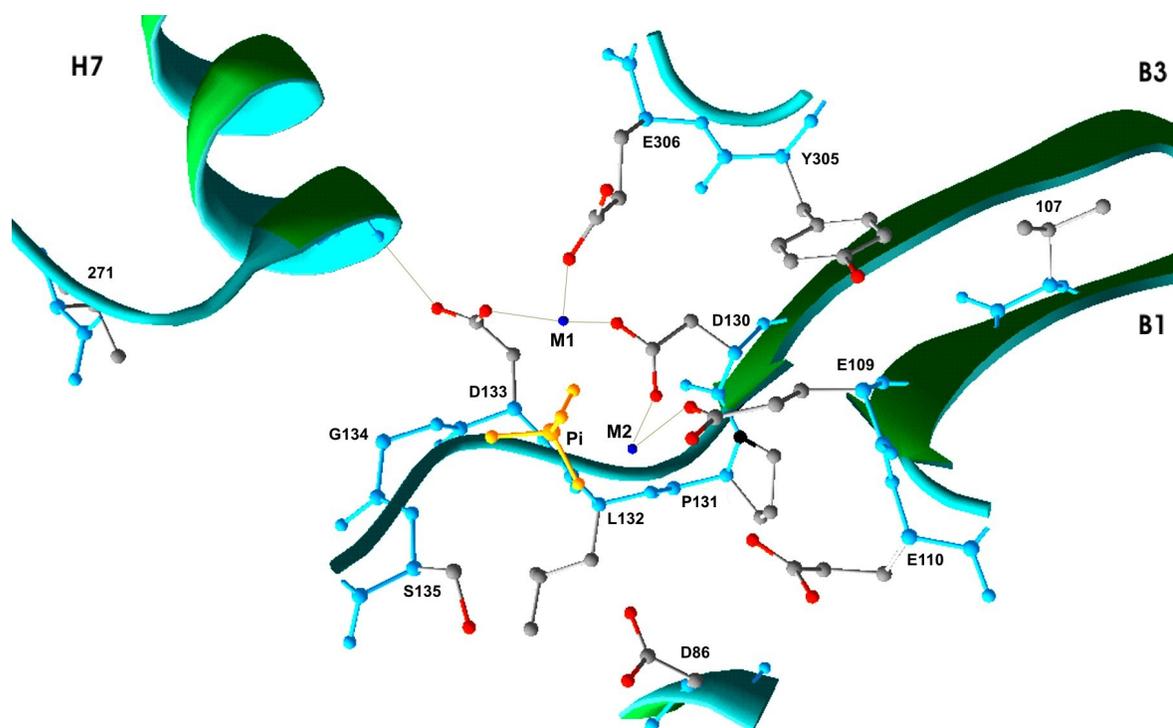


Figura 33. El sitio activo de las fosfomonoesterasas Mg^{2+} dependientes Li^+ inhibibles. La imagen fue generada a partir de la estructura cristalográfica de la FBPasa de cerdo (PDB ID: 1CNQ) utilizando el programa Swiss-PdbViewer (v3.7). Se muestran (en representación *ball-and-stick*) los residuos de los aminoácidos que conforman el motivo secuencial común de la familia de fosfomonoesterasas Mg^{2+} dependientes Li^+ inhibibles. La numeración de los residuos corresponden a la CFBPasa de colza (para las correspondencias ver Figura 3). También se indican las posiciones 107 y 271. En color rojo se identifican los átomos de oxígeno, en gris los carbonos, en celeste el *backbone*, en amarillo el Pi hidrolizado y en azul los dos sitios de metal principales (M1 y M2). Asimismo se destacan tres estructuras secundarias comunes (en representación *ribbon*): la hélice H7 y la parte de la lámina β conformada por las hojas paralelas B1 y B3 (para la ubicación de estas estructuras en el contexto general de la FBPasa ver la Figura 4). Con líneas tenues se representan los enlaces de coordinación entre los sitios de metal y los aminoácidos con grupos ácidos como así también la unión puente hidrógeno entre D133 y la región N-terminal de la hélice H7.

Efectos estructurales de la mutación I271S

La Tyr270, contigua a la Ile271, une FBP a través del fosfato-6. Como este fosfato no es hidrolizado en la catálisis, es posible que la mutación I271S interfiera con la unión del sustrato a la enzima. Aunque esta idea es congruente con la menor afinidad de la CFBPasa I271S por FBP, el corrimiento del pH óptimo de catálisis es más difícil de interpretar.

La estructura tridimensional de la mutante I271S, basada en el modelado molecular a partir de la estructura cristalográfica de la CFBPasa de arveja (Figura 34), exhibió al residuo Ser271 muy alejado tanto de la Tyr270 como del sustrato. Además la posición de la Tyr270 no cambió respecto a la enzima nativa. La novedad que mostró el modelo fue un puente hidrógeno entre el hidroxilo de la Ser271 y la región N-terminal de la hélice H7 cuyas posibles consecuencias pasamos a analizar.

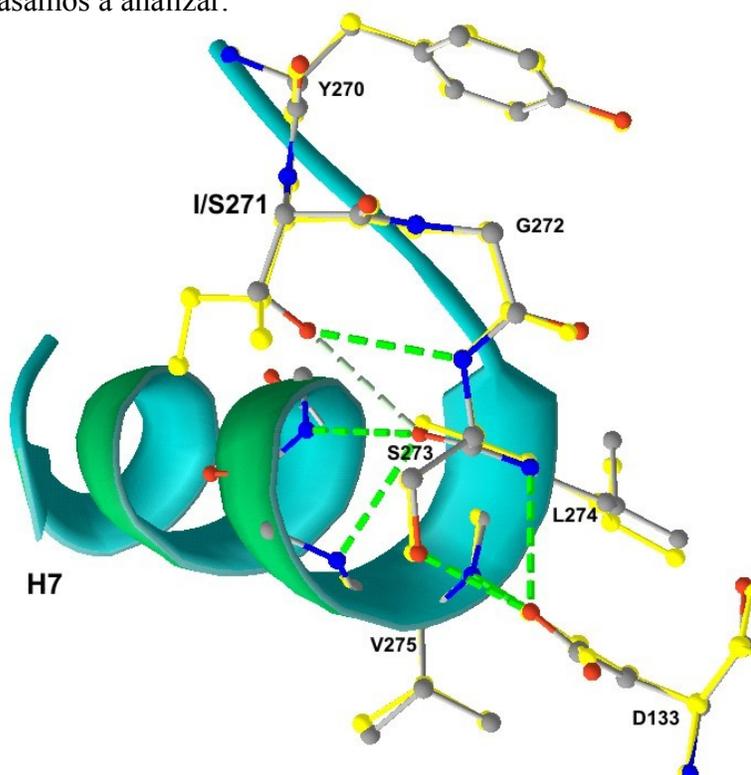


Figura 34. El sitio 271 en la CFBPasa. Se modeló la estructura de la CFBPasa de colza partiendo de su secuencia primaria con la mutación I271S y tomando como molde las estructuras cristalográficas de la proteína homóloga de arveja (1d9qB, 1d9qC, 1dcuA, 1dcuC, 1dcuD). Los aminoácidos desde la posición 270 a la 275 y el Asp133 se representan como *ball-and-stick*. El resto de los aminoácidos que conforman la hélice H7 se representan como *ribbon*. En la CFBPasa de colza los átomos de oxígeno se representan en rojo, los de nitrógeno en azul y los carbonos en gris. Todos los átomos de la enzima de arveja se superponen en amarillo. Los enlaces puente hidrógeno se muestran con líneas de puntos. La imagen se generó con el programa Swiss-PdbViewer (v3.7) y el modelado se llevó a cabo a través de internet usando el servicio de Swiss-Model [84] (ver Materiales y Métodos).

El dipolo de las hélices α y su efecto en el pKa de los aminoácidos

El enlace peptídico presenta un momento dipolar entre el oxígeno del carbonilo (polo negativo) y el protón de la amida (polo positivo). La geometría de las distintas estructuras secundarias ubican a los átomos del *backbone* de tal manera que estos dipolos se compensan, contribuyendo así a la estabilidad estructural. En las hélices α el oxígeno del carbonilo de un aminoácido establece un puente hidrógeno con el nitrógeno de la amida del residuo ubicado cuatro posiciones más adelante, de manera que todos los dipolos se alinean de forma paralela al eje de la hélice α . La suma vectorial de los dipolos microscópicos genera un dipolo “macroscópico” cuyo resultado semeja a una carga positiva en la región N-terminal de la hélice α y una carga negativa compensatoria en la región C-terminal. Este dipolo influye en distintas propiedades de las proteínas [85, 86] y depende no sólo del medio dieléctrico dentro de la proteína sino también de la longitud y la posición relativa de la hélice α (interna o externa) [87]. En particular, varios trabajos establecieron que el desplazamiento del pKa de la histidina depende de su ubicación relativa al dipolo [88-90]. La proximidad de la histidina a la región C-terminal o N-terminal de la hélice α aumenta o disminuye, respectivamente, su pKa. Sobre esta base, la estabilización o desestabilización de la carga positiva en la histidina dependerá de su cercanía a la región negativa o positiva del dipolo, respectivamente. Además, se construyeron péptidos helicoidales con aspárticos ubicados en distintas regiones de la hélice α para verificar este efecto en los aminoácidos con residuos ácidos. Los estudios efectuados comprobaron que el aspártico ubicado en la región N-terminal tenía un pKa menor al exhibido por idéntico residuo posicionado tanto en la región C-terminal como en un péptido no helicoidal [91]. Este resultado es congruente con la estabilización de la carga negativa del aspártico en la región N-terminal (positiva) de la hélice α .

Interacción de la Ser271 con la región N-terminal de la hélice H7

Anteriormente se mencionó la preponderancia de los grupos ácidos en el sitio activo de la CFBPasa y la red de enlaces de coordinación que vinculan a los distintos carboxilos, los metales, el fosfato que se hidroliza y las moléculas de agua que actúan como nucleófilo y como dadoras de protón. Sin embargo, pocos comentarios existen en la literatura sobre la interacción de este sistema con la región N-terminal de una hélice α (H7 en la CFBPasa de colza) que se conserva en todas las fosfomonoesterasas de esta familia.

Analizando las estructuras cristalográficas de distintos representantes de la familia (PAPasa: 1K9Y, PIPasa: 1JP4, IMPasa: 1G0I, IPPasa: 1INP, FBPasa: 1CNQ) observamos que el Asp133 (numeración CFBPasa de colza) no sólo coordina al metal del sitio 1 sino que también hace puente hidrógeno con un nitrógeno del *backbone* de la región N-terminal de una hélice α . Aunque la estructura primaria de dicha hélice α no está conservada, sí lo están la estructura secundaria y su posición.

Cuando modelamos la estructura de la CFBPasa I271S, teniendo como referencia la estructura cristalográfica de su contraparte de arveja, obtuvimos un modelo que mostró la aparición de un puente hidrógeno entre el hidroxilo de la serina y la región N-terminal de la hélice H7 (Figura 34). Más específicamente, este hidroxilo estaría interactuando con el amino y el carbonilo de la Ser273, primer aminoácido de la hélice α .

Sobre estas bases, proponemos que:

a) La región N-terminal de la hélice H7 contribuye a disminuir el pKa del Asp133 con lo cual causa la disminución del pKa del sitio activo.

b) La mutación I271S introduce un puente hidrógeno en la región N-terminal de dicha hélice α , afectando su interacción electrostática con el Asp133. En consecuencia, el pKa del Asp133 disminuye con lo cual aumenta el pKa del sitio activo desplazando el pH óptimo de catálisis hacia regiones alcalinas.

Estas consideraciones son congruentes con el aumento de 0,6 unidades de pH para el pH óptimo de catálisis de I271S CFBPasa respecto a la enzima nativa, ambas en las formas oxidadas (Figura 30) (Tabla 10). En cambio, esta variación fue menor en las formas reducidas.

Las estructuras cristalográficas de la CFBPasa de espinaca (1SPI) y de arveja (1D9Q, 1DCU) aparentan ser las formas “activa” (reducida) e “inactiva” (oxidada), respectivamente [55]. Cuando modelamos la estructura de la mutante I271S basados en la enzima de espinaca, el hidroxilo de la serina no apuntó hacia la hélice H7 y no apareció el puente hidrógeno, resultados que son coherentes con el menor desplazamiento del pH óptimo hacia regiones alcalinas.

Sin embargo los resultados del modelado deben ser tomados con cuidado. La menor influencia de la hélice H7 en el desplazamiento del pKa podría deberse a una alteración general que produce una enzima reducida con afinidad por los metales mucho mayor que la forma oxidada. Cabe aquí mencionar el trabajo de Sarker y Hardman [92] que analizaron el

efecto del dipolo de una hélice α sobre el K_m y el *turnover* en la triptofano sintetasa. Concluyeron que dicha influencia sólo sería catalíticamente evidente para la forma más activa de la enzima (en presencia de L-serina).

Efectos estructurales de la mutación A107V

Conservación de las hojas B1 y B3

Dentro de la familia de fosfomonoesterasas que estamos considerando, las hojas B1 y B3 (numeración en FBPasas) están conservadas, son paralelas y forman parte de una lámina β mayor. Al igual que la hélice H7 mencionada, los aminoácidos que la componen no están conservados, aunque predominan los hidrofóbicos. Sin embargo, en la región C-terminal de ambas hojas se originan los loops que contienen los aminoácidos conservados. En particular, el loop relacionado con la hoja B3 contiene el motivo central conservado en estas fosfomonoesterasas: (numeración en CFBPasa de colza) **Asp(130)-Pro(131)-(Ile o Leu)(132)-Asp(133)-(Gly o Ser)(134)-(Thr o Ser)(135)** mientras que el loop vinculado con la hoja B1 contiene los residuos **Glu(109)-Glu(110)** (Figura 33).

Por otro lado la hoja B2 de las FBPasas no está conservada en otras fosfomonoesterasas. Aunque ubicada antiparalela y adyacente a la hoja B1, la disposición de la hoja B2 respecto a la hoja B3 es materia de controversia por cuanto varía en las estructuras cristalográficas de la CFBPasa de espinaca (1SPI) y de arveja (1D9Q, 1DCU) (ver abajo). La ubicación de la mutación A107V en la hoja B1 y la proximidad de ésta a la hoja B2 nos lleva a centrar nuestra atención en las mismas.

El intercambio entre las hojas B1 y B2 en las CFBPasas

En las FBPasas, el loop de la hoja B1, conteniendo residuos esenciales para la catálisis, conecta con la hoja B2 produciendo una disposición antiparalela. La hoja B1, adyacente a la hoja B3, genera una disposición (B2 \downarrow) (B1 \uparrow) (B3 \uparrow) en las estructuras cristalográficas de la CFBPasa de espinaca (ver esquema en Figura 4). En cambio, en las estructuras cristalográficas de la CFBPasa de arveja la disposición es (B1 \uparrow) (B2 \downarrow) (B3 \uparrow), alejando la hoja B1 de la hoja B3. Además las hojas B1 y B2 están desplazadas hacia el interior del dímero provocando la distorsión de los sitios de unión al metal 2 y 3. Por ello se postula que esta conformación es la

forma inactiva (oxidada). en contraposición a la forma activa (reducida) representada por la estructura de la enzima de espinaca. (cf. “El loop regulador 170” en la Introducción).

Chiadmi et al [55] propusieron dos alternativas para explicar este hecho:

- a) Como en el modelo de arveja, las CFBPasas, tanto oxidadas como reducidas, transponen las hojas B1 y B2 y, en consecuencia, exhiben un ordenamiento diferente de las otras FBPasas. En este modelo, la activación/desactivación de la enzima procedería por el desplazamiento horizontal de dichas hojas. La ausencia este intercambio en la actual estructura de la enzima de espinaca provendría de la menor resolución cristalográfica.
- b) La ubicación de la hoja B1 próxima a la B3 $\{(B2\downarrow) (B1\uparrow) (B3\uparrow)\}$ conduce a la forma activa mientras que surge la forma inactiva cuando la hoja B1 está alejada de la B3 $\{(B1\uparrow) (B2\downarrow) (B3\uparrow)\}$. La oxidación-reducción de la enzima provoca la transposición de las hojas B1 y B2 inactivando-activando la capacidad catalítica. Para los autores, este fenómeno de reorganización estructural sería análogo al que ocurre en la activación de la GTP-binding protein [93].

Según nuestro criterio la primer hipótesis es poco probable por las siguientes razones: Primero, en todas las fosfomonoesterasas de esta familia las hojas B1 y B3 están conservadas y son paralelas mientras que la hoja B2 no está conservada (cf. PAPasa 1K9Y). Segundo, el intercambio entre las hojas B1 y B2 implica el cambio no sólo de las posiciones del Glu109 y Glu110 sino también de todo su entorno. Ambos aminoácidos están involucrados en el proceso de catálisis y con funciones diferentes por lo que resulta difícil pensar que la reacción enzimática proceda. Tercero, como veremos, los resultados bioquímicos obtenidos con la mutante A107V avalan la suposición de que la hoja B1 se encuentra junto a la hoja B3.

Interacción de la posición 107 con la Tyr305

Como se mencionó las estructuras secundarias unen por medio de puentes de hidrógeno los carbonilos y las amidas del *backbone* constituyendo patrones regulares y repetitivos. De esta manera, los residuos se proyectan fuera de la estructura definida por el *backbone* produciendo una superficie texturada e irregular que asegura una fuerte interacción de van der Waals con otras estructuras complementarias de la secuencia. Poniendo esto en otras palabras: “En las estructuras secundarias ... las superficies proyectadas por las cadenas laterales se

comportan como el velcro, uniendo estructuras secundarias de partes distantes de la estructura primaria vía la interdigitalización de las cadenas laterales y generando una considerable estabilización a través de las interacciones de van der Waals” [94].

En particular, los enlaces puente hidrógeno del *backbone* de una lámina β se encuentran en el plano de la misma, mientras que las cadenas laterales alternativamente se proyectan por debajo y por encima de la hoja β . Este es el caso de la posición 107 que se encuentra en la hoja B1 proyectando la cadena lateral hacia “arriba”.

Modelamos la estructura de la CFBPasa de colza y de la mutante A107V teniendo como molde la estructura de la contraparte de espinaca (1SPI). De esta manera observamos que la Tyr305 “interdigitaliza” con los residuos Ala/Val107 y Val128 (este último de la hoja B3) produciendo un contacto hidrofóbico con los mismos (Figura 35). Por otra parte esta tirosina

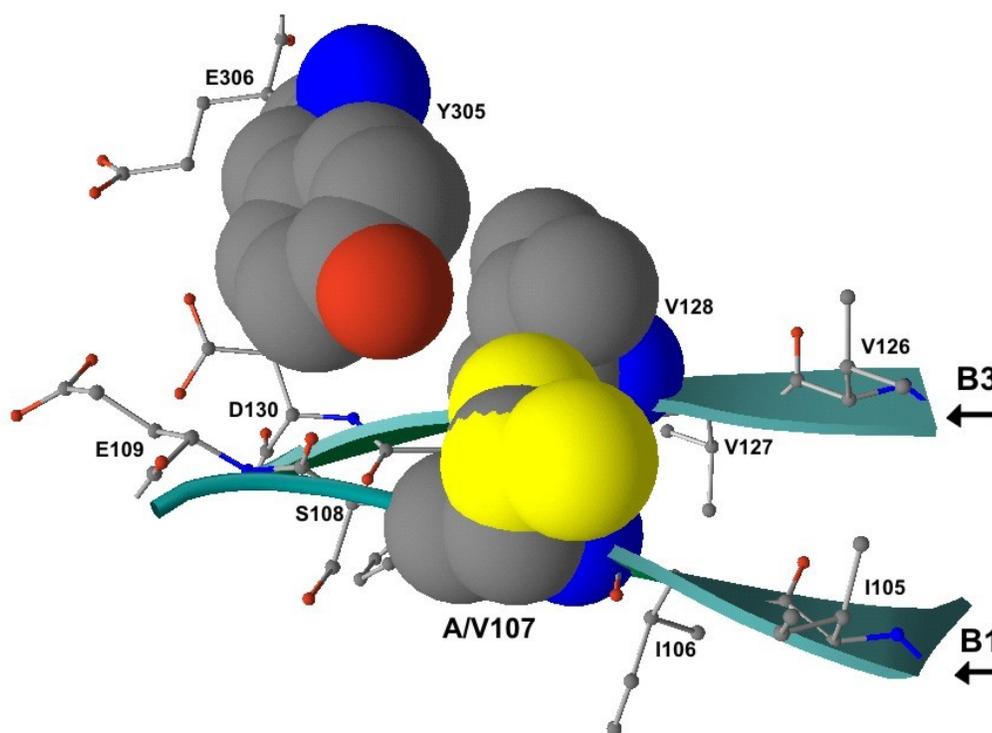


Figura 35. El sitio 107 en la CFBPasa. El modelado de la CFBPasa de colza se realizó como se describe en la leyenda de la Figura 34 con las siguientes diferencias: Se utilizó la secuencia primaria de la enzima WT y luego la de la mutante A107V tomando como molde la estructura cristalográfica de la enzima homóloga de espinaca (1spiA, 1spiB, 1spiC, 1spiD). Los aminoácidos Asp/Val107, Val128 y Tyr305 se muestran con la representación *space-filling* para destacar las superficies de Van der Waals. El resto de los aminoácidos se representan en *ball-and-stick*. Se adopta la convención de color CPK salvo para los dos grupos metilo extra que posee la Valina respecto de la Alanina los cuales se muestran en amarillo para resaltar la diferencia.

interactúa directamente con aminoácidos cuyos carboxilos forman parte de los sitio de metal - Glu109 (sitio 2), Asp130 (sitio 1 y 2)- y está adyacente al Glu306 (sitio 1). La Tyr305 es uno de los aminoácidos conservados en el motivo secuencial de las fosfomonoesterasas Mg^{2+} -dependientes Li^+ -inhibibles cuya posición puede estar ocupada tanto por una tirosina como por un triptofano [24]. Comparando las secuencias y estructuras de los distintos miembros de la familia, encontramos una sola excepción, la IMPasa/FBPasa que exhibe una valina en esta posición (UniProt ref. Q57573, PDB ID 1DK4, 1G0H, 1G0I) [95]. En la IMPasa de mamífero, la mutación del Trp219, análogo estructural de la Tyr305 de la CFBPasa de colza, y los residuos adyacentes (W219F, H217Q, C218A) producen una menor afinidad de la enzima tanto por el cofactor Mg^{2+} como por el inhibidor Li^+ [96, 97].

Cuando modelamos la estructura de la CFBPasa de colza y la mutante A107V, no observamos mayores cambios estructurales por los dos metilos adicionales provistos por la valina al reemplazar a la alanina (Figura 35). Sin embargo, el programa Swiss-PdbViewer muestra que esta mutación es energéticamente favorable y los dos metilos extras no entran en conflicto estérico con los átomos circundantes. Por lo tanto su incorporación aumentaría los contactos hidrofóbicos, tanto con la Tyr305 como con la Val128, estabilizando la estructura.

Efecto de la mutación A107V en la afinidad por los metales

La reducción de las CFBPasas produce un aumento en la afinidad por los metales. Paradójicamente los sitios de unión a metal 2 y 3 están distorsionados en las estructuras cristalográficas de la CFBPasa C153S de arveja, mutante “constitutivamente reducida y activa”. Chiadmi et al [55] sugirieron que la enzima tiende hacia la conformación inactiva, predominante en ausencia del sustrato, del cofactor y de la señal redox. En este mecanismo la formación del puente disulfuro sólo contribuye a la estabilización de la forma inactiva (ver introducción para los detalles del mecanismo). Por otra parte, el sustrato y el cofactor conducirían rápidamente a la conformación activa, tanto a la forma reducida como la oxidada. En línea con esta suposición, la CFBPasa oxidada exhibe capacidad catalítica en presencia del sustrato y altas concentraciones de Mg^{2+} [98].

Por lo tanto existiría un equilibrio entre la forma activa e inactiva de la CFBPasa, en el cual los distintos factores regularían la actividad desplazándolo hacia una u otra forma. De esta manera, el FBP y el Mg^{2+} estabilizarían la forma activa del centro catalítico mientras que la oxidación del puente disulfuro estabilizaría la forma inactiva. Cuando la escisión del puente

disulfuro (reducción) desplaza el equilibrio hacia la forma activa aumenta la afinidad por los metales y por el sustrato.

Cuando modelamos la estructura de la CFBPasa A107V respecto a la de arveja (hojas B1 y B2 intercambiadas), el residuo valina no hizo contacto con la Tyr305 y se ubicó hacia el exterior de la enzima. En particular, los dos metilos de la valina protruyeron en la superficie de la proteína.

Tomados en conjunto estos aspectos sugerimos que la mutación A107V desplaza el equilibrio hacia la forma activa de la CFBPasa y de esta manera aumenta la afinidad por los metales. Los nuevos contactos hidrofóbicos no sólo estabilizan la posición de la hoja B1 junto a la hoja B3 y la Tyr305 sino también favorecen la ubicación interna, más alejada del solvente, de la hoja B1 (forma activa).

El sitio 107 en otras fosfomonoesterasas

En este contexto surge la pregunta: ¿Es relevante el sitio 107 de la CFBPasa de colza en las demás fosfomonoesterasas?. Como ya lo mencionamos, las hojas B1 y B3 están conservadas en esta familia y el sitio estructural 107 en la hoja B1 también. Un análisis exhaustivo de las distintas estructuras arrojó los siguientes aminoácidos en posiciones homólogas a la 107 de la CFBPasa de colza:

PAPasa: Val70 (1K9Y).

PIPasa: Ile74 (1JP4).

IMPasa: Ile68 (2HHM), Val63 (1DK4), Ile79 (2CZH)

IPPasa: Phe77 (1INP).

FBPasa: Val95 (citoplasmática, mamíferos) (1CNQ), Ala105 (espinaca, cloroplastos) (1SPI), Ala103 (arveja, cloroplastos) (1D9Q).

Claramente, el sitio está ocupado por pocos aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina, fenilalanina, valina y alanina) apareciendo la alanina solamente en las formas cloroplásticas. Sorprendentemente la mutación A107V, generada al azar, introduce la valina, un aminoácido conservado en otras fosfomonoesterasas incluida la FBPasa citoplasmática.

En esta etapa, es de resaltar el estudio realizado por Albert et al [22]. Estos investigadores reportaron un screening funcional *in vivo* en levaduras cuando la enzima Hal2p (una PAPasa) es limitante para el crecimiento bajo estrés de litio y sodio. En estos estudios produjeron mutaciones al azar en el gen HAL2 y seleccionaron las levaduras con sensibilidad reducida al

litio. Obtuvieron dos mutantes diferentes partiendo de una biblioteca de 600.000 posibles variantes. Sorprendentemente una de las variantes era V70A, posición homóloga al sitio 107 en la CFBPasa de colza. Obviamente, la mutación V70A es opuesta a la A107V. Por ello, la primera otorga resistencia a la inhibición por Li^+ (i.e. menor afinidad) mientras que la segunda confiere mayor afinidad por Mg^{2+} , pero no introduce grandes cambios en la inhibición por Li^+ (Tabla 10). En línea con la Hal2p V70A de levaduras y la CFBPasa A107V de colza, los mismos autores construyeron la mutante IMPasa I68A humana que exhibió menor inhibición por Li^+ . El conjunto de estos resultados con las fosfomonoesterasas es congruente no sólo con la importancia de la hoja B1 y el sitio 107 para en la afinidad por los metales sino también con la contribución importante de las interacciones hidrofóbicas en dicha función.

La conjunción de las mutaciones I271S y A107V

La mutación I271S provoca el corrimiento alcalino del pH óptimo de catálisis y una sensibilidad a la inhibición por Li^+ a pH 8,5 menor que la enzima nativa ($I_{0,5}$ 50 mM vs. 2,5 mM respectivamente) (Tabla 10). Sorprendentemente, el Li^+ , a pH 7,9, es un activador de la forma oxidada de la I271S CFBPasa. Aunque la reducción de esta mutante atenúa estas características y la semejan a la forma nativa. Por otra parte, la CFBPasa A107V no muestra grandes cambios en el pH óptimo de catálisis ni en la inhibición por Li^+ pero exhibe una mayor afinidad por el Mg^{2+} .

En cambio, la doble mutante I271S/A107V posee características insospechadas; anula el corrimiento alcalino del pH óptimo de catálisis y aumenta la inhibición por Li^+ mostrados por la CFBPasa I271S oxidada. Sobre la base de las consideraciones anteriores, esta modificación de las propiedades catalíticas estarían vinculadas a los siguientes hechos:

- a) La reducción tanto en la CFBPasa nativa como en las mutantes estabiliza la forma activa de la enzima.
- b) La mutación A107V también estabilizaría la forma activa de la CFBPasa.
- c) La reducción de la CFBPasa I271S atenúa sus efectos en el pH óptimo de catálisis y en la inhibición por Li^+ .

De esta manera la mutación A107V estaría atenuando los efectos de la mutación I271S en la doble mutante I271S/A107V oxidada al estabilizar la forma activa de la enzima.

Consideraciones finales

En esta tesis se han abordado, entre otros temas, la inhibición por Li^+ y el pH óptimo de catálisis de la CFBPasa de colza. Al mismo tiempo intentamos extender las conclusiones para las otras enzimas que componen la familia de fosfomonoesterasas que son dependientes de Mg^{2+} e inhibibles por Li^+ .

La inhibición por Li^+

La inhibición por Li^+ de las fosfomonoesterasas es un tema que ha suscitado la atención de los investigadores por varios motivos. En primer lugar la administración de Li^+ ha sido usado en terapias contra el síndrome maníaco depresivo. Se cree que el Li^+ inhibe el camino de segundos mensajeros de fosfatidilinositol en el cerebro que está sobre estimulado en esta enfermedad [99, 100]. En particular la IMPasa sería la enzima inhibida por el Li^+ [101].

Por otro lado la progresiva salinización de la tierra lleva a buscar plantas con mayor resistencia a las sales. En este sentido se descubrió que la sobre expresión del gen HAL2 (que corresponde a la PAPasa) en tomate produce plantas con una mayor tolerancia a la sal por cuanto el estrés salino provoca la acumulación de PAP en la célula y, en consecuencia, una variedad de efectos tóxicos. [67]. [102, 103].

No se conoce exactamente el mecanismo por el cual el Li^+ inhibe a las enzimas de esta familia porque no presenta una densidad electrónica suficiente para aparecer en las estructuras cristalográficas. La hipótesis generalizada es que el metal ocupa el sitio 1 ya que desplaza a otros metales de dicho sitio; e.g., la PAPasa y la FBPasa [22, 104]. Además se postula que su acción retardaría la liberación de los productos mientras que el Ca^{2+} directamente impediría la hidrólisis al introducirse en el sitio 2 de metal [82] (tener en cuenta que la numeración 1 y 2 para los sitios de metal está invertida en las PAPasas).

El pH óptimo de catálisis

El tema del pH óptimo de catálisis y su modificación en las enzimas también ha sido abordado no sólo por consideraciones fisiológicas sino también para aplicaciones industriales. Hasta el momento existen principalmente tres estrategias para cambiar el perfil de pH en la catálisis enzimática:

a) Reemplazo de los grupos ionizables que están directamente involucrados en la unión del sustrato o del producto [105].

b) Reemplazo de los residuos que están en contacto directo con los aminoácidos del punto anterior ya sea por puentes hidrógenos o salinos [106].

c) Modificación de la carga superficial de la enzima (interacciones a distancia) ya sea por modificaciones químicas [107] o por mutaciones sitio dirigidas [108, 109]. Al hacer la superficie más positivamente cargada se produce un descenso en el pKa de los grupos ionizables y por lo tanto en el pH óptimo de catálisis. Lo inverso ocurre al hacer la superficie más negativa.

Como ejemplo de su importancia en la industria podemos mencionar los trabajos hechos sobre fitasas. Las fitasas inician la hidrólisis de los fosfatos del ácido fítico (*myo*-inositol hexakisphosphate). Este compuesto es la fuente principal de almacenamiento de fósforo en las semillas de plantas. Sin embargo animales monogástricos como cerdos y aves de corral poseen una baja actividad fitasa en el tracto digestivo por lo que el alimento debe ser suplementado con fósforo inorgánico. De esta manera aumenta la carga de fósforo en las heces produciendo contaminación ambiental por eutrofización de las aguas superficiales. Este problema fue abordado con la adición de fitasas recombinantes en el alimento. Sin embargo para aumentar la eficiencia se debió adaptar el pH óptimo de catálisis al existente en el estómago de los animales. Esto se hizo tanto con el reemplazo de aminoácidos superficiales [110] como con el reemplazo de aminoácidos en el sitio activo [111].

El fin de esta tesis

En esta tesis nos propusimos abordar el tema de la inhibición por metales y la modificación del pH óptimo de catálisis en la CFBPasas de colza aplicando para ello un screening funcional. Consecuentemente primero debimos desarrollar un nuevo método de screening para la actividad fosfatasa que permitiese utilizar el sustrato específico de la CFBPasa (Capítulo 2). Otros métodos de screening de actividad fosfatasa ya existentes utilizan sustratos generales [75-78]. Luego efectuamos dos ciclos de mutagénesis al azar y screening procurando detectar mutantes de la enzima con comportamiento diferente respecto a la inhibición por metales (Capítulo 3). Posteriormente, teniendo en cuenta estudios básicos sobre la CFBPasa (Capítulo 1), realizamos un análisis bioquímico de dichas mutantes respecto a la inhibición por Li^+ y las modificaciones en el pH óptimo de catálisis (Capítulo 4). Finalmente propusimos algunas hipótesis respecto al mecanismo estructural subyacente en los

cambios bioquímicos observados. Al mismo tiempo señalamos distintos campos donde dichas propiedades son aplicadas (Discusión general).

Uno de los objetivos del screening funcional es aportar nuevos datos estructurales acerca de una determinada propiedad enzimática. En contraposición un estudio racional con mutaciones sitio dirigidas es más difícil que aporte datos realmente innovadores ya que necesariamente debe partir de suposiciones previas. En particular, la hipótesis aquí desarrollada sobre la influencia de una hélice α en el pH óptimo de catálisis no está mayormente estudiada y es algo que no se nos hubiese ocurrido analizar *a priori*. Por supuesto que es sólo una hipótesis. Sin embargo si ésta y las demás hipótesis aquí propuestas sirven de base a nuevos experimentos y reflexiones entonces el fin de esta tesis no habrá sido en vano. Esa es nuestra intención.

Materiales y Métodos

Biología molecular

Bibliografía general consultada

Para llevar a cabo las técnicas de ingeniería genética y de biología molecular que se utilizaron en la presente tesis se consultaron principalmente tres fuentes: 1) *Molecular Cloning. A laboratory manual* [112] 2) *Current Protocols in Protein Science* [113] 3) *Current Protocols in Molecular Biology* [114].

El vector pTOTO1c

En todos los ensayos con FBPasa de esta tesis se usó la forma recombinante de la enzima madura de cloroplastos de colza (*Brassica napus*). Para ello se utilizó un vector (pTOTO1c) producto de un subclonado del pTOTO1. Los detalles de la construcción del pTOTO1 están reportados por Rodriguez Suarez y Wolosiuk [57]. Este fágmido de expresión es el pET22b (+) (Novagen, USA) con la forma madura de la enzima clonada entre los sitios NdeI y EcoRI (Figura 36). El subclonado se efectuó simplemente para hacer coincidir el codón Stop con el sitio EcoRI y de esta forma eliminar unas cincuenta pares de bases no codificantes entre dichos sitios lo cual mejoró las posteriores secuenciaciones. En la Figura 3 se muestra la secuencia de la enzima (GenBank L15303) [115].



Figura 36. Sitio de clonado de la CFBPasa. En la tesis se usó la forma madura de la CFBPasa de colza clonada en el fágmido de expresión pET 22b(+) entre los sitios NdeI y EcoRI (pTOTO1c). Se indica el sitio de restricción XbaI utilizado con el sitio EcoRI para los distintos subclonados y otros tres sitios de restricción internos que no aparecen en el resto del vector. Asimismo se muestra la posición de las secuencias T7 y T7 terminator (T7T) utilizadas por los correspondientes primers en las PCR y en las secuenciaciones. Todas las distancias están representadas proporcionalmente.

Mutagénesis sitio dirigida

Para obtener las mutantes puntuales de CFBPasa se utilizó el método del “*megaprimer*” [116]. El procedimiento consistió fundamentalmente en dos PCR sucesivas (Figura 37). Para obtener suficiente material algunas veces fue necesario realizar una tercera PCR utilizando como molde al producto de la segunda PCR (que previamente se purificó extrayendo la correspondiente banda de un gel de agarosa) y los *primers* T7 y T7 *terminator*.

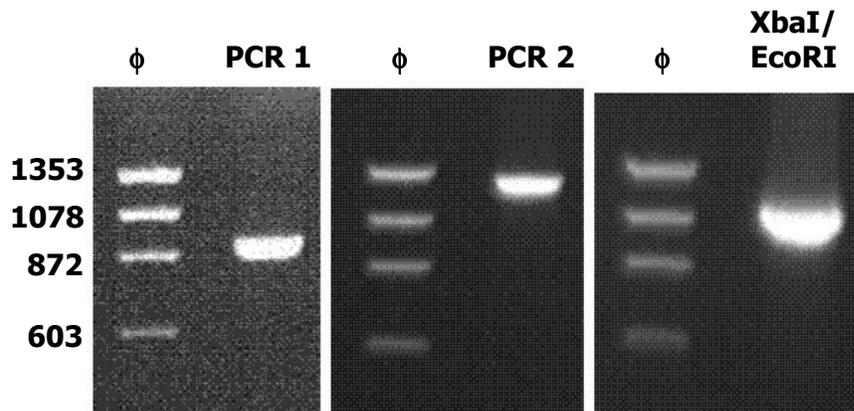


Figura 37. Técnica del “megaprimer” para la mutagénesis sitio dirigida. Se muestran las fotos de tres geles de agarosa 1 % (p/v) que ilustran las sucesivas etapas para la obtención de la mutante I271S **PCR1:** Aparece el fragmento (906 pb) producto de la amplificación en el pTOTO1c con el primer T7 y el oligonucleótido complementario a la zona del sitio 271 pero que contiene la mutación buscada. **PCR2:** El fragmento anterior, luego de ser purificado extrayendo la banda de un gel de agarosa, sirve como “*megaprimer*” junto al oligonucleótido T7 *terminator* en una segunda PCR que reconstruye todo el gen de la CFBPasa (1290 pb). **XbaI/EcoRI:** Estas enzimas de restricción son usadas para la obtención del fragmento (1119 pb) que servirá para el posterior clonado. **Φ:** Marcadores de peso molecular (ΦX-174 digerido con HaeIII).

Amplificación del ADN por PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico Perkin Elmer en un volumen de 50 μ l. La técnica se utilizó para generar mutaciones sitio dirigidas y al azar. En cada caso las condiciones de reacción fueron diferentes:

a) PCR para mutagénesis sitio dirigida: Se utilizó la técnica del “*megaprimer*” y en todas las reacciones de PCR involucradas los reactivos fueron Tris-HCl 20 mM (pH 8,5), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP. Según se indica en cada caso los *primers* fueron un par de los siguientes: T7 1 μ M, T7 *terminator* 1 μ M, oligonucleótido con la mutación buscada y el producto de la primer PCR purificado (este es el *megaprimer* que se agregó en exceso sin cuantificar). El molde fue el pTOTO1c. Para tener buena fidelidad en la reacción de

síntesis se utilizó la enzima Pfu-DNA polimerasa. El programa de ciclado fue: 94 °C durante 2 min para desnaturalización inicial seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 45 seg para la desnaturalización, 55 °C durante 30 seg para la hibridización y 72 °C durante 60 seg para la extensión. Al final del programa la reacción prosiguió 5 min a 72°C para terminar la síntesis de las cadenas incompletas.

b) PCR para mutagénesis al azar: Los reactivos fueron Tris-HCl 20 mM (pH 8,5), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, MnCl₂ (la cantidad se indica en cada caso), 0,1 mM de cada dNTP, *primers* T7 1 μM y T7 *terminator* 1 μM. El molde fue el pTOTO1c o la mezcla equimolar de algunas de sus variantes con mutaciones (se especifican en el Capítulo 3). La enzima utilizada fue la Taq-DNA polimerasa para facilitar la aparición de mutaciones. El programa de ciclado fue: 94 °C durante 2 min para desnaturalización inicial seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 15 seg para la desnaturalización, 55 °C durante 15 seg para la hibridización y 72 °C durante 45 seg para la extensión. En este caso la reacción también prosiguió 5 min a 72 °C.

Introducción del vector en las bacterias

La transformación de las bacterias con el vector siempre se efectuó a través de la técnica de electroporación. Tanto la preparación de las correspondientes células competentes como la posterior electroporación se llevaron a cabo, en gran parte, según lo descrito en el manual de clonado molecular de Sambrook ([112] capítulo 1, protocolo 26).

Para preparar las cepas competentes se usó la cepa JM109(DE3) de *E. coli*. La electroporación se hizo con el aparato Gene Pulser (BioRad) a 250 mF, 1500 V/cm y 200 Ω.

Secuenciación del ADN

Se utilizó un secuenciador automático capilar (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer). Todas las secuenciaciones se realizaron sobre el vector pTOTO1c (Figura 36). Para cubrir la secuencia completa de la CFBPasa (1080 pares de nucleótidos) siempre fue necesario realizar una secuenciación de la cadena directa con el *primer* T7 y una secuenciación de la cadena complementaria con el *primer* T7 *terminator*.

Bioquímica

Expresión y extracción de la CFBPasa

En todos los casos como medio de expresión se usó la cepa JM109(DE3) de *E. coli* transformada con las distintas variantes del vector pTOTO1c.

1) Las células se cultivaron (siempre con agitación) en medio LB-ampicilina (100 µg/ml) 8 ml por 16 h a 37 °C hasta obtener un cultivo saturado 2) Una alícuota (670 µl) se inoculó en el mismo medio de cultivo fresco (40 ml ya a 37 °C) y se dejó crecer hasta una densidad óptica de A_{600} igual a 0,5-0,7 (ca. 2 h 45 min) 3) Se indujo con IPTG 0,2 mM y se incubó por 3 h más a 37 °C 4) Se centrifugó a 7000 g por 10 min. y se resuspendió en buffer de lisis (670 µl; NaAcO 100 mM (pH 5,2), NaCl 300 mM, EDTA 20 mM) 5) La lisis de las bacterias se realizó por sonicación en tubos eppendorf (dos veces) y se centrifugó a 12.000 g por 10 min. Se separó el sobrenadante donde se encontró la proteína.

Purificación enzimática

En la presente tesis se utilizó la CFBPasa en dos grados de pureza diferentes. La “purificación parcial” implica menor tiempo de trabajo y fue aplicada para todas las variantes descritas en el capítulo 3. Los experimentos descritos en los capítulos 1 y 4, salvo indicación contraria, utilizaron a la CFBPasa obtenida por “purificación completa”.

Purificación parcial (columna DEAE)

Se utilizó la resina de intercambio aniónico DEAE Sepharose Fast Flow (Sigma) empacada en una columna de vidrio (Econo-Column Chromatography Column 1x5 cm, BioRad). El volumen utilizado de resina fue de 1,5 ml y la corrida se efectuó por gravedad a temperatura ambiente. La purificación fue del tipo discontinuo (purificación en *batch*) empleándose tres soluciones diferentes en el siguiente orden:

1) Solución de equilibrio/lavado (NaAcO 30 mM (pH 5,2), NaCl 300 mM). Luego de equilibrar la columna con la solución, se sembró la muestra (ca. 600 µl) obtenida según se describe en el paso anterior (expresión/extracción). El lavado se efectuó con la misma solución (ca. 5 ml).

2) Solución de elusión (NaAcO 30 mM (pH 5,2), NaCl 700 mM). Al aplicar esta solución se tomaron alícuotas de 0,5 ml. La CFBPasa eluyó principalmente en las fracciones 3 a 5 las cuales fueron juntadas (por lo general la presencia de la enzima en las distintas fracciones se confirmó midiendo actividad en placas de microtitulación).

3) Solución de lavado (NaAcO 30 mM (pH 5,2), NaCl 1 M). Se empleó para terminar de eluir el resto de la muestra y así poder reutilizar la columna.

Las fracciones con la muestra se concentraron por centrifugación en dispositivos Centricon YM-10 (Amicon).

Purificación completa (columna Superdex-200)

La muestra obtenida en el paso anterior de purificación fue sembrada utilizando un loop de 500µl en una columna analítica de tamiz molecular Superdex-200 (Amersham Biosciences, Suecia) corrida en un aparato de HPLC (Jasco). La solución de equilibrio y elución fue NaAcO 30 mM (pH 5,2), NaCl 100 mM que se corrió a un flujo de 0,5 ml/min. Las fracciones de CFBPasa así eluidas fueron concentradas de la manera ya descrita.

Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteína fue empleada para el cálculo de la actividad específica en las diferentes variantes de CFBPasa. Para ello se utilizó el método de Lowry *et al* [117] usando seroalbúmina bovina como estándar en la curva de calibración.

Obtención de las formas oxidadas y reducidas de CFBPasa

Forma oxidada: Las distintas variantes de CFBPasa se oxidaron espontáneamente luego de la purificación completa antes descrita. Es indispensable el paso por la columna de tamiz molecular luego de la columna DEAE. Igualmente para estabilizar la enzima en el pH de catálisis, se efectuó una preincubación en tubos eppendorf con Tris-HCl 75 mM (pH 7,9) durante 1 h 30 min a 25 °C. La concentración de enzima varió alrededor de 50 µg/ml.

Forma reducida: En general la reducción se llevó a cabo en tubos eppendorf durante 3 h a 25 °C en una solución de preincubación (antes de la catálisis) que contenía Tris-HCl 75 mM (pH 7,9), CaCl₂ 50 µM, FBP 3 mM y DTT 10 mM. La concentración de enzima fue variable según cada experimento aunque estuvo alrededor de 15 µg/ml.

Medición de la actividad CFBPasa

Se utilizaron dos métodos para medir la velocidad de catálisis de la CFBPasa: el método con enzimas acopladas y el método de Chen para la detección del fosfato liberado. Este último fue el método más extensamente aplicado. En todos los casos la catálisis se llevó a cabo a 25 °C y la reacción se inició agregando la enzima, preincubada como se indica anteriormente, a la solución de catálisis de tal manera de que se produjo una dilución de 200 veces (en general 10 µl de enzima se agregaron a 1990 µl de solución de catálisis).

Método con enzimas acopladas

La solución de catálisis contuvo: fosfoglucoasa isomerasa 50 µg/ml, glucosa 6 fosfato deshidrogenada 50 µg/ml y β-NADP 400 µM además del buffer, FBP y Mg²⁺ cuyas cantidades se indican en cada caso. La primer enzima transforma F6P (producto de reacción de la CFBPasa) en glucosa 6-fosfato. La segunda enzima transforma la glucosa 6-fosfato en 6-fosfogluconato en presencia de NADP que se reduce a NADPH.

La formación de NADPH se siguió espectrofotométricamente en tiempo real a 340 nm usando cubetas de cuarzo termostalizadas a 25 °C. Los datos fueron tomados cada 2 seg.

El NADPH fue cuantificado por medio de una curva de calibración que se construyó para un rango de concentración entre 25 µM y 160 µM de NADPH. Se eligió la cuantificación por absorbancia en vez de fluorescencia porque mostró un mayor rango de linealidad.

Método de Chen

La reacción fue llevada a cabo en tubos de ensayo de vidrio a 25 °C. Los componentes de la solución de catálisis se detallan en cada experimento sin más agregados. La reacción se detuvo con la solución de Chen (cantidad 1:1 con la solución de catálisis) para la cuantificación del Pi liberado. Esta solución estuvo compuesta por: ácido sulfúrico 1,2 N, molibdato de amonio 0,5 % (p/v) y ácido ascórbico 2 % (p/v) [73]. Para permitir el desarrollo del color se esperó 1 h a 25 °C. Posteriormente se midió la absorbancia a 820 nm y la concentración de Pi se calculó por medio de una curva de calibración construida para un rango de concentraciones entre 15 µM y 150 µM.

Adquisición de datos

En ambos casos la formación de producto se siguió con un espectrofotómetro Hitachi 220A de doble haz. En la celda de referencia se colocó agua. El aparato contaba con una placa RS232 a través de la cual se pudieron enviar los datos a una computadora por uno de sus puertos seriales. Dichos datos fueron tomados directamente en una planilla de cálculo Excel por medio de un pequeño programa que escribimos para tal fin. El programa fue escrito en lenguaje Visual Basic for Applications (VBA) y requirió la instalación de un *driver* para permitir la comunicación con el espectrofotómetro (NETcomm OCX Driver).

Técnicas aplicadas a proteínas

Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En todos los casos se aplicó la técnica de electroforesis en gel desnaturizante (SDS), discontinuo y con alta concentración de Tris y Tricina ([113] capítulo 10). Las muestras proteicas se diluyeron en una solución con Tris-HCl 50 mM (pH 8,4), SDS 2 % (p/v), DTT 12,5 mM, glicerol 10 % (v/v) y Bromofenol Blue. En general no se requirió el calentamiento de la muestra previo al sembrado en el gel. Las proteínas en el gel se revelaron con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Detección inmunológica de proteínas inmovilizadas en membrana (Western Blot)

Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas mediante el sistema semi-seco (semi-dry blotter, techware, SIGMA-ALDRICH) a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,2 μm , Bio-Rad) según protocolos ya establecidos ([113] capítulo 10). Como suero primario se usó un anti-CFBPasa de colza (recombinante) hecho en conejo y como suero secundario un anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma). El revelado fue por incubación de la membrana con NBT/BCIP (Gibco) según las recomendaciones del fabricante.

Dicroísmo circular

Los experimentos de dicroísmo circular fueron hechos en un espectro polarímetro Jasco J-810 (Nikota, Japón) con control de temperatura Peltier. Los datos son informados en

elipticidad molar por residuo (θ_{mrw}) en unidades $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ que normaliza por paso de luz, concentración y número de enlaces peptídicos. Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$\theta_{mrw} = (\theta \cdot M_{mrw}) / (10 \cdot c \cdot l) \text{ donde}$$

θ = la señal medida (mdeg).

M_{mrw} = el peso molecular promedio. Se calculó haciendo el cociente entre el peso molecular del monómero de la CFBPasa (39000,64 Da) y el número total de residuos (358). Por lo tanto $M_{mrw} = 108,9 \text{ g/mol}$.

c = la concentración de la enzima. En general estuvo alrededor de $0,15 \text{ mg/cm}^3$.

l = el paso de luz ($l = 0,1 \text{ cm}$).

(Empleando las unidades mencionadas en cada caso el número 10 de la fórmula transforma mol en dmol).

Los espectros en el UV lejano fueron obtenidos tomando valores cada $0,2 \text{ nm}$ y se promediaron tres espectros para cada muestra.

En los experimentos con gradiente de temperatura se tomaron valores cada $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ y se realizaron a una velocidad de $3 \text{ }^\circ\text{C/min}$. Para suavizar las curvas que se obtuvieron de esta manera cada valor medido fue promediado con los tres anteriores y los tres posteriores.

Screening de la actividad fosfatasa

El esquema general del método de screening se resume en la Figura 16. Todo el procedimiento fue llevado a cabo a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Se partió de diluciones adecuadas de cultivos líquidos “*over night*” o de gliceroles de *E. coli* para luego plaquearlas sobre una membrana de nitrocelulosa. Salvo indicación contraria, se utilizaron membranas de nitrocelulosa con soporte (tamaño de poro $0,2 \text{ }\mu\text{m}$, Bio-Rad). En otros casos se emplearon membranas de nitrocelulosa sin soporte (Gibco). El medio de cultivo siempre fue agar-LB suplementado con ampicilina $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$.

Una vez que las colonias alcanzaron un diámetro de 1 mm (24 h después de plaquear, aproximadamente), la expresión de la CFBPasa clonada en el vector pET se indujo con $0,2 \text{ ml}$ de IPTG 40 mM aplicados sobre el agar. Por otra parte, la expresión de las enzimas clonadas en el vector pBAD se indujo con $0,2 \text{ ml}$ de L-Arabinosa $10 \text{ } \%$ (p/v) y se reprimió con $0,2 \text{ ml}$ de Glucosa $10 \text{ } \%$ (p/v), esta última aplicada antes del plaqueo.

Luego de 3 h la membrana de nitrocelulosa con las colonias fue retirada de la placa de cultivo y colocada sobre un papel de filtro Whatman 3MM embebido en agua. Se repitió este paso de lavado varias veces y finalmente se colocó la membrana sobre un papel de filtro Whatman embebido en la solución de catálisis correspondiente (ver en cada caso). En ningún momento las colonias estuvieron en contacto directo con los papeles de filtro pero se cuidó que éstos estuvieran lo suficientemente húmedos como para mojar la membrana, sin inundar las colonias, durante 10 min cada vez.

La membrana de nitrocelulosa fue retirada y guardada en la placa de cultivo original para conservar las colonias. El papel de filtro correspondiente a la catálisis fue sumergido rápidamente (ca. 2 seg) en la solución de Chen para la detección del fosfato liberado [73] e inmediatamente se lo colocó sobre papel absorbente para remover el exceso de líquido y esperar la aparición de las manchas azules.

Modelado molecular

La estructura tridimensional de la CFBPasa de colza fue obtenida a partir de su secuencia y las estructuras cristalográficas de su contraparte de espinaca (1SPI) y de arveja (1D9Q, 1DCU) según se indica en cada caso. Para ello se utilizó el sitio de internet del Swiss-Model [84] (ver Direcciones de internet). Para visualizar las estructuras y generar las imágenes se usó el programa Swiss-PdbViewer (v3.7).

El procedimiento para optimizar el modelado en la región de una mutación fue el siguiente: a) Se envió la secuencia mutada al Swiss-Model en el modo “*First Approach*” determinando el molde a utilizar. b) Sobre la base del modelo devuelto se seleccionaron todos los aminoácidos que estuviesen 6 Å de distancia al aminoácido mutado. Se obtuvieron los rotámeros optimizados según la herramienta “*Quick and dirty*” del Swiss-PdbViewer. c) El modelo así obtenido fue reenviado al Swiss-Model en el modo “*Project (optimise)*”. Este resultado fue considerado el modelo final.

Direcciones de internet

COG, Clusters of Orthologous Groups [12]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>

Clasificación filogenética que divide a la FBPasa en cinco grupos.

PDB, Protein Data Bank

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Desde este sitio se bajaron las estructuras cristalográficas y la información relacionada.

PROSITE, Database of protein domains, families and functional sites [31]

<http://ca.expasy.org/prosite/>

Se obtuvo el motivo de secuencia que identifica la actividad FBPasa.

SCOP, Structural Classification of Proteins [13]

<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop>

Se identificaron las dos familias estructurales a las que pertenecen las FBPasas.

SIM, Local similarity program [118]

<http://ca.expasy.org/tools/sim-prot.html>

Se usó para calcular los porcentajes de identidad entre pares de proteínas.

Swiss-Model, An Automated Comparative Protein Modelling Server [84]

<http://swissmodel.expasy.org/>

Se usó para modelar la estructura tridimensional de la CFBPasa de colza a partir de su secuencia aminoacídica.

Apéndice

Lista de Figuras

• Figura 1. La reacción FBPasa.....	4
• Figura 2. Superposición del sitio activo de una FBPasa una IMPasa y una IPPasa [25].....	7
• Figura 3. Alineamiento estructural entre diferentes FBPasas.....	8
• Figura 4. Estructura tridimensional de la FBPasa eucariota.	10
• Figura 5. Mecanismo de reacción disociativo de la FBPasa [53].	16
• Figura 6. Mecanismo de reacción asociativo de la FBPasa [54].....	17
• Figura 7. Superposición del sitio de metal de la FBPasa de cerdo (activa) y el de arveja (inactiva) [55]....	20
• Figura 8. Etapas en un ciclo de evolución dirigida [63].....	22
• Figura 9. Paisaje de adaptación [64].	25
• Figura 10. Tasa de mutación óptima [64].	28
• Figura 11. Purificación de la CFBPasa por una columna Superdex-200.....	33
• Figura 12. Actividad de la CFBPasa dependiente de la purificación y la preincubación.	34
• Figura 13. Medición de la actividad CFBPasa en función del tiempo y de $[E]_t$	37
• Figura 14. Inhibición de la CFBPasa con Ca^{2+} y Li^+ usando diferentes cofactores.	40
• Figura 15. Efecto dual del Zn^{2+} como inhibidor y cofactor.....	40
• Figura 16. Esquema del procedimiento de screening de actividad catalítica.....	49
• Figura 17. Célula de <i>E. coli</i>	50
• Figura 18. Inducción de la expresión proteica.	51
• Figura 19. Catálisis y lavado.....	53
• Figura 20. Diferenciación entre la actividad CFBPasa y la <i>phoA</i>	57
• Figura 21. Screening preliminar de la actividad CFBPasa.	65
• Figura 22. Western blot de mutantes al azar de CFBPasa.	66
• Figura 23. Distribución en el gen de la CFBPasa de mutaciones generadas al azar.....	68
• Figura 24. Sustituciones generadas por mutagénesis al azar.	68
• Figura 25. Cantidad de sustituciones por clon generadas por mutagénesis al azar.....	69
• Figura 26. Esquema del proceso de evolución dirigida.	70
• Figura 27. Detección de una colonia expresando una CFBPasa menos inhibible por Ca^{2+}	71
• Figura 28. Inhibición por Ca^{2+} de mutantes de CFBPasa obtenidas a partir del primer screening.	72
• Figura 29. Dicroísmo circular y termoestabilidad.....	84
• Figura 30. Actividad a distintos pH.	85
• Figura 31. Actividad en función de la concentración de sustrato (FBP) y de cofactor (Mg^{2+}).....	89
• Figura 32. Inhibición por Li^+	92
• Figura 33. El sitio activo de las fosfomonoesterasas Mg^{2+} dependientes Li^+ inhibibles.	100
• Figura 34. El sitio 271 en la CFBPasa.	101
• Figura 35. El sitio 107 en la CFBPasa.	106
• Figura 36. Sitio de clonado de la CFBPasa.	115
• Figura 37. Técnica del “megaprimer” para la mutagénesis sitio dirigida.	116

Lista de Tablas

• Tabla 1. Clasificación de las FBPasas.	5
• Tabla 2. Lista de los aminoácidos que conforman el sitio activo de la FBPasa.....	13
• Tabla 3. Valores estadísticos de la actividad CFBPasa en función del tiempo.....	36
• Tabla 4. Constantes cinéticas para la catálisis con distintos cofactores de la CFBPasa.	39
• Tabla 5. Ecuaciones para el cálculo de las concentraciones en el equilibrio de FBP y Mg^{2+}	43
• Tabla 6. Detección de actividad fosfatasa utilizando distintas enzimas y sustratos.	55
• Tabla 7. Análisis de once mutantes al azar de CFBPasa.	67
• Tabla 8. Inhibición por Ca^{2+} de distintas mutantes del sitio 271 y del sitio 270.	74
• Tabla 9. Colonias seleccionadas en el segundo ciclo de mutagénesis al azar.....	77
• Tabla 10. Constantes cinéticas básicas de la CFBPasa nativa y de distintas mutantes.....	94

Listado de las estructuras cristalográficas de la FBPasa

La información fue tomada del *Protein Data Bank* para las estructuras cristalográficas existentes hasta el momento de la FBPasa (EC 3.1.3.11). En cada caso se indica la **fente** de la enzima utilizada mostrándose entre paréntesis las mutaciones si no se trata de la forma nativa. Asimismo se enumeran el tipo y cantidad de **ligandos**, la **cita** del artículo correspondiente, su **año** de publicación y las **páginas** de la presente tesis donde se hace referencia a la cita. Los registros se ordenan de acuerdo al año de publicación en forma descendente.

PDB ID	Fuente	Ligando	Año	Cita	Páginas
2GQ1	<i>E. coli</i>	3 SO ₄	2006	[50]	15
2FIX	Humano	870	2006	[41]	13
2FIE	Humano	A74			
2FHY	Humano	Mg, A37	2006	[42]	13
1YXI	Cerdo (A54L)	3 Mg, 2 Pi, F6P	2005	[52]	15, 16
1YYZ	Cerdo (A54L)	2 Mg, Pi, F6P, AMP			
1YZ0	Cerdo (A54L)	2 Mg, F6P, AMP			
1UMG	Archaea	4 Mg, MPD, 2FP	2004	[17]	6
1LEV	Cerdo	4 Mn, 2 F6P, 2 CLI	2003	[40]	13
1NUW	Cerdo	4 Mg, PO ₃ , F6P	2003	[53]	16, 99
1NUX	Cerdo	3 Mg, PO ₃ , F6P			
1NUY	Cerdo	3 Mg, F6P, 2 Pi			
1NUZ	Cerdo	3 Mg, F6P, 2 Pi			
1NV0	Cerdo	3 Mg, TI, F6P, 2 Pi			
1NV1	Cerdo	2 Mg, 6 TI, F6P, 2 Pi			
1NV2	Cerdo	2 Mg, 6 TI, F6P, 2 Pi			
1NV3	Cerdo	Mg, 4 TI, F6P, 2 Pi	2003	[54]	17, 99
1NV4	Cerdo	2 Mg, 3TI, F6P, 2Pi			
1NV5	Cerdo	2 Mg, 6 TI, F6P, 2 Pi			
1NV6	Cerdo	2 Mg, 5 TI, F6P, 2 Pi			
1NV7	Cerdo	2 Mg, 8 TI, 2 Pi, 2 F6P, 2 AMP			
1Q9D	Cerdo	4 Mg, 4 Pi, 2 F6P, 2 OI1	2003	[44]	13
1KZ8	Cerdo	2 Mn, 2 F6P, 2 AMP, 2 PFE	2002	[43]	13
1LBV	Archaea		2002	[16]	6
1LBW	Archaea				
1LBX	Archaea	4 Ca, 2 IPD			
1LBY	Archaea	2 Pi, 6 Mn, 2 F6P			
1LBZ	Archaea	6 Ca, 2 FBP			
1EYI	Cerdo	2 Mg, F6P, 2 Pi	2000	[29]	8, 10, 14
1EYJ	Cerdo	2 Mg, 2 Pi, 2 F6P, 2 AMP			
1EYK	Cerdo	2 Zn, 2 Pi, 2F6P, 2AMP			

1FJ6	Cerdo (Y57W)	3 Zn, F6P, 2 Pi	2000	[45]	14
1FJ9	Cerdo (Y57W)	4 Zn, 2 Pi, 2 F6P, 2 AMP			
1BK4	Conejo	Mg, 2 SO ₄	1999	[119]	
1D9Q	Arveja		1999	[55]	18, 19, 20, 103, 105, 107
1DBZ	Arveja (C153S)				
1DCU	Arveja				
1CNQ	Cerdo	3 Zn, Pi, 2 F6P	1998	[32]	8, 11, 13, 14
1FSA	Cerdo (K42A)	2 Mn, 2 F6P, 2 AMP	1996	[120]	
1RDX	Cerdo (R243A)	2 F6P	1996	[121]	
1RDY	Cerdo (R243A)	2 F6P, 2 AMP			
1RDZ	Cerdo (R243A)	2 F6P, 2 AMP			
1FPD	Cerdo	4 Mn, 2 AMP, 2 AHG	1995	[122]	
1FPE	Cerdo	4 Mn, 2 AMP, 2 AHG			
1FPF	Cerdo	4 Mn, 2 AMP, 2 AHG			
1FPG	Cerdo	4 Mn, 2 AMP, 2 AHG			
1FPI	Cerdo	6 K, 2 AMP, 2 AHG	1995	[104]	110
1FPJ	Cerdo	AMP, 2 AHG			
1FPK	Cerdo				
1FPL	Cerdo	AMP, 2 AHG			
1SPI	Espinaca		1995	[30]	8, 18, 19, 20
1FRP	Cerdo	2 Zn, 2 FDP, 2 AMP	1994	[37]	11
1FTA	Humano	4 AMP	1994	[123]	
1FBC	Cerdo	2 Mg, 2 AHG	1993	[35]	11, 99
1FBD	Cerdo	4 Mn, 2 AHG			
1FBE	Cerdo	4 Zn, 2 AHG			
1FBF	Cerdo	2 Mg, 2 AHM			
1FBG	Cerdo	2 Mn, 2 AHM			
1FBH	Cerdo	2 BFP, 2 AFP			
1FPB	Cerdo	3 FDP	1992	[36]	11
4FBP	Cerdo	4 AMP	1991	[38]	13
5FBP	Cerdo	3 F6P	1991	[124]	
1FBP	Cerdo	2 Mg, 2 F6P, 2 AMP	1990	[27]	8, 13
2FBP	Cerdo		1990	[19]	6, 14
3FBP	Cerdo	2 FDP			

Deducción de las ecuaciones que expresan las concentraciones de equilibrio entre FBP y Mg^{2+}

Todas las ecuaciones necesarias para el cálculo de las concentraciones de los distintos compuestos que surgen del equilibrio entre FBP y Mg^{2+} se enumeran en la Tabla 5 la cual puede ser copiada en una hoja de cálculo para la evaluación automática de los valores. A continuación se muestra la deducción de dichas ecuaciones conservando la numeración Dn para cada ecuación de la tabla.

Concentraciones iniciales

Corresponden a las concentraciones conocidas y totales de FBP, Mg^{2+} y H^+ (pH).

$$(D1) \quad [FBP]_T$$

$$(D2) \quad [Mg^{2+}]_T$$

$$(D3) \quad [H^+] = 10^{-pH}$$

Concentraciones en el equilibrio

Son las concentraciones que se busca calcular. Corresponden a los compuestos producto de la disociación ácida del FBP y de los correspondientes complejos con Mg^{2+} . No se consideran las especies que predominan a pH ácido.

$$(D4) \quad [FBP^{4-}]$$

$$(D5) \quad [HFBP^{3-}]$$

$$(D6) \quad [H_2FBP^{2-}]$$

$$(D7) \quad [MgFBP^{2-}]$$

$$(D8) \quad [MgHFBP^-]$$

$$(D9) \quad [Mg^{2+}] \text{ (libre)}$$

Ecuaciones a resolver

Estas ecuaciones relacionan entre sí a todas las concentraciones enumeradas anteriormente. Son dos ecuaciones de masa y cuatro ecuaciones de equilibrio de disociación. Los valores de las constantes de disociación (**D10**, **D11**, **D12**, **D13**) fueron tomados del trabajo de Boiteux et al. [125] que a su vez se basa en mediciones hechas anteriormente [126].

$$(D14) \quad [FBP]_T = [FBP^{4-}] + [HFBP^{3-}] + [H_2FBP^{2-}] + [MgFBP^{2-}] + [MgHFBP^-]$$

$$(D15) \quad [Mg^{2+}]_T = [Mg^{2+}] + [MgFBP^{2-}] + [MgHFBP^-]$$

$$(D16) \quad k_1 = \frac{[FBP^{4-}][H^+]}{[HFBP^{3-}]} = 1,74 \times 10^{-4} \text{ mM}$$

$$(D17) \quad k_2 = \frac{[HFBP^{3-}][H^+]}{[H_2FBP^{2-}]} = 1,1 \times 10^{-3} \text{ mM}$$

$$(D18) \quad k_3 = \frac{[FBP^{4-}][Mg^{2+}]}{[MgFBP^{2-}]} = 2 \text{ mM}$$

$$(D19) \quad k_4 = \frac{[HFBP^{3-}][Mg^{2+}]}{[MgHFBP^-]} = 7,59 \text{ mM}$$

Deducción

El objetivo es expresar las concentraciones en el equilibrio (D4 a D9) en función de las concentraciones iniciales (D1 a D3) que son conocidas. Observamos que para ello tenemos seis ecuaciones (D14 a D19) y seis incógnitas (D4 a D9).

Inicialmente expresamos dichas concentraciones en función de $[FBP^{4-}]$ y de valores conocidos. Despejando en D16:

$$(1) \quad [HFBP^{3-}] = \frac{[H^+][FBP^{4-}]}{k_1}$$

Multiplicando miembro a miembro D16 y D17 y despejando:

$$(2) \quad [H_2FBP^{2-}] = \frac{[H^+]^2[FBP^{4-}]}{k_1 k_2}$$

Despejando en D18:

$$[78] \quad [\text{MgFBP}^{2-}] = \frac{[\text{Mg}^{2+}][\text{FBP}^{4-}]}{k_3}$$

Multiplicando miembro a miembro D16 y D19 y despejando:

$$(4) \quad [\text{MgHFBP}^-] = \frac{[\text{H}^+][\text{Mg}^{2+}][\text{FBP}^{4-}]}{k_1 k_4}$$

Reemplazando en D15 con 3 y 4, tomando como factor común $[\text{Mg}^{2+}]$ y despejando:

$$[\text{Mg}^{2+}] = \frac{[\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}}}{\left(1 + \frac{[\text{FBP}^{4-}]}{k_3} + \frac{[\text{H}^+][\text{FBP}^{4-}]}{k_1 k_4}\right)} \Rightarrow$$

$$(5) \quad [\text{Mg}^{2+}] = \frac{[\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}}}{\left(\frac{1}{k_3} + \frac{[\text{H}^+]}{k_1 k_4}\right)[\text{FBP}^{4-}] + 1}$$

Reemplazando en 3 con 5:

$$(6) \quad [\text{MgFBP}^{2-}] = \frac{[\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}}[\text{FBP}^{4-}]}{\left(1 + \frac{k_3[\text{H}^+]}{k_1 k_4}\right)[\text{FBP}^{4-}] + k_3}$$

Reemplazando en 4 con 5:

$$(7) \quad [\text{MgHFBP}^-] = \frac{[\text{H}^+][\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}}[\text{FBP}^{4-}]}{\left([\text{H}^+] + \frac{k_1 k_4}{k_3}\right)[\text{FBP}^{4-}] + k_1 k_4}$$

Ahora lo que resta es expresar $[\text{FBP}^{4-}]$ en función de los valores conocidos. Para ello reemplazamos en D14 con 1, 2, 6 y 7 tomando como factor común a $[\text{FBP}^{4-}]$:

(8)

$$[\text{FBP}]_{\text{T}} = \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{k_1} + \frac{[\text{H}^+]^2}{k_1 k_2} \right) [\text{FBP}^{4-}] + \frac{[\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} [\text{FBP}^{4-}]}{\left(1 + \frac{k_3 [\text{H}^+]}{k_1 k_4} \right) [\text{FBP}^{4-}] + k_3} + \frac{[\text{H}^+] [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} [\text{FBP}^{4-}]}{\left([\text{H}^+] + \frac{k_1 k_4}{k_3} \right) [\text{FBP}^{4-}] + k_1 k_4}$$

Para facilitar la deducción reemplazamos los factores que multiplican a $[\text{FBP}^{4-}]$ en los tres términos (salvo en el numerador del segundo y tercer término) por a_1 , a_2 y a_3 respectivamente.

Tenemos entonces que:

$$\text{(D21)} \quad a_1 = \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{k_1} + \frac{[\text{H}^+]^2}{k_1 k_2} \right)$$

$$\text{(D22)} \quad a_2 = \left(1 + \frac{k_3 [\text{H}^+]}{k_1 k_4} \right)$$

$$\text{(D23)} \quad a_3 = \left([\text{H}^+] + \frac{k_1 k_4}{k_3} \right)$$

Para pasar las $[\text{FBP}^{4-}]$ que están dividiendo al primer término hay que sacar el común denominador de los tres términos de la derecha:

$$= 1 \left(a_2 [\text{FBP}^{4-}] + k_3 \right) \left(a_3 [\text{FBP}^{4-}] + k_1 k_4 \right) = a_2 a_3 [\text{FBP}^{4-}]^2 + (a_2 k_1 k_4 + a_3 k_3) [\text{FBP}^{4-}] + k_1 k_3 k_4$$

Nuevamente reemplazamos los factores que multiplican a $[\text{FBP}^{4-}]$:

$$\text{(D24)} \quad b_0 = k_1 k_3 k_4$$

$$\text{(D25)} \quad b_1 = a_2 k_1 k_4 + a_3 k_3$$

$$\text{(D26)} \quad b_2 = a_2 a_3$$

De esta manera la ecuación 8 puede ser rescrita así:

$$[\text{FBP}]_{\text{T}} = \frac{a_1 b_2 [\text{FBP}^{4-}]^3 + a_1 b_1 [\text{FBP}^{4-}]^2 + a_1 b_0 [\text{FBP}^{4-}] + a_3 [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} [\text{FBP}^{4-}]^2 + \dots}{b_2 [\text{FBP}^{4-}]^2 + b_1 [\text{FBP}^{4-}] + b_0}$$
$$\frac{\dots + k_1 k_4 [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} [\text{FBP}^{4-}] + a_2 [\text{H}^+] [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} [\text{FBP}^{4-}]^2 + k_3 [\text{H}^+] [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} [\text{FBP}^{4-}]}{\dots}$$

Pasando el denominador al primer término y agrupando $[\text{FBP}^{4-}]$ según las potencias queda una ecuación de la forma

$$(9) \quad c_3 [\text{FBP}^{4-}]^3 + c_2 [\text{FBP}^{4-}]^2 + c_1 [\text{FBP}^{4-}] + c_0 = 0$$

donde

$$(D27) \quad c_0 = -b_0 [\text{FBP}]_{\text{T}}$$

$$(D28) \quad c_1 = a_1 b_0 + k_1 k_4 [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} + k_3 [\text{H}^+] [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} - b_1 [\text{FBP}]_{\text{T}}$$

$$(D29) \quad c_2 = a_1 b_1 + a_3 [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} + a_2 [\text{H}^+] [\text{Mg}^{2+}]_{\text{T}} - b_2 [\text{FBP}]_{\text{T}}$$

$$(D30) \quad c_3 = a_1 b_2$$

La ecuación 9 tiene tres soluciones para $[\text{FBP}^{4-}]$. De las tres soluciones la única que da valores reales y positivos (no lo demostramos) es la siguiente:

$$(10) \quad [\text{FBP}^{4-}] = \frac{Z}{2^{1/3} 3c_3} - \frac{2^{1/3} (3c_1 c_3 - c_2^2)}{3c_3 Z} - \frac{c_2}{3c_3}$$

donde

$$Z = \left(9c_1 c_2 c_3 - 27c_0 c_3^2 - 2c_2^3 + \sqrt{4(3c_1 c_3 - c_2^2)^3 + (9c_1 c_2 c_3 - 27c_0 c_3^2 - 2c_2^3)^2} \right)^{1/3}$$

La raíz cuadrada de la expresión anterior es negativa (no lo demostramos aquí) por lo tanto teniendo en cuenta que $\sqrt{-a} = \sqrt{i^2 a} = i\sqrt{a}$ podemos expresar Z de la siguiente manera:

$$(11) \quad Z = x + iy = (x' + iy')^{1/3}$$

donde

$$(D31) \quad x' = 9c_1 c_2 c_3 - 27c_0 c_3^2 - 2c_2^3$$

$$(D32) \quad y' = \sqrt{- \left(4(3c_1 c_3 - c_2^2)^3 + (9c_1 c_2 c_3 - 27c_0 c_3^2 - 2c_2^3)^2 \right)}$$

Ahora lo que falta es encontrar x, y. Para ello hay que calcular la raíz cúbica de un número complejo. Si se expresa al número complejo en forma trigonométrica la fórmula para dicho cálculo es $\sqrt[3]{r} \left(\cos \left(\frac{\theta + 2k\pi}{3} \right) + i \text{sen} \left(\frac{\theta + 2k\pi}{3} \right) \right)$ donde k= 0, 1 y 2. La solución

adecuada en este caso aparece cuando $k = 0$ y la raíz cae entonces en el primer cuadrante de las coordenadas polares (tampoco demostramos esto aquí). Por lo tanto calculando los parámetros r y θ de la forma trigonométrica y aplicando la fórmula anterior podemos hallar (x, y) de la ecuación 10:

$$(D33) \quad x = \sqrt[6]{x'^2 + y'^2} \cos \left(\frac{\arctg \left(\frac{y'}{x'} \right)}{3} \right)$$

$$(D34) \quad y = \sqrt[6]{x'^2 + y'^2} \operatorname{sen} \left(\frac{\arctg \left(\frac{y'}{x'} \right)}{3} \right)$$

La imagen de la función $\arctg()$ aquí expresada debe estar definida tal que exprese el ángulo θ correspondiente a la forma polar del número $x' + iy'$. Tener en cuenta que a partir de la definición en la ecuación D32 y' es siempre positivo por lo que θ va a estar entre 0 y π . En este sentido la función ATAN2 de la planilla de cálculo Excel cumple con los requisitos (y no la función ATAN).

Finalmente tenemos que diferenciar la parte real de la imaginaria en la ecuación 10. Para ello reemplazamos a Z por la correspondiente expresión $x + iy$ según se define en 11 y multiplicamos numerador y denominador por el conjugado de Z en el segundo término de la derecha. La expresión resultante es:

$$[\text{FBP}^4] = \frac{1}{3c_3} \left(\frac{x + iy}{2^{1/3}} - \frac{2^{1/3} (3c_1c_3 - c_2^2)(x - iy)}{x^2 + y^2} - c_2 \right)$$

Ahora resulta sencillo separar la parte real y la imaginaria:

$$(11) \quad [\text{FBP}^4]_{\text{real}} = \frac{1}{3c_3} \left(\frac{x}{2^{1/3}} - \frac{2^{1/3} (3c_1c_3 - c_2^2)x}{x^2 + y^2} - c_2 \right)$$

$$(12) \quad [\text{FBP}^4]_{\text{imag}} = \frac{1}{3c_3} \left(\frac{y}{2^{1/3}} - \frac{2^{1/3} (3c_1c_3 - c_2^2)y}{x^2 + y^2} \right)$$

La parte imaginaria resulta igual a cero (no lo demostramos) y la parte real es la solución del problema.

En resumen, las incógnitas D4 a D9 son resueltas en función de parámetros conocidos por las ecuaciones 11, 1, 2, 6, 7 y 5 respectivamente:

$$(D4) \quad [FBP^{4-}] = \frac{1}{3c_3} \left(\frac{x}{2^{1/3}} - \frac{2^{1/3} (3c_1c_3 - c_2^2) x}{x^2 + y^2} - c_2 \right)$$

$$(D5) \quad [HFBP^{3-}] = \frac{[H^+][FBP^{4-}]}{k_1}$$

$$(D6) \quad [H_2FBP^{2-}] = \frac{[H^+]^2[FBP^{4-}]}{k_1k_2}$$

$$(D7) \quad [MgFBP^{2-}] = \frac{[Mg^{2+}]_T [FBP^{4-}]}{\left(1 + \frac{k_3[H^+]}{k_1k_4} \right) [FBP^{4-}] + k_3}$$

$$(D8) \quad [MgHFBP^-] = \frac{[H^+][Mg^{2+}]_T [FBP^{4-}]}{\left([H^+] + \frac{k_1k_4}{k_3} \right) [FBP^{4-}] + k_1k_4}$$

$$(D9) \quad [Mg^{2+}] = \frac{[Mg^{2+}]_T}{\left(\frac{1}{k_3} + \frac{[H^+]}{k_1k_4} \right) [FBP^{4-}] + 1}$$

Siendo necesario hallar los valores de los parámetros definidos por las ecuaciones D21 a D34 para calcular $[FBP^{4-}]$ en D4.

Referencias

Listado de las citas bibliográficas

1. Pilakis, S.J., M.R. el-Maghrabi, and T.H. Claus, *Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis*. *Annu Rev Biochem*, 1988. **57**: p. 755-83.
2. Buchanan, B.B., *Role of light in the regulation of chloroplast enzymes*. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 1980. **31**: p. 341-374.
3. Wolosiuk, R.A., M.A. Ballicora, and K. Hagelin, *The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: Enzyme modulation*. *FASEB Journal*, 1993. **7**(8): p. 622-637.
4. Buchanan, B.B., *Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development*. *Arch Biochem Biophys*, 1991. **288**(1): p. 1-9.
5. Werdan, K., H.W. Heldt, and M. Milovancev, *The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO₂ fixation in the light and dark*. *Biochim Biophys Acta*, 1975. **396**(2): p. 276-92.
6. Krause, G.H., *Light-induced movement of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectroscopic determination with Eriochrome Blue SE*. *Biochim Biophys Acta*, 1977. **460**(3): p. 500-10.
7. Portis, A.R., Jr. and H.W. Heldt, *Light-dependent changes of the Mg²⁺ concentration in the stroma in relation to the Mg²⁺ dependency of CO₂ fixation in intact chloroplasts*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **449**(3): p. 434-6.
8. Donahue, J.L., J.L. Bownas, W.G. Niehaus, and T.J. Larson, *Purification and characterization of glpX-encoded fructose 1, 6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2000. **182**(19): p. 5624-7.
9. Verhees, C.H., J. Akerboom, E. Schiltz, W.M. de Vos, and J. van der Oost, *Molecular and biochemical characterization of a distinct type of fructose-1,6-bisphosphatase from Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol*, 2002. **184**(12): p. 3401-5.
10. Rashid, N., H. Imanaka, T. Kanai, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka, *A novel candidate for the true fructose-1,6-bisphosphatase in archaea*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(34): p. 30649-55.
11. Verhees, C.H., S.W. Kengen, J.E. Tuininga, G.J. Schut, M.W. Adams, W.M. De Vos, and J. Van Der Oost, *The unique features of glycolytic pathways in Archaea*. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 2): p. 231-46.
12. Tatusov, R.L., E.V. Koonin, and D.J. Lipman, *A genomic perspective on protein families*. *Science*, 1997. **278**(5338): p. 631-7.
13. Murzin, A.G., S.E. Brenner, T. Hubbard, and C. Chothia, *SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*. *J Mol Biol*, 1995. **247**(4): p. 536-40.
14. Fujita, Y., K. Yoshida, Y. Miwa, N. Yanai, E. Nagakawa, and Y. Kasahara, *Identification and expression of the Bacillus subtilis fructose-1, 6-bisphosphatase gene (fbp)*. *J Bacteriol*, 1998. **180**(16): p. 4309-13.
15. Stec, B., H. Yang, K.A. Johnson, L. Chen, and M.F. Roberts, *MJ0109 is an enzyme that is both an inositol monophosphatase and the 'missing' archaeal fructose-1,6-bisphosphatase*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(11): p. 1046-50.

-
16. Stieglitz, K.A., K.A. Johnson, H. Yang, M.F. Roberts, B.A. Seaton, J.F. Head, and B. Stec, *Crystal structure of a dual activity IMPase/FBPase (AF2372) from Archaeoglobus fulgidus. The story of a mobile loop.* J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22863-74.
 17. Nishimasu, H., S. Fushinobu, H. Shoun, and T. Wakagi, *The first crystal structure of the novel class of fructose-1,6-bisphosphatase present in thermophilic archaea.* Structure, 2004. **12**(6): p. 949-59.
 18. Ke, H., C.M. Thorpe, B.A. Seaton, F. Marcus, and W.N. Lipscomb, *Molecular structure of fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8-Å resolution.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(5): p. 1475-9.
 19. Ke, H.M., C.M. Thorpe, B. Seaton, W.N. Lipscomb, and F. Marcus, *Structure refinement of fructose-1,6-bisphosphatase and its fructose 2,6-bisphosphate complex at 2.8 Å resolution.* J Mol Biol, 1990. **212**(3): p. 513-39.
 20. Bone, R., L. Frank, J.P. Springer, and J.R. Atack, *Structural studies of metal binding by inositol monophosphatase: evidence for two-metal ion catalysis.* Biochemistry, 1994. **33**(32): p. 9468-76.
 21. York, J.D., J.W. Ponder, Z.W. Chen, F.S. Mathews, and P.W. Majerus, *Crystal structure of inositol polyphosphate 1-phosphatase at 2.3-Å resolution.* Biochemistry, 1994. **33**(45): p. 13164-71.
 22. Albert, A., L. Yenush, M.R. Gil-Mascarell, P.L. Rodriguez, S. Patel, M. Martinez-Ripoll, T.L. Blundell, and R. Serrano, *X-ray structure of yeast Hal2p, a major target of lithium and sodium toxicity, and identification of framework interactions determining cation sensitivity.* J Mol Biol, 2000. **295**(4): p. 927-38.
 23. Lopez-Coronado, J.M., J.M. Belles, F. Lesage, R. Serrano, and P.L. Rodriguez, *A novel mammalian lithium-sensitive enzyme with a dual enzymatic activity, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate phosphatase and inositol-polyphosphate 1-phosphatase.* J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16034-9.
 24. York, J.D., J.W. Ponder, and P.W. Majerus, *Definition of a metal-dependent/Li(+)-inhibited phosphomonoesterase protein family based upon a conserved three-dimensional core structure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5149-53.
 25. Strater, N., W. Lipscomb, T. Klabunde, and B. Krebs, *Two-Metal Ion Catalysis in Enzymatic Acyl- and Phosphoryl-Transfer Reactions.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1996. **35**: p. 2025-2055.
 26. Burton, V.A., M. Chen, W.C. Ong, T. Ling, H.J. Fromm, and M.M. Stayton, *High-level expression of porcine fructose-1,6-bisphosphatase in Escherichia coli: purification and characterization of the enzyme.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192**(2): p. 511-7.
 27. Ke, H.M., Y.P. Zhang, and W.N. Lipscomb, *Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5243-7.
 28. Marcus, F., I. Edelstein, I. Reardon, and R.L. Heinrikson, *Complete amino acid sequence of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(23): p. 7161-5.
 29. Choe, J.Y., H.J. Fromm, and R.B. Honzatko, *Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: mechanism of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes.* Biochemistry, 2000. **39**(29): p. 8565-74.
-

30. Villeret, V., S. Huang, Y. Zhang, Y. Xue, and W.N. Lipscomb, *Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8 Å resolution*. *Biochemistry*, 1995. **34**(13): p. 4299-306.
31. Hulo, N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, E. De Castro, P.S. Langendijk-Genevaux, M. Pagni, and C.J. Sigrist, *The PROSITE database*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Database issue): p. D227-30.
32. Choe, J.Y., B.W. Poland, H.J. Fromm, and R.B. Honzatko, *Role of a dynamic loop in cation activation and allosteric regulation of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase*. *Biochemistry*, 1998. **37**(33): p. 11441-50.
33. Reyes, A.M., H.C. Ludwig, A.J. Yanez, P.H. Rodriguez, and J.C. Slebe, *Nativelike intermediate on the unfolding pathway of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase*. *Biochemistry*, 2003. **42**(23): p. 6956-64.
34. Zhang, Y., J.Y. Liang, S. Huang, and W.N. Lipscomb, *Toward a mechanism for the allosteric transition of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase*. *J Mol Biol*, 1994. **244**(5): p. 609-24.
35. Zhang, Y., J.Y. Liang, S. Huang, H. Ke, and W.N. Lipscomb, *Crystallographic studies of the catalytic mechanism of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase*. *Biochemistry*, 1993. **32**(7): p. 1844-57.
36. Liang, J.Y., S. Huang, Y. Zhang, H. Ke, and W.N. Lipscomb, *Crystal structure of the neutral form of fructose 1,6-bisphosphatase complexed with regulatory inhibitor fructose 2,6-bisphosphate at 2.6-Å resolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(6): p. 2404-8.
37. Xue, Y., S. Huang, J.Y. Liang, Y. Zhang, and W.N. Lipscomb, *Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 2,6-bisphosphate, AMP, and Zn²⁺ at 2.0-Å resolution: aspects of synergism between inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 12482-6.
38. Ke, H.M., J.Y. Liang, Y.P. Zhang, and W.N. Lipscomb, *Conformational transition of fructose-1,6-bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose 6-phosphate complex (R form)*. *Biochemistry*, 1991. **30**(18): p. 4412-20.
39. Erion, M.D., P.D. van Poelje, Q. Dang, S.R. Kasibhatla, S.C. Potter, M.R. Reddy, K.R. Reddy, T. Jiang, and W.N. Lipscomb, *MB06322 (CS-917): A potent and selective inhibitor of fructose 1,6-bisphosphatase for controlling gluconeogenesis in type 2 diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(22): p. 7970-5.
40. Wright, S.W., A.A. Carlo, D.E. Danley, D.L. Hageman, G.A. Karam, M.N. Mansour, L.D. McClure, J. Pandit, G.K. Schulte, J.L. Treadway, I.K. Wang, and P.H. Bauer, *3-(2-carboxyethyl)-4,6-dichloro-1H-indole-2-carboxylic acid: an allosteric inhibitor of fructose-1,6-bisphosphatase at the AMP site*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. **13**(12): p. 2055-8.
41. Lai, C., R.J. Gum, M. Daly, E.H. Fry, C. Hutchins, C. Abad-Zapatero, and T.W. von Geldern, *Benzoxazole benzenesulfonamides as allosteric inhibitors of fructose-1,6-bisphosphatase*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006. **16**(7): p. 1807-10.
42. von Geldern, T.W., C. Lai, R.J. Gum, M. Daly, C. Sun, E.H. Fry, and C. Abad-Zapatero, *Benzoxazole benzenesulfonamides are novel allosteric inhibitors of fructose-1,6-bisphosphatase with a distinct binding mode*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006. **16**(7): p. 1811-5.

-
43. Wright, S.W., A.A. Carlo, M.D. Carty, D.E. Danley, D.L. Hageman, G.A. Karam, C.B. Levy, M.N. Mansour, A.M. Mathiowetz, L.D. McClure, N.B. Nestor, R.K. McPherson, J. Pandit, L.R. Pustilnik, G.K. Schulte, W.C. Soeller, J.L. Treadway, I.K. Wang, and P.H. Bauer, *Anilinoquinazoline inhibitors of fructose 1,6-bisphosphatase bind at a novel allosteric site: synthesis, in vitro characterization, and X-ray crystallography*. J Med Chem, 2002. **45**(18): p. 3865-77.
 44. Choe, J.Y., S.W. Nelson, K.L. Arienti, F.U. Axe, T.L. Collins, T.K. Jones, R.D. Kimmich, M.J. Newman, K. Norvell, W.C. Ripka, S.J. Romano, K.M. Short, D.H. Slee, H.J. Fromm, and R.B. Honzatko, *Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by a new class of allosteric effectors*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51176-83.
 45. Nelson, S.W., C.V. Iancu, J.Y. Choe, R.B. Honzatko, and H.J. Fromm, *Tryptophan fluorescence reveals the conformational state of a dynamic loop in recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase*. Biochemistry, 2000. **39**(36): p. 11100-6.
 46. Nelson, S.W., F.T. Kurbanov, R.B. Honzatko, and H.J. Fromm, *The N-terminal segment of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase participates in the allosteric regulation of catalysis*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6119-24.
 47. Chatterjee, T., I. Reardon, R.L. Heinrikson, and F. Marcus, *Des-1-25-fructose-1,6-bisphosphatase, a nonallosteric derivative produced by trypsin treatment of the native protein*. J Biol Chem, 1985. **260**(25): p. 13553-9.
 48. Horecker, B.L., E. Melloni, and S. Pontremoli, *Fructose 1,6-bisphosphatase: properties of the neutral enzyme and its modification by proteolytic enzymes*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1975. **42**: p. 193-226.
 49. Melloni, E., S. Pontremoli, F. Salamino, B. Sparatore, M. Michetti, and B.L. Horecker, *Characterization of three rabbit liver lysosomal proteinases with fructose 1,6-bisphosphatase converting enzyme activity*. Arch Biochem Biophys, 1981. **208**(1): p. 175-83.
 50. Hines, J.K., H.J. Fromm, and R.B. Honzatko, *Novel allosteric activation site in Escherichia coli fructose-1,6-bisphosphatase*. J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18386-93.
 51. Babul, J. and V. Guixe, *Fructose bisphosphatase from Escherichia coli. Purification and characterization*. Arch Biochem Biophys, 1983. **225**(2): p. 944-9.
 52. Iancu, C.V., S. Mukund, H.J. Fromm, and R.B. Honzatko, *R-state AMP complex reveals initial steps of the quaternary transition of fructose-1,6-bisphosphatase*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19737-45.
 53. Choe, J.Y., C.V. Iancu, H.J. Fromm, and R.B. Honzatko, *Metaphosphate in the active site of fructose-1,6-bisphosphatase*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 16015-20.
 54. Choe, J.Y., S.W. Nelson, H.J. Fromm, and R.B. Honzatko, *Interaction of Tl⁺ with product complexes of fructose-1,6-bisphosphatase*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 16008-14.
 55. Chiadmi, M., A. Navaza, M. Miginiac-Maslow, J.P. Jacquot, and J. Cherfils, *Redox signalling in the chloroplast: structure of oxidized pea fructose-1,6-bisphosphate phosphatase*. Embo J, 1999. **18**(23): p. 6809-15.
 56. Zimmermann, G., G.J. Kelly, and E. Latzko, *Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase*. Eur J Biochem, 1976. **70**(2): p. 361-7.

57. Rodriguez-Suarez, R.J. and R.A. Wolosiuk, *High level expression in Escherichia coli, purification and properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed (Brassica napus) leaves*. Photosynthesis Research, 1995. **46**(1-2): p. 313-322.
58. Ballicora, M.A. and R.A. Wolosiuk, *Effect of alkaline pH on the activity and the structure of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase*. Plant Sci, 1990. **70**: p. 35-41.
59. Buc, J., J. Pradel, J.C. Meunier, J.M. Soulie, and J. Ricard, *The pH-Induced dissociation of fructose-1,6-bisphosphatase of spinach chloroplasts*. FEBS Lett, 1980. **113**(2): p. 285-288.
60. Marcus, F., L. Moberly, and S.P. Latshaw, *Comparative amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphatases: identification of a region unique to the light-regulated chloroplast enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5379-83.
61. Jacquot, J.P., J. Lopez-Jaramillo, M. Miginiac-Maslow, S. Lemaire, J. Cherfils, A. Chueca, and J. Lopez-Gorge, *Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase*. FEBS Lett, 1997. **401**(2-3): p. 143-7.
62. Rodriguez-Suarez, R.J., S. Mora-Garcia, and R.A. Wolosiuk, *Characterization of cysteine residues involved in the reductive activation and the structural stability of rapeseed (Brassica napus) chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **232**(2): p. 388-93.
63. Tao, H. and V.W. Cornish, *Milestones in directed enzyme evolution*. Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(6): p. 858-64.
64. Voigt, C.A., S. Kauffman, and Z.G. Wang, *Rational evolutionary design: the theory of in vitro protein evolution*. Adv Protein Chem, 2000. **55**: p. 79-160.
65. Borges, J.L., *La biblioteca de Babel (El jardín de senderos que se bifurcan (1941; Ficciones, 1944))*.
66. Sagan, C., *Cosmos. Capítulo Primero (En la orilla del océano cósmico)*: Editorial Planeta.
67. Arrillaga, I., R. Gil-Mascarell, C. Gisbert, E. Sales, C. Montesinos, R. Serrano, and V. Moreno, *Expression of the yeast HAL2 gene in tomato increases the in vitro salt tolerance of transgenic progenies*. Plant Science, 1998. **136**(2): p. 219-226.
68. Bartfai, T., *Preparation of metal-chelate complexes and the design of steady-state kinetic experiments involving metal nucleotide complexes*. Adv Cyclic Nucleotide Res, 1979. **10**: p. 219-42.
69. Storer, A.C. and A. Cornish-Bowden, *Concentration of MgATP²⁻ and other ions in solution. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions*. Biochem J, 1976. **159**(1): p. 1-5.
70. Nelson, S.W., R.B. Honzatko, and H.J. Fromm, *Origin of cooperativity in the activation of fructose-1,6-bisphosphatase by Mg²⁺*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18481-7.
71. Miao, J., K.O. Hodgson, T. Ishikawa, C.A. Larabell, M.A. LeGros, and Y. Nishino, *Imaging whole Escherichia coli bacteria by using single-particle x-ray diffraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 110-2.
72. Guzman, L.M., D. Belin, M.J. Carson, and J. Beckwith, *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4121-30.
73. P.S. Chen, T.Y.T., H. Warner, *Microdetermination of phosphorus*. Anal. Chem, 1956. **28**: p. 1756-1758.

-
74. Wen, J., S.W. Nelson, R.B. Honzatko, H.J. Fromm, and J.W. Petrich, *Environment of tryptophan 57 in porcine fructose-1,6-bisphosphatase studied by time-resolved fluorescence and site-directed mutagenesis*. Photochem Photobiol, 2001. **74**(5): p. 679-85.
 75. Cabib, E. and A. Duran, *Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at nonpermissive temperatures*. J Bacteriol, 1975. **124**(3): p. 1604-6.
 76. Chaffin, D.O. and C.E. Rubens, *Blue/white screening of recombinant plasmids in Gram-positive bacteria by interruption of alkaline phosphatase gene (phoZ) expression*. Gene, 1998. **219**(1-2): p. 91-9.
 77. Riccio, M.L., G.M. Rossolini, G. Lombardi, A. Chiesurin, and G. Satta, *Expression cloning of different bacterial phosphatase-encoding genes by histochemical screening of genomic libraries onto an indicator medium containing phenolphthalein diphosphate and methyl green*. J Appl Microbiol, 1997. **82**(2): p. 177-85.
 78. van Ommen Kloeke, F., A.M. Baty, 3rd, C.C. Eastburn, Z. Diwu, and G.G. Geesey, *Novel method for screening bacterial colonies for phosphatase activity*. J Microbiol Methods, 1999. **38**(1-2): p. 25-31.
 79. Copeland, W.C., N.K. Lam, and T.S. Wang, *Fidelity studies of the human DNA polymerase alpha. The most conserved region among alpha-like DNA polymerases is responsible for metal-induced infidelity in DNA synthesis*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11041-9.
 80. Neylon, C., *Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(4): p. 1448-59.
 81. Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J.A. Affholter, and F.H. Arnold, *Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(3): p. 258-61.
 82. Patel, S., M. Martinez-Ripoll, T.L. Blundell, and A. Albert, *Structural enzymology of Li(+)-sensitive/Mg(2+)-dependent phosphatases*. J Mol Biol, 2002. **320**(5): p. 1087-94.
 83. Patel, S., L. Yenush, P.L. Rodriguez, R. Serrano, and T.L. Blundell, *Crystal structure of an enzyme displaying both inositol-polyphosphate-1-phosphatase and 3'-phosphoadenosine-5'-phosphate phosphatase activities: a novel target of lithium therapy*. J Mol Biol, 2002. **315**(4): p. 677-85.
 84. Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3381-5.
 85. Hol, W.G., P.T. van Duijnen, and H.J. Berendsen, *The alpha-helix dipole and the properties of proteins*. Nature, 1978. **273**(5662): p. 443-6.
 86. Hol, W.G., *The role of the alpha-helix dipole in protein function and structure*. Prog Biophys Mol Biol, 1985. **45**(3): p. 149-95.
 87. Sengupta, D., R.N. Behera, J.C. Smith, and G.M. Ullmann, *The alpha helix dipole: screened out?* Structure, 2005. **13**(6): p. 849-55.
 88. Lodi, P.J. and J.R. Knowles, *Direct evidence for the exploitation of an alpha-helix in the catalytic mechanism of triosephosphate isomerase*. Biochemistry, 1993. **32**(16): p. 4338-43.
 89. Sancho, J., L. Serrano, and A.R. Fersht, *Histidine residues at the N- and C-termini of alpha-helices: perturbed pKas and protein stability*. Biochemistry, 1992. **31**(8): p. 2253-8.
-

90. Sali, D., M. Bycroft, and A.R. Fersht, *Stabilization of protein structure by interaction of alpha-helix dipole with a charged side chain*. Nature, 1988. **335**(6192): p. 740-3.
91. Joshi, H.V. and M.S. Meier, *The effect of a peptide helix macrodipole on the pK(a) of an Asp side chain carboxylate*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(48): p. 12038-12044.
92. Sarker, K.D. and J.K. Hardman, *Affinities of phosphorylated substrates for the E. coli tryptophan synthase alpha-subunit: roles of Ser-235 and helix-8' dipole*. Proteins, 1995. **21**(2): p. 130-9.
93. Goldberg, J., *Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching*. Cell, 1998. **95**(2): p. 237-48.
94. Carter, C.W. and S.M. Hecht(editor), *Protein Structure (Chapter 5)*. Bioorganic Chemistry. Peptides and proteins., 1998: p. 172.
95. Johnson, K.A., L. Chen, H. Yang, M.F. Roberts, and B. Stec, *Crystal structure and catalytic mechanism of the MJ0109 gene product: a bifunctional enzyme with inositol monophosphatase and fructose 1,6-bisphosphatase activities*. Biochemistry, 2001. **40**(3): p. 618-30.
96. Gore, M.G., P. Greasley, G. McAllister, and C.I. Ragan, *Mammalian inositol monophosphatase: the identification of residues important for the binding of Mg²⁺ and Li⁺ ions using fluorescence spectroscopy and site-directed mutagenesis*. Biochem J, 1993. **296** (Pt 3): p. 811-5.
97. Rees-Milton, K., M. Thorne, P. Greasley, J. Churchich, and M.G. Gore, *Detection of metal binding to bovine inositol monophosphatase by changes in the near and far ultraviolet regions of the CD spectrum*. Eur J Biochem, 1997. **246**(1): p. 211-7.
98. Schurmann, P. and R.A. Wolosiuk, *Studies on the regulatory properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase*. Biochim Biophys Acta, 1978. **522**(1): p. 130-8.
99. Allison, J.H. and M.A. Stewart, *Reduced brain inositol in lithium-treated rats*. Nat New Biol, 1971. **233**(43): p. 267-8.
100. Berridge, M.J., C.P. Downes, and M.R. Hanley, *Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands*. Biochem J, 1982. **206**(3): p. 587-95.
101. Vadnal, R. and R. Parthasarathy, *Myo-inositol monophosphatase: diverse effects of lithium, carbamazepine, and valproate*. Neuropsychopharmacology, 1995. **12**(4): p. 277-85.
102. Murguia, J.R., J.M. Belles, and R. Serrano, *The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29029-33.
103. Glaser, H.U., D. Thomas, R. Gaxiola, F. Montrichard, Y. Surdin-Kerjan, and R. Serrano, *Salt tolerance and methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae involve a putative phosphatase gene*. Embo J, 1993. **12**(8): p. 3105-10.
104. Villeret, V., S. Huang, H.J. Fromm, and W.N. Lipscomb, *Crystallographic evidence for the action of potassium, thallium, and lithium ions on fructose-1,6-bisphosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8916-20.
105. Tanner, K.G., R.C. Trievel, M.H. Kuo, R.M. Howard, S.L. Berger, C.D. Allis, R. Marmorstein, and J.M. Denu, *Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18157-60.
106. Fang, T.Y. and C. Ford, *Protein engineering of Aspergillus awamori glucoamylase to increase its pH optimum*. Protein Eng, 1998. **11**(5): p. 383-8.

-
107. Siddiqui, K.S., T. Loviny-Anderton, M. Rangarajan, and B.S. Hartley, *Arthrobacter D-xylose isomerase: chemical modification of carboxy groups and protein engineering of pH optimum*. Biochem J, 1993. **296 (Pt 3)**: p. 685-91.
 108. Loewenthal, R., J. Sancho, T. Reinikainen, and A.R. Fersht, *Long-range surface charge-charge interactions in proteins. Comparison of experimental results with calculations from a theoretical method*. J Mol Biol, 1993. **232(2)**: p. 574-83.
 109. Mantafounis, D. and J. Pitts, *Protein engineering of chymosin; modification of the optimum pH of enzyme catalysis*. Protein Eng, 1990. **3(7)**: p. 605-9.
 110. Tomschy, A., R. Brugger, M. Lehmann, A. Svendsen, K. Vogel, D. Kostrewa, S.F. Lassen, D. Burger, A. Kronenberger, A.P. van Loon, L. Pasamontes, and M. Wyss, *Engineering of phytase for improved activity at low pH*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68(4)**: p. 1907-13.
 111. Kim, T., E.J. Mullaney, J.M. Porres, K.R. Roneker, S. Crowe, S. Rice, T. Ko, A.H. Ullah, C.B. Daly, R. Welch, and X.G. Lei, *Shifting the pH profile of Aspergillus niger PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72(6)**: p. 4397-403.
 112. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
 113. Coligan, J.E., B.M. Dunn, D.W. Speicher, and P.T. Wingfield, *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc, 2006.
 114. Ausubel, F.M., R. Brent, and R.E. Kingston, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, 2006.
 115. Rodriguez-Suarez, R.J. and R.A. Wolosiuk, *Sequence of a cDNA encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed*. Plant Physiol, 1993. **103(4)**: p. 1453-4.
 116. Sarkar, G. and S.S. Sommer, *The 'megaprimer' method of site-directed mutagenesis*. BioTechniques, 1990. **8(4)**: p. 404-407.
 117. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193(1)**: p. 265-75.
 118. Huang, X. and W. Miller, *A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm*. Advances in Applied Mathematics, 1991. **12**: p. 337-357.
 119. Weeks, C.M., A.W. Roszak, M. Erman, R. Kaiser, H. Jornvall, and D. Ghosh, *Structure of rabbit liver fructose 1,6-bisphosphatase at 2.3 Å resolution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999. **55(Pt 1)**: p. 93-102.
 120. Lu, G., B. Stec, E.L. Giroux, and E.R. Kantrowitz, *Evidence for an active T-state pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase: interface residue Lys-42 is important for allosteric inhibition and AMP cooperativity*. Protein Sci, 1996. **5(11)**: p. 2333-42.
 121. Stec, B., R. Abraham, E. Giroux, and E.R. Kantrowitz, *Crystal structures of the active site mutant (Arg-243-->Ala) in the T and R allosteric states of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase expressed in Escherichia coli*. Protein Sci, 1996. **5(8)**: p. 1541-53.
 122. Villeret, V., S. Huang, Y. Zhang, and W.N. Lipscomb, *Structural aspects of the allosteric inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by AMP: the binding of both the substrate analogue 2,5-anhydro-D-glucitol 1,6-bisphosphate and catalytic metal ions monitored by X-ray crystallography*. Biochemistry, 1995. **34(13)**: p. 4307-15.
 123. Gidh-Jain, M., Y. Zhang, P.D. van Poelje, J.Y. Liang, S. Huang, J. Kim, J.T. Elliott, M.D. Erion, S.J. Pilkis, and M. Raafat el-Maghrabi, *The allosteric site of human liver fructose-1,6-bisphosphatase. Analysis of six AMP site mutants based on the crystal structure*. J Biol Chem, 1994. **269(44)**: p. 27732-8.
-

-
124. Ke, H.M., Y.P. Zhang, J.Y. Liang, and W.N. Lipscomb, *Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the product fructose 6-phosphate at 2.1-Å resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 2989-93.
 125. Boiteux, A., M. Markus, T. Plesser, B. Hess, and M. Malcovati, *Analysis of progress curves. Interaction of pyruvate kinase from Escherichia coli with fructose 1,6-bisphosphate and calcium ions*. Biochem J, 1983. **211**(3): p. 631-40.
 126. McGilvery, R.W., *Fructose 1,6-Diphosphate. Acidic Dissociation Constants, Chelation with Magnesium, and Optical Rotatory Dispersion*. Biochemistry, 1965. **4**: p. 1924-1930.