



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Química Biológica

**Caracterización biofísicoquímica de
proteínas quinasas de
*Mycobacterium tuberculosis***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Marisol N. Cabrera

Director de tesis: Dr. Adrián Turjanski

Director asistente: Dr. Sebastián Suárez

Consejero de estudios: Dr. Julio Caramelo

Buenos Aires, Abril 2019

Caracterización biofísicoquímica de proteínas quinasas de *Mycobacterium tuberculosis*

Resumen

La tuberculosis (TB) es un problema de salud a nivel mundial. Un millón y medio de personas al año mueren por esta enfermedad, siendo la primera causa de muerte entre los infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). El microorganismo causante de la enfermedad, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*), es una bacteria de crecimiento lento que vive dentro de los macrófagos del hospedador, en donde puede residir por años sin producir síntomas, en un estado que se conoce como de latencia. Dentro del macrófago la mycobacteria se encuentra sometida a una serie de condiciones de estrés como hipoxia, falta de nutrientes y presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON). *Mtb* posee varias estrategias que le permiten sobrevivir en dicho ambiente tan adverso.

Las Ser/Thr quinasas son proteínas que han mostrado ser centrales para el control de diversos procesos celulares en una gran variedad de organismos. Es por ello que son reconocidas como importantes blancos farmacológicos para el tratamiento de diversas patologías, y más recientemente, para combatir enfermedades infecciosas como la tuberculosis. Las quinasas tienen un rol central en la cadena de transducción de señales y es por esto que su actividad está altamente regulada. Debido a la versatilidad del dominio quinasa, hay proteínas que han evolucionado mecanismos particulares para regular su actividad, como es el caso de la PknG de *Mtb*. PknG es una quinasa particular, ya que por un lado carece de *loop* de activación, y por otro tiene un dominio Rubredoxina (Rbx), un dominio pequeño con un centro metálico coordinado por 4 cisteínas, con interacción directa con el dominio quinasa. Se ha demostrado que PknG posee un rol clave tanto en la patogenia como en la regulación del ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) y síntesis del glutamato. Se ha propuesto que esta regulación sería importante en el estado de latencia *Mtb*; de este modo, PknG estaría generando cambios metabólicos que permiten que el bacilo sobreviva dentro de los macrófagos. El mecanismo propuesto

es que las ERON producidas dentro del macrófago serían “*sensadas*” por el dominio Rbx que a su vez funcionaría como un regulador de la actividad quinasa de PknG. Sin embargo esto no ha sido demostrado.

El presente trabajo de tesis tiene como principal objetivo comprender los mecanismos de regulación (activación/inhibición) de la actividad quinasa de la serin treonin quinasa G (PknG) de *Mtb*, y se encuentra dividido en tres partes.

Se sabe que esta quinasa regula al ciclo TCA y la síntesis de glutamato mediante la fosforilación de GarA. GarA es una proteína pequeña que posee como elemento de regulación dos treoninas susceptibles de ser fosforiladas: la Thr 21 y la Thr 22. Cuando GarA se encuentra sin fosforilar, interactúa e inhibe a las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH) y α -cetoglutarato descarboxilasa (KGD), y se une y activa la glutamina oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT). KGD es una proteína central en el TCA, mientras que las otras dos regulan la síntesis del glutamato. PknG fosforila a GarA en el residuo 21, mientras que PknB, otra quinasa de *Mtb*, la fosforila en el residuo 22. Ambos eventos son específicos y excluyentes, y hasta el momento no se conoce el motivo de su especificidad, el cual fue estudiado a nivel atómico en la primera sección de esta tesis, mediante simulaciones computacionales y ensayos de actividad *in vitro* utilizando péptidos derivados de GarA.

En la segunda parte, se realizó una caracterización fisicoquímica de PknG *in vitro*, para lo cual se caracterizó el centro metálico por técnicas de absorción y emisión molecular. Estos resultados han permitido determinar la presencia de Zn, Cd y Fe en el centro de Rbx. Posteriormente, se analizó la relevancia del metal unido en la actividad quinasa. Sumamente importante, en el caso de la proteína que posee hierro (el estado propuesto en *Mtb*), se analizó el efecto del estado de oxidación sobre la actividad de la misma. Para ello se hicieron estudios por técnicas espectroscópicas UV-VIS y Raman Resonante. Nuevamente se correlacionaron los resultados con las actividades medidas, observándose que el estado de oxidación (II) presenta la mayor actividad (similar a cuando posee Cd y Zn).

En la tercera parte, se analizó la actividad de PknG en presencia de ERON, en particular NO, HNO/NO⁻ y H₂O₂. En estos caso pudimos observar que el poder de modular el estado de oxidación del hierro varía según la capacidad

reductora/oxidante de las especies reactivas, y que el estado de oxidación del metal regula la actividad de PknG.

Nuestros resultados en su conjunto permiten comprender que PknG es una proteína constitutivamente activa, que posee un sitio hidrofóbico de reconocimiento a sustrato bien diferente de PknB y cuya actividad quinasa es regulada por el estado de oxidación del centro metálico del dominio Rbx. Finalmente, pudimos determinar que la óxido/reducción puede ser mediada por ERON de interés fisiológico

Biophysical chemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* protein kinases

Abstract

Tuberculosis (TB) remains a worldwide issue, 1.5 million people die from TB each year being the first cause of death among HIV infected people. The microorganism responsible for TB, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*), is a slow growing bacteria which lives inside host's macrophages where it can stay for years without causing symptoms to the host, in a state known as latency. Inside the macrophage, mycobacteria is exposed to a series of stressful conditions such as hypoxia, starvation or the presence of reactive oxygen and nitrogen species (RNOS). *Mtb.* has several strategies that allow him to survive in such an adverse environment.

It has been shown that Ser/Thr kinases play a central role in the control of diverse cellular processes in a wide variety of organisms. That is why they are recognized as important pharmacological targets for the treatment of various pathologies, and more recently, to combat infectious diseases such as TB. Protein kinases have a central role in the signal transduction chain and this is why their activity is highly regulated. Due to the versatility of the kinase domain, there are proteins that have evolved particular mechanisms to regulate their activity, as is the case of the PknG *Mtb* protein. PknG is a particular kinase, since on the one hand it lacks an activation loop, and on the other it has a Rubredoxin domain (Rbx), a small domain with a metallic center coordinated by 4 cysteines, with direct interaction with the kinase domain. It has been shown that PknG has a key role both in the pathogenesis and in the regulation of the tricarboxylic acid cycle (TCA) and glutamate synthesis. It has been proposed that this regulation could be important in the *Mtb.* latency state, so PknG would be generating metabolic changes that allow the bacillus to survive inside the macrophages. The proposed mechanism is that the RNOS produced within the macrophage would be "sensed" by the Rbx domain which in turn would function as a regulator of the PknG kinase activity. However this has not been demonstrated.

The main objective of this thesis is to understand the regulatory mechanisms (activation/inhibition) of the kinase activity of the serine threonine kinase G from *Mtb*. It is divided into three parts.

It is known that this kinase regulates the TCA cycle and the synthesis of glutamate by the phosphorylation of GarA. GarA is a small protein that has as regulatory elements two phosphorylatable threonines: Thr 21 and Thr 22. When GarA is unphosphorylated, it interacts and inhibits the enzymes glutamate dehydrogenase (GDH) and α -ketoglutarate decarboxylase (KGD), and activates glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT). KGD is a central TCA protein, while the other two regulate glutamate synthesis. PknG phosphorylates GarA at residue 21, while PknB, another kinase from *Mtb*, phosphorylates residue 22. Both events are specific and exclusive, and the reason for their specificity is unknown. In the first section of this thesis, through computational simulations and *in vitro* activity tests using GarA-derived peptides, we studied at the atomic level the reason for that specificity.

In the second part, an *in vitro* physicochemical characterization of PknG was carried out. In this study we characterized the metal center by absorption and molecular emission techniques. These results have allowed us to determine the presence of Zn, Cd and Fe in the center of Rbx. Subsequently, the relevance of the bound metal in the kinase activity was analyzed. Extremely important, in the case of the protein that has iron (the state proposed in *Mtb*), we analyzed the effect of the oxidation state on the activity of the kinase. For this, we used UV-VIS and Resonant Raman spectroscopic techniques. Again, the results were correlated with the measured activities, observing that the oxidation state (II) has the highest activity (similar to the observed in the case of Zn or Cd).

In the third part, the activity of PknG was analyzed in the presence of RNOS, in particular NO, HNO/NO⁻ and H₂O₂. In these cases we observed that the power to modulate the oxidation state of iron varies according to the reducing/oxidant capacity of the reactive species, and that the oxidation state of the metal regulates the activity of PknG.

Together, this data allow us to understand that PknG is a constitutively active protein, which has an hydrophobic substrate recognition site and whose kinase

activity is regulated by the oxidation state of the metallic center of the Rbx domain. Finally, we were able to determine that the oxidation/reduction can be mediated by RNOS of physiological interest.

Agradecimientos

Qué difícil resulta resumir en pocos párrafos lo agradecida que estoy por toda la gente linda que tuve la suerte de cruzarme en años de doctorado. Quizás olvide a alguna persona que haya contribuido directa o indirectamente desde el punto científico y/o humano. Sepan disculpar :)

A mis directores, Adrián T. y Seba S. Gracias Adri por brindarme la posibilidad de hacer un doctorado cuando te caí del cielo a días de que cierre inscripción de la beca. Gracias Seba por tu contagioso optimismo que llena de ganas de trabajar.

A Lucas D; Luquitas, podría hacer un capítulo extra con todas las cosas que tengo para agradecerte. Pero voy a ser breve: gracias por estar siempre al pie del cañón. Aprendí mucho con vos.

A Elías L, Hernán B y Martín D, quienes me enseñaron muchísimas cosas, especialmente en los primeros años de doctorado. Gracias por su tiempo y paciencia.

A Ari A, un amigo de la vida con quien tuve la suerte de compartir el espacio de trabajo. Gracias por hacerme reír tanto, y por obligarme a respirar hondo en los momentos que lo requerían.

A los Nefastos, por todo lo compartido, especialmente a Noe, Migue y Titi, que han sido grandes sostenes y compañeros de aventuras.

A todos mis compañerxs de QB5, QB6, QB10, QB65, QB9 y de QBs cuyo número no recuerdo. Gracias por todo. Gracias por los mates, por los almuerzos compartidos, por los chistes, por los consejos, por escucharme, por sacarme los cultivos de la estufa, y por un montón de cosas más.

A lxs chicxs de Bedelía, sobre todo a Eva que me ha salvado las papas varias veces.

A mis padres, Silvana y Jorge. Gracias por apoyarme incondicionalmente, y por intentar sacarme una sonrisa siempre (“dividí por dos”).

A mis hermanos, Lautá, Nan y Ari. La vida es más bonita y más fácil junto a uds, locos lindos.

Abreviaturas

ATP: adenosín trifosfato

CD: dicroísmo circular

DM: dinámica molecular

DOPE: *Discrete Optimized Protein Energy*

FHA: *forkhead associated domain*

GDH: glutamato deshidrogenasa

GltS: glutamato sintasa (GltS, también conocida como GOGAT)

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

HNO: nitroxilo

HEPES: 2-[(ácido 4- (2-hidroxietyl) -1-piperazineetanosulfónico

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

KD: dominio quinasa

KDH: α -cetoglutarato deshidrogenasa

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

M9: medio mínimo de cultivo

Mtb.: *Mycobacterium tuberculosis*

NO: óxido nítrico

OD: densidad óptica

P: sitio de fosforilación

PASTA: *penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated*

PDB: protein data bank

PHK: fosforilasa quinasa

PKA: proteína quinasa A

pET28a: vector de expresión

PKI: péptido inhibidor de la quinasa A

PknG: proteína quinasa G

PknG-Cd: PknG expresada en medio mínimo suplementado con Cd

PknG-Fe: PknG expresada en medio mínimo suplementado con Fe

PknG-Zn: PknG expresada en medio mínimo suplementado con Zn

PknG-MR: PknG expresada en medio rico

ppb: partes por billón

ppm: partes por millón

pThr: treonina fosforilada

Rbx: dominio rubredoxina

RMSD: *Root Mean Square Deviation*

RMSF: *Root Mean Square Fluctuation*

SDS: dodecil sulfato sódico

STPKs: Ser/Thr quinasas

TB: tuberculosis

TCA: ácidos tricarbónicos

TPR: tritricopéptidos

TRIS: trisaminometano

Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	5
Agradecimientos.....	8
Abreviaturas.....	9
Capítulo 1: Introducción	16
1.1. Tuberculosis.....	16
1.2. Tratamiento actual.....	18
1.3. Metabolismo de <i>Mtb.</i> en el ambiente intracelular de macrófagos.....	19
1.4. Sistemas de transducción de señales en bacterias.....	21
1.5. Proteínas quinasas.....	22
1.5.1. Estructura de las quinasas.....	23
1.5.2. Mecanismos de activación de las proteínas quinasas.....	26
1.5.2.1. Activación por proteínas accesorias u otros dominios.....	26
1.6. La familia de serin/treonin quinasas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
1.7. PknG.....	29
1.7.1. Estructura y regulación de PknG.....	30
1.7.2. El rol de PknG en <i>Mtb.</i>	32
1.7.2.1. Regulación del ciclo de ácidos tricarbónicos y síntesis del glutamato.....	32
1.7.2.2. PknG y la homeostasis redox.....	36
1.7.2.3. Otras funciones de PknG.....	37
1.8. Bibliografía.....	39
Capítulo 2: Materiales y métodos	49
2.1. Métodos computacionales.....	49
2.1.1. Dinámica molecular.....	49
2.1.1.1. Campos de fuerza clásicos.....	49
2.1.1.2. Radio de Corte.....	52
2.1.1.3. Condiciones periódicas.....	52
2.1.1.4. Modelo de Agua Explícita.....	52
2.1.1.5. Integración de la Dinámica Molecular.....	53
2.1.1.6. Termostato y barostato.....	53
2.1.1.7. RMSD.....	54

2.1.2. Modelado por homología o comparativo.....	54
2.1.3. Campo de fuerza FoldX.....	56
2.2. Métodos experimentales.....	57
2.2.1. Clonado.....	57
2.2.2. Expresión de GarA.....	60
2.2.3. Expresión de PknG.....	61
2.2.4. Purificación.....	61
2.2.5. Electroforesis en gel de acrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	62
2.2.6. Cambio de buffer con columna desalado.....	63
2.2.7. Espectroscopía.....	63
2.2.7.1. Espectroscopia UV-VIS.....	63
2.2.7.2. Determinación y cuantificación de Fe y Zn por espectroscopia de absorción atómica.....	64
2.2.7.3. Espectroscopia Raman resonante.....	66
2.2.7.4. Espectroscopía de fluorescencia de triptófanos.....	68
2.2.7.5. Espectrometría de masa (MS).....	69
2.2.8. Síntesis y solubilización de péptidos.....	71
2.2.9 Ensayos de actividad quinasa <i>in vitro</i>	71
2.2.9.1 Kinase-Glo.....	71
2.2.9.2. SDS-PAGE.....	73
2.2.9.3. ATP radiactivo.....	74
2.2.10. Cuantificación de tioles libres.....	74
2.2.11. Reducción/oxidación de PknG.....	75
2.2.12. Determinación colorimétrica y cuantificación de hierro (II) y/o (III).....	76
2.2.13. Dicroísmo circular.....	76
2.3. Bibliografía.....	78
Capítulo 3: Especificidad de PknG y PknB.....	82
3.1. Introducción.....	82
3.1.1. GarA como sustrato de PknG y PknB.....	82
3.2. Resultados.....	83
3.2.1. Análisis de interacciones PknB-GarA y PknG-GarA.....	83
3.2.1.1. Construcción del modelo inicial de PknB.....	84
3.2.1.2. Dinámica molecular clásica de PknB con GarA.....	85
3.2.1.2.1. Estabilidad del sistema.....	85

3.2.1.2.2. El bolsillo RD de PknB	87
3.2.1.3. Bases moleculares de reconocimiento de GarA por PknB	89
3.2.1.4. Construcción del modelo inicial de PknG	91
3.2.1.5. Dinámica molecular clásica de PknG con GarA	92
3.2.1.5.1. Estabilidad del sistema.....	93
3.2.1.5.2. Bases moleculares de reconocimiento de GarA por PknG	96
3.2.2. Comparación con otros sustratos de PknG	98
3.2.3. Desempeño del campo de fuerzas FoldX sobre mutantes puntuales.....	99
3.2.4. Determinación de actividad quinasa de PknG sobre péptido WT y péptido mutante.....	100
3.2.4.1. Purificación de PknG y GarA.....	101
3.2.4.2. Análisis de la integridad estructural	102
3.2.4.3. Actividad quinasa de PknG sobre GarA	103
3.2.4.3.1. SDS-PAGE.....	103
3.2.4.3.2 Kinase Glo.....	106
3.2.4.4. Actividad de PknG sobre péptido <i>wild type</i> y mutante.....	107
3.2.4.5. Análisis de la actividad de PknG sobre péptido WT y mutante por espectrometría de masa.....	108
3.3. Conclusiones	112
3.4. Información suplementaria.....	116
3.5. Materiales y métodos.....	118
3.5.1. Mutagénesis <i>in silico</i> utilizando el software FoldX.....	118
3.5.2. Puesta a punto de purificación de PknG.....	118
3.6. Bibliografía.....	119
Capítulo 4: Caracterización fisicoquímica de PknG	126
4.1. Introducción	126
4.1.1. Proteínas Fe–S.....	126
4.1.2. Dominio Rubredoxina	127
4.1.3. El dominio Rbx de PknG de <i>Mtb</i>	128
4.2. Resultados.....	129
4.2.1. Análisis del metal coordinado al dominio Rubredoxina.....	129
4.2.1. Actividad comparada de PknG-MR/Fe/Zn	130
4.2.3. Estado de oxidación del Fe del dominio Rbx de PknG-Fe.....	131
4.2.4. Regulación redox de la actividad quinasa de PknG-Fe	133

4.2.5. Recuperación de actividad quinasa de PknG mediante reducción	133
4.2.6. Contenido de sulfhidrilos de PknG-MR	134
4.2.7. Espectrometría UV-VIS y Raman resonante	136
4.2.8. UV-VIS.....	136
4.2.9. Espectroscopía de Raman resonante (RR)	139
4.2.10. Espectrometría de fluorescencia de triptófanos.....	141
4.3. Conclusiones	143
4.4. Materiales y métodos	147
4.4.1. Absorción atómica	147
4.4.2. Ensayos de actividad quinasa, Kinase Glo	148
4.4.3. Ensayos colorimétricos	149
4.4.4. Ensayos de actividad regulación redox	151
4.4.5. Cuantificación de tioles libres	152
4.4.6. Espectrometría UV-VIS.....	152
4.4.7. Espectrometría Raman resonante	152
4.4.8. Espectroscopía de fluorescencia de triptófanos	153
4.5. Bibliografía	154
Capítulo 5: Efecto del NO y del HNO sobre la actividad de PknG.....	159
5.1. Introducción	159
5.1.1 .Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	159
5.1.1.1. Superóxido y peróxido de hidrógeno	159
5.1.1.2. Óxido nítrico	160
5.1.1.3. Nitroxilo	162
5.1.1.4. Peroxinitrito	163
5.1.2. ERON y <i>Mtb</i>	164
5.2. Resultados	166
5.3. Conclusiones	174
5.4. Materiales y métodos.....	177
5.4.1. Síntesis de NO.....	177
5.4.2. Síntesis de de sal de Angeli.....	177
5.4.2.1. Síntesis de hidroxilamina Nitrato de metilo.....	177
5.4.2.2 Procedimiento experimental	177
5.4.3. Ensayos de actividad quinasa, Kinase Glo.....	178

5.4.4. Ensayos espectrometría Raman Resonante	178
5.4.5. ATP radiactivo	178
5.6. Bibliografía	180
Capítulo 6: Conclusiones generales y perspectivas	188
6.1. Conclusiones generales.....	188
6.2. Perspectivas	190
6.3. Bibliografía	193

Capítulo 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*), una pequeña bacteria que posee unos 5000 genes y cuyo genoma ya ha sido secuenciado (S. T. Cole et al. 1998a; Stewart T. Cole 1999). Por lo general, afecta los pulmones (TB pulmonar), pero también puede afectar otros sitios (TB extrapulmonar). La enfermedad se propaga cuando las personas que están enfermas con tuberculosis pulmonar expulsan las bacterias al aire, por ejemplo al toser. Una proporción relativamente pequeña (5-10%) de las 1.7 mil millones de personas estimadas infectadas con *Mtb.* desarrollará la enfermedad durante su vida (Figura 1.1). Sin embargo, la probabilidad de desarrollar TB es mucho mayor entre las personas infectadas con HIV, así como entre las personas afectadas por factores de riesgo tales como desnutrición, diabetes, el hábito de fumar y el consumo de alcohol. En general, alrededor del 90% de los casos ocurre en adultos, con más casos entre hombres que mujeres. La relación hombre: mujer en los adultos es de aproximadamente 2: 1 (“WHO | Global Tuberculosis Report 2018” 2018).

La TB es la novena causa de muerte a nivel mundial y la primera por enfermedades infecciosas, causante de alrededor de 1.6 millones de muertes anuales (Figura 1.2) (“WHO | Global Tuberculosis Report 2018” 2018). En la República Argentina, si bien se considera que la enfermedad tiene una carga moderada, la TB continúa siendo un problema de salud pública. En el 2016 se notificaron 11.560 casos y 757 muertes. Asimismo la tasa de notificación de casos de TB aumentó nuevamente con respecto a 2015: de 24,9 a 26,5 por 100.000 habitantes, con importantes diferencias entre jurisdicciones. Esto determinó cuatro años consecutivos de aumento sostenido de la enfermedad, a lo que se suma un incremento de casos de TB en grupos jóvenes (Boletín sobre tuberculosis en Argentina 2018).

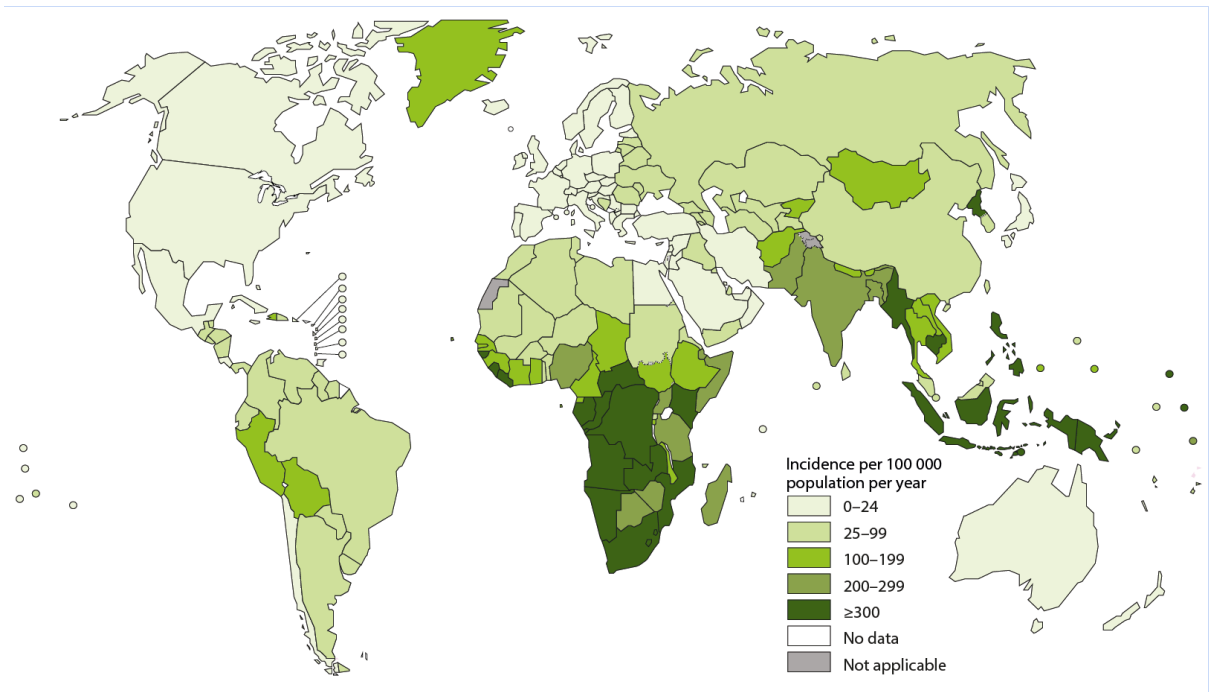


Figura 1.1. Tasas de incidencia de TB por año. Tomado de WHO 2018.

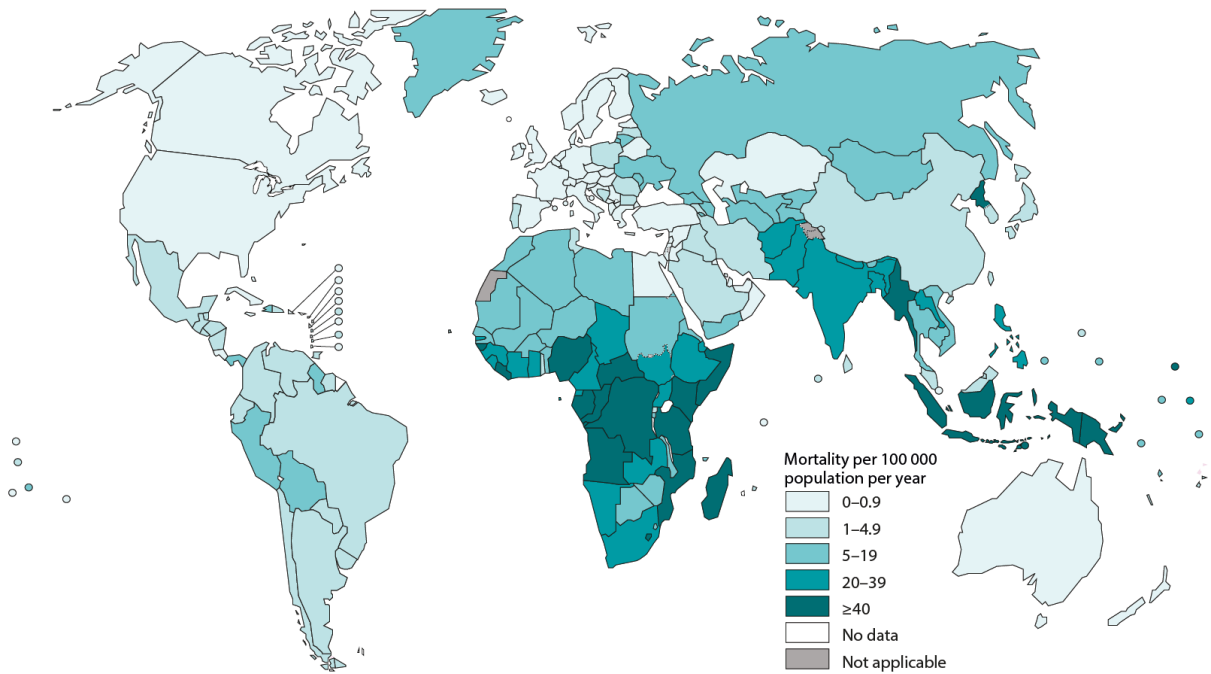


Figura 1.2. Tasas de mortalidad estimadas causadas por TB, incluyendo los casos de HIV positivo. Tomado de WHO 2018.

1.2. Tratamiento actual

El tratamiento de la infección tuberculínica enfrenta hoy en día numerosos obstáculos (Nguyen and Pieters 2009). Las drogas más frecuentes para tratarla son la isoniazida y la rifampicina; las cuales implican un tratamiento largo (6 meses) y muy costoso. Otro problema que se presenta para combatir la enfermedad es la aparición cada vez más frecuente de cepas multi resistentes (MDR), las cuales pueden ser tratadas con drogas de segunda generación, pero los efectos secundarios implicados son graves (por ejemplo, ceguera y/o sordera), de cepas extremadamente resistentes (XDR), las cuales implican tratamientos aún más largos y agresivos, y cepas totalmente resistentes (TDR), para las que aún no existe tratamiento (Janin 2007; “WHO | Key Bottlenecks in M/XDR-TB Control and Patient Care” 2012, *Treatment Strategies for MDR-TB and XDR-TB* 2014; Hameed et al. 2018). Además, existen interacciones negativas entre las drogas anti-tuberculínicas y las anti-HIV, lo que presenta un problema severo en los casos comunes de co-infección (Bonora and Di Perri 2008).

Finalmente un punto clave es que no existen drogas que ataquen al bacilo en fase latente, es decir, en el punto en el cual existe un estado de equilibrio en el que el huésped puede controlar la infección pero no erradicar por completo la bacteria (Lin and Flynn 2010). Aproximadamente un 20% de las personas infectadas en esta fase desarrollan la enfermedad, y el porcentaje es aún mayor en personas inmunosuprimidas (Pawlowski et al. 2012). En este contexto, el desarrollo de nuevos fármacos es apremiante; para lo cual es necesario sortear numerosos obstáculos, siendo los más importantes el limitado conocimiento de la fisiología del bacilo (especialmente en condiciones fisiológicamente relevantes, como las de estrés oxi/nitrosativo), el desconocimiento de blancos moleculares eficientes (capaces de matar al bacilo al ser inhibidos) y la comprensión de porqué muchos fármacos prometedores *in-vitro* fallan en las etapas posteriores de desarrollo (*in vivo/clínico*) (Pawlowski et al. 2012).

1.3. Metabolismo de *Mtb.* en el ambiente intracelular de macrófagos.

Tras la fagocitosis por parte de las células huésped, *Mtb.* experimenta cambios ambientales drásticos y, por lo tanto, tiene que reacomodar su metabolismo para asegurar su supervivencia. Los estudios de la respuesta transcripcional de *Mtb.* a esta transición han proporcionado una visión más profunda de la naturaleza del entorno fagosómico, que se sugiere nitrosativo, oxidativo, bajo en tensión de oxígeno y limitado en nutrientes (Schnappinger et al. 2003).

Se ha demostrado que el metabolismo de lípidos es crítico para la virulencia de *Mtb.* (Movahedzadeh et al. 2004; Brzostek et al. 2007; Chang et al. 2009; Nesbitt et al. 2010). Cuando los ácidos grasos son la fuente exclusiva de carbono se activa el ciclo del glioxilato, un atajo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), que evita los pasos que implican la pérdida de carbono por formación de CO₂. Se ha identificado a la isocitrato liasa como una enzima clave en el metabolismo del glioxilato, y se ha observado actividad del ciclo del glioxilato durante la infección crónica en ratones, lo que sugiere que los lípidos son accesibles como nutrientes *in vivo* (McKinney et al. 2000).

Las vías metabólicas relevantes durante la infección de *Mtb.* se muestran en la Figura 1.3. Aunque la naturaleza exacta de las fuentes de carbono utilizadas durante la infección sigue siendo difícil de dilucidar, se ha demostrado que *Mtb.* metaboliza el colesterol y triacilglicerol del huésped (Pandey and Sasseti 2008; Daniel et al. 2011). El catabolismo del colesterol, de los ácidos grasos de cadena impar, de los ácidos grasos ramificados con metilo y de los aminoácidos se canaliza en propionil-CoA, que es tóxico en exceso (Savvi et al. 2008; X. Yang et al. 2009), y que a su vez sirve como sustrato para el ciclo del 2-metilcitrato, en el que se sintetizan succinato y piruvato (Figura 1.3) (Muñoz-Elías et al. 2006). El propionil-CoA puede metabolizarse también mediante la vía de metilmalonil-CoA. El producto final de esta vía es el metilmalonil-CoA, que a su vez puede convertirse en succinil-CoA por una mutasa dependiente de vitamina B12 o ser incorporada directamente a ácidos grasos ramificados de metilo (Savvi et al. 2008) (Figura 1.3). Estos ácidos grasos se encuentran en la gran familia de lípidos micobacterianos únicos que forman la pared celular del patógeno (Brennan and Nikaido 1995; Jackson, Stadthagen, and Gicquel 2007). Típicamente, la pérdida de los componentes de la pared celular conduce a

una virulencia disminuida (Glickman, Cox, and Jacobs 2000; Makinoshima and Glickman 2005). En conclusión, el metabolismo del propionil-CoA es extremadamente crítico para *Mtb. in vivo*.

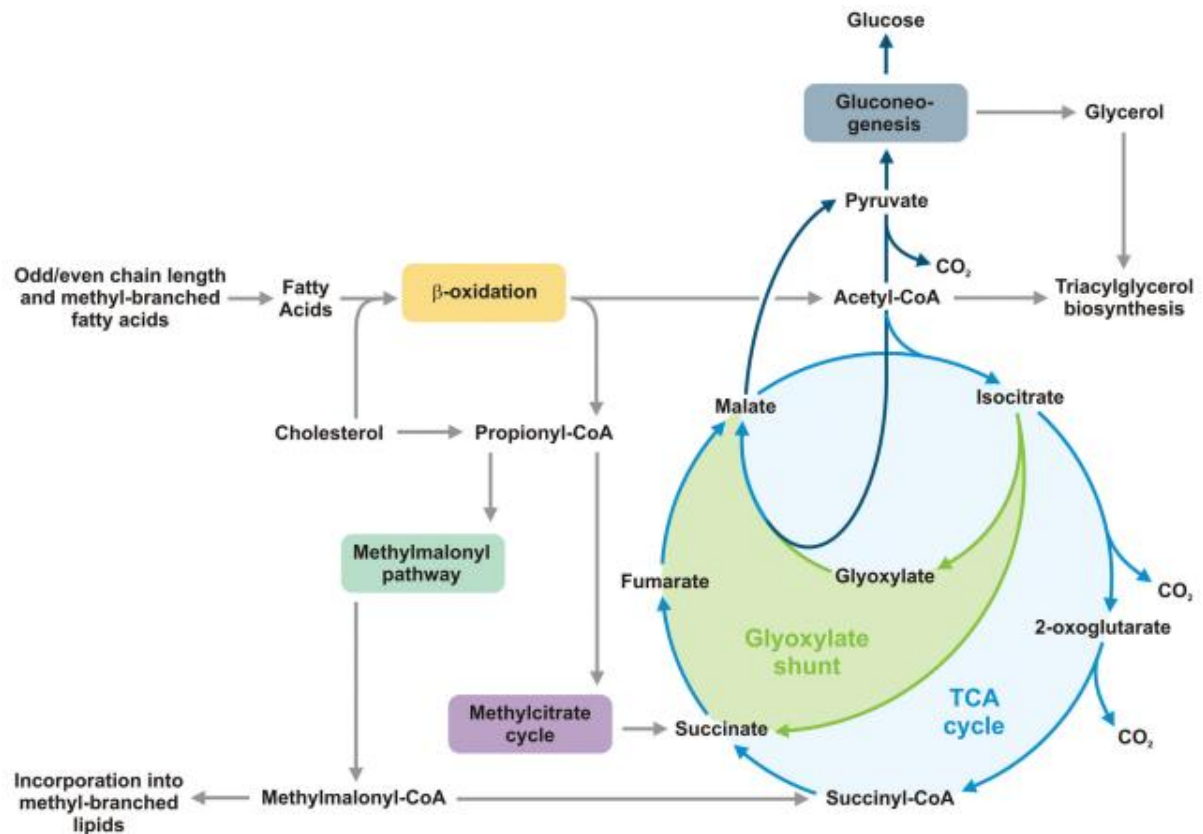


Figura 1.3. Vías metabólicas de *Mtb.* importantes durante la infección. La degradación de los ácidos grasos por la β -oxidación conduce a acetil-CoA (C2) y propionil-CoA (C3). El patógeno puede metabolizar directamente las unidades C2 a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), mientras que la acumulación excesiva de propionil-CoA tóxica se evita mediante dos rutas metabólicas: (1) el ciclo del metilcitrato y (2) la ruta del metilmalonilo. Los productos de ambas vías pueden ingresar al ciclo de los TCA, ya sea directamente (succinato) o después de la conversión a succinil-CoA (metilmalonil-CoA). Por su parte, el glioxilato se puede usar para generar piruvato (a través de malato), a partir del cual los sustratos glicolíticos se pueden reponer por gluconeogénesis. Los cuerpos C3 de la glucólisis/ gluconeogénesis y acetil-CoA son necesarios para la biosíntesis del triacilglicerol, un lípido relevante durante la latencia. Tomado de (Gengenbacher and Kaufmann 2012).

Por otro lado, la escisión asimétrica de isocitrato produce glioxilato, que se convierte en malato y succinato. El malato intermedio del ciclo de los TCA se puede usar para generar piruvato y, además, para reponer el conjunto de productos intermedios glicolíticos mediante gluconeogénesis (Figura 1.3). Tales intermediarios

son necesarios para producir los componentes esenciales de las proteínas, el ADN y la pared celular. La gluconeogénesis es crítica durante la infección de TB en ratones y, por lo tanto, podría ser relevante en la latencia (Marrero et al. 2010).

En los últimos años se han realizado estudios *in vitro* que apuntan a reproducir los impactos del ambiente del huésped en *Mtb.*, es decir, en el estado latente del bacilo. En conjunto, estas investigaciones sugieren que los genes relacionados con el estrés y las vías alternativas están regulados positivamente, mientras que los genes de las rutas metabólicas centrales, que incluyen la glucólisis, el ciclo de los TCA, la producción de energía y la respiración, se encuentran regulados negativamente (Keren et al. 2004; Vázquez-Laslop, Lee, and Neyfakh 2006; Bryk et al. 2008; Keren et al. 2011).

1.4. Sistemas de transducción de señales en bacterias

Comúnmente, la transducción de señales se refiere a la detección de una señal extracelular que se transduce a través de la membrana citoplásmica y se convierte en una respuesta intracelular. Por lo tanto, la transducción de señales es crítica para la adaptación celular a los cambios en el entorno extracelular (Prisic and Husson 2014).

Los sistemas de transducción de señales bacterianos son responsables de detectar señales ambientales y ajustar el comportamiento celular y/o el metabolismo en respuesta a estas señales (Galperin 2018). También controlan las condiciones intracelulares, el estado de desarrollo celular y la membrana citoplásmica y desencadenan diversas respuestas de estrés para contrarrestar los cambios adversos. Esta vigilancia involucra varias clases de proteínas sensoras: histidina quinasas (Gao and Stock 2009; Zschiedrich, Keidel, and Szurmant 2016); quimiorreceptores (Salah Ud-Din and Roujeinikova 2017; Bi and Sourjik 2018); componentes de la membrana del sistema de la fosfotransferasa de azúcar (Deutscher 2008; Västermark and Saier 2014); ciclasas de adenilato, diadenilato y diguanilato y ciertas fosfodiesterasas de cAMP, c-di-AMP y c-di-GMP (Jenal, Reinders, and Lori 2017; Bassler, Schultz, and Lupas 2018; Noshu et al. 2018; Commichau et al. 2018); Factores sigma de función extra citoplásmica (Helmann

2016; Asai 2018) y proteína quinasas (Av-Gay and Everett 2000; Prisic and Husson 2014) y fosfoproteínas fosfatasas (Wright and Ulijasz 2014).

Mientras que en humanos se codifican más de 600 proteínas quinasas y 800 receptores acoplados a la proteína G (GPCR), las bacterias tienen muchas menos proteínas de señalización, cuyas funciones se están descubriendo gradualmente (Galperin 2018).

En eucariotas las vías de transducción de señales están reguladas mayoritariamente por proteínas quinasas (Paul et al. 2008); en contraste, en procariotas este papel lo desempeñan los sistemas de dos componentes, compuestos por un sensor histidina quinasa y los elementos de respuesta asociados (Parish et al. 2003). En estos sistemas, el sensor y el transductor (denominado regulador de respuesta) son en muchos casos proteínas separadas: la proteína sensor abarca la membrana citoplásmica y el regulador de respuesta es una proteína citoplásmica, generalmente un factor de transcripción que se activa tras ser fosforilado por la proteína sensor (Parish 2014). También se han reportado casos de sistemas de dos componentes solubles, por ejemplo el sistema que controla la expresión de la quinoproteína etanol deshidrogenasa en *Pseudomonas aeruginosa* (Schobert and Görisch 2001).

Se sugiere que en las bacterias que contienen un número relativamente bajo de sistemas de dos componentes, como *Mycoplasma genitalium* o *Mycobacterium tuberculosis*, esta carencia está compensada por mecanismos alternativos de transducción de señales que involucran la fosforilación de los residuos de serina/treonina, llevada a cabo por STPKs, una familia de quinasas similares a las eucariotas (Wehenkel et al. 2008; Av-Gay and Everett 2000).

1.5. Proteínas quinasas

El descubrimiento de las proteínas quinasas en la década de 1950 condujo a un cambio importante en la clarificación de las vías biológicas y los mecanismos de desarrollo de las enfermedades y de las terapias durante las siguientes seis décadas (Hunter 2000; Krebs and Beavo 1979). Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato de ATP a cadenas laterales de los

aminoácidos de proteínas, siendo los más comunes Ser/Thr y Tyr. Si bien se postula que cada quinasa específica tiene una función especializada, hay muchas características conservadas entre las quinasas con respecto a sus estructuras y mecanismos catalíticos (Hanks, Quinn, and Hunter 1988).

Las proteínas quinasas están fuertemente reguladas mediante distintos mecanismos, entre los cuales se destacan: los inhibidores y las proteínas activadoras asociadas (Figura 1.4), la fosforilación, la localización celular (que limita la disponibilidad de sustratos y activadores), la degradación de proteínas y la transcripción de genes (Jeffrey et al. 1995; Young et al. 2003; Bergeron et al. 2016; Liao et al. 2018; Endicott, Noble, and Johnson 2012). La fosforilación de proteínas *target* puede tener efectos profundos, pudiendo dar lugar a la activación, a la inhibición, a la creación de sitios de reconocimiento para el reclutamiento de otras proteínas y a cambios conformacionales que pueden afectar la interacción con otras moléculas (Johnson and Lewis 2001).

Una característica distintiva de la familia de las proteínas quinasas son las diferentes estructuras que adoptan entre los estados activo e inactivo. Esta característica se apreció por primera vez luego de la determinación de las primeras estructuras de la proteína quinasa A (PKA) (PDBid: 1ATP) (Knighton et al. 1991) en la conformación activa y la proteína quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) (PDBid: 1HCK) (De Bondt et al. 1993) en una conformación inactiva. La adopción del estado activo se produce en respuesta a eventos de señalización específicos, que se transducen a través de los dominios reguladores asociados a la quinasa en *cis* o en *trans*, y/o por fosforilación del dominio de la quinasa (Endicott, Noble, and Johnson 2012).

1.5.1. Estructura de las quinasas

Las Ser/Thr y Tyr quinasas comparten un dominio catalítico de ~290 residuos, en el que el sitio activo se encuentra entre un lóbulo N-terminal compuesto por hojas β y una única hélice α (la "hélice C") y un lóbulo C-terminal más grande, conectado por un linker (Figura 1.4, violeta oscuro). El lóbulo C-terminal es predominantemente α -helicoidal e incluye el segmento o *loop* de activación: una región de 20 a 35 residuos localizada entre un motivo DFG conservado (utilizando los códigos de aminoácidos de una sola letra) y un motivo APE, menos conservado (Figura 1.5) (Huse and

Kuriyan 2002; Nolen, Taylor, and Ghosh 2004). En la conformación activa, las hélices C se empaquetan contra el lóbulo N-terminal y el aspartato del DFG coordina un ión Mg^{2+} , que orienta al ATP. En la conformación inactiva, esta última interacción a menudo se interrumpe, y la fenilalanina del motivo DFG se dirige hacia el sitio del ATP. En algunas quinasas, el dominio catalítico está flanqueado por extensiones N y C terminales que pueden estar involucradas en la regulación (Endicott, Noble, and Johnson 2012).

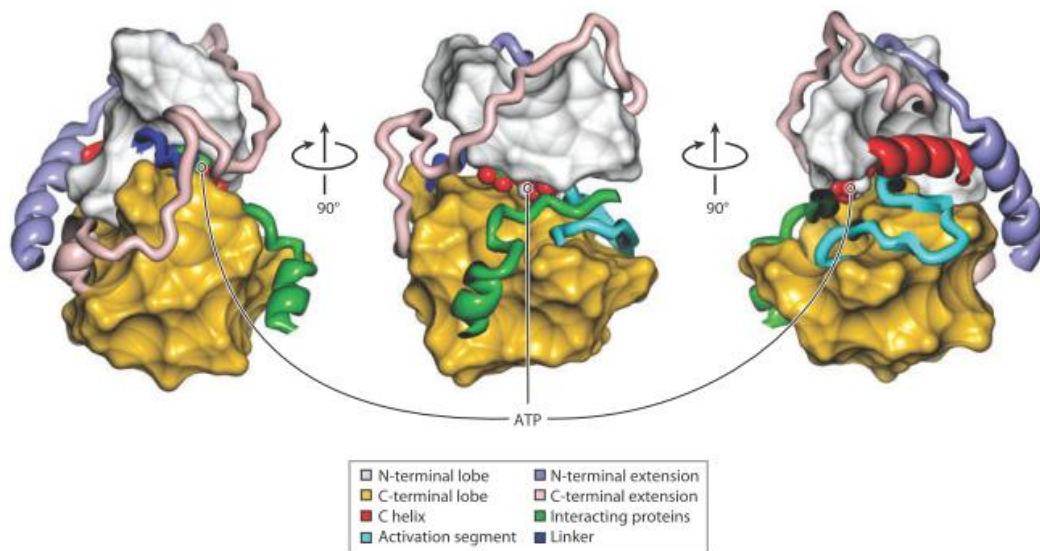


Figura 1.4. Representación reducida de los elementos estructurales y reguladores clave de una proteína quinasa, tomando como modelo a la proteína quinasa A (PDBid: 1ATP). Se ilustran las superficies de la cadena principal del lóbulo N y C terminal (en blanco y amarillo respectivamente), mientras que el segmento de activación (celeste), la extensión del C-terminal (rosa) y del N terminal (lila), la hélice C (rojo) y las proteínas interactuantes (verde) se encuentran representadas como “*new cartoon*”. Tomado de (Endicott, Noble, and Johnson 2012).

El segmento de activación forma una parte crucial del sitio de unión al sustrato. En las estructuras de las quinasas inactivas, suele estar parcialmente desordenado. La adopción de la conformación catalíticamente activa para formar la plataforma de unión al péptido se desencadena en muchas quinasas por fosforilación (Endicott, Noble, and Johnson 2012). En la Figura 1.4 puede observarse la posición relativa del segmento de activación, mientras que la Figura 1.5 resume la nomenclatura asociada con este segmento: desplazándonos desde el N al C terminal se observa el *loop* de unión a magnesio, la $\beta 9$, el *loop* de activación y el *loop* P+1.

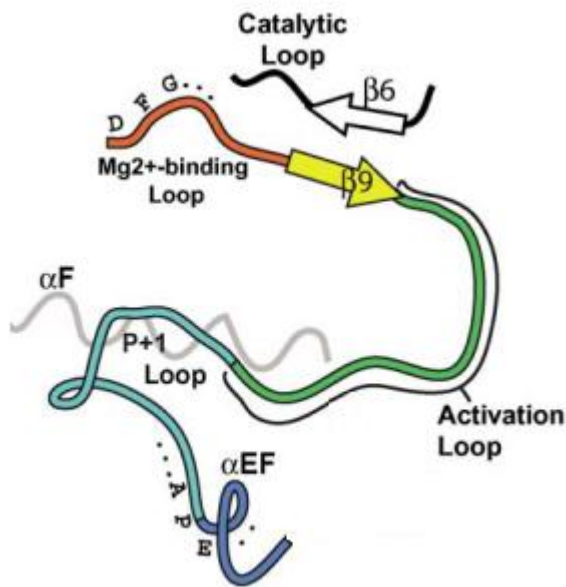


Figura 1.5. Nomenclatura del segmento de activación. El segmento de activación abarca a la región comprendida entre el motivo DFG, contenido en el loop de unión al magnesio hasta el motivo APE, en el *loop* P+1, e incluye la $\beta 9$ y el *loop* de activación. Aunque el *loop* αEF no es parte del segmento de activación, se discute en el texto, por lo que se indica aquí. Adaptado de (Nolen, Taylor, and Ghosh 2004).

El *loop* de unión a magnesio y la $\beta 9$ forman el punto de anclaje del *loop* de activación de la región N-terminal. El *loop* de unión a magnesio contiene al motivo DFG. El aspartato dentro de esta secuencia es un residuo catalítico invariable, responsable de coordinar un magnesio que posiciona al fosfato para la fosfotransferencia (Adams 2001). La $\beta 9$ por su parte interactúa con la $\beta 6$ del *loop* catalítico mediante tres enlaces de hidrógeno característicos del estado activo de las quinasas. En muchas quinasas, en el estado inactivo la carencia de estas interacciones provocan distorsiones, principalmente en el *loop* de unión al magnesio, con múltiples consecuencias estructurales, todas las cuales pueden contribuir a disminuir la actividad (Hubbard et al. 1994; Xie et al. 1998; J. Yang, Cron, Thompson, et al. 2002).

El ancla C-terminal para el *loop* de activación comienza cerca de la mitad del *loop* P+1, y se extiende hasta la αEF , una hélice corta que está constantemente presente pero rara vez anotada en estructuras de quinasa (Figura 1.5). El *loop* P+1, fue originalmente nombrado por el papel en el contacto del residuo P+1 (donde P es la posición del residuo fosforilable) con el péptido inhibidor PKI unido en la estructura de la PKA; este segmento se encuentra en un punto crítico para la interacción entre el sustrato y la quinasa, y de hecho hay varias interacciones entre el péptido sustrato y la quinasa, aparte de la establecida por el residuo P+1 (Madhusudan et al. 1994;

Hubbard et al. 1994; Brown et al. 1999; Favelyukis et al. 2001; J. Yang, Cron, Good, et al. 2002)

En contraste con las quinasas activas, que comparten una conformación catalíticamente competente, las quinasas inactivas son diferentes entre sí (Noble, Endicott, and Johnson 2004). Esta diversidad surge debido a que ningún requisito catalítico restringe el *fold* en este estado, lo que permite la proliferación de diferentes conformaciones que, sin embargo, comparten una serie de temas estructurales comunes (Endicott, Noble, and Johnson 2012).

1.5.2. Mecanismos de activación de las proteínas quinasas

1.5.2.1. Activación por proteínas accesorias u otros dominios

La estructura de una proteína quinasa es flexible y puede ser manipulada para dar lugar a una conformación activa o inactiva por dominios adicionales o subunidades separadas. Por ejemplo, la quinasa CDK2 depende de la asociación con una subunidad de ciclina para la actividad (Figura 1.6 A), la cual se asocia en la región de la hélice α C y promueve una rotación de la hélice (PDBid: 1FIN) (Jeffrey et al. 1995), lo que promueve cambios estructurales necesarios para estabilizar la unión al ATP. En paralelo con el cambio de la hélice α C, un movimiento del segmento de activación, que comienza en el motivo DFG, saca el segmento de activación fuera del sitio catalítico para que la treonina sea accesible para la fosforilación y el aspartato de la DFG se desplace a un sitio interno donde coordina al ion Mg^{2+} para la unión a ATP. Por otro lado, existen quinasas constitutivamente activas, como PhK, que posee una hélice α C anfipática que no requiere interacciones extras para adoptar la conformación activa (Lowe et al. 1997).

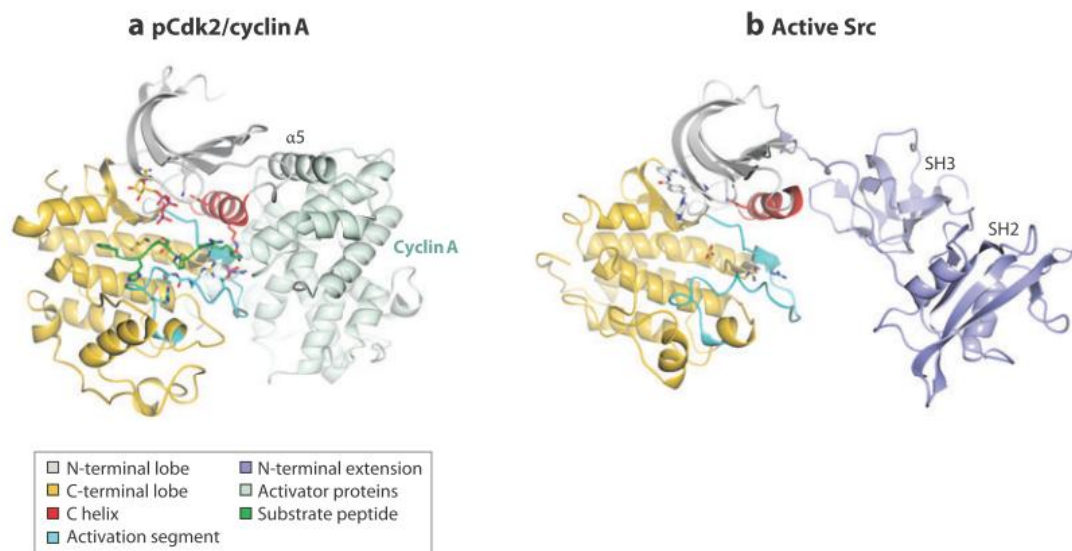


Figura 1.6 Interacciones de la hélice C. (a) CDK2 fosforilada/ciclina A. La hélice H5 de la ciclina se acopla contra la hélice α C para promover la conformación activa (PDBid: 1QMZ). (b) Src quinasa humana en la conformación activa. Los dominios SH2 y SH3 se liberan, liberando a su vez a la quinasa, que puede adoptar su conformación activa (código PDB 1Y57). Adaptado de (Endicott, Noble, and Johnson 2012).

En contraste, el dominio de quinasa de Src se mantiene con la hélice α C en una conformación inactiva al restringir las interacciones con sus dominios SH2 y SH3 que se empaquetan en el lado opuesto de la quinasa y no están en contacto directo con la hélice α C (PDBid: 1FMK) (Jeffrey et al. 1995; Xu, Harrison, and Eck 1997). Cuando se eliminan estas restricciones, ya sea a través de los dominios SH2 y SH3 que se acoplan a proteínas de reconocimiento o por hidrólisis mediada por una fosfatasa de la tirosina fosforilada que forma el sitio de acoplamiento SH2, la quinasa puede relajarse hasta su conformación activa de la hélice α C (código PDB 1Y57) (Figura 1. 6 B) (Cowan-Jacob et al. 2005).

1.5.2.2. Dimerización y activación

Muchas proteínas quinasas dimerizan como parte de su mecanismo de activación (X. Zhang et al. 2006; Hu et al. 2013; Bae and Luo 2018; Mortuza et al. 2018), la cual puede considerarse como un caso especial de activación por proteínas o dominios accesorios. En tales casos, ambos miembros del dímero se activan por fosforilación recíproca, o bien uno de los miembros activa al otro a través de un mecanismo alostérico (Huse and Kuriyan 2002).

1.6. La familia de serin/treonin quinasas de *Mycobacterium tuberculosis*

A diferencia de los sistemas de dos componentes, que son un importante mecanismo de señalización en casi todos los tipos de bacterias, las serin treonin quinasas (STPKs) están menos distribuidas entre los diferentes grupos bacterianos, siendo abundantes entre las acidobacterias, las actinobacterias (que incluyen micobacterias), algunas cianobacterias y un orden de las Deltaproteobacterias (las Myxococcales, las primeras bacterias en las que se identificaron las STPKs) (Muñoz-Dorado, Inouye, and Inouye 1991; Pérez et al. 2008).

En contraste con muchos de los patógenos bacterianos y organismos modelo ampliamente estudiados que tienen pocas o ninguna STPK pero muchos sistemas de dos componentes, el genoma de *Mtb.* codifica 11 STPKs, nombradas desde PknA hasta PknL (S. T. Cole et al. 1998a), (S. T. Cole et al. 1998b), así como un número similar de sistemas de dos componentes, lo que indica que estos dos mecanismos juegan un papel importante en la transducción de señales en este organismo (Parish 2014; Prisic and Husson 2014).

De las 11 STPKs de *Mtb.* 2 son solubles (PknG y PknK), mientras que las otras 9 poseen un dominio transmembrana, con un dominio sensor extracelular y un dominio quinasa (KD) intracelular (Figura 1.7). Así, estas nueve proteínas transmembrana pueden clasificarse como quinasas de tipo receptor, en las que el dominio sensor extracelular detecta señales extra citoplásmicas y transfiere esta información al KD intracelular, lo que lleva a la activación de la quinasa y la fosforilación de residuos de Ser o Thr en proteínas diana. Esta fosforilación puede alterar la función de la proteína directamente o al afectar las interacciones entre pares específicos de proteínas o entre complejos multiproteicos. A diferencia de la transducción de señales mediada por sistemas de dos componentes, donde la respuesta primaria habitual son cambios en la transcripción (Laub and Goulian 2007; Capra and Laub 2012), los cambios en la transcripción en respuesta a la fosforilación de Ser/Thr son menos frecuentes (Wehenkel et al. 2008).

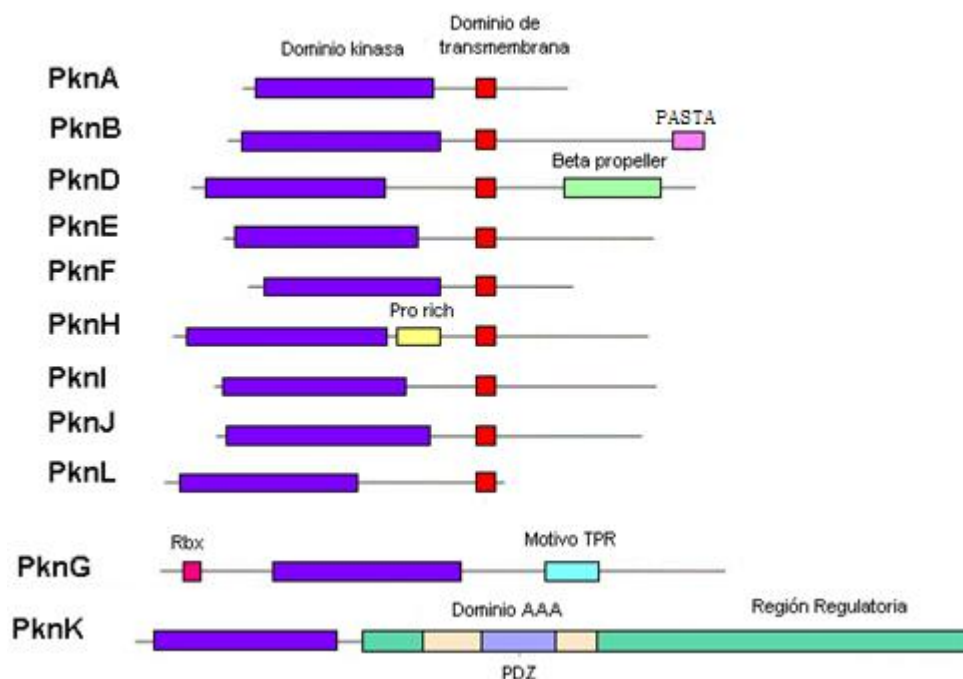


Figura 1.7. Representación esquemática de la organización de los dominios de las distintas STPKs de Mtb. Adaptado de (Av-Gay and Everett 2000).

Según su similitud de secuencia, estas STPKs se han agrupado en cinco clados: Clado I (PknA, PknB, PknL), Clado II (PknD, PknE, PknH), Clado III (PknF, PknI, PknJ), Clado IV (PknG) y Clado V (PknK) (Narayan et al. 2007). Se sabe que estas STPKs juegan un papel crítico en la adaptación a diversas condiciones ambientales (Ortega et al. 2014), síntesis de la pared celular (S. Khan et al. 2010), división celular (Janin 2007) y patogenicidad (Wolff et al. 2015); lo cual las convierte en un blanco farmacológico interesante. Sin embargo, a excepción de algunas STPKs relativamente bien estudiadas, como PknA, PknB (Gee et al. 2012; Kang et al. 2008) y PknG (Walburger et al. 2004), aún queda mucho por dilucidar en cuanto a la caracterización de esta familia de proteínas.

1.7. PknG

La proteína quinasa G (PknG) se destaca entre las STPKs bacterianas debido a su gran conservación en las Actinobacterias, por su papel central en la sobreproducción de glutamato industrial por *Corynebacterium glutamicum* (Niebisch

et al. 2006) y por la gran cantidad de información sobre su requerimiento para la virulencia en *Mtb.* (Cowley et al. 2004; Walburger et al. 2004; Wolff et al. 2015).

PknG es una proteína quinasa soluble, la cual se propone es secretada extracelularmente, evitando la fusión del fagosoma y del lisosoma, promoviendo así la supervivencia y la virulencia de *Mtb.* en la célula huésped y contribuyendo a la latencia de la TB (Walburger et al. 2004). Además, la inactivación de PknG por intercambio alélico disminuye la viabilidad de *Mtb. in vitro* y causa una mortalidad retardada de ratones altamente susceptibles infectados con el bacilo (Cowley et al. 2004).

1.7.1. Estructura y regulación de PknG

La estructura de PknG ha sido elucidada (Scherr et al. 2007; Lisa et al. 2015), observándose cuatro dominios funcionales: la región de estructura secundaria no regulatoria (NORS), que abarca los primeros 75 residuos del dominio N-terminal; el dominio Rubredoxina (Rbx), el dominio canónico catalítico quinasa conservado (KD) y el dominio de repetición tetratricopéptido en el dominio C-terminal (TPR) (Figura 1.8).

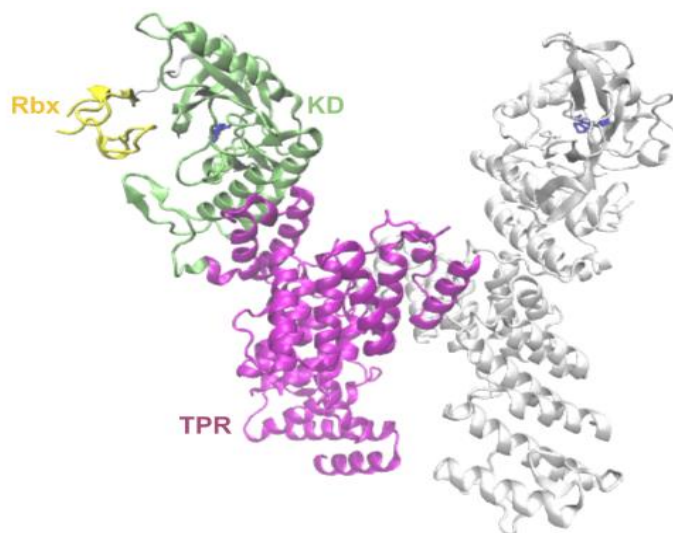


Figura 1.8. Estructura de PknG (PDBid: 2PZI), mostrando en magenta el dominio de tetratricopéptidos (TPR), en verde el dominio quinasa (KD) y en amarillo el rubredoxina (Rbx). En gris se muestra otro monómero y en azul la droga AX20017.

Se ha postulado que la región NORS se encuentra intrínsecamente desordenada, y que alberga un importante sitio de fosforilación *in vivo*, la Thr 63 (Scherr et al. 2007, 2009; Tiwari et al. 2009). PknG puede autofosforilarse en *trans* (Scherr et al. 2009; Tiwari et al. 2009), sin embargo, a diferencia de otras quinasas micobacterianas, como PknB (Boitel et al. 2003; Young et al. 2003; Durán et al.

2005), la autofosforilación no afecta la actividad de la quinasa, pero se requiere para la supervivencia de las micobacterias patógenas dentro de los macrófagos del huésped (Scherr et al. 2009); y para la unión y el reclutamiento de GarA, una proteína sustrato de PknG (O'Hare et al. 2008).

Por su parte, el dominio Rbx está tipificado por un ión de hierro coordinado a cuatro residuos de cisteína conservados, los cuales forman dos motivos Cys-X-x-Cys-Gly, que en general participa en reacciones de transferencia de electrones (Sieker, Stenkamp, and Legall 1994; van Beilen et al. 2002). Sin embargo, se ha observado que *in vitro* el dominio Rbx de PknG puede coordinar distintos iones metálicos divalentes, como zinc, hierro o cadmio, en el estado reducido (Scherr et al. 2007; Gil et al. 2013; Lisa et al. 2015; Wittwer and Dames 2015), desconociéndose qué ión se une *in vivo*. Así mismo, el papel del dominio Rbx en PknG es todavía incierto, no obstante debido a que otros dominios Rbx participan en procesos de transferencia de electrones, es posible que su función esté relacionada con el balance redox de la bacteria (Bryan 2002). La interrupción del sitio de unión al metal por mutaciones simultáneas de los residuos cisteína del Rbx de PknG tiene un efecto notable sobre la actividad de la quinasa (Scherr et al. 2007; Tiwari et al. 2009), lo que apunta a un papel funcional o estructural relevante del dominio Rbx. Además, otros autores proponen que este dominio modula la entrada de sustratos al sitio activo restringiendo el acceso por impedimento estérico (Lisa et al. 2015; Wittwer et al. 2016).

Por último, el dominio C-terminal de PknG contiene un motivo TPR, un dominio que participa en las interacciones proteína-proteína en células tanto eucariotas como procariontes (Scherr et al. 2007). Este dominio estaría involucrado en la dimerización de la proteína, sin efectos aparentes en la actividad quinasa (Scherr et al. 2007; Lisa et al. 2015). Por otro lado, recientemente se ha reportado que la concentración de aminoácidos en el periplasma de *Mtb.* es detectada por una proteína llamada GlnH, la cual interactúa con GlnX que a su vez interactúa con PknG mediante el dominio TPR de esta última, regulando su actividad quinasa (Bhattacharyya et al. 2018).

En resumen, el estado de fosforilación de la región NORS regularía la afinidad por sustratos (O'Hare et al. 2008), mientras que los dominios Rbx y TRP regularían

la actividad quinasa intrínseca de PknG (Bhattacharyya et al. 2018; Tiwari et al. 2009; Scherr et al. 2007; Gil et al. 2013; Wittwer and Dames 2015).

1.7.2. El rol de PknG en *Mtb.*

1.7.2.1. Regulación del ciclo de ácidos tricarboxílicos y síntesis del glutamato

Uno de los aspectos más estudiados de PknG es su rol en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y en la regulación del ciclo del glutamato (O'Hare et al. 2008; Ventura et al. 2013). *In vitro Mtb.* es capaz de utilizar diversas fuentes de carbono, ya que como mencionamos anteriormente posee vías completas para la glucólisis, el ciclo de los TCA, la vía de la pentosa fosfato, el ciclo del glioxilato y el ciclo del metilcitrate (Marrero et al. 2010; Beste et al. 2007). Sin embargo, para el crecimiento y persistencia *in vivo*, se requiere un metabolismo de carbono eficiente, ya que se ha observado que la interrupción de la gluconeogénesis, del ciclo del glioxilato y del ciclo del citrato de metilo reducen la virulencia del bacilo en ratones (McKinney et al. 2000; Muñoz-Elías et al. 2006; Marrero et al. 2010).

El ciclo de los TCA es la principal vía de generación de energía en los organismos aeróbicos, siendo el complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDH) el principal punto de control del flujo a través del ciclo (Bunik and Fernie 2009). En la mayoría de los organismos aeróbicos la KDH está regulada a nivel de la expresión génica y también por metabolitos clave (activadores o inhibidores alostéricos) (Bunik and Fernie 2009). En *Mtb.*, la KDH se regula tanto por regulación alostérica (Wagner et al. 2011) como por la unión a una proteína inhibidora denominada GarA (*Glycogen accumulation regulator*) (O'Hare et al. 2008; Ventura et al. 2013). Este regulador no convencional se identificó por primera vez en *C. glutamicum* (Niebisch et al. 2006) y puede operar en muchos otros organismos, ya que los homólogos de GarA están muy extendidos en las Actinobacterias.

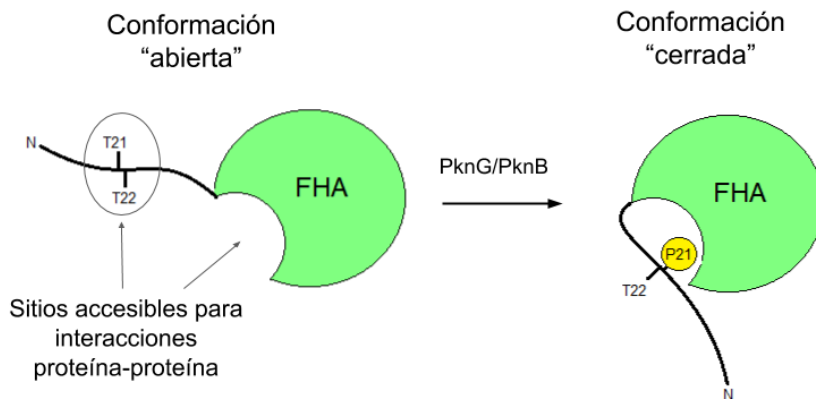


Figura 1.9. Modelo propuesto de GarA como un interruptor molecular dependiente de la fosforilación. La proteína no fosforilada (izquierda) tiene el sitio de unión a treoninas fosforiladas y la extensión del péptido N-terminal accesibles para la interacción con otras proteínas. La fosforilación en una treonina

dentro del motivo de ETTS promueve el reconocimiento de sí mismo (derecha), bloqueando efectivamente el sitio de unión del FHA y desactivando las funciones reguladoras de la proteína.

GarA es una proteína pequeña que consiste en un dominio desordenado asociado a un *forkhead associated domain* (FHA). La función típica de un dominio FHA es la interacción proteína-proteína mediada por el reconocimiento específico de residuos de treonina fosforilados (Durocher et al. 1999), y de hecho, cuando GarA se fosforila en su extremo N-terminal, el dominio FHA es capaz de unirse a la fosfotreonina en un evento de auto-reconocimiento (Figura 1.9) (Barthe et al. 2009; England et al. 2009; Nott et al. 2009), que bloquea la unión a KDH, lo que alivia la inhibición sobre esta última enzima (Figura 1.10).

El sustrato de la KDH, el α -cetoglutarato, se encuentra en la encrucijada entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Figura 1.10), ya que también es un sustrato para la síntesis de glutamato. Además de la regulación del ciclo de los TCA, GarA regula el equilibrio entre este ciclo y el metabolismo del glutamato mediante la inhibición de la glutamato deshidrogenasa (GDH), involucrada en la degradación del glutamato y la activación de la glutamato sintasa (GltS), involucrada en la síntesis de glutamato (Nott et al. 2009). El resultado neto es que GarA sin fosforilar promueve la síntesis de glutamato (Figura 1.10).

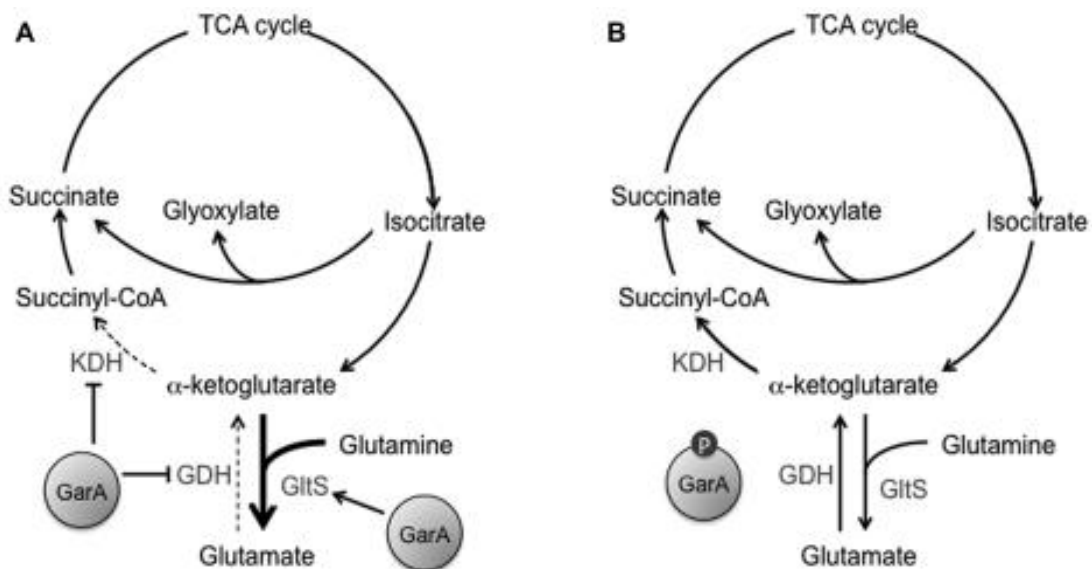


Figura 1.10. Modelo de la regulación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la síntesis de glutamato por GarA. A. Cuando GarA no está fosforilada, se une e inhibe el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDH) y glutamato deshidrogenasa (GDH). GarA no fosforilada se une y activa la glutamato sintasa (GltS, también conocida como GOGAT). El efecto neto es la inhibición del ciclo de TCA y la promoción de la síntesis de glutamato. B. Cuando GarA se encuentra fosforilada, ya no puede unirse a ninguna de sus enzimas asociadas, aliviándose la inhibición del ciclo de TCA. Tomado de Ventura et al 2013.

El glutamato es el principal donante de grupos amino en el anabolismo y uno de los metabolitos celulares más abundantes. Como tal, la biosíntesis y degradación del glutamato están sujetas a una regulación compleja (Leigh and Dodsworth 2007). El catabolismo del glutamato plantea el desafío de mantener el equilibrio entre el metabolismo del carbono y el nitrógeno, lo cual, dadas las estrategias del huésped para privar a las bacterias intracelulares de los aminoácidos, es vital para la subsistencia de *Mtb.* (Y. J. Zhang and Rubin 2013). En las bacterias, el glutamato se sintetiza por la glutamato deshidrogenasa o, en momentos donde la disponibilidad de nitrógeno es limitada, por la actividad coordinada de la glutamato sintasa y la glutamina sintetasa dependiente de ATP (Yan 2007; Feehily and Karatzas 2013). Se propone que esta última vía sería la vía principal de la síntesis de glutamato en *Mtb.*, ya que el análisis genómico del bacilo predice que la única GDH codificada es dependiente de NADH y catabólica. En contraste, el genoma de *M. smegmatis*, codifica dos enzimas GDH anabólicas dependientes de NADPH adicionales (Ventura et al. 2013).

La importancia de GarA para la regulación metabólica de *Mtb.* ha quedado demostrada al comparar el crecimiento *in vitro* y en macrófagos de mutantes deletéreas tanto en la cepa no patógena *M. smegmatis* como en *Mtb.*; mientras que en la primera GarA resultó prescindible, se encontró que para *Mtb.* esta proteína es esencial (Ventura et al. 2013; Rieck et al. 2017). Estos datos subrayan la importancia del ciclo de los TCA y el equilibrio con la síntesis de glutamato en *Mtb.*

GarA posee dos sitios susceptibles a la fosforilación: la treonina 21 y la treonina 22, siendo ambos eventos excluyentes (Villarino et al. 2005; O'Hare et al. 2008; Ventura et al. 2013).

Ensayos realizados tanto sobre *Mtb.* como en la cepa no patógena *M. smegmatis* indican que PknG es la principal responsable de la fosforilación de GarA (Rieck et al. 2017; M. Z. Khan et al. 2017). PknG fosforila a GarA en el residuo 21, y hasta la fecha es la única quinasa reportada que fosforila este sitio, aunque existen indicios de que otras quinasas también podrían hacerlo en menor proporción (O'Hare et al. 2008; Rieck et al. 2017). Para que este evento ocurra, la autofosforilación de PknG resulta crucial, ya que permite la estabilización del complejo quinasa-sustrato mediante la interacción de los residuos fosforilados de la quinasa y el dominio FHA del sustrato (O'Hare et al. 2008; Lisa et al. 2015).

Por otro, el residuo 22 de GarA es fosforilado principalmente por PknB, sin embargo otras STPKs (PknD, PknE y PknF) pueden fosforilarlo también en menor proporción (Villarino et al. 2005). Estudios enzimológicos y de unión de las proteínas recombinantes demostraron que se requieren interacciones de acoplamiento entre los residuos fosforilados del *loop* de activación de PknB y el dominio FHA C-terminal de GarA para permitir la fosforilación eficiente en el residuo 22 del sustrato (Villarino et al. 2005).

En resumen, la activación de PknG (Rieck et al. 2017), y en menor medida de PknB y otras STPKs (Villarino et al. 2005), conllevan a la fosforilación de GarA, lo cual alivia la inhibición del ciclo de los TCA, y desfavorece la síntesis del glutamato.

Mientras que las bacterias comúnmente tienen múltiples mecanismos para detectar el estado de carbono y nitrógeno (Leigh and Dodsworth 2007; Primm et al.

2000), el(los) sensor (es) de nitrógeno de *Mtb.* aún no se ha(n) identificado (Nott et al. 2009). Dados los efectos directos de GarA sobre las actividades enzimáticas relevantes (KDH, GDH y GltS), se ha postulado que PknG-GarA podría cumplir esta función en *Mtb.* y otras Actinobacterias (Rieck et al. 2017; Bhattacharyya et al. 2018).

1.7.2.2. PknG y la homeostasis redox

Como mencionamos anteriormente, la presencia del dominio Rbx en el extremo N-terminal de PknG sugiere una posible participación de esta quinasa en la homeostasis redox (Scherr et al. 2007). De hecho, recientemente Wolf et al. (Wolff et al. 2015) han demostrado que PknG es un componente integral de un sistema homeostático redox, RHOCS, que incluye la proteína ribosomal L13, y RenU una hidrolasa codificada por un gen adyacente a PknG. Estudios en *M. smegmatis* demostraron que la expresión de PknG es inducida por NADH, el cual desempeña un papel clave en el metabolismo y la homeostasis redox. *In vitro*, RenU hidroliza FAD, ADP-ribosa y NADH, pero no NAD⁺. La ausencia de actividades de RHOCS *in vivo* provoca la acumulación de NADH y FAD, y una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. Wolf et al. demostraron además que PknG fosforila L13 y promueve su asociación citoplásmica a RenU, y que la fosforilación de L13 acelera la hidrólisis de NADH catalizada por RenU. Asimismo, observaron que la interrupción de RHOCS reduce la supervivencia de *Mtb.* en macrófagos (Wolff et al. 2015). Por lo tanto, RHOCS representaría un punto de control en el programa de desarrollo requerido para el crecimiento de micobacterias en entornos de estrés oxidativo. El modelo propuesto se muestra en la Figura 1.11.

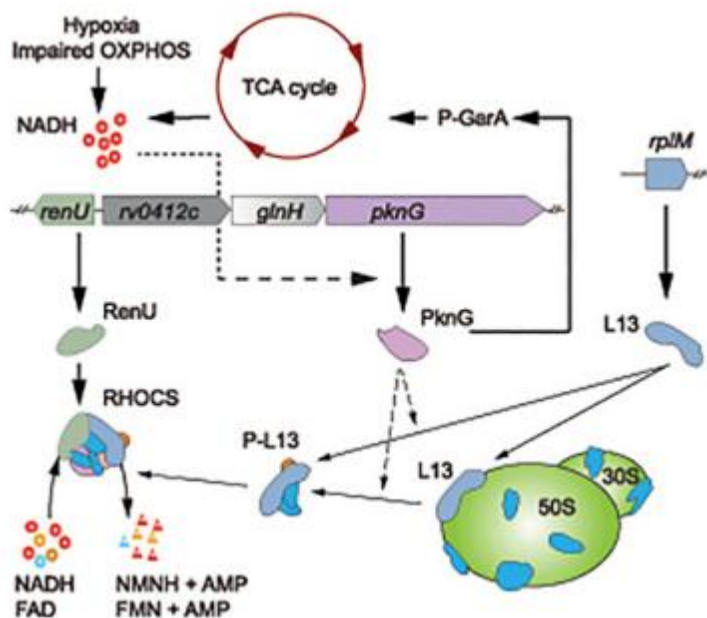


Figura 1.11. Modelo que representa la actividad y función de RHOCS en micobacterias. El aumento de la actividad del ciclo del TCA, la hipoxia o la disminución de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), conducen a niveles elevados de NADH. Para proteger las células micobacterianas contra el cambio en el estado redox, la expresión de PknG se regula positivamente, lo que lleva a la cascada de señalización que incluye L13 y RenU, lo que degrada NADH y FAD y restaura su nivel óptimo.

AMP, adenosina monofosfato, FAD, flavina adenina dinucleótido; FMN, flavina mononucleótido; NMNH, nicotinamida mononucleótido. Tomado de Wolff et al. 2015.

El mecanismo de acción propuesto para RHOCS (Figura 1.11) encaja muy bien con algunas observaciones previas. Como mencionamos anteriormente, se sugiere que PknG inhibe el ciclo de los TCA a través de la fosforilación de GarA (O'Hare et al. 2008). Por lo tanto, se espera que la actividad de PknG en el ciclo de los TCA aumente la producción de NADH, que luego se alimenta a la vía de fosforilación oxidativa que produce especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Además, NADH es un inhibidor efectivo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa, el generador clave de NADH y el estrés oxidativo (Tretter and Adam-Vizi 2005), y un *target* de GarA (O'Hare et al. 2008). Así, PknG podría proporcionar a las micobacterias un mecanismo de soporte que previene la muerte celular causada por la alteración redox causada por el aumento de la actividad de TCA mediante la vía RHOCS.

1.7.2.3. Otras funciones de PknG

Además de las funciones nombradas anteriormente, se ha descrito que PknG tiene un papel central en la facilitación del crecimiento bacteriano en condiciones que imitan el entorno del huésped, como la hipoxia o los entornos ácidos (Paroha et al. 2018; M. Z. Khan et al. 2017). Además, se observó que la eliminación de PknG causó un fenotipo sensible a múltiples fármacos en contraposición a la resistencia

antibiótica intrínseca de las micobacterias patógenas (Wolff et al. 2009). Muy recientemente, se ha identificado a la glutamina sintasa como nuevo sustrato de PknG (Gil et al. 2018), lo que refuerza el rol de PknG en el control del metabolismo bacteriano del nitrógeno. Además, existe evidencia de que PknG podría regular otros procesos en la fisiología micobacteriana, incluida la traducción de proteínas y la síntesis de la pared celular (Gil et al. 2018).

1.8. Bibliografía

- Adams, J. A. 2001. "Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases." *Chemical Reviews* 101 (8): 2271–90.
- Asai, Kei. 2018. "Anti-Sigma Factor-Mediated Cell Surface Stress Responses in *Bacillus Subtilis*." *Genes & Genetic Systems* 92 (5): 223–34.
- Av-Gay, Y., and M. Everett. 2000. "The Eukaryotic-like Ser/Thr Protein Kinases of *Mycobacterium Tuberculosis*." *Trends in Microbiology* 8 (5): 238–44.
- Bae, Sung Jun, and Xuelian Luo. 2018. "Activation Mechanisms of the Hippo Kinase Signaling Cascade." *Bioscience Reports* 38 (4). <https://doi.org/10.1042/BSR20171469>.
- Barthe, Philippe, Christian Roumestand, Marc J. Canova, Laurent Kremer, Corinne Hurard, Virginie Molle, and Martin Cohen-Gonsaud. 2009. "Dynamic and Structural Characterization of a Bacterial FHA Protein Reveals a New Autoinhibition Mechanism." *Structure* 17 (4): 568–78.
- Bassler, Jens, Joachim E. Schultz, and Andrei N. Lupas. 2018. "Adenylate Cyclases: Receivers, Transducers, and Generators of Signals." *Cellular Signalling* 46 (June): 135–44.
- Beilen, Jan B. van, Martin Neuenschwander, Theo H. M. Smits, Christian Roth, Stefanie B. Balada, and Bernard Witholt. 2002. "Rubredoxins Involved in Alkane Oxidation." *Journal of Bacteriology* 184 (6): 1722–32.
- Bergeron, John J. M., Gianni M. Di Guglielmo, Sophie Dahan, Michel Dominguez, and Barry I. Posner. 2016. "Spatial and Temporal Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Activation and Intracellular Signal Transduction." *Annual Review of Biochemistry* 85 (June): 573–97.
- Beste, Dany J. V., Tracy Hooper, Graham Stewart, Bhushan Bonde, Claudio Avignone-Rossa, Michael E. Bushell, Paul Wheeler, Steffen Klamt, Andrzej M. Kierzek, and Johnjoe McFadden. 2007. "GSMN-TB: A Web-Based Genome-Scale Network Model of *Mycobacterium Tuberculosis* Metabolism." *Genome Biology* 8 (5): R89.
- Bhattacharyya, Nabanita, Irene Nailain Nkumama, Zaccheus Newland-Smith, Li-Ying Lin, Wen Yin, Rebecca E. Cullen, Jack S. Griffiths, et al. 2018. "An Aspartate-Specific Solute-Binding Protein Regulates Protein Kinase G Activity To Control Glutamate Metabolism in *Mycobacteria*." *mBio* 9 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00931-18>.
- Bi, Shuangyu, and Victor Sourjik. 2018. "Stimulus Sensing and Signal Processing in Bacterial Chemotaxis." *Current Opinion in Microbiology* 45 (October): 22–29.
- Boitel, Brigitte, Miguel Ortiz-Lombardía, Rosario Durán, Frédérique Pompeo, Stewart T. Cole, Carlos Cerveñansky, and Pedro M. Alzari. 2003. "PknB Kinase Activity Is Regulated by Phosphorylation in Two Thr Residues and Dephosphorylation by PstP, the Cognate Phospho-Ser/Thr Phosphatase, in *Mycobacterium Tuberculosis*." *Molecular Microbiology* 49 (6): 1493–1508.
- Bonora, Stefano, and Giovanni Di Perri. 2008. "Interactions between Antiretroviral Agents and Those Used to Treat Tuberculosis." *Current Opinion in HIV and AIDS* 3 (3): 306–12.
- Brennan, P. J., and H. Nikaido. 1995. "The Envelope of *Mycobacteria*." *Annual Review of Biochemistry* 64: 29–63.
- Brown, N. R., M. E. Noble, J. A. Endicott, and L. N. Johnson. 1999. "The Structural Basis for Specificity of Substrate and Recruitment Peptides for Cyclin-Dependent Kinases." *Nature Cell Biology* 1 (7): 438–43.

- Bryan, Robert F. 2002. "Handbook of Metalloproteins. Vols. 1 & 2. Edited by Albrecht Messerschmidt, Robert Huber, Thomas Poulos and Karl Wieghardt. Chichester: John Wiley & Sons, 2001. Pp. Xxviii + 1472. Price US\$945.00. ISBN 0-471-62743-7." *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 58 (6 Part 2): 1084.
- Bryk, Ruslana, Benjamin Gold, Aditya Venugopal, Jasbir Singh, Raghu Samy, Krzysztof Pupek, Hua Cao, et al. 2008. "Selective Killing of Nonreplicating Mycobacteria." *Cell Host & Microbe* 3 (3): 137–45.
- Brzostek, Anna, Bożena Dziadek, Anna Rumijowska-Galewicz, Jakub Pawelczyk, and Jarosław Dziadek. 2007. "Cholesterol Oxidase Is Required for Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *FEMS Microbiology Letters* 275 (1): 106–12.
- Bunik, Victoria I., and Alisdair R. Fernie. 2009. "Metabolic Control Exerted by the 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Reaction: A Cross-Kingdom Comparison of the Crossroad between Energy Production and Nitrogen Assimilation." *Biochemical Journal* 422 (3): 405–21.
- Capra, Emily J., and Michael T. Laub. 2012. "Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems." *Annual Review of Microbiology* 66 (June): 325–47.
- Chang, Jennifer C., Maurine D. Miner, Amit K. Pandey, Wendy P. Gill, Nada S. Harik, Christopher M. Sasseti, and David R. Sherman. 2009. "Igr Genes and Mycobacterium Tuberculosis Cholesterol Metabolism." *Journal of Bacteriology* 191 (16): 5232–39.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, et al. 1998a. "Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence." *Nature* 393 (6685): 537–44.
- . 1998b. "Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence: Erratum." *Nature* 396 (6707): 190–190.
- Cole, Stewart T. 1999. "Learning from the Genome Sequence of Mycobacterium Tuberculosis H37Rv." *FEBS Letters* 452 (1): 7–10.
- Commichau, Fabian M., Johannes GIBhardt, Sven Halbedel, Jan Gundlach, and Jörg Stülke. 2018. "A Delicate Connection: C-Di-AMP Affects Cell Integrity by Controlling Osmolyte Transport." *Trends in Microbiology* 26 (3): 175–85.
- Cowan-Jacob, Sandra W., Gabriele Fendrich, Paul W. Manley, Wolfgang Jahnke, Dorian Fabbro, Janis Liebetanz, and Thomas Meyer. 2005. "The Crystal Structure of a c-Src Complex in an Active Conformation Suggests Possible Steps in c-Src Activation." *Structure* 13 (6): 861–71.
- Cowley, Siobhan, Mary Ko, Neora Pick, Rayken Chow, Katrina J. Downing, Bhavna G. Gordhan, Joanna C. Betts, et al. 2004. "The Mycobacterium Tuberculosis Protein Serine/threonine Kinase PknG Is Linked to Cellular Glutamate/glutamine Levels and Is Important for Growth in Vivo." *Molecular Microbiology* 52 (6): 1691–1702.
- Daniel, Jaiyanth, Hédia Maamar, Chirajyoti Deb, Tatiana D. Sirakova, and Pappachan E. Kolattukudy. 2011. "Mycobacterium Tuberculosis Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-like Phenotype in Lipid-Loaded Macrophages." *PLoS Pathogens* 7 (6): e1002093.
- De Bondt, H. L., J. Rosenblatt, J. Jancarik, H. D. Jones, D. O. Morgan, and S. H. Kim. 1993. "Crystal Structure of Cyclin-Dependent Kinase 2." *Nature* 363 (6430): 595–602.
- Deutscher, Josef. 2008. "The Mechanisms of Carbon Catabolite Repression in Bacteria." *Current Opinion in Microbiology* 11 (2): 87–93.
- Durán, Rosario, Andrea Villarino, Marco Bellinzoni, Annemarie Wehenkel, Pablo

- Fernandez, Brigitte Boitel, Stewart T. Cole, Pedro M. Alzari, and Carlos Cerveñansky. 2005. "Conserved Autophosphorylation Pattern in Activation Loops and Juxtamembrane Regions of Mycobacterium Tuberculosis Ser/Thr Protein Kinases." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (3): 858–67.
- Durocher, D., J. Henckel, A. R. Fersht, and S. P. Jackson. 1999. "The FHA Domain Is a Modular Phosphopeptide Recognition Motif." *Molecular Cell* 4 (3): 387–94.
- Endicott, Jane A., Martin E. M. Noble, and Louise N. Johnson. 2012. "The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases." *Annual Review of Biochemistry* 81 (April): 587–613.
- England, P., A. Wehenkel, S. Martins, and S. Hoos. 2009. "The FHA- containing Protein GarA Acts as a Phosphorylation- dependent Molecular Switch in Mycobacterial Signaling." *FEBS*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.febslet.2008.12.036>.
- Favelyukis, S., J. H. Till, S. R. Hubbard, and W. T. Miller. 2001. "Structure and Autoregulation of the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Kinase." *Nature Structural Biology* 8 (12): 1058–63.
- Feehily, C., and K. A. G. Karatzas. 2013. "Role of Glutamate Metabolism in Bacterial Responses towards Acid and Other Stresses." *Journal of Applied Microbiology* 114 (1): 11–24.
- Galperin, Michael Y. 2018. "What Bacteria Want." *Environmental Microbiology* 20 (12): 4221–29.
- Gao, Rong, and Ann M. Stock. 2009. "Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins." *Annual Review of Microbiology* 63: 133–54.
- Gee, Christine L., Kadamba G. Papavinasasundaram, Sloane R. Blair, Christina E. Baer, Arnold M. Falick, David S. King, Jennifer E. Griffin, et al. 2012. "A Phosphorylated Pseudokinase Complex Controls Cell Wall Synthesis in Mycobacteria." *Science Signaling* 5 (208): ra7.
- Gengenbacher, Martin, and Stefan H. E. Kaufmann. 2012. "Mycobacterium Tuberculosis: Success through Dormancy." *FEMS Microbiology Reviews* 36 (3): 514–32.
- Gil, Magdalena, Martín Graña, Francisco J. Schopfer, Tristan Wagner, Ana Denicola, Bruce A. Freeman, Pedro M. Alzari, Carlos Batthyány, and Rosario Durán. 2013. "Inhibition of Mycobacterium Tuberculosis PknG by Non-Catalytic Rubredoxin Domain Specific Modification: Reaction of an Electrophilic Nitro-Fatty Acid with the Fe-S Center." *Free Radical Biology & Medicine* 65 (December): 150–61.
- Gil, Magdalena, Analía Lima, Bernardina Rivera, Jessica Rossello, Estefanía Urdániz, Alessandro Cascioferro, Federico Carrión, et al. 2018. "New Substrates and Interactors of the Mycobacterial Serine/Threonine Protein Kinase PknG Identified by a Tailored Interactomic Approach." *Journal of Proteomics*, September. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.013>.
- Glickman, M. S., J. S. Cox, and W. R. Jacobs Jr. 2000. "A Novel Mycolic Acid Cyclopropane Synthetase Is Required for Cording, Persistence, and Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *Molecular Cell* 5 (4): 717–27.
- Hameed, H. M. Adnan, Md Mahmudul Islam, Chiranjibi Chhotaray, Changwei Wang, Yang Liu, Yaoju Tan, Xinjie Li, et al. 2018. "Molecular Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-Mycobacterium Tuberculosis Strains." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8 (April): 114.

- Hanks, S. K., A. M. Quinn, and T. Hunter. 1988. "The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains." *Science* 241 (4861): 42–52.
- Helmann, John D. 2016. "Bacillus Subtilis Extracytoplasmic Function (ECF) Sigma Factors and Defense of the Cell Envelope." *Current Opinion in Microbiology* 30 (April): 122–32.
- Hubbard, S. R., L. Wei, L. Ellis, and W. A. Hendrickson. 1994. "Crystal Structure of the Tyrosine Kinase Domain of the Human Insulin Receptor." *Nature* 372 (6508): 746–54.
- Hu, Jiancheng, Edward C. Stites, Haiyang Yu, Elizabeth A. Germino, Hiruy S. Meharena, Philip J. S. Stork, Alexandr P. Kornev, Susan S. Taylor, and Andrey S. Shaw. 2013. "Allosteric Activation of Functionally Asymmetric RAF Kinase Dimers." *Cell* 154 (5): 1036–46.
- Hunter, T. 2000. "Signaling--2000 and beyond." *Cell* 100 (1): 113–27.
- Huse, Morgan, and John Kuriyan. 2002. "The Conformational Plasticity of Protein Kinases." *Cell* 109 (3): 275–82.
- Jackson, Mary, Gustavo Stadthagen, and Brigitte Gicquel. 2007. "Long-Chain Multiple Methyl-Branched Fatty Acid-Containing Lipids of Mycobacterium Tuberculosis: Biosynthesis, Transport, Regulation and Biological Activities." *Tuberculosis* 87 (2): 78–86.
- Janin, Yves L. 2007. "Antituberculosis Drugs: Ten Years of Research." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (7): 2479–2513.
- Jeffrey, P. D., A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massagué, and N. P. Pavletich. 1995. "Mechanism of CDK Activation Revealed by the Structure of a cyclinA-CDK2 Complex." *Nature* 376 (6538): 313–20.
- Jenal, Urs, Alberto Reinders, and Christian Lori. 2017. "Cyclic Di-GMP: Second Messenger Extraordinaire." *Nature Reviews. Microbiology* 15 (5): 271–84.
- Johnson, L. N., and R. J. Lewis. 2001. "Structural Basis for Control by Phosphorylation." *Chemical Reviews* 101 (8): 2209–42.
- Kang, Choong-Min, Seeta Nyayapathy, Jung-Yeon Lee, Joo-Won Suh, and Robert N. Husson. 2008. "Wag31, a Homologue of the Cell Division Protein DivIVA, Regulates Growth, Morphology and Polar Cell Wall Synthesis in Mycobacteria." *Microbiology* 154 (Pt 3): 725–35.
- Keren, Iris, Shoko Minami, Eric Rubin, and Kim Lewis. 2011. "Characterization and Transcriptome Analysis of Mycobacterium Tuberculosis Persisters." *mBio* 2 (3): e00100–00111.
- Keren, Iris, Devang Shah, Amy Spoering, Niilo Kaldalu, and Kim Lewis. 2004. "Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 186 (24): 8172–80.
- Khan, Mehak Zahoor, Ashima Bhaskar, Sandeep Upadhyay, Pooja Kumari, Raju S. Rajmani, Preeti Jain, Amit Singh, Dhiraj Kumar, Neel Sarovar Bhavesh, and Vinay Kumar Nandicoori. 2017. "Protein Kinase G Confers Survival Advantage to Mycobacterium Tuberculosis during Latency-like Conditions." *The Journal of Biological Chemistry* 292 (39): 16093–108.
- Khan, Shazia, Sathya Narayanan Nagarajan, Amit Parikh, Sharmishtha Samantaray, Albel Singh, Devanand Kumar, Rajendra P. Roy, Apoorva Bhatt, and Vinay Kumar Nandicoori. 2010. "Phosphorylation of Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase InhA Impacts Mycobacterial Growth and Survival." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (48): 37860–71.
- Knighton, D. R., J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S.

- Taylor, and J. M. Sowadski. 1991. "Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase." *Science* 253 (5018): 407–14.
- Krebs, E. G., and J. A. Beavo. 1979. "Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes." *Annual Review of Biochemistry* 48: 923–59.
- Laub, Michael T., and Mark Goulian. 2007. "Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways." *Annual Review of Genetics* 41: 121–45.
- Leigh, John A., and Jeremy A. Dodsworth. 2007. "Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea." *Annual Review of Microbiology* 61: 349–77.
- Liau, Nicholas P. D., Artem Laktyushin, Isabelle S. Lucet, James M. Murphy, Shenggen Yao, Eden Whitlock, Kimberley Callaghan, Nicos A. Nicola, Nadia J. Kershaw, and Jeffrey J. Babon. 2018. "The Molecular Basis of JAK/STAT Inhibition by SOCS1." *Nature Communications* 9 (1): 1558.
- Lin, Philana Ling, and Joanne L. Flynn. 2010. "Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target." *Journal of Immunology* 185 (1): 15–22.
- Lisa, María-Natalia, Magdalena Gil, Gwénaëlle André-Leroux, Nathalie Barilone, Rosario Durán, Ricardo M. Biondi, and Pedro M. Alzari. 2015. "Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from *Mycobacterium Tuberculosis*." *Structure* 23 (6): 1039–48.
- Lowe, E. D., M. E. Noble, V. T. Skamnaki, N. G. Oikonomakos, D. J. Owen, and L. N. Johnson. 1997. "The Crystal Structure of a Phosphorylase Kinase Peptide Substrate Complex: Kinase Substrate Recognition." *The EMBO Journal* 16 (22): 6646–58.
- Madhusudan, E. A. Trafny, N. H. Xuong, J. A. Adams, L. F. Ten Eyck, S. S. Taylor, and J. M. Sowadski. 1994. "cAMP-Dependent Protein Kinase: Crystallographic Insights into Substrate Recognition and Phosphotransfer." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 3 (2): 176–87.
- Makinoshima, Hideki, and Michael S. Glickman. 2005. "Regulation of *Mycobacterium Tuberculosis* Cell Envelope Composition and Virulence by Intramembrane Proteolysis." *Nature* 436 (7049): 406–9.
- Marrero, Joeli, Kyu Y. Rhee, Dirk Schnappinger, Kevin Pethe, and Sabine Ehrt. 2010. "Gluconeogenic Carbon Flow of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates Is Critical for *Mycobacterium Tuberculosis* to Establish and Maintain Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (21): 9819–24.
- McKinney, J. D., K. Höner zu Bentrup, E. J. Muñoz-Elías, A. Miczak, B. Chen, W. T. Chan, D. Swenson, J. C. Sacchettini, W. R. Jacobs Jr, and D. G. Russell. 2000. "Persistence of *Mycobacterium Tuberculosis* in Macrophages and Mice Requires the Glyoxylate Shunt Enzyme Isocitrate Lyase." *Nature* 406 (6797): 735–38.
- Mortuza, Gulnazar B., Dario Hermida, Anna-Kathrine Pedersen, Sandra Segura-Bayona, Blanca López-Méndez, Pilar Redondo, Patrick Rüther, et al. 2018. "Molecular Basis of Tosl-2-Like Kinase 2 Activation." *Nature Communications* 9 (1): 2535.
- Movahedzadeh, Farahnaz, Debbie A. Smith, Richard A. Norman, Premkumar Dinadayala, Judith Murray-Rust, David G. Russell, Sharon L. Kendall, et al. 2004. "The *Mycobacterium Tuberculosis* *ino1* Gene Is Essential for Growth and Virulence." *Molecular Microbiology* 51 (4): 1003–14.
- Muñoz-Dorado, J., S. Inouye, and M. Inouye. 1991. "A Gene Encoding a Protein Serine/threonine Kinase Is Required for Normal Development of *M. Xanthus*, a

- Gram-Negative Bacterium." *Cell* 67 (5): 995–1006.
- Muñoz-Elías, Ernesto J., Anna M. Upton, Joseph Cherian, and John D. McKinney. 2006. "Role of the Methylcitrate Cycle in Mycobacterium Tuberculosis Metabolism, Intracellular Growth, and Virulence." *Molecular Microbiology* 60 (5): 1109–22.
- Narayan, Azeet, Preeti Sachdeva, Kirti Sharma, Adesh K. Saini, Anil K. Tyagi, and Yogendra Singh. 2007. "Serine Threonine Protein Kinases of Mycobacterial Genus: Phylogeny to Function." *Physiological Genomics* 29 (1): 66–75.
- Nesbitt, Natasha M., Xinxin Yang, Patricia Fontán, Irina Kolesnikova, Issar Smith, Nicole S. Sampson, and Eugenie Dubnau. 2010. "A Thiolase of Mycobacterium Tuberculosis Is Required for Virulence and Production of Androstenedione and Androstadienedione from Cholesterol." *Infection and Immunity* 78 (1): 275–82.
- Nguyen, Liem, and Jean Pieters. 2009. "Mycobacterial Subversion of Chemotherapeutic Reagents and Host Defense Tactics: Challenges in Tuberculosis Drug Development." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49: 427–53.
- Niebisch, Axel, Armin Kabus, Christian Schultz, Brita Weil, and Michael Bott. 2006. "Corynebacterial Protein Kinase G Controls 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Activity via the Phosphorylation Status of the OdhI Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (18): 12300–307.
- Noble, Martin E. M., Jane A. Endicott, and Louise N. Johnson. 2004. "Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure." *Science* 303 (5665): 1800–1805.
- Nolen, Brad, Susan Taylor, and Gourisankar Ghosh. 2004. "Regulation of Protein Kinases; Controlling Activity through Activation Segment Conformation." *Molecular Cell* 15 (5): 661–75.
- Nosho, Kazuki, Hiroko Fukushima, Takehiro Asai, Masahiro Nishio, Reiko Takamaru, Koseki Joseph Kobayashi-Kirschvink, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, and Haruhiko Masaki. 2018. "cAMP-CRP Acts as a Key Regulator for the Viable but Non-Culturable State in Escherichia Coli." *Microbiology* 164 (3): 410–19.
- Nott, Timothy J., Geoff Kelly, Lasse Stach, Jiejun Li, Sarah Westcott, Dony Patel, Debbie M. Hunt, et al. 2009. "An Intramolecular Switch Regulates Phosphoindependent FHA Domain Interactions in Mycobacterium Tuberculosis." *Science Signaling* 2 (63): ra12.
- O'Hare, Helen M., Rosario Durán, Carlos Cerveñansky, Marco Bellinzoni, Anne Marie Wehenkel, Otto Pritsch, Gonzalo Obal, et al. 2008. "Regulation of Glutamate Metabolism by Protein Kinases in Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 70 (6): 1408–23.
- Ortega, Corrie, Reiling Liao, Lindsey N. Anderson, Tige Rustad, Anja R. Ollodart, Aaron T. Wright, David R. Sherman, and Christoph Grundner. 2014. "Mycobacterium Tuberculosis Ser/Thr Protein Kinase B Mediates an Oxygen-Dependent Replication Switch." *PLoS Biology* 12 (1): e1001746.
- Pandey, Amit K., and Christopher M. Sassetti. 2008. "Mycobacterial Persistence Requires the Utilization of Host Cholesterol." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (11): 4376–80.
- Parish, Tanya. 2014. "Two-Component Regulatory Systems of Mycobacteria." *Microbiology Spectrum* 2 (1): MGM2–0010 – 2013.
- Parish, Tanya, Debbie A. Smith, Sharon Kendall, Nicola Casali, Gregory J. Bancroft, and Neil G. Stoker. 2003. "Deletion of Two-Component Regulatory

- Systems Increases the Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *Infection and Immunity* 71 (3): 1134–40.
- Paroha, Ruchi, Rashmi Chourasia, Rajesh Mondal, and Shivendra K. Chaurasiya. 2018. "PknG Supports Mycobacterial Adaptation in Acidic Environment." *Molecular and Cellular Biochemistry* 443 (1-2): 69–80.
- Paul, Ralf, Tina Jaeger, Sören Abel, Irene Wiederkehr, Marc Folcher, Emanuele G. Biondi, Michael T. Laub, and Urs Jenal. 2008. "Allosteric Regulation of Histidine Kinases by Their Cognate Response Regulator Determines Cell Fate." *Cell* 133 (3): 452–61.
- Pawlowski, Andrzej, Marianne Jansson, Markus Sköld, Martin E. Rottenberg, and Gunilla Källenius. 2012. "Tuberculosis and HIV Co-Infection." *PLoS Pathogens* 8 (2): e1002464.
- Pérez, J., A. Castañeda-García, H. Jenke-Kodama, R. Müller, and J. Muñoz-Dorado. 2008. "Eukaryotic-like Protein Kinases in the Prokaryotes and the Myxobacterial Kinome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (41): 15950–55.
- Primm, T. P., S. J. Andersen, V. Mizrahi, D. Avarbock, H. Rubin, and C. E. Barry 3rd. 2000. "The Stringent Response of Mycobacterium Tuberculosis Is Required for Long-Term Survival." *Journal of Bacteriology* 182 (17): 4889–98.
- Prisic, Sladjana, and Robert N. Husson. 2014. "Mycobacterium Tuberculosis Serine/Threonine Protein Kinases." *Microbiology Spectrum* 2 (5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0006-2013>.
- Rieck, Barbara, Giulia Degiacomi, Michael Zimmermann, Alessandro Cascioferro, Francesca Boldrin, Natalie R. Lazar-Adler, Andrew R. Bottrill, et al. 2017. "PknG Senses Amino Acid Availability to Control Metabolism and Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *PLoS Pathogens* 13 (5): e1006399.
- Salah Ud-Din, Abu Iftiaf Md, and Anna Roujeinikova. 2017. "Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins: A Core Sensing Element in Prokaryotes and Archaea." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 74 (18): 3293–3303.
- Savvi, Suzana, Digby F. Warner, Bavesh D. Kana, John D. McKinney, Valerie Mizrahi, and Stephanie S. Dawes. 2008. "Functional Characterization of a Vitamin B12-Dependent Methylmalonyl Pathway in Mycobacterium Tuberculosis: Implications for Propionate Metabolism during Growth on Fatty Acids." *Journal of Bacteriology* 190 (11): 3886–95.
- Scherr, Nicole, Srinivas Honnappa, Gabriele Kunz, Philipp Mueller, Rajesh Jayachandran, Fritz Winkler, Jean Pieters, and Michel O. Steinmetz. 2007. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12151–56.
- Scherr, Nicole, Philipp Müller, Damir Perisa, Benoît Combaluzier, Paul Jenö, and Jean Pieters. 2009. "Survival of Pathogenic Mycobacteria in Macrophages Is Mediated through Autophosphorylation of Protein Kinase G." *Journal of Bacteriology* 191 (14): 4546–54.
- Schnappinger, Dirk, Sabine Ehrt, Martin I. Voskuil, Yang Liu, Joseph A. Mangan, Irene M. Monahan, Gregory Dolganov, et al. 2003. "Transcriptional Adaptation of Mycobacterium Tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment." *The Journal of Experimental Medicine* 198 (5): 693–704.
- Schobert, M., and H. Görisch. 2001. "A Soluble Two-Component Regulatory System Controls Expression of Quinoprotein Ethanol Dehydrogenase (QEDH)

- but Not Expression of Cytochrome c(550) of the Ethanol-Oxidation System in *Pseudomonas Aeruginosa*." *Microbiology* 147 (Pt 2): 363–72.
- Sieker, Larry C., Ronald E. Stenkamp, and Jean Legall. 1994. "[14] Rubredoxin in Crystalline State." In *Methods in Enzymology*, 243:203–16. Academic Press.
- Tiwari, Divya, Rajnish Kumar Singh, Kasturi Goswami, Sunil Kumar Verma, Balaji Prakash, and Vinay Kumar Nandicoori. 2009. "Key Residues in Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinase G Play a Role in Regulating Kinase Activity and Survival in the Host." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27467–79.
- Treatment Strategies for MDR-TB and XDR-TB*. 2014. World Health Organization.
- Tretter, Laszlo, and Vera Adam-Vizi. 2005. "Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase: A Target and Generator of Oxidative Stress." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360 (1464): 2335–45.
- Västermark, Ake, and Milton H. Saier Jr. 2014. "The Involvement of Transport Proteins in Transcriptional and Metabolic Regulation." *Current Opinion in Microbiology* 18 (April): 8–15.
- Vázquez-Laslop, Nora, Hyunwoo Lee, and Alexander A. Neyfakh. 2006. "Increased Persistence in *Escherichia Coli* Caused by Controlled Expression of Toxins or Other Unrelated Proteins." *Journal of Bacteriology* 188 (10): 3494–97.
- Ventura, Marcello, Barbara Rieck, Francesca Boldrin, Giulia Degiacomi, Marco Bellinzoni, Nathalie Barilone, Faisal Alzaidi, Pedro M. Alzari, Riccardo Manganelli, and Helen M. O'Hare. 2013. "GarA Is an Essential Regulator of Metabolism in *Mycobacterium Tuberculosis*." *Molecular Microbiology* 90 (2): 356–66.
- Villarino, A., R. Duran, A. Wehenkel, P. Fernandez, P. England, P. Brodin, S. T. Cole, et al. 2005. "Proteomic Identification of *M.tuberculosis* Protein Kinase Substrates: PknB Recruits GarA, a FHA Domain-Containing Protein, Through Activation Loop-Mediated Interactions." *Journal of Molecular Biology* 350 (5): 953–63.
- Wagner, Tristan, Marco Bellinzoni, Annemarie Wehenkel, Helen M. O'Hare, and Pedro M. Alzari. 2011. "Functional Plasticity and Allosteric Regulation of α -Ketoglutarate Decarboxylase in Central Mycobacterial Metabolism." *Chemistry & Biology* 18 (8): 1011–20.
- Walburger, Anne, Anil Koul, Giorgio Ferrari, Liem Nguyen, Cristina Prescianotto-Baschong, Kris Huygen, Bert Klebl, Charles Thompson, Gerald Bacher, and Jean Pieters. 2004. "Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival within Macrophages." *Science* 304 (5678): 1800–1804.
- Wehenkel, Annemarie, Marco Bellinzoni, Martin Graña, Rosario Duran, Andrea Villarino, Pablo Fernandez, Gwénaëlle Andre-Leroux, et al. 2008. "Mycobacterial Ser/Thr Protein Kinases and Phosphatases: Physiological Roles and Therapeutic Potential." *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (1): 193–202.
- "WHO | Global Tuberculosis Report 2018." 2018, November. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
- "WHO | Key Bottlenecks in M/XDR-TB Control and Patient Care." 2012, October. <http://www.who.int/tb/challenges/mdr/bottlenecks/en/index.html>.
- Wittwer, Matthias, and Sonja A. Dames. 2015. "Expression and Purification of the Natively Disordered and Redox Sensitive Metal Binding Regions of *Mycobacterium Tuberculosis* Protein Kinase G." *Protein Expression and Purification* 111 (July): 68–74.
- Wittwer, Matthias, Qi Luo, Ville R. I. Kaila, and Sonja A. Dames. 2016. "Oxidative Unfolding of the Rubredoxin Domain and the Natively Disordered N-Terminal

- Region Regulate the Catalytic Activity of Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinase G." *The Journal of Biological Chemistry* 291 (53): 27062–72.
- Wolff, Kerstin A., Hoa T. Nguyen, Richard H. Cartabuke, Ajay Singh, Sam Ogwang, and Liem Nguyen. 2009. "Protein Kinase G Is Required for Intrinsic Antibiotic Resistance in Mycobacteria." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8): 3515–19.
- Wolff, Kerstin A., Andres H. de la Peña, Hoa T. Nguyen, Thanh H. Pham, L. Mario Amzel, Sandra B. Gabelli, and Liem Nguyen. 2015. "A Redox Regulatory System Critical for Mycobacterial Survival in Macrophages and Biofilm Development." *PLoS Pathogens* 11 (4): e1004839.
- Wright, David P., and Andrew T. Ulijasz. 2014. "Regulation of Transcription by Eukaryotic-like Serine-Threonine Kinases and Phosphatases in Gram-Positive Bacterial Pathogens." *Virulence* 5 (8): 863–85.
- Xie, X., Y. Gu, T. Fox, J. T. Coll, M. A. Fleming, W. Markland, P. R. Caron, K. P. Wilson, and M. S. Su. 1998. "Crystal Structure of JNK3: A Kinase Implicated in Neuronal Apoptosis." *Structure* 6 (8): 983–91.
- Xu, W., S. C. Harrison, and M. J. Eck. 1997. "Three-Dimensional Structure of the Tyrosine Kinase c-Src." *Nature* 385 (6617): 595–602.
- Yan, Dalai. 2007. "Protection of the Glutamate Pool Concentration in Enteric Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (22): 9475–80.
- Yang, Jing, Peter Cron, Valerie M. Good, Vivienne Thompson, Brian A. Hemmings, and David Barford. 2002. "Crystal Structure of an Activated Akt/protein Kinase B Ternary Complex with GSK3-Peptide and AMP-PNP." *Nature Structural Biology* 9 (12): 940–44.
- Yang, Jing, Peter Cron, Vivienne Thompson, Valerie M. Good, Daniel Hess, Brian A. Hemmings, and David Barford. 2002. "Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation." *Molecular Cell* 9 (6): 1227–40.
- Yang, Xinxin, Natasha M. Nesbitt, Eugenie Dubnau, Issar Smith, and Nicole S. Sampson. 2009. "Cholesterol Metabolism Increases the Metabolic Pool of Propionate in Mycobacterium Tuberculosis." *Biochemistry* 48 (18): 3819–21.
- Young, Tracy A., Benedicte Delagoutte, James A. Endrizzi, Arnold M. Falick, and Tom Alber. 2003. "Structure of Mycobacterium Tuberculosis PknB Supports a Universal Activation Mechanism for Ser/Thr Protein Kinases." *Nature Structural Biology* 10 (3): 168–74.
- Zhang, Xuewu, Jodi Gureasko, Kui Shen, Philip A. Cole, and John Kuriyan. 2006. "An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor." *Cell* 125 (6): 1137–49.
- Zhang, Yanjia J., and Eric J. Rubin. 2013. "Feast or Famine: The Host-Pathogen Battle over Amino Acids." *Cellular Microbiology* 15 (7): 1079–87.
- Zschiedrich, Christopher P., Victoria Keidel, and Hendrik Szurmant. 2016. "Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction." *Journal of Molecular Biology* 428 (19): 3752–75.

Objetivos

El objetivo general de la presente tesis es comprender con detalle atómico la especificidad y reactividad de quinasa PknG de *Mycobacterium tuberculosis*. Para ello se utilizará un enfoque interdisciplinario que involucra el uso de técnicas de bioquímica enzimáticas y de simulación computacional; asimismo se busca contribuir a la comprensión las señales que detecta el dominio rubredoxina de esta proteína y cómo este modula la actividad quinasa, en el contexto de la fisiología de *Mycobacterium tuberculosis* en condiciones de estrés nitro oxidativo.

Capítulo 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Métodos computacionales

2.1.1. Dinámica molecular

La dinámica molecular es una técnica de simulación computacional que, utilizando un modelo de interacción entre los átomos que conforman las moléculas (un potencial de interacción basado ya sea en la mecánica clásica y/o la mecánica cuántica), permite observar el movimiento de las partículas mediante la integración numérica de las ecuaciones de movimiento. Esta técnica fue concebida dentro de la física teórica, y ahora es ampliamente utilizada en el campo de la biofísica en sistemas con gran cantidad de átomos, como por ejemplo, las proteínas (cita). Dado el tamaño de estos sistemas, resulta imposible su tratamiento completo con mecánica cuántica con el poder computacional existente hasta el momento; es por ello que para sistemas en los que no es necesario un detalle de la distribución electrónica, se utiliza la Mecánica Molecular (MM), con un modelo de energía potencial basado en la mecánica clásica. En este modelo se ignora el movimiento de los electrones, y se calcula la energía exclusivamente en función de las posiciones de los núcleos.

2.1.1.1. Campos de fuerza clásicos

En los métodos de mecánica molecular, la energía potencial viene dada por lo que se denomina campo de fuerza, una expresión de la energía potencial dependiente de las coordenadas de los núcleos y una serie de parámetros. En este trabajo, se utilizó la expresión del campo de fuerza AMBER 99SB (Hornak et al. 2006), el cual contiene dos tipos de contribuciones: las de unión y las de no unión. Las contribuciones de unión se calculan para átomos formando un enlace o como máximo a 3 átomos de distancia, e incluyen penalidades para las desviaciones respecto de su valor de equilibrio de distancias de enlace, ángulos y ángulos diedros. Mientras que las dos primeras se representan a través de un potencial armónico centrado en la distancia de equilibrio, los ángulos diedros o torsiones están descritos con una función periódica. Las contribuciones de no unión, se

computan entre átomos que están en diferentes moléculas o a más de 3 enlaces de distancia, y están compuestas por interacciones electrostáticas, basadas en la ley de Coulomb, y un potencial de Lennard-Jones. El potencial de Lennard-Jones describe en forma aproximada las interacciones dispersivas y de repulsión, esta última originada por el principio de exclusión de Pauli a distancias muy cortas. La expresión de la energía potencial resulta en el caso del campo de fuerzas AMBER en:

$$E(r^N) = \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_{bi}}{2} (r_i - r_{io}) + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_{\theta i}}{2} (\Theta_i - \Theta_{i0}) + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} \cos(\eta\varpi - \gamma) \\ + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left\{ \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\}$$

(ecuación 2.1)

El primer término modela la contribución de estiramiento de los enlaces, descrito través de un potencial armónico. $k_{b,i}$ corresponde a la constante de fuerza asociada a la unión i y r_{io} a la distancia de equilibrio de la misma unión. El segundo término refleja las contribuciones dadas por las flexiones angulares. Estas también se representan con un potencial armónico de constante $k_{\theta,i}$ y valor de equilibrio θ_0 . El término asociado a los ángulos diedros tiene tres parámetros: V_n que corresponde a la barrera energética asociada a la rotación entre dos mínimos sucesivos, η , que indica el número de mínimos encontrados entre 0° y 360° , y γ , que corresponde a la fase de la función sinusoidal.

El último término de la ecuación 2.1 contiene las contribuciones de no unión, dependientes de la distancia entre pares de átomos, r_{ij} . La primera parte, corresponde al potencial de Van der Waals, y contiene los parámetros ϵ_{ij} (asociado a la profundidad del pozo de energía) y σ_{ij} , correspondiente a la distancia entre los átomos concerniente al mínimo de energía. La segunda parte corresponde al potencial electrostático que contiene como parámetros las cargas sobre los átomos q_i y q_j . En el campo de fuerzas de AMBER, la distribución de cargas es representada a través de cargas puntuales ubicadas en el centro de las coordenadas de cada átomo; estas cargas se obtienen de manera tal de reproducir el potencial electrostático de la molécula, a partir de cálculos cuánticos. La obtención de valores

de las cargas parciales se realiza a través del cómputo de una grilla de potencial electrostático determinada utilizando un hamiltoniano cuántico (ya sea Hartree-Fock/6-31G* o AM1-bcc) (Jakalian, Jack, and Bayly 2002) ajustando los valores de las cargas puntuales en dos pasos, obteniendo primero los valores de los heteroátomos y, restringiendo el valor de los heteroátomos al obtenido en el paso anterior, de los hidrógenos (Bayly et al. 1993).

Cabe destacar que las interacciones de no unión no se computan para los átomos enlazados (1-2) ni a un átomo de distancia (1-3), y que dicha contribución se escala en el caso de dos átomos de distancia (1-4). Esto es para no contabilizar dos veces la interacción de los átomos que ya se encuentra de forma implícita en los parámetros de enlace de los mismos. El valor de escalado utilizado en esta tesis es de 1,2 para la Electrostatica (1-4) y 2,0 para las interacciones de Lennard-Jones.

Finalmente, puede observarse que la expresión de la energía potencial no es suficiente para definir un campo de fuerza. El campo de fuerza es constituido además por una gran cantidad de parámetros asociados a cada uno de los sumandos en la energía potencial. Para el caso de simulación de proteínas, el campo de fuerza de AMBER contiene los parámetros asociados a los aminoácidos naturales presentes en la mayoría de las proteínas, en sus distintos estados de oxidación o protonación, cuando corresponde. En el campo de fuerza de AMBER, los átomos dentro de cada residuo reciben un nombre y "tipo" de átomo. Los tipos permiten que no sea necesario incluir parámetros para cada átomo incluido en cada uno de los aminoácidos. Distintas especies pueden poseer el mismo tipo de átomo, y los parámetros asociados a las uniones, los ángulos y los diedros (los denominados parámetros de unión) se dan por tipo de átomo, en lugar de para cada átomo de cada residuo en particular. Si bien en el campo de fuerza se incluyen parámetros específicos para todos los aminoácidos naturales y otras moléculas comúnmente encontradas en los sistemas biológicos, para incluir modificaciones post-traduccionales, es necesario obtener parámetros para realizar la simulación.

2.1.1.2. Radio de Corte

A fin de disminuir el costo computacional asociado a los términos de no unión, se utiliza un radio de corte, de modo que los átomos que se encuentran a una distancia mayor que este radio no sean contabilizados para calcular las interacciones. En el caso de las interacciones de Lennard-Jones, al ser de corto alcance, esto no genera un problema siempre que el radio de corte sea lo suficientemente grande.

2.1.1.3. Condiciones periódicas

Por otro lado, en las interacciones coulómbicas, de mayor alcance, en los casos en que se utilizan condiciones periódicas de contorno en la simulación se emplean las sumas de Ewald (Salomon-Ferrer et al. 2013); esta metodología es utilizada para calcular las interacciones electrostáticas totales entre los átomos presentes en cada celda unidad. La energía electrostática se calcula en dos partes: una en la cual las interacciones electrostáticas de corto alcance se calculan en el espacio real y otra (en el espacio recíproco) en la que se calcula utilizando la transformada de Fourier. Este procedimiento tiene como ventaja una convergencia mucho más rápida con respecto a los cálculos de interacciones directas. Así, se logra tener en cuenta las interacciones electrostáticas de largo alcance más allá del radio de corte de las interacciones de no unión, en forma altamente eficiente.

2.1.1.4. Modelo de Agua Explícita

Por último, cabe realizar un comentario especial referido a la forma de representación de las moléculas de agua en el campo de fuerza; la cual representa un factor importante en el cálculo, dada la gran cantidad de moléculas normalmente presentes en el sistema. En los cálculos realizados en esta tesis, se utilizó un modelo de agua simple denominado TIP3P (Price and Brooks 2004). En los modelos de agua simples, cada molécula de agua se mantiene en una geometría rígida, y la interacción entre moléculas de agua se describe a través de interacciones Coulombianas y de Lennard-Jones. En el modelo TIP3P se ubican tres cargas puntuales, una sobre cada átomo de la molécula. La carga negativa ubicada en el átomo de oxígeno es compensada por las cargas positivas en los átomos de hidrógeno. La distancia entre el oxígeno y los átomos de hidrógeno, así

como el ángulo H-O-H se mantienen fijos, mediante el uso del algoritmo de SHAKE (Settle 1992).

2.1.1.5. Integración de la Dinámica Molecular.

Hasta aquí, se ha descrito cómo se construye el potencial clásico, pero no como se calcula el movimiento, ni qué otros elementos son necesarios para realizar las simulaciones en fase condensada. Para realizar los movimientos en cada paso de integración se utiliza un algoritmo conocido como *Velocity Verlet* (Grubmüller et al. 1991). Este algoritmo fue desarrollado para resolver las ecuaciones de movimiento de Newton de forma eficiente, permitiendo calcular las velocidades (necesarias para determinar la energía cinética y, por lo tanto la temperatura) y posición de los átomos en el mismo paso de integración.

2.1.1.6. Termostato y barostato

Otros requisitos para realizar las simulaciones en un ensamble Isotérmico-Isobárico (NPT), importante para sistemas de interés biológico, es contar tanto con un termostato como con un barostato, a fin de mantener estas propiedades oscilando en torno a un valor dado (300 K y 1 bar). El termostato utilizado para las simulaciones de esta tesis fue el termostato de Berendsen (Berendsen et al. 1984), el cual utiliza un decaimiento exponencial de las fluctuaciones de la energía cinética (a una temperatura T_0 con una constante de tiempo (τ)) (ecuación 2.2).

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}$$

(ecuación 2.2)

Lo mismo sucede con la presión: dado que los sistemas biológicos se encuentran a presión constante, es necesario conservar esta propiedad oscilando en un valor dado. Para ello se utilizó la misma estrategia, realizando las simulaciones con el barostato de Berendsen (Berendsen et al. 1984).

2.1.1.7. RMSD

Una de las técnicas más utilizadas para analizar los cambios de una molécula a lo largo de una trayectoria respecto a una referencia es la desviación del cuadrático medio, definida como:

$$RMSD_j = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{j,i} - x_{ref,i})^2}$$

(ecuación 2.3)

donde N es el número de átomos del sistema, $x_{j,i}$ es la posición del átomo i en la foto j; $x_{ref,i}$ es la posición del átomo i en la foto de referencia. Se pueden realizar cálculos de RMSD a lo largo de una dinámica molecular para observar, de forma global, que le sucede al sistema respecto a la referencia.

2.1.2. Modelado por homología o comparativo

Para algunas proteínas de las cuales no conocemos su estructura tridimensional (o parte de la misma), podemos construir un modelo basado en estructuras que sí se encuentran resueltas, que tienen similitud a nivel de secuencia con la proteína objetivo.

El *software* elegido en esta tesis para realizar modelos fue MODELLER (Webb and Sali 2016), el cual posee un *pipeline* general que mediante el uso de estructuras que cumplan con un umbral de identidad de secuencia con respecto a aquel complejo que se desea modelar (para que los modelos sean de buena calidad, se recomienda una identidad mayor al 50% en los moldes) permite realizar el modelo en cuestión.

MODELLER implementa un modelado comparativo de estructuras de proteínas que se basa en la satisfacción de restricciones espaciales como pueden ser:

- Restricciones en las distancias y ángulos diedros en la secuencia objetivo, extraídas de su alineamiento con las estructuras molde.

- Restricciones estereoquímicas como largo de uniones y preferencia en ángulos de unión, obtenidas del campo de fuerzas CHARMM-22 (Brooks et al. 1983) .

- Preferencias determinadas estadísticamente para ángulos diedro y para distancias en enlaces de no unión, obtenidas de un conjunto representativo de estructuras resueltas de proteínas.

Estas restricciones espaciales, expresadas como funciones de densidad de probabilidad, son combinadas en una función objetivo que es optimizada por combinaciones de gradientes conjugados y mecánica molecular con *simulated annealing* -recocido simulado-- . En términos prácticos, dadas las estructuras molde, se va "montando" la secuencia a modelar posición a posición satisfaciendo las restricciones ya enumeradas, teniendo en cuenta el alineamiento de la proteína a modelar con los templados. Se comienza determinando la estructura de la cadena principal y luego se modela la posición de las cadenas laterales.

Las restricciones que se toman en cuenta para el *simulated annealing* son evaluadas en base a un potencial denominado DOPE 62 (*Discrete Optimized Protein Energy*). Este potencial se define como el logaritmo negativo de la densidad de probabilidad conjunta de ocurrencia de las coordenadas cartesianas atómicas entre todos los pares de átomos. DOPE puede ser pensado como un potencial de interacciones de a pares, donde la energía se determina a partir de datos empíricos derivados de estructuras conocidas.

La densidad de probabilidad conjunta puede expresarse de la siguiente manera:

$$p(x_1, x_2, \dots, x_n) \approx \prod_{i \neq j}^N p(x_i, x_j) / \left(\prod_i^N p(x_i) \right)^{N-2} \propto \prod_{i \neq j}^N p(x_i, x_j)$$

(ecuación 2.4)

Donde p es la función de densidad de probabilidad, el vector x_i representa las coordenadas cartesianas del átomo, i , N es la cantidad de átomos del templado y vemos que evoluciona proporcionalmente tratando los átomos de a pares. En otras palabras, se verán beneficiadas energéticamente configuraciones observadas en

estructuras conocidas y se verán penalizadas configuraciones atómicas no observadas.

De estos términos pareados es más simple conocer su expresión:

$$P_{nm}(r) = N_{mn}(r) / \sum_{r_j} N_{mn}(r_j) \Delta r$$

(ecuación 2.5)

Donde m y n denotan tipos de átomos y $M_{mn}(r)$ es el número de pares de átomos (m, n) dentro de la distancia $(-r, r)$.

Calculado este potencial sobre las estructuras que sirven de templado se va generando la nueva estructura de manera de minimizar la energía en base a este potencial, en donde se evalúa con el potencial generado la estructura a generar satisfaciendo las restricciones espaciales obtenidas.

2.1.3. Campo de fuerza FoldX

Este tipo de campo de fuerza empírico permite una evaluación rápida y cuantitativa de interacciones importantes que contribuyen a la estabilidad de las proteínas y/o complejos proteicos. En particular, permite evaluar en forma sencilla el efecto de miles de mutantes sobre una cadena polipeptídica.

FoldX utiliza una descripción atomística de la estructura proteica y una función de puntuación “energética” que incluye términos que se han encontrado como importantes descriptores para la estabilidad proteica (Schymkowitz et al. 2005). La energía libre de “desplegado” (ΔG) de la molécula de interés es calculada utilizando la siguiente ecuación :

$$\Delta G = W_{vdw} \Delta G_{vdw} + W_{solH} \Delta G_{solvH} + W_{solP} \Delta G_{solP} + \\ + W_{wb} \Delta G_{hbond} + \Delta G_{el} + \Delta G_{el} + \Delta G_{kon} + W_{mc} T \Delta S_{sc}$$

(ecuación 2.6)

Donde ΔG_{vdw} es la suma de todas las contribuciones de van der Waals de todos los átomos con respecto a las mismas interacciones con el solvente; ΔG_{solVH} y ΔG_{solVP} corresponden a las energías de desolvatación durante el proceso de plegado para grupos apolares y polares, respectivamente; ΔG_{hbond} es la energía libre asociada a la formación de interacciones de puente de hidrógeno intramoleculares comparadas con la formación de interacciones intermoleculares con el solvente; ΔG_{wb} es un término extra que tiene en cuenta la energía de estabilización por parte de un molécula de agua sobre la estructura, contemplando que interactúa en más de un punto y que dicho efecto no puede ser compensado con aproximaciones implícitas (Petukhov et al. 1999); ΔG_{el} es la contribución electrostática de grupos cargados, incluyendo el dipolo de hélices; ΔS es el costo entrópico de fijar el esqueleto carbonado o *backbone* en el estado plegado este término es dependiente de la tendencia natural de un aminoácido en particular a adoptar un dado ángulo diedro (Muñoz and Serrano 1994). Finalmente ΔS_{sc} es el costo entrópico de fijar una cadena lateral en una dada conformación (Abagyan and Totrov 1994).

En la estimación sobre proteínas oligoméricas o complejos proteicos, se utilizan dos términos extras: ΔG_{kon} y ΔS_{tr} ; el primero refleja el efecto de las interacciones electrostáticas (Vijayakumar et al. 1998), mientras que el segundo el cambio en la entropía traslacional y rotacional consecuencia de la formación del complejo, término se anula cuando se observa el efecto de mutantes puntuales en complejos.

Los valores de energía de ΔG_{vdw} , ΔG_{solH} , ΔG_{solVP} y ΔG_{hbond} atribuidos a cada tipo de átomo, fueron derivados de un conjunto de datos experimentales, mientras que el ΔS_{mc} y ΔS_{sc} han sido estimados teóricamente. Los factores de ponderación o repesado mostrados en la ecuación 2.6, W_{vdw} , W_{solVH} , W_{solVP} , W_{mc} y W_{sc} son iguales a 1 salvo para la contribución de Van der Waals, que es igual a 0.33 (Schymkowitz et al. 2005).

2.2. Métodos experimentales

2.2.1. Clonado

Existen varias técnicas para la introducción de un transgen a una célula u organismo, como son la microinyección (Michaelis, Sobczak, and Weitzel 2014;

Nakagawa et al. 2015), la infección de una célula huésped con virus que contenga al vector (Lange et al. 2013; Samara Shekar Reddy et al. 2018), o mediante el uso de bacterias (principalmente para la transformación de plantas) (Krenek et al. 2015; Batool, Tuz Zahra, and Rehman 2017). En el caso de la transformación en procariontes, generalmente se introduce en las bacterias el DNA exógeno por micro electroporación (Solioz and Bienz 1990) o por choque térmico (D. Hanahan 1983) (técnica utilizada en la presente tesis). Durante el choque térmico, las bacterias son pre-tratadas con agentes que ocasionan el aumento en su permeabilidad membranal (D. Hanahan 1983). Estos agentes pueden ser una temperatura elevada y el uso de iones que cambian la carga eléctrica de la membrana al recubrir las cabezas polares de lípidos (por ejemplo los iones Ca^{2+}), lo que disminuye la repulsión de cargas eléctricas entre los fosfatos de los nucleótidos y la membrana, y además facilita la entrada del plásmido al interior celular (Mandel and Higa 1970). Las células bacterianas que han recibido un tratamiento apropiado para llevar a cabo la introducción de material genético se denominan células competentes (D. Hanahan 1983). Una vez que se introduce el material genético a las bacterias competentes, se disminuye la temperatura y se diluye el calcio, con lo que se restaura la permeabilidad membranal. Al colocar a las bacterias en condiciones óptimas de crecimiento se obtienen las bacterias transformadas (Figura 2.1).

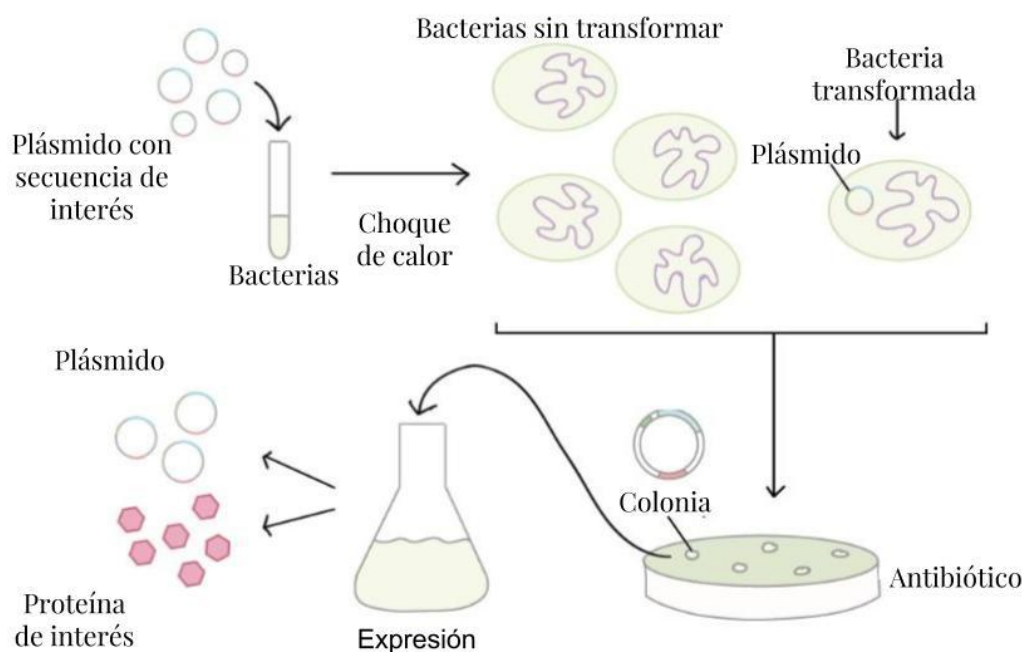


Figura 2.1: Esquema de proceso de clonado. Las bacterias son puestas en contacto con el plásmido e incubadas en hielo durante media hora. Luego, se las somete a un shock térmico, en el que son inmersas en un baño térmico a 42 grados durante 30 segundos. Posteriormente, se las deja reposar 2 minutos en hielo, se les agrega LB y se las incuba una hora a 37°C. Después, se plaquea en medio sólido LB agar y el medio de selección (en nuestro caso, kanamicina), y se incuba *overnight* a 37°C. Finalmente, se seleccionan colonias que más tarde serán empleadas para largar cultivos líquidos, los cuales se usarán para la expresión de proteínas.

En esta tesis, se utilizó el plásmido pET28a con la secuencia de cada proteína, y un tag de hexahistidina; dicho plásmido es de uso frecuente en procesos de expresión heteróloga de proteínas. Posee el promotor T7, un terminador, y resistencia a kanamicina (Figura 2.2).

Para ambas proteínas se trabajó con cepas de *E. coli*. En el caso de PknG, la cepa empleada fue BL21(DE3), la cual se caracteriza por alcanzar una alta densidad óptica, ser no patogénica y deficiente en la expresión de ompT y Lon, dos proteasas que pueden degradar la proteína de interés (Miroux and Walker 1996). En el caso de GarA, se probaron varias cepas, a saber: BL21(DE3) (Miroux and Walker 1996), DH5α (Douglas Hanahan, Jessee, and Bloom 1991), C43(DE3) (Arechaga et al. 2000) y BL21A1 (Studier 2005). Dado que solo se observó expresión en esta última, fue la elegida para esta tesis. La cepa BL21A1, también deficiente en la

proteasa ompT, está diseñada para aplicaciones que requieren una regulación estricta y una expresión firme de proteínas tóxicas, en la que la expresión génica es regulada mediante la adición de L-arabinosa al cultivo. Tanto la cepa BL21(DE3) como BL21-AI son adecuadas para el uso con plásmidos basados en el promotor T7.

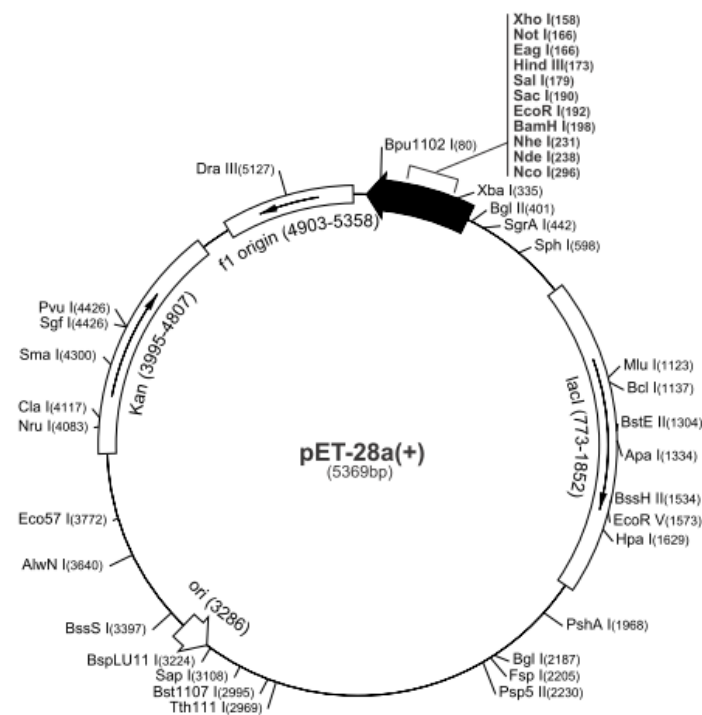


Figura 2.2: Esquema del plásmido pET28A.

2.2.2. Expresión de GarA

Las bacterias se cultivaron en medio LB suplementado con glucosa al 0,1%, tetraciclina 10 µg/µL, 50 µg/µL de kanamicina a 37 °C con agitación hasta OD600 = 0,8, y luego se incubó en agitación (200 rpm) durante 18 horas a 18 °C, previa adición de IPTG 1 mM y arabinosa al 0,02%. Posteriormente, se centrifugó a 4000 G por 15 minutos (Sorval, RC-5) a 4°C, se descartó el sobrenadante, se resuspendió en buffer A (5 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 25 mM imidazol, pH 8) y se congeló a -20°C hasta el momento de la purificación.

2.2.3. Expresión de PknG

Para PknG-MR (PknG expresada en medio rico) se utilizó medio LB, mientras que para PknG-Fe, PknG-Zn y PknG-Cd se empleó medio M9 (Na_2HPO_4 3,37 mM, KH_2PO_4 2,20 mM NaCl 0,86 mM NH_4Cl 0,94 mM, glucosa 0,4%, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 0,1 mM). Todos los cultivos fueron suplementados con 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de kanamicina, crecidos a 30 °C hasta $\text{OD}_{600} = 0,8$, momento en el que se adicionó IPTG 1 mM y FeCl_3 100 μM (PknG-MR y PknG-Fe) o ZnCl_2 100 μM (PknG-Zn) o CdCl_2 100 μM (PknG-Cd), según corresponda. Finalmente, se centrifugó a 4000 G (Sorval, RC-5) por 30 min, se resuspendió en buffer A y se congeló a -20°C hasta el momento de la purificación.

2.2.4. Purificación

Todas las proteínas fueron purificadas siguiendo el mismo protocolo.

Como paso inicial se comprobó que la proteína en cuestión se haya expresado mediante SDS-PAGE (ver siguiente sección). Luego, se sonicó hasta lisis total utilizándose pulsos de 25% de amplitud durante 15 segundos, con pausas de 1 minuto entre pulso y pulso (Vibracell, Sonic). Los restos bacterianos fueron centrifugados 3 veces a 20.000 G, a 4°C durante 20 minutos (Hanil, Combi 514R) y luego filtrados a través de filtros de celulosa de 0,45 μm . Las proteínas fusionadas a un his-tag se purificaron del sobrenadante mediante una cromatografía de afinidad metálica en una columna HisTrap Ni^{2+} -IMAC de 1 mL (GE Healthcare), pre equilibrada con buffer A (10 volúmenes de columna). Para la elusión, se utilizó un gradiente escalonado de imidazol (50-400 mM), recogándose alícuotas de 1 ml en el caso de PknG-MR y GarA, y 0,5 ml para el resto de las proteínas. Las fracciones contenedoras de proteína se identificaron utilizando SDS-PAGE, y se procedió a cambiar el buffer por buffer B (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% glicerol, pH=7,4); en el caso de GarA y PknG-MR, mediante diálisis, mientras que para las PknG expresadas en M9 se utilizó una columna de desalado (ver siguiente sección). Finalmente, se centrifugó 20 minutos a 20.000 G a 4°C (Hanil, Combi 514R) y el sobrenadante fue alicuotado y guardado a -80 °C.

2.2.5. Electroforesis en gel de acrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis es un procedimiento analítico basado en la separación de moléculas cargadas en un medio acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado entre dos electrodos, uno positivo y otro negativo (Kuhn and Hoffstetter-Kuhn 2013). El movimiento de las moléculas, en nuestro caso proteínas, dependerá de su tamaño y de la carga neta que presenten en el pH del buffer seleccionado para el análisis. Aquellas moléculas que tengan una carga neta mayor, tenderán a moverse más rápidamente que aquellas con menor carga neta. En el caso de que esta sea igual, las moléculas menores se desplazarán con mayor rapidez (Schwenke 1982).

El SDS-PAGE es una técnica consistente en disolver las proteínas de la muestra en soluciones del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS). De este modo, las proteínas pierden sus cargas individuales adquiriendo una carga neta negativa como resultado del complejo proteína-anión SDS formado (Weber and Osborn 1969). La cantidad de detergente que se incorpora por unidad de masa es la misma para todas las proteínas, y en consecuencia, la movilidad en la electroforesis va a depender exclusivamente de la masa. La separación de las proteínas, una vez disueltas, se hace en geles de poliacrilamida a los que se incorpora también SDS (Instruments 1994; Derua and Bossuyt 2002).

En particular, en este trabajo se tomaron 30 μ l de muestra, a las que se le añadió cracking buffer 4x, el cual se utiliza para desnaturalizar proteínas (200 mM Tris-Cl, pH 6,8, 8% SDS, 0,4% azul de bromofenol, 40% glicerol) en una relación 3:1 (volumen:volumen). Las muestras fueron calentadas a 95°C por 5 minutos, y luego sembradas (20 μ l por muestra) en geles de poliacrilamida. Para la identificación de PknG se utilizaron geles 10% de poliacrilamida, mientras que para la identificación de GarA y para los ensayos de actividad se utilizaron geles de 15%; los cuales fueron corridos a voltaje constante: 100 V para la zona del *stacking* y 200 V para la zona del *running*. Una vez finalizada la corrida electroforética, se procedió a la tinción (Goldring 2018). Para ello se incubó al gel 1 hora con agitación constante (70 R.P.M.) en solución de tinción (60 μ M azul de *coomassie*, 10% ácido acético, 45% etanol, 45% agua bidestilada). Para desteñir el gel, se lo incubó 3 veces durante 20

minutos a agitación constante (70 R.P.M) en solución decolorante (10% ácido acético, 45% etanol, 45% agua bidestilada) (Goldring 2018).

2.2.6. Cambio de buffer con columna desalado

Se cargó la muestra en la columna de desalado (PD-10, GE Healthcare), previamente equilibrada con 3 volúmenes del buffer en el cual se quiere tener solubilizada a la proteína y se eluyó con 3,5 ml del mismo buffer, recolectándose alícuotas de 0,5 ml. Para identificar qué fracciones contenían proteína, se midió absorbancia a 280 nm.

2.2.7. Espectroscopía

La espectroscopía constituye la base del análisis espectroquímico, en el que la interacción de la radiación electromagnética con la materia se utiliza para obtener información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de una muestra (Gauglitz and Vo-Dinh 2005).

2.2.7.1. Espectroscopia UV-VIS

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-VIS implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano. En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas (Perkampus 1992) .

La espectrometría UV-Vis se utiliza con frecuencia en forma cuantitativa para determinar las concentraciones de especies absorbentes en solución, usando la Ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon cl$$

(ecuación 2.7)

Donde: A es absorbancia o densidad óptica, ϵ = coeficiente de absortividad molar (constante), c = Concentración de la muestra y l = Longitud de onda. Si l permanece constante, tenemos que A es directamente proporcional a la concentración de la muestra. De este modo, la ley de Beer- Lambert establece que la concentración de un analito en solución, es directamente proporcional a la cantidad de energía

radiante absorbida e inversamente proporcional al logaritmo de la energía radiante transmitida.

En esta tesis, la concentración de proteína fue estimada a partir de la absorbancia de muestras a 280 nm, utilizando coeficientes de extinción molar predichos por la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

En el caso de PknG, (debido a su alto coeficiente de extinción molar, aproximadamente: $\epsilon=73800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) fue necesario diluir 10 veces las muestras antes de realizar la mediciones en torno a 280 nm, a fin de que la señal no sature.

En todos los casos, los espectros de absorción de las proteínas se registraron en buffer B a 25 °C, en un espectrofotómetro Jasco, modelo V-650, en una cubeta de cuarzo de paso óptico de 1 cm.

2.2.7.2. Determinación y cuantificación de Fe y Zn por espectroscopia de absorción atómica

Dentro del análisis espectroquímico, la espectroscopía de absorción atómica estudia la radiación por especies atómicas libres. Estas especies son generadas y examinadas en un medio gaseoso de alta energía, que constituye una fuente de vaporización-atomización-ionización-excitación.

Cuando una solución es introducida por aspiración en una llama, la mayor parte de los componentes inorgánicos son vaporizados y convertidos en su forma elemental, y los átomos son excitados térmicamente por la energía generada mediante reacciones químicas.

En un átomo en su estado de menor energía (estado fundamental), uno de los electrones de valencia correspondiente a un orbital externo puede ser transferido a un estado electrónico de mayor energía. Al retornar al estado fundamental o a uno de menor energía, los átomos pierden su energía de excitación en forma de calor o como radiación electromagnética de longitud de onda característica.

Los átomos neutros gaseosos en su estado fundamental pueden también absorber radiación a longitudes de onda específicas, correspondientes a las energías de las transiciones electrónicas en sus orbitales externos. Este fenómeno se denomina absorción atómica. La medición de la magnitud de esa absorción

atómica y su aplicación al análisis cuantitativo constituyen la espectrometría de absorción atómica (EAA) (Pfeil 1993). La fuente primaria de radiación luminosa es generalmente una lámpara de cátodo hueco del elemento de interés.

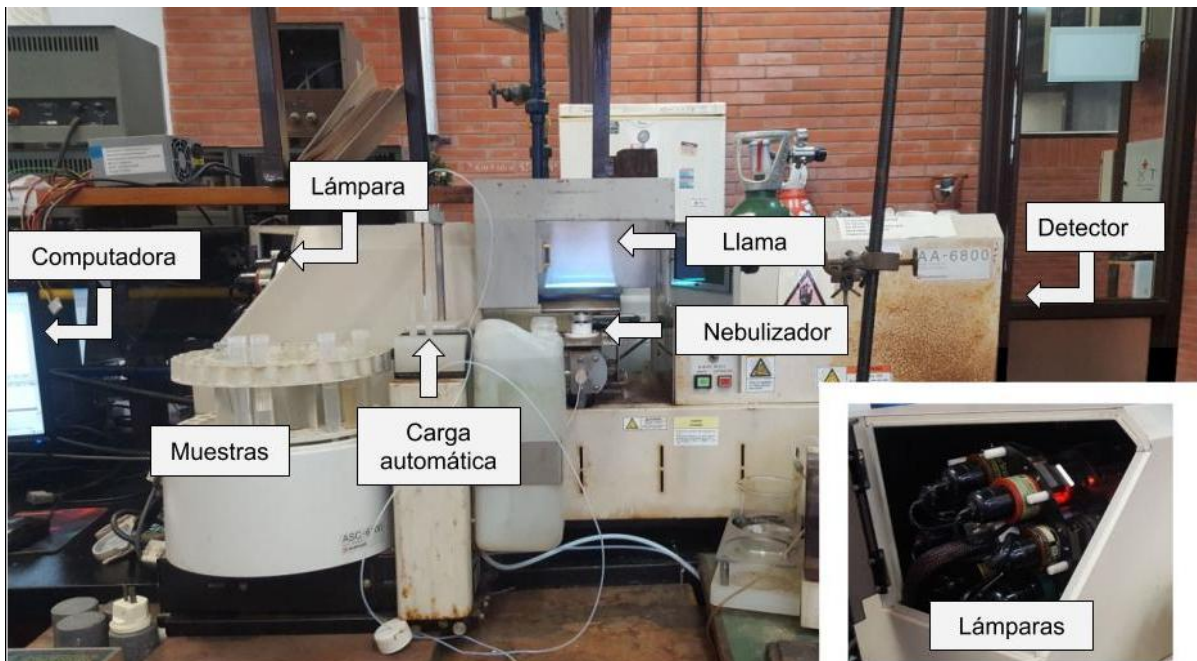
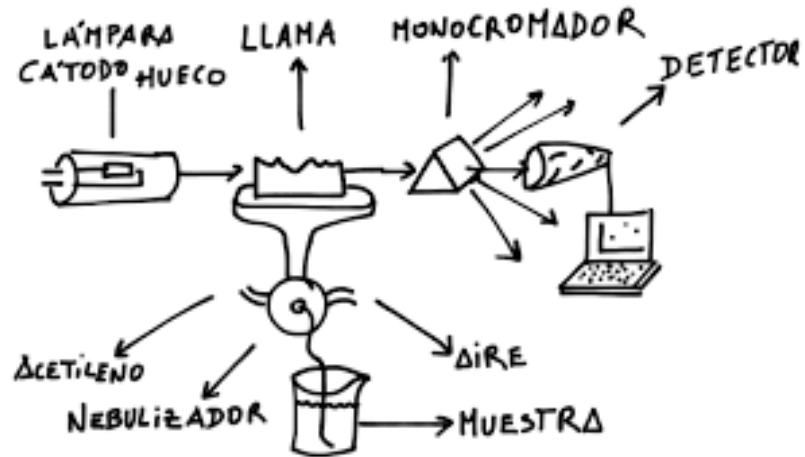


Figura 2.3. Arriba: Esquema de un sistema espectrométrico de absorción atómica tradicional. Abajo: equipo utilizado en este trabajo (DQIAyQF/INQUIMAE – FCEN/CONICET)

En esta tesis, se utilizó un espectrómetro de absorción atómica Shimadzu modelo AA-6800, provisto de un quemador de laminar para llama de aire-acetileno y las lámparas de cátodo hueco correspondientes como fuente de radiación. Los componentes básicos de un sistema espectrométrico para la medición de absorción atómicos se muestran en la Figura 2.3.

Finalmente, como todas las técnicas instrumentales, la espectrometría de llama es una técnica relativa. Por consiguiente, es necesario establecer experimentalmente una curva que relacione la señal analítica obtenida con la concentración del elemento analito en las soluciones a analizar (patrones).

2.2.7.3. Espectroscopia Raman resonante

El fenómeno de dispersión Raman se basa en la dispersión inelástica de la luz monocromática, generalmente proveniente de un láser, ya sea del espectro visible, infrarrojo o ultravioleta cercano. Dicho fenómeno ha sido aprovechado en el desarrollo de una variedad de técnicas espectroscópicas que permiten el estudio de modos de baja frecuencia de un sistema, tales como rotaciones y vibraciones (Smith and Dent 2013).

El efecto Raman ocurre cuando la luz interactúa con la nube electrónica de una molécula, excitándola hacia un estado virtual. Cuando la molécula relaja, emite un fotón y regresa a un estado rotacional o vibracional distinto del que partió. La diferencia de energía entre el estado original y este nuevo estado lleva a un corrimiento en la frecuencia del fotón emitido respecto a la frecuencia de excitación. Aproximadamente uno de cada 10 millones de fotones sufre este proceso, mientras que la gran mayoría son dispersados elásticamente, proceso conocido como radiación Rayleigh. Estos procesos se ejemplifican en la Figura 2.4.

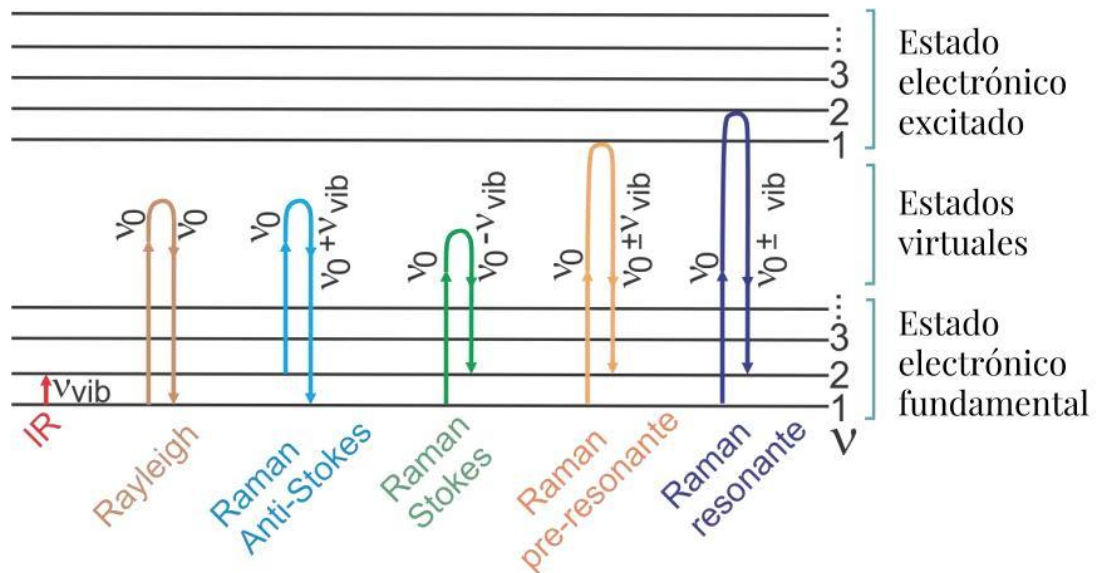


Figura 2.4. Representación de diversos estados electrónicos con sus correspondientes estados vibracionales, y de los estados virtuales. El fenómeno de absorción IR involucra la absorción de un cuanto equivalente a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales. Los diferentes fenómenos dispersivos se clasifican dependiendo de la energía de la radiación dispersada en relación a la radiación incidente ν_0 . La radiación dispersada de menor longitud de onda presenta un corrimiento anti-Stokes, mientras que la de mayor longitud de onda presenta un corrimiento Stokes. A su vez, dependiendo de la magnitud de ν_0 en relación con la energía necesaria para promover una transición electrónica, se puede trabajar en condiciones de pre-resonancia o resonancia.

La espectroscopia Raman por resonancia es una variante de la espectroscopia Raman. En la resonancia Raman, la longitud de onda de excitación se elige cuidadosamente para superponerse con (o estar muy cerca de) una transición electrónica, lo que típicamente significa en un área de absorción UV visible. Dicha superposición puede dar como resultado intensidades de dispersión que aumentan por factores de 10^2 a 10^6 , por lo que los límites de detección y los tiempos de medición pueden disminuir significativamente. Si una macromolécula, como una proteína, posee un cromóforo y mediante un láser de la longitud de onda adecuada se excita dicho cromóforo, las señales Raman que sufrirán intensificación serán las pertenecientes al mismo. Dado que el clúster de hierro-azufre de PknG presenta un máximo de absorción en 480 nm (color rojizo) cuando el hierro se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}) (Bandemer and Schaible 1944; Niazi 2006), ésta técnica puede ser empleada para magnificar la señal.

2.2.7.4. Espectroscopía de fluorescencia de triptófanos

Se denomina luminiscencia a la emisión de fotones ultravioleta, visibles o infrarrojos a partir de una especie química en estado electrónico excitado. La fluorescencia y la fosforescencia son casos particulares de luminiscencia. En estos casos, la especie química se excita por la absorción de un fotón y como consecuencia la lleva a un estado electrónico excitado (ver Figura 2.5) (Valeur and Berberan-Santos 2012). Esta molécula excitada emite el exceso de energía en forma de fotones, proceso que denominamos fluorescencia o fosforescencia según si la emisión involucra o no un cambio en el spin total de la molécula. En la fluorescencia el tiempo entre la absorción y emisión de la luz es del orden de 10^{-8} segundos, mientras que el proceso de fosforescencia es mucho más lento y toma alrededor de 10^{-3} a 1 segundo en ocurrir. Así, la fluorescencia dura únicamente mientras dura el estímulo, es un fenómeno virtualmente instantáneo, mientras que la fosforescencia puede durar minutos luego de desaparecido el estímulo.

En la figura 2.5 se muestra un diagrama de Perrin-Jablonski; estos diagramas son de suma utilidad para representar las transiciones foto físicas probables desde la absorción de un fotón por la especie química hasta la relajación de este estado excitado. En el caso representado, la absorción se produce desde el estado fundamental singulete (S_0) hasta distintos sub estados vibracionales de un singulete excitado (por ejemplo, S_1 o S_2).

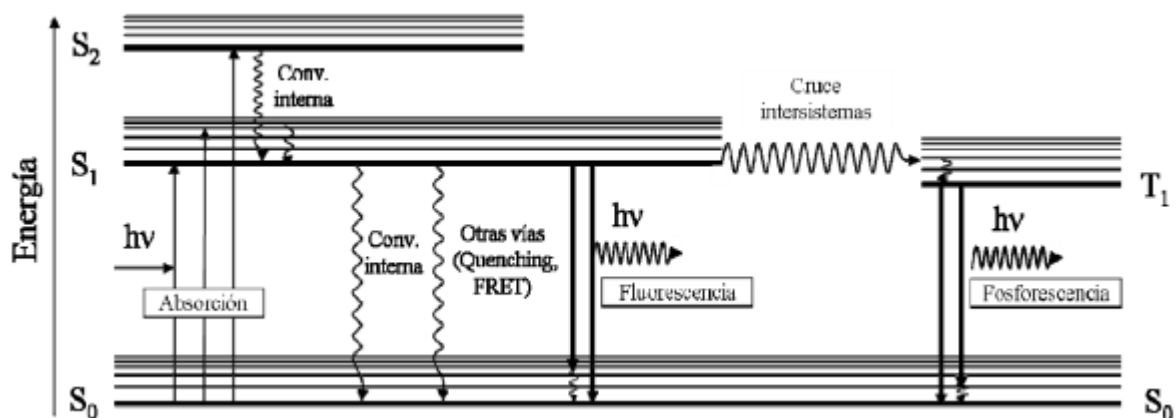


Figura 2.5. Diagrama de Perrin-Jablonski. Los fenómenos de absorción y emisión de un fotón se representan con flechas rectas. Las flechas onduladas representan relajación o pasaje a un subnivel energético sin emisión de luz. S: singulete T: triplete.

La fluorescencia de una proteína plegada es una mezcla de la fluorescencia individual de los residuos aromáticos (Weinryb and Steiner 1971). La mayoría de las emisiones fluorescentes intrínsecas de una proteína plegada son debidas a la excitación de los residuos de triptófano, con algunas emisiones debidas a la tirosina y fenilalanina, aunque los enlaces disulfuro también pueden aportar a la absorción (Lakowicz 2013). Usualmente, el triptófano tiene una longitud de onda de máxima absorción de 280 nm y una banda de emisión solvatocrómica desde 300 a 350 nm, dependiendo de la polaridad del medio local (Mocz 2002). Dado lo expuesto anteriormente, la fluorescencia de una proteína puede ser usada como diagnóstico del estado conformacional (Vivian and Callis 2001).

El triptófano es una importante sonda fluorescente intrínseca, que puede ser usada para estimar la naturaleza de los microambientes del triptófano. Cuando se realizan experimentos con desnaturalizantes, tensoactivos u otras molécula anfifílicas, el microambiente del triptófano puede cambiar. Por ejemplo, si una proteína que contiene un solo triptófano en su núcleo “hidrofóbico” se desnaturaliza con el incremento de temperatura, el desplazamiento en el espectro causaría que la emisión en el rojo desapareciera.

2.2.7.5. Espectrometría de masa (MS)

Un espectrómetro de masa es un instrumento que puede ionizar una muestra y medir la relación masa/carga de los iones resultantes, permitiendo el análisis de masas que van desde unos pocos átomos (algunos Daltons), hasta proteínas de gran masa (sobre los 300 Kilodaltons) (Becker 2008); pese a esto último, las muestras proteicas son frecuentemente pretratadas con alguna proteasa. Una de las proteasas más empleadas es la tripsina (Huynh, Russell, and Walsh 2009), dada su eficacia y su frecuencia de corte (suele generar péptidos con un tamaño medio de unos 8- 10 aminoácidos, que es adecuado para el análisis por MS).

En un espectrómetro de masas, en general, podemos diferenciar cuatro partes: una fuente de ionización, un analizador, un detector y un sistema de integración. El esquema de las partes que constituyen un espectrómetro de masas se representa en la Figura 2.6.

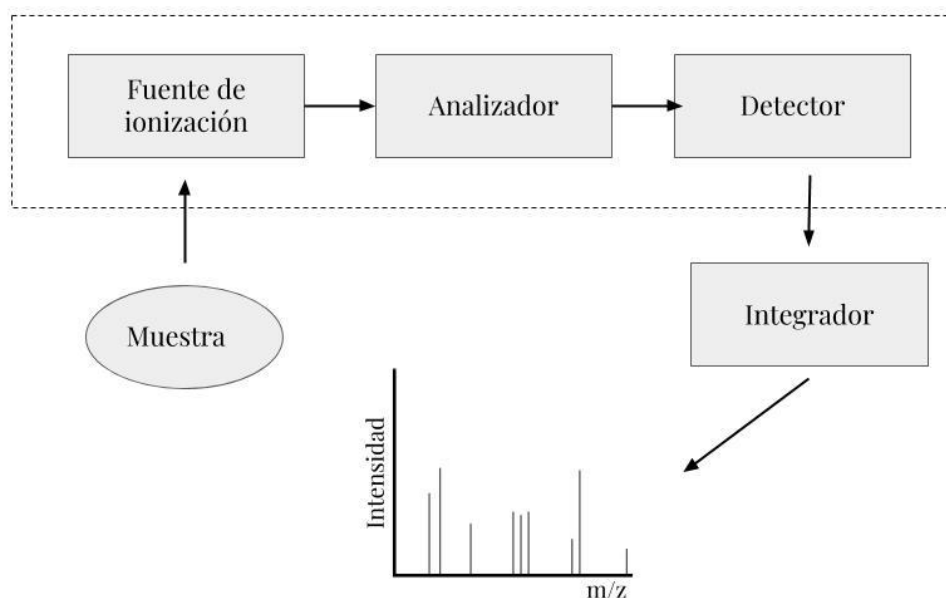


Figura 2.6: Esquema de las partes de un espectrofotómetro de masa

La fuente es la responsable de la volatilización e ionización de la muestra, de modo de obtener los analitos en estado gaseoso e ionizado. Hay varios tipos de fuentes, pero sólo las de ionización suave son las que permiten analizar biomoléculas como las proteínas, ya que son capaces de ionizarlas sin fragmentarlas. Existen dos posibilidades de fuente de ionización suave: pulverización eléctrica o “electrospray” (ESI) y la desorción/ionización mediante láser inducida por matriz o “matrix assisted laser desorption ionization” (MALDI); la última es la usada en esta tesis.

Una vez que las proteínas se encuentran ionizadas y en fase gaseosa, son aceleradas y guiadas hasta el analizador de masas, donde se separarán en función de su relación masa/carga (m/z). El movimiento de iones en el analizador puede manipularse mediante lentes electromagnéticas que permiten dirigir los iones hacia el detector.

Existen varios tipos de analizadores; cada uno de ellos difiere en sensibilidad, resolución, exactitud de masa y posibilidad de fragmentar los analitos ionizados (Aebersold and Mann 2003). En esta tesis, se empleó uno de tipo de tiempo de vuelo o “*time of flight*” (TOF). Para analizar una muestra en un espectrómetro de masas del tipo MALDI-TOF, la muestra debe co-cristalizar con una matriz orgánica.

La co-cristalización se consigue mezclando la muestra con la matriz, depositando dicha mezcla en una placa de metal, dejándola secar. Los cristales resultantes son irradiados con pulsos de rayos láser de una longitud de onda en la cual la matriz tiene el máximo de absorción. Este proceso produce la desorción de la mezcla y fotoactiva la matriz. La matriz excitada ioniza el analito mediante transferencia de protón. El resultado de todo este proceso es la obtención del analito ionizado en fase gaseosa, teniendo la mayoría de los iones con una sola carga positiva (Pusch et al. 2003). Finalmente, se comparan las masas peptídicas medidas (reales) con las masas peptídicas teóricas, generadas "*in silico*", que están en las bases de datos. motores de búsqueda más comúnmente utilizados son: Mascot, MS-Fit (Clauser, Baker, and Burlingame 1999) y ProFound (Zhang and Chait 2000).

2.2.8. Síntesis y solubilización de péptidos

Tanto el péptido *wild type* (WT) correspondiente a los residuos 14-30 de GarA (SDEVTVET21TSVFRADFL), como el mutante V24A y F25A (MUT_AA, SDEVTVET21TSAARADFL) fueron adquiridos en GenScript, NJ, Estados Unidos.

Se prepararon soluciones madres de 2,5 mM de cada uno. El péptido WT fue solubilizado en un buffer TRIS 100 mM, pH 7,36, NaCl 60 mM, mientras que el MUT_AA en 3% amonio, NaCl 60 mM.

2.2.9 Ensayos de actividad quinasa *in vitro*

2.2.9.1 Kinase-Glo

Para medir actividad quinasa, se empleó el kit comercial Kinase Glo Plus Luminescent Kinase Assay (Promega); este kit permite realizar ensayos con prácticamente cualquier combinación de quinasa y sustrato, y no requiere componentes marcados radioactivamente. El sustrato de la quinasa puede ser un péptido, proteína, lípido o azúcar. Los reactivos de Kinase Glo se basan en las propiedades de una luciferasa termoestable (Luciferasa Recombinante Ultra-Glo) que está formulada para generar una señal luminiscente de tipo "incandescente" estable en una amplia gama de condiciones de ensayo. La señal luminiscente, que se produce por la reacción de luciferasa, tiene una vida media superior a cinco horas. La combinación de Ultra-Glo Luciferasa y la formulación del buffer del kit da como resultado una luminiscencia que es mucho menos susceptible a la

interferencia con respecto a otros reactivos de detección de ATP basados en luciferasa (Koresawa and Okabe 2004; Baki et al. 2007; Kashem et al. 2007).

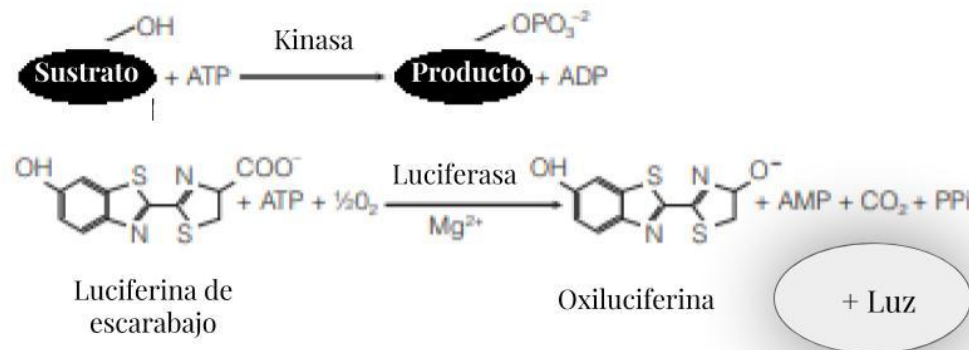


Figura 2.7. Reacciones del ensayo Kinase Glo. Tras la incubación el ATP restante en el momento en que se agrega el reactivo se usa como sustrato por la Luciferasa Ultra-Glo para catalizar la monooxigenación de luciferina. La reacción de luciferasa produce un fotón de luz por rotación. La luminiscencia está inversamente relacionada con la actividad de la quinasa. Imagen adaptada del Manual de Usuario del Fabricante (Promega, Madison, Estados Unidos, 2018).

En esta tesis, cada medición de actividad fue realizada en un volumen final de 50 μ l, conteniendo 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM $MnCl_2$, 2 μ M ATP, 700 μ M de péptido WT/MUT_AA o 25 μ M de GarA (según corresponda) como sustrato. La concentración de enzima en los ensayos fue de 1 μ M. Las reacciones fueron iniciadas mediante la adición de ATP, incubadas 1 hora a 37°C y la actividad quinasa fue medida usando el kit mencionado anteriormente, según las indicaciones del fabricante. Cabe destacar que se ensayaron distintas concentraciones de ATP de enzima, así como distintos tiempos antes de establecer cuáles eran las condiciones óptimas para medir la actividad.

La actividad en los ensayos con GarA fue calculada como:

$$Actividad = \left(1 - \frac{reacción}{control}\right) * 100$$

(ecuación 2.8)

Donde reacción corresponde a la luminiscencia medida de la reacción con sustrato, mientras que control corresponde al promedio de luminiscencia medida sin sustrato.

La actividad en los ensayos con péptidos fue calculada como:

$$Actividad = \frac{Control_2 - Péptido}{Control_2 - Control_1} * 100$$

(ecuación 2.9)

Donde Control₁ y Control₂ son respectivamente la medida de la luminiscencia de la reacción con 25 µM GarA y sin GarA.

Ambas medidas se usaron para estimar la actividad media y la desviación estándar en las condiciones experimentales antes mencionadas.

En resumen, la actividad fue medida usando GarA (con una relación sustrato-quinasa 1:40) o péptidos (relación sustrato-quinasa 1:700) y el ATP remanente fue cuantificado por luminiscencia (BMG Labtech, Optima Fluostar).

2.2.9.2. SDS-PAGE

Aprovechando que tanto PknG como GarA presentan cambios electroforéticos entre sus formas fosforiladas y no fosforiladas, se utilizó SDS-PAGE para seguir la reacción a través del tiempo. Para ello se preparó una reacción madre (25 mM Tris-HCl -pH 7,4-, 2 mM MnCl₂, 2 µM ATP, 25 µM de GarA; volúmen final 140 µl), la cual fue incubada a 37°C. A los 0, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos se tomaron alícuotas de 20 µl, en las cuales la reacción fue frenada mediante la adición de cracking buffer.

Se corrieron geles de poliacrilamida en las condiciones que se indican en la sección 2.2.5, y los resultados fueron analizando con ImageJ, utilizando la

herramienta “*Plot Profile*”, con la cual se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas teñidas.

2.2.9.3. ATP radiactivo

Cómo se mencionó anteriormente, las quinasas catalizan la reacción de incorporación del fosfato- γ del ATP a los grupos hidroxilo de los aminoácidos Ser, Treonina o Tyr. Esta reacción se puede monitorizar utilizando un ATP en el que el fósforo del grupo fosfato- γ ha sido sustituido por el isótopo radiactivo ^{32}P ($[\text{Y-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$). Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 37°C , utilizándose concentraciones de $0,5\ \mu\text{M}$ de quinasas, $25\ \mu\text{M}$ de sustrato, $2\ \mu\text{M}$ de ATP frío (no marcado) y $100\ \mu\text{Ci/nM}\mu\text{l}$ $[\text{Y-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Perkin-Elmer) y buffer de quinasas ($25\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 7,4, $2\ \text{mM}$ MgCl_2). Estas condiciones fueron seleccionadas luego de analizar la señal obtenida empleando distintas concentraciones de quinasas y distintos tiempos de incubación.

Los ensayos realizados con $[\text{Y-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ fueron hechos en una cámara habilitada específicamente para trabajar con isótopos radiactivos, siempre detrás de una pantalla de metacrilato. Luego de la incubación, la reacción se detiene por agregado de cracking buffer e incubación a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se separan por electroforesis SDS-PAGE (ver sección 2.2.5) y el gel de poliacrilamida se tiñe con azul de *Coomassie* para garantizar que se ha utilizado la misma cantidad de enzima y sustrato en todos los casos analizados. Una vez desteñido el gel se seca, se expone a una placa amplificadora y se reveló utilizando un Storm (Phosphoimager, Storm 820).

2.2.10. Cuantificación de tioles libres

Se usó ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitobenzóico), DTNB, también conocido como reactivo de Ellman's; compuesto que posee un enlace bisulfito, mediante el cual se lleva a cabo la reducción equimolar de los tioles libres por medio de una reacción de intercambio (Winther and Thorpe 2014). De estas interacciones químicas se obtiene como producto final el cromógeno ácido 5-Tio-2-nitobenzóico (TNB), el cual posee un máximo de absorbancia a $412\ \text{nm}$ (Figura 2.8) (Rahman, Kode, and Biswas 2006).

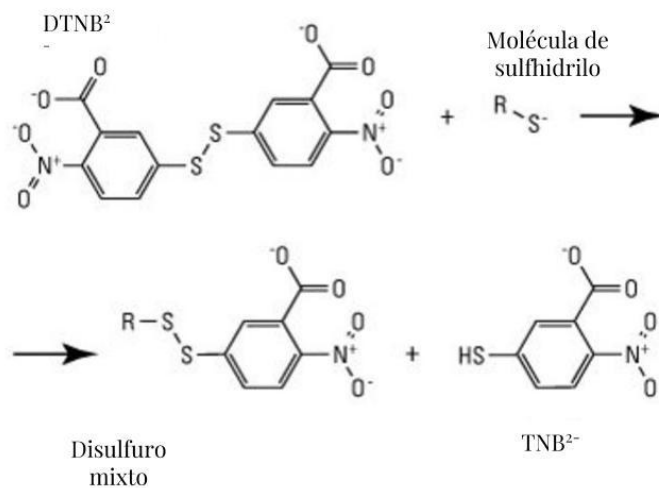


Figura 2.8. Reacción formadora de color del reactivo de Ellman con grupos sulfhidrilo: El DTNB reacciona con grupos sulfhidrilo, como las cisteínas peptídicas, para formar disulfuros mixtos y TNB, cuyo color se puede medir a 412 nm con un lector de placas o un espectrofotómetro.

A un volumen de 100 μL de muestra (se usó PknG 10 μM para los tratamientos y buffer B como blanco) se le añadió 1 μL de solución del reactivo Ellman's 5 mM. Se homogeneizó suavemente con pipeta y se leyó absorbancia a 412 nm.

La cantidad de cisteínas libres por unidad de PknG (μM) se calcula como:

$$\text{Cisteínas libres } (\mu\text{M}) = \text{Abs} * \frac{1106}{141500}$$

(ecuación 2.9)

Donde Abs es absorbancia determinada a 412 nm.

2.2.11. Reducción/oxidación de PknG

Las proteínas tratadas con ácido ascórbico fueron incubadas 30 minutos. Las proteínas tratadas con H_2O_2 , 10 minutos. Las proteínas reducidas y luego oxidadas fueron pre incubadas 30 minutos en ácido ascórbico y luego 10 minutos en H_2O_2 , realizándose lo inverso para proteínas oxidadas y luego reducidas. En todos los casos la incubación se llevó a cabo en eppendorf sellados en parafilm en hielo.

2.2.12. Determinación colorimétrica y cuantificación de hierro (II) y/o (III)

El hierro (II) forma un complejo de color rojo con la 1,10-fenantrolina (Amonette and Templeton 1998; Amonette 1998); este complejo es un quelato conformado por 3 moléculas de fenantrolina por cada ión Fe^{2+} (Figura 2.9), el cual posee un máximo de absorbancia a 580 nm.

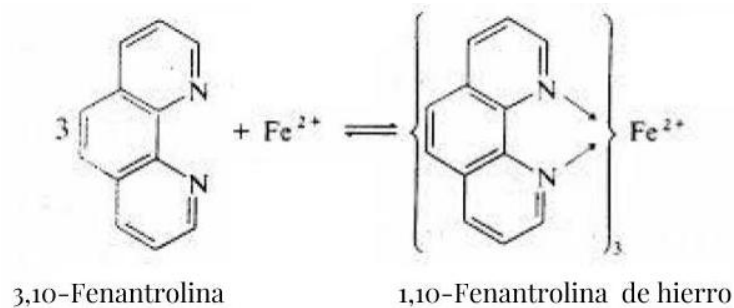


Figura 2.9. Esquema de formación del complejo Fe(II)-Fenantrolina.

La solución coloreada obtenida tras incubar Fe(II) con 1,10-fenantrolina obedece a la ley de Beer-Lambert, por lo que es posible calcular la concentración de Fe(II) espectrofotométricamente. Un pH entre 2,9 y 3,5 asegura un rápido desarrollo de color en presencia de exceso de fenantrolina, por lo cual se utilizó citrato sódico para ajustar el pH a 3,5.

En una primera etapa se determina la posible presencia de Fe(II) en la muestra de proteína. Luego, para estimar el Fe(III) se repite la misma reacción pero agregando previamente un agente reductor, a fin de reducir al Fe(III) presente a Fe(II). La concentración de Fe(III) se lo calcula por diferencia. En este caso se utilizó ácido ascórbico como reductor, el cual se oxida a ácido dehidroascórbico. La siguiente es la reacción global:



(ecuación 2.10)

2.2.13. Dicroísmo circular

La estructura secundaria de las proteínas puede ser explorada utilizando espectroscopía de dicroísmo circular en el UV lejano. Esta técnica está basada en la absorción diferencial de luz circularmente polarizada en un determinado sentido.

Este fenómeno es producido por moléculas con centros quirales o regiones que presenten asimetrías por su propia complejidad estructural (como en el caso de las proteínas) (Kelly, Jess, and Price 2005). El enlace peptídico presenta absorción en el UV lejano por lo que esta técnica permite al analizar esta región del espectro obtener señales características de los motivos de estructura secundaria típicos de proteínas.

Las mediciones de dicroísmo circular (CD) se realizaron utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810. Los espectros se registraron en una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso a 25 °C, en el rango de longitudes de onda comprendido entre 200–320 nm. La velocidad de escaneo fue de 20 nm/min con una constante de tiempo de 1 s.

2.3. Bibliografía

- Abagyan, R., and M. Totrov. 1994. "Biased Probability Monte Carlo Conformational Searches and Electrostatic Calculations for Peptides and Proteins." *Journal of Molecular Biology* 235 (3): 983–1002.
- Aebbersold, Ruedi, and Matthias Mann. 2003. "Mass Spectrometry-Based Proteomics." *Nature* 422 (6928): 198–207.
- Amonette, James E. 1998. "Improvements to the Quantitative Assay of Nonrefractory Minerals for Fe(II) and Total Fe Using 1,10-Phenanthroline." *Clays and Clay Minerals* 46 (1): 51–62.
- Amonette, James E., and J. Charles Templeton. 1998. "Improvements to the Quantitative Assay of Nonrefractory Minerals for Fe (II) and Total Fe Using 1, 10-Phenanthroline." *Clays and Clay Minerals* 46 (1): 51–62.
- Arechaga, I., B. Miroux, S. Karrasch, and R. Huijbregts. 2000. "Characterisation of New Intracellular Membranes in Escherichia Coli Accompanying Large Scale Over production of the B Subunit of F1Fo ATP Synthase." FEBS. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/S0014-5793\(00\)02054-8](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/S0014-5793(00)02054-8).
- Baki, Andrea, Attila Bielik, László Molnár, Györgyi Szendrei, and György M. Keserü. 2007. "A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors." *Assay and Drug Development Technologies* 5 (1): 75–84.
- Bandemer, Selma L., and P. J. Schaible. 1944. "Determination of Iron. A Study of the O-Phenanthroline Method." *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition* 16 (5): 317–19.
- Batool, Kanza, Fatima Tuz Zahra, and Yasir Rehman. 2017. "Arsenic-Redox Transformation and Plant Growth Promotion by Purple Nonsulfur Bacteria Rhodospseudomonas Palustris CS2 and Rhodospseudomonas Faecalis SS5." *BioMed Research International* 2017 (March): 6250327.
- Bayly, Christopher I., Piotr Cieplak, Wendy Cornell, and Peter A. Kollman. 1993. "A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model." *The Journal of Physical Chemistry* 97 (40): 10269–80.
- Becker, Sabine. 2008. *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
- Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak. 1984. "Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath." *The Journal of Chemical Physics* 81 (8): 3684–90.
- Brooks, Bernard R., Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, David J. States, S. Swaminathan, and Martin Karplus. 1983. "CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations." *Journal of Computational Chemistry* 4 (2): 187–217.
- Clauser, Karl R., Peter Baker, and Alma L. Burlingame. 1999. "Role of Accurate Mass Measurement (± 10 Ppm) in Protein Identification Strategies Employing MS or MS/MS and Database Searching." *Analytical Chemistry* 71 (14): 2871–82.
- Derua, R., and X. Bossuyt. 2002. "Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Application of DNA and Protein Separations, Reiner Westermeier. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2001, 368 Pp" *Clinical Chemistry*. <http://clinchem.aaccjnls.org/content/48/5/803.2.extract>.
- Gauglitz, Guenter, and Tuan Vo-Dinh, eds. 2005. *Handbook of Spectroscopy*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Goldring, J. P. Dean. 2018. "The Roles of Acetic Acid and Methanol During Fixing

- and Staining Proteins in an SDS-Polyacrylamide Electrophoresis Gel." *Methods in Molecular Biology* 1853: 15–18.
- Grubmüller, H., H. Heller, A. Windemuth, and K. Schulten. 1991. "Generalized Verlet Algorithm for Efficient Molecular Dynamics Simulations with Long-Range Interactions." *Molecular Simulation* 6 (1-3): 121–42.
- Hanahan, D. 1983. "Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–80.
- Hanahan, Douglas, Joel Jessee, and Fredric R. Bloom. 1991. "[4] Plasmid Transformation of Escherichia Coli and Other Bacteria." In *Methods in Enzymology*, 204:63–113. Academic Press.
- Hornak, Viktor, Robert Abel, Asim Okur, Bentley Strockbine, Adrian Roitberg, and Carlos Simmerling. 2006. "Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters." *Proteins* 65 (3): 712–25.
- Huynh, Mai-Loan, Pamela Russell, and Bradley Walsh. 2009. "Tryptic Digestion of in-Gel Proteins for Mass Spectrometry Analysis." *Methods in Molecular Biology* 519: 507–13.
- Instruments, H. S. 1994. "Protein Electrophoresis Applications Guide." *Hofer Scientific Instruments, San Francisco*.
- Jakalian, A., D. B. Jack, and C. I. Bayly. 2002. "Fast, Efficient Generation of High- quality Atomic Charges. AM1- BCC Model: II. Parameterization and Validation." *Journal of Computational Chemistry*.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.10128>.
- Kashem, Mohammed A., Richard M. Nelson, Jeffrey D. Yingling, Steven S. Pullen, Anthony S. Prokopowicz 3rd, Jessi Wildeson Jones, John P. Wolak, et al. 2007. "Three Mechanistically Distinct Kinase Assays Compared: Measurement of Intrinsic ATPase Activity Identified the Most Comprehensive Set of ITK Inhibitors." *Journal of Biomolecular Screening* 12 (1): 70–83.
- Kelly, Sharon M., Thomas J. Jess, and Nicholas C. Price. 2005. "How to Study Proteins by Circular Dichroism." *Biochimica et Biophysica Acta* 1751 (2): 119–39.
- Koresawa, Mitsunori, and Takayoshi Okabe. 2004. "High-Throughput Screening with Quantitation of ATP Consumption: A Universal Non-Radioisotope, Homogeneous Assay for Protein Kinase." *Assay and Drug Development Technologies* 2 (2): 153–60.
- Krenek, Pavel, Olga Samajova, Ivan Luptovciak, Anna Daskocilova, George Komis, and Jozef Samaj. 2015. "Transient Plant Transformation Mediated by Agrobacterium Tumefaciens: Principles, Methods and Applications." *Biotechnology Advances* 33 (6 Pt 2): 1024–42.
- Kuhn, Reinhard, and Sabrina Hoffstetter-Kuhn. 2013. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer Science & Business Media.
- Lakowicz, Joseph R. 2013. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- Lange, Matthias, Aravinda L. Yellina, Svetlana Orashakova, and Annette Becker. 2013. "Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) in Plants: An Overview of Target Species and the Virus-Derived Vector Systems." *Methods in Molecular Biology* 975: 1–14.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. "Calcium-Dependent Bacteriophage DNA Infection." *Journal of Molecular Biology* 53 (1): 159–62.
- Michaelis, Marten, Alexander Sobczak, and Joachim M. Weitzel. 2014. "In Vivo Microinjection and Electroporation of Mouse Testis." *Journal of Visualized*

- Experiments: JoVE*, no. 90 (August). <https://doi.org/10.3791/51802>.
- Miroux, B., and J. E. Walker. 1996. "Over-Production of Proteins in Escherichia Coli: Mutant Hosts That Allow Synthesis of Some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels." *Journal of Molecular Biology* 260 (3): 289–98.
- Mocz, Gabor. 2002. "Intrinsic Fluorescence of Proteins and Peptides." *Cited May 10*.
- Muñoz, V., and L. Serrano. 1994. "Intrinsic Secondary Structure Propensities of the Amino Acids, Using Statistical Phi-Psi Matrices: Comparison with Experimental Scales." *Proteins* 20 (4): 301–11.
- Nakagawa, Yoshiko, Tetsushi Sakuma, Takuya Sakamoto, Masaki Ohmuraya, Naomi Nakagata, and Takashi Yamamoto. 2015. "Production of Knockout Mice by DNA Microinjection of Various CRISPR/Cas9 Vectors into Freeze-Thawed Fertilized Oocytes." *BMC Biotechnology* 15 (May): 33.
- Niazi, Ali. 2006. "Simultaneous Spectrophotometric Determination of FeII and FeIII in Pharmaceuticals by Partial Least Squares with Chromogenic Mixed Reagents." *Croatica Chemica Acta. Arhiv Za Kemiju* 79 (4): 573–79.
- Perkampus, Heinz-Helmut. 1992. "UV-VIS Spectroscopy and Its Applications." <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77477-5>.
- Petukhov, M., D. Cregut, C. M. Soares, and L. Serrano. 1999. "Local Water Bridges and Protein Conformational Stability." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 8 (10): 1982–89.
- Pfeil, D. L. 1993. "Atomic Absorption Spectrometry: Theory, Design and Application. Edited by S. J. Haswell, Elsevier, Amsterdam, 1991, 529 Pp., \$179.00." *Microchemical Journal*. <https://doi.org/10.1006/mchj.1993.1062>.
- Price, Daniel J., and Charles L. Brooks 3rd. 2004. "A Modified TIP3P Water Potential for Simulation with Ewald Summation." *The Journal of Chemical Physics* 121 (20): 10096–103.
- Pusch, Wolfgang, Mark T. Flocco, Sau-Mei Leung, Herbert Thiele, and Markus Kostrzewa. 2003. "Mass Spectrometry-Based Clinical Proteomics." *Pharmacogenomics* 4 (4): 463–76.
- Rahman, Irfan, Aruna Kode, and Saibal K. Biswas. 2006. "Assay for Quantitative Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Levels Using Enzymatic Recycling Method." *Nature Protocols* 1 (6): 3159–65.
- Salomon-Ferrer, Romelia, Andreas W. Götz, Duncan Poole, Scott Le Grand, and Ross C. Walker. 2013. "Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald." *Journal of Chemical Theory and Computation* 9 (9): 3878–88.
- Samara Shekar Reddy, S., Bharat Singh, A. J. Peter, and T. Venkateswar Rao. 2018. "Production of Transgenic Local Rice Cultivars (*Oryza Sativa* L.) for Improved Drought Tolerance Using Agrobacterium Mediated Transformation." *Saudi Journal of Biological Sciences* 25 (8): 1535–45.
- Schwenke, K. D. 1982. "A. T. ANDREWS: Electrophoresis. Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. 336 Seiten, Mit Zahlreichen Abb. Und Tab. Clarendon Press, Oxford 1981. Preis: 25.00 £." *Food / Nahrung*. <https://doi.org/10.1002/food.19820260907>.
- Schymkowitz, Joost W. H., Frederic Rousseau, Ivo C. Martins, Jesper Ferkinghoff-Borg, Francois Stricher, and Luis Serrano. 2005. "Prediction of Water and Metal Binding Sites and Their Affinities by Using the Fold-X Force Field." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29): 10147–52.
- Settle, Mskp. 1992. "An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for

- Rigid Water Molecules.” *Journal of Computational Chemistry* 13: 952–62.
- Smith, Ewen, and Geoffrey Dent. 2013. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. John Wiley & Sons.
- Solioz, M., and D. Bienz. 1990. “Bacterial Genetics by Electric Shock.” *Trends in Biochemical Sciences* 15 (5): 175–77.
- Studier, F. William. 2005. “Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures.” *Protein Expression and Purification* 41 (1): 207–34.
- Valeur, Bernard, and Mário Nuno Berberan-Santos. 2012. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
- Vijayakumar, M., K. Y. Wong, G. Schreiber, A. R. Fersht, A. Szabo, and H. X. Zhou. 1998. “Electrostatic Enhancement of Diffusion-Controlled Protein-Protein Association: Comparison of Theory and Experiment on Barnase and Barstar.” *Journal of Molecular Biology* 278 (5): 1015–24.
- Vivian, J. T., and P. R. Callis. 2001. “Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins.” *Biophysical Journal* 80 (5): 2093–2109.
- Webb, Benjamin, and Andrej Sali. 2016. “Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER.” *Current Protocols in Bioinformatics / Editorial Board, Andreas D. Baxevanis ... [et Al.]* 54 (June): 5.6.1–5.6.37.
- Weber, K., and M. Osborn. 1969. “The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.” *The Journal of Biological Chemistry* 244 (16): 4406–12.
- Weinryb, I., and R. F. Steiner. 1971. “The Luminescence of the Aromatic Amino Acids.” In *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*, edited by Robert F. Steiner and Ira Weinryb, 277–318. Boston, MA: Springer US.
- Winther, Jakob R., and Colin Thorpe. 2014. “Quantification of Thiols and Disulfides.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2): 838–46.
- Zhang, W., and B. T. Chait. 2000. “ProFound: An Expert System for Protein Identification Using Mass Spectrometric Peptide Mapping Information.” *Analytical Chemistry* 72 (11): 2482–89.

Capítulo 3

3. ESPECIFICIDAD DE PKNG Y PKNB

3.1. Introducción

3.1.1. GarA como sustrato de PknG y PknB

Como mencionamos anteriormente, en *Mtb.* el ciclo de los TCA y la síntesis del glutamato se encuentra regulada por una proteína llamada GarA (O'Hare et al. 2008; Ventura et al. 2013) (ver sección 1.7.2.1).

GarA es una pequeña proteína de 162 residuos con un dominio FHA (*forkhead associated domain*), que media interacciones proteína-proteína, reconociendo específicamente residuos treonina fosforilados (Durocher et al. 1999). Como elemento de regulación posee en el extremo N-terminal dos treoninas susceptibles de ser fosforiladas: la Thr 21 y la Thr 22, que a su vez pueden unirse al FHA en un evento de auto-reconocimiento (Barthe et al. 2009; England et al. 2009; Ventura et al. 2013) (Figura 1.9). Cuando GarA se encuentra sin fosforilar, interactúa e inhibe a las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH) y α -cetoglutarato descarboxilasa (KGD), y se une y activa la glutamina oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT) (Ventura et al. 2013) (Figura 1.10).

Se ha reportado que GarA puede ser fosforilada por PknG y por PknB (Villarino et al. 2005; O'Hare et al. 2008; Ventura et al. 2013). De PknG, proteína central en esta tesis, hemos hablado extensamente en el primer capítulo (sección 1.7). PknB, por su lado, es una proteína esencial para el crecimiento de *Mtb.* (P. Fernandez et al. 2006; Chawla et al. 2014). Posee tres dominios: un dominio extracelular PASTA (*penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated*), uno de transmembrana y un dominio quinasa (Av-Gay and Everett 2000), todos los cuales son esenciales para su función (Chawla et al. 2014; Prigozhin et al. 2016). Se cree que el dominio PASTA extracelular reconoce fragmentos de peptidoglicano, y se ha implicado en la localización de PknB (Yeats, Finn, and Bateman 2002; Mir et al. 2011). Se ha reportado que PknB fosforila múltiples sustratos (Kang et al. 2005; Villarino et al. 2005; Dasgupta et al. 2006; Sharma et al. 2006; Parikh et al. 2009; Gupta et al. 2009; Barik et al. 2010; Sajid et al. 2011; Gee et al. 2012; Kieser et al.

2015; Turapov et al. 2018), y que interactúa con Mur ligasas (Munshi et al. 2013) y con proteínas asociadas al metabolismo de lípidos (Wu et al. 2017). De todos modos, aún se desconoce por qué PknB es esencial para el bacilo (Turapov et al. 2018).

Investigaciones previas demuestran que GarA es fosforilada en la Thr 21 por PknG (Durán et al. 2005), y en la Thr 22 por PknB, siendo ambos eventos excluyentes (O'Hare et al. 2008). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce a nivel atómico el motivo de la especificidad de cada quinasa por su sitio de fosforilación.

Por consiguiente, en este trabajo utilizamos técnicas de modelado molecular, dinámica molecular y medidas de actividad quinasa *in vitro* (para el caso de PknG) para evaluar cómo estas quinasas reconocen su sustrato y cuáles son los residuos claves de dicho reconocimiento.

3.2. Resultados

3.2.1. Análisis de interacciones PknB-GarA y PknG-GarA

Para identificar interacciones que ayuden a comprender el motivo de especificidad que presentan las quinasas se realizó un modelo para cada proteína, en el que se incluyó el sustrato, ATP y Mg^{2+} . Para independizarnos de las interacciones que podría establecer el dominio FHA (Durocher et al. 1999), y para simplificar el sistema, como sustrato se utilizó un péptido derivado de la región N-terminal de GarA, que en ambos casos incluyó a las treoninas 21 y 22. La coordinación entre ATP, el Mg^{2+} y cada quinasa se modificó de modo tal que se ajuste a lo descrito en la literatura para el estado activo (Zheng et al. 1993; Bellon et al. 1999). Una vez confeccionados los modelos, se corrieron dinámicas moleculares clásicas y se realizaron experimentos de mutación *in-silico*.

Todas las simulaciones clásicas han sido realizadas empleando el paquete AMBER12 (Case et al., n.d.). Los modelos iniciales fueron solvatados con moléculas TIP3P en una caja octaédrica truncada (Price and Brooks 2004), que se extiende 12 Å desde la superficie de cada proteína. Los parámetros para las fosfotreoninas fueron obtenidos de Craft et al. (Craft and Legge 2005), mientras que los parámetros

para el ATP y el magnesio de Meagher et al. (Meagher, Redman, and Carlson 2003) y Allnér et al. (Allnér, Nilsson, and Villa 2012). Los parámetros empleados para el centro hierro-azufre del Rbx son los desarrollados por el grupo de Ramos et. al (Carvalho, Teixeira, and Ramos 2013). En la etapa de dinámica molecular de producción se realizaron simulaciones a temperatura y presión constantes de 100 ns para PknB y 50 ns para PknG.

3.2.1.1. Construcción del modelo inicial de PknB

En el caso de PknB se trabajó sólo con el KD (dominio quinasa), excluyéndose los dominios PASTA y transmembrana.

Se sabe que para que esta quinasa esté activa los residuos Thr 171 y Thr 173 (ambos ubicados en el *loop* de activación) tienen que estar fosforilados (Boitel et al. 2003); no obstante aún se desconoce el papel estructural de estos fosforesiduos debido a que dicho *loop* no se encuentra resuelto en ninguna de las estructuras depositadas en PDB (Ortiz-Lombardía, Pompeo, and Boitel 2003; Tracy A. Young et al. 2003; Mieczkowski, Iavarone, and Alber 2008; Lombana et al. 2010), algo frecuente en estructuras quinasa (Boitel et al. 2003).

La literatura describe que el *loop* de activación de las quinamas típicamente contiene un residuo Ser/Thr o Tyr que se orienta de modo estratégico para organizar el sitio activo (Kornev and Taylor 2010), e investigaciones previas proponen que la interacción entre PknB y GarA ocurre principalmente entre los residuos fosforilados de la primera y el dominio FHA de la segunda (Villarino et al. 2005). Esta información sugiere que una de las pThr podría estar involucrada en la activación enzimática, mientras que la otra podría participar en el reconocimiento de GarA. Teniendo esto en mente, se modeló el *loop* de activación en una conformación extendida, característica del KD en estado activo (Nolen, Taylor, and Ghosh 2004), con la pThr 173 mirando hacia el sitio activo, y la pThr 171 expuesta al solvente. El modelo de PknB doblemente fosforilado se confeccionó a partir del cristal 1MRU (T. A. Young et al. 2003), completándose el *loop* de activación utilizando MODELLER (Webb and Sali 2016).

Luego, se incorporó el péptido derivado de GarA (19VETTSVFR26), que incluye el residuo a ser fosforilado (Thr 22). Como estructura de referencia, para modelar la

posición del sustrato, se utilizó el cristal 2PHK (Lowe et al. 1997); un complejo de una subunidad truncada de fosforilasa quinasa perteneciente *Oryctolagus cuniculus* (la cual presenta un 27% de identidad con PknB) cristalizada junto con un sustrato peptídico (Figura 3.1). Dado que PknB fosforila al residuo 22 de GarA (O'Hare et al. 2008), este residuo fue colocado apuntando al fosfato y del ATP.

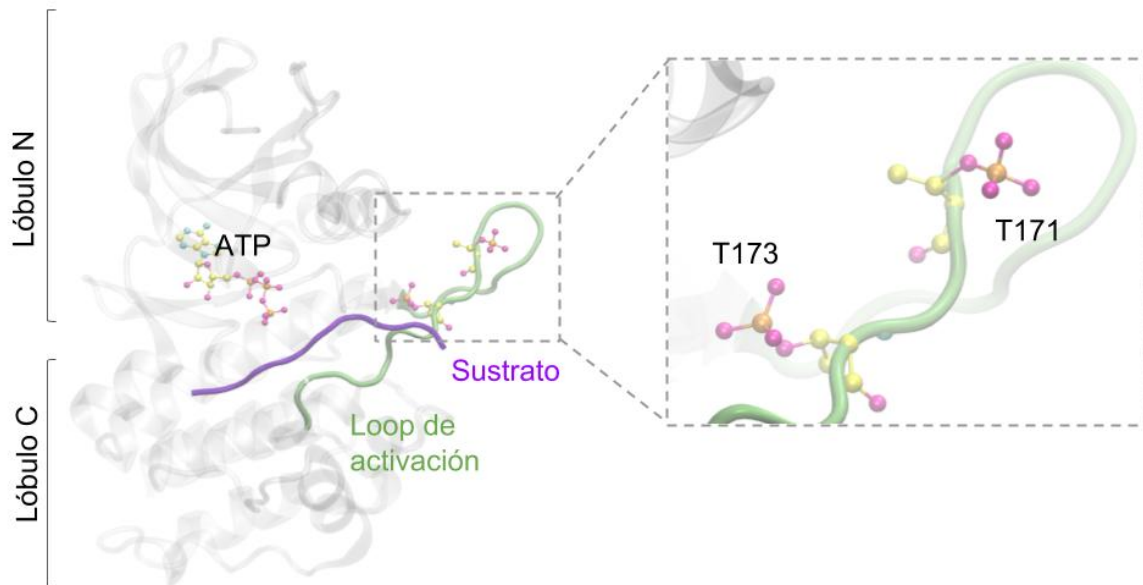


Figura 3.1. Modelo inicial de PknB-ATP-Mg²⁺-sustrato. En el detalle, se observa la disposición espacial de las pThr 171 y 173.

3.2.1.2. Dinámica molecular clásica de PknB con GarA

Una vez armada la estructura inicial, para comprender las interacciones entre las dos proteínas se corrieron 5 réplicas de dinámica molecular de 100 ns cada una.

3.2.1.2.1. Estabilidad del sistema

En el tiempo simulado (100 ns) el sistema se mantiene estable, lo cual se ve reflejado en el monitoreo de métricas como RMSD y RMSF (Figura 3.2).

En el panel B, correspondiente al RMSF promedio entre las 5 dinámicas, podemos observar que los residuos que más fluctúan son los que conforman el *loop* de activación, lo cual es consistente con que no hayan sido resueltos en ninguno de

los cristales existentes de PknB (Ortiz-Lombardía, Pompeo, and Boitel 2003; Tracy A. Young et al. 2003; Mieczkowski, Iavarone, and Alber 2008; Lombana et al. 2010).

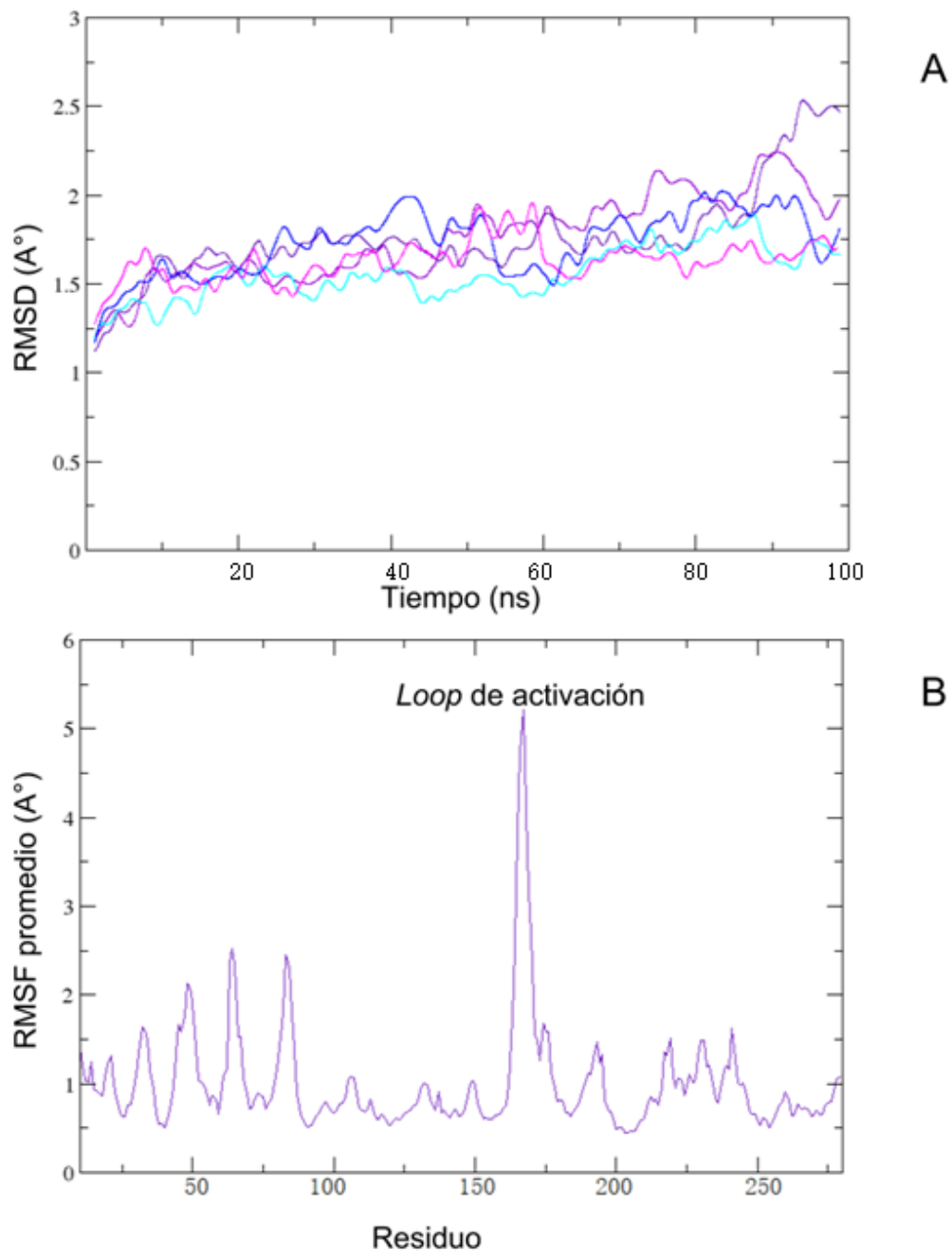


Figura 3.2. Dinámica molecular de PknB A: RMSD. B: RMSF. Se ensayaron 5 réplicas (100 ns). El valor de RMSD informado corresponde a los carbonos alfa del dominio quinasa, mientras que el RMSF corresponde a los carbonos alfa del el sistema completo.

3.2.1.2.2. El bolsillo RD de PknB

Como se mencionó anteriormente, la fosforilación es uno de los métodos más comunes para regular la actividad quinasa. La fosforilación de uno o más residuos en el *loop* de activación da lugar a que se establezcan interacciones que reducen la movilidad del *loop*, posicionándolo para la óptima interacción con el sustrato (Nolen, Taylor, and Ghosh 2004). Para que ocurra este cambio conformacional son esenciales las interacciones electrostáticas entre un pThr del *loop* de activación (que suele recibir el nombre de “fosfato primario”) y un bolsillo básico que suele estar conservado entre la mayoría de las quinasas que se activan a través del *loop* de activación. Este bolsillo suele llamarse “bolsillo RD”, a raíz de que uno de los residuos que lo compone es una Arg (Arg 137 en el caso de PknB) que invariablemente precede a un aspartato catalítico (Asp 138) (Johnson, Noble, and Owen 1996). El segundo residuo que conforma este bolsillo se encuentra ubicado en la $\beta 9$ (Arg 161), y el tercero en la hélice αC del el lóbulo N (Arg 55) (Nolen, Taylor, and Ghosh 2004). En la Figura 3.3 se compara el bolsillo RD de PknB con el de PKA (PDBid: 1ATP). Se observa que los residuos básicos que rodean a la Thr fosforilada tienen una distribución similar, aunque el bolsillo de PknB es más amplio.

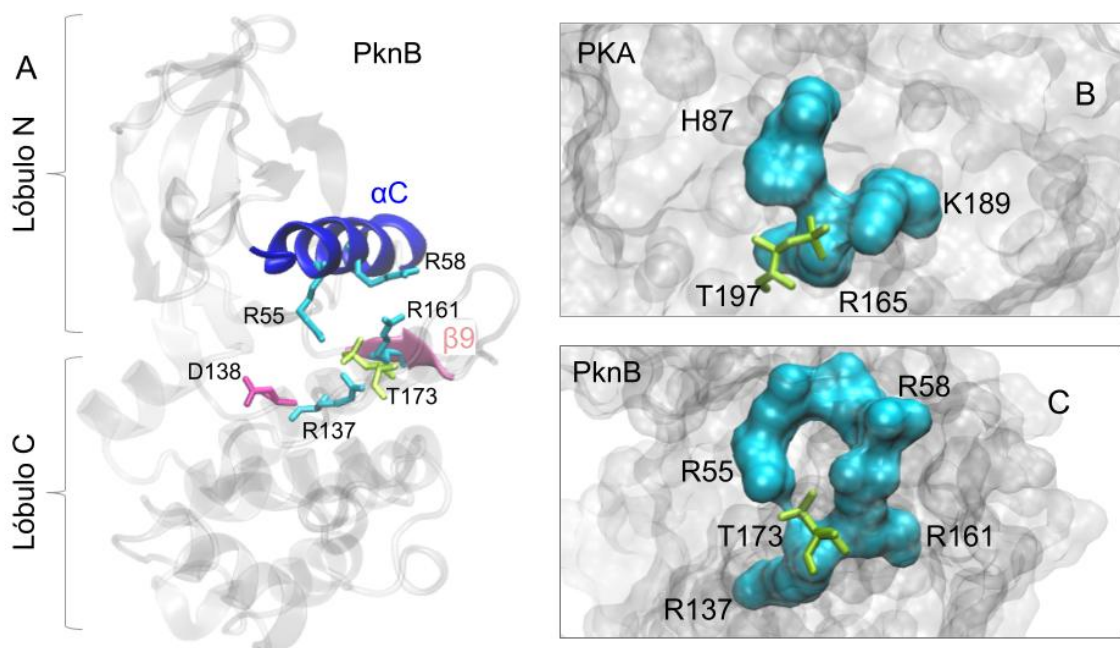


Figura 3.3. Bolsillo RD de PknB. A: Ubicación de los elementos del bolsillo RD de PknB. B: Detalle del bolsillo RD de PKA (residuos básicos en cian, pThr en verde). C: Detalle del bolsillo RD de PknB (residuos básicos en cian, pThr fosforilada en verde).

Para validar nuestro modelo, se analizaron las interacciones entre el fosfato primario de PknB (pThr 173) y el bolsillo RD en el transcurso de las dinámicas moleculares clásicas realizadas (para este análisis solo se tuvieron en cuenta aquellas argininas con un análogo en PKA, excluyéndose la Arg 58). Los resultados se encuentran resumidos en la Figura 3.4, en la que se encuentran las distancias entre los CZ de las Arg 55, 137 y 161 y el P de la pThr 173 de una dinámica representativa. Distancias entorno a los 4 Å indican interacción.

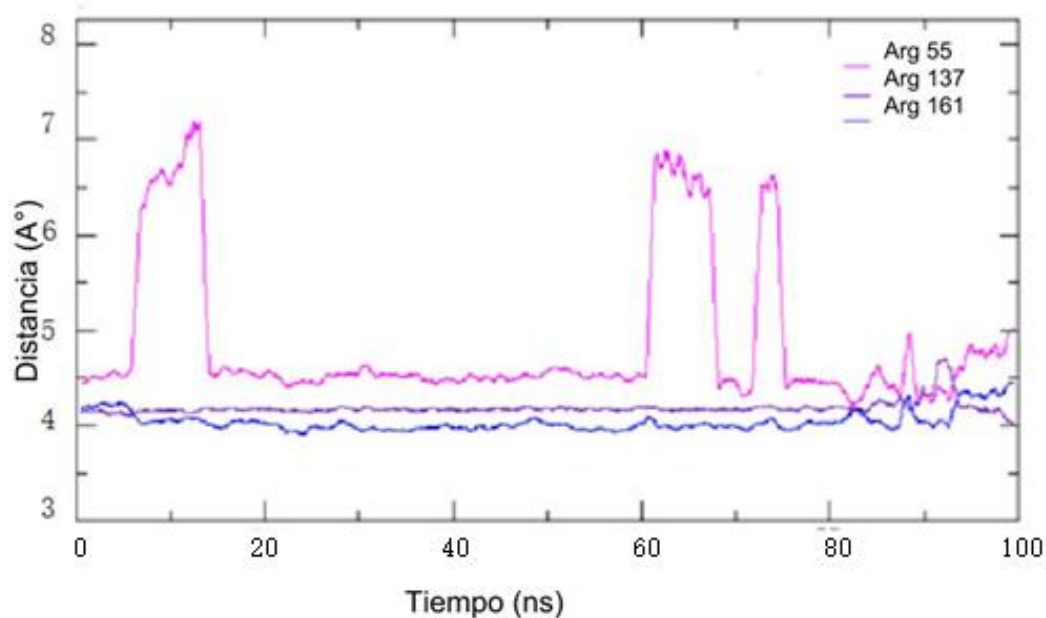


Figura 3.4. Distancia entre residuo P del pThr 173 y los carbonos CZ de las Arg 55, 137 y 161, correspondientes al bolsillo RD de PknB.

Se observa una interacción estable entre las argininas 55, 137 y 161, lo que se corresponde con la conformación de las quinasas activas (Nolen, Taylor, and Ghosh 2004). En el caso de la Arg 55 se observa que esta se aleja pero vuelve a interactuar fluctuando entre dos conformaciones. Esto indicaría que la interacción está presente pero que hay dos mínimos en la superficie de energía potencial, quizás indicando que la interacción es más fuerte con las Arg 137 y 161 que con la 55.

3.2.1.3. Bases moleculares de reconocimiento de GarA por PknB

Las interacciones polares observadas en el complejo a lo largo de las DM ensayadas se resumen en la Figura 3.5, donde puede observarse que la Arg 101 y el Glu 20 de GarA se vinculan mediante una interacción iónica; la Lys 140 de PknB interactúa con el fosfato y del ATP, orientándolo para posibilitar la transferencia del fosfato (este evento fue explorado por otro miembro del grupo, el Dr. Elías López, y no será tratado en este trabajo; el manuscrito que compila esos resultados junto del presente capítulo se encuentra en preparación); y la pThr 173 interactúa con la Arg 26 de GarA. Ésta última fue la principal interacción observada, estable incluso tras correr centenas de ns (Figura 3.6). *Proponemos que esta interacción es crucial para colocar a la Thr 22 a la distancia adecuada para el ataque nucleofílico.*

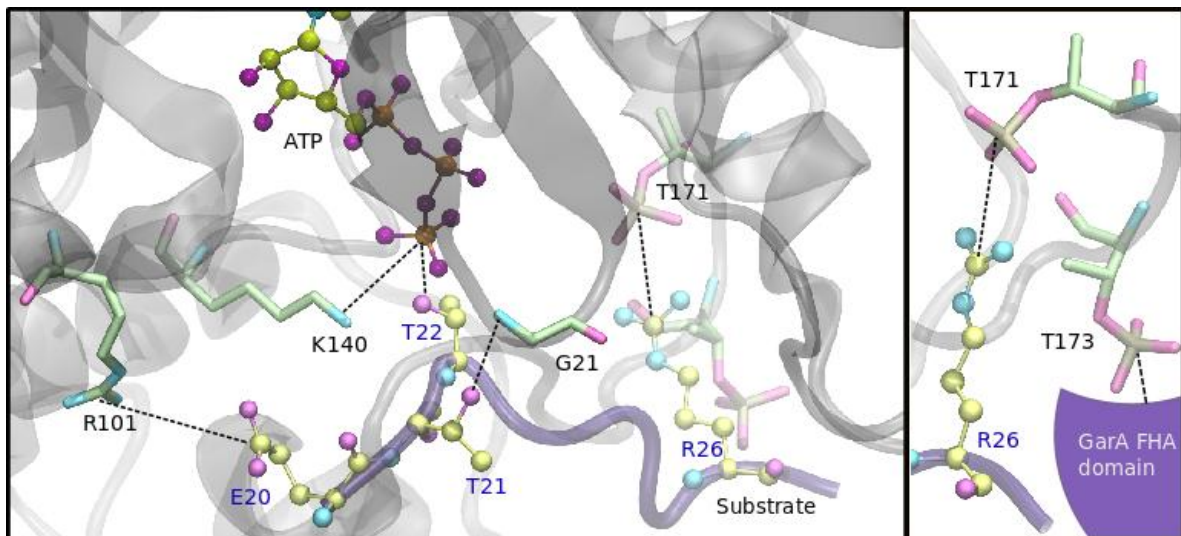


Figura 3.5. Bases moleculares del reconocimiento de GarA por PknB. Los residuos de la quinasa que participan en el reconocimiento se hayan esquematizados con un modelo de varillas, mientras que los residuos de GarA claves para la interacción, así como el ATP, se muestran utilizando un modelo de esferas y varillas. El detalle es un esquema de las interacciones propuestas entre los pThr de PknB y GarA. El dominio FHA del sustrato interactúa directamente con el *loop* de activación, posicionando al dominio N-terminal en la cercanía del ATP, donde luego sufre una modificación post-traducciona en el residuo Thp 22.

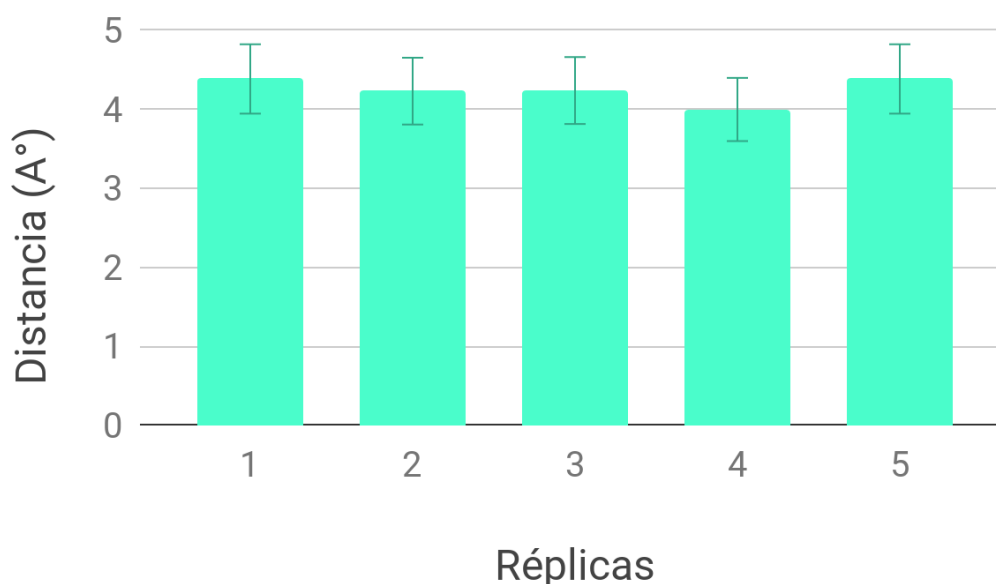


Figura 3.6. Distancia promedio entre el CZ de la Arg 26 de GarA y el fosfato del pThr 173 de PknB en las 5 réplicas de DM de 100 ns.

En las Figuras 3.5 y 3.1 podemos apreciar que el residuo pThr 173 se encuentra libre para interactuar con el dominio FHA, marcado en azul en la figura 3.5.

En la literatura se ha señalado la importancia de interacciones hidrofóbicas para la unión sustrato-quinasa; de hecho es frecuente que el sitio de fosforilación (P) sea posicionado por el P+1 *loop*, que acomoda al residuo P+1 mediante este tipo de interacciones. El P+1 *loop* es una región que le sigue al *loop* de activación, importante para las interacciones quinasa-sustrato (Figura 1.5) (Johnson et al. 1998; Nolen, Taylor, and Ghosh 2004; Kornev and Taylor 2010). Incluso, en el caso puntual de PknB se ha propuesto que la secuencia consenso que reconoce la quinasa posee residuos hidrofóbicos en la posición P+2 y P+3 (Prisic et al. 2010). Sin embargo, en nuestras DM estas interacciones, aunque observadas, son muy poco estables, por lo que su contribución a la estabilidad del complejo parece ser escasa. De hecho, al calcular el promedio entre las 5 dinámicas de la interacción de la Val 24 y la Phe 25 con el parche hidrofóbico, se observó que el primer residuo interactuaba un 30% del tiempo, mientras que el segundo tan solo un 15%. Para realizar este cálculo, se utilizó la distancia del centro de masa de la cadena lateral de cada residuo (Val 24, Phe 25) con respecto al centro de masa de los aminoácidos que componen el parche hidrofóbico, y se consideró que existe interacción en aquellos *frames* que presenten una distancia de hasta 11 Å entre

dichos puntos. Cada centro de masa fue calculado usando CPPTRAJ (Roe and Cheatham 2013).

En la Figura 3.7 A pueden observarse a la Val 24 y a la Phe 25 de GarA interactuando con el parche hidrofóbico de PknB, sin embargo el panel B es una representación más fidedigna de lo observado en las dinámicas, donde se puede ver que Val 24 y Phe 25 se alejan del parche. Como puede observarse, y en concordancia con lo presentado en la Figura 3.5 en ambos casos la Arg 26 de GarA se encuentra en estrecha relación con la pThr 173 de PknB.

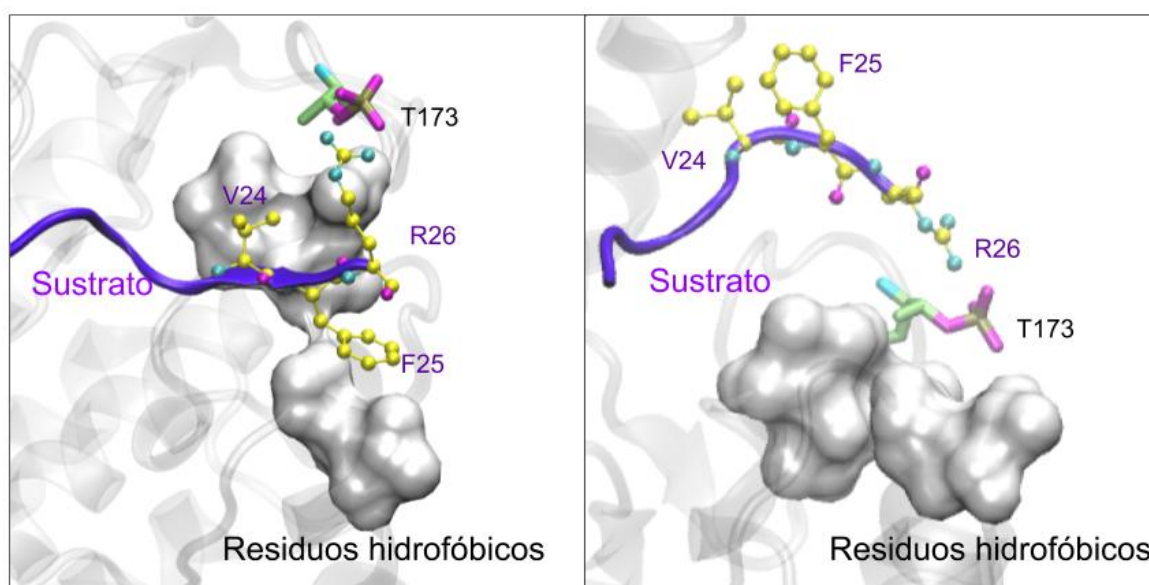


Figura 3.7. Interacciones hidrofóbicas PknB-GarA. Se representan los residuos del sustrato Val 24, Phe 25 y Arg 26 (esferas y varillas), así como la pThr 173 (varillas) y el parche hidrofóbico ("Surf") de PknB.

3.2.1.4. Construcción del modelo inicial de PknG

Hasta la fecha, se han publicado tres estructuras cristalinas de PknG de *Mtb.*, una de PknG74-750 (dominios Rbx, KD y TPR), con el Rbx coordinado a Cd^{2+} y el KD en complejo con el inhibidor AX20017 (PDBid 2PZI) (Scherr et al. 2007a); y dos de PknG74-405 (dominios Rbx y KD), ambos con dominio Rbx coordinado a Zn^{2+} , una con el KD en complejo con un análogo de ATP (ATP-S) y la otra con ADP (PDBid: 4Y12 y 4Y0X) (Lisa et al. 2015). La estructura del Rbx es muy similar en las tres estructuras, pero la orientación del Rbx con respecto al KD es ligeramente diferente. En la estructura unida al inhibidor (2PZI), el Rbx interactúa con los lóbulos N-terminal y C-terminal del dominio quinasa, mientras que en la forma unida al

análogo de ATP (4Y12), el Rbx hace contacto solo con el lóbulo N-terminal (Figura 3.8). Se propuso que el Rbx regula la actividad intrínseca de la quinasa al restringir la accesibilidad del sitio activo (Scherr et al. 2007; Lisa et al. 2015).

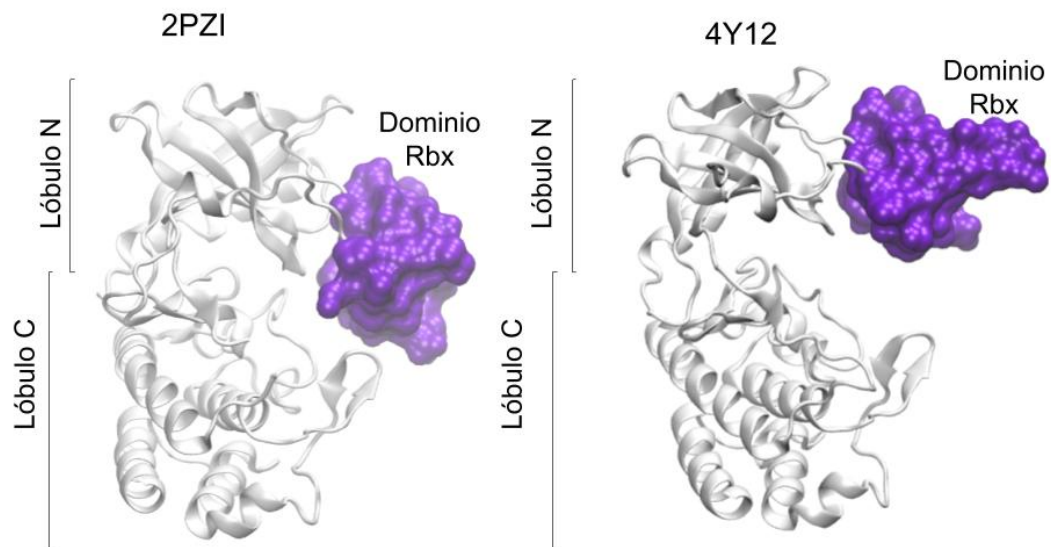


Figura 3.8. PknG, KD dominio Rbx (residuos \approx 99 a 137). El dominio Rbx interactúa tanto con el lóbulo N como con el C cuando la quinasa está unida a un inhibidor (PDBid: 2PZI), y con el lóbulo N cuando está unida a un análogo de ATP (PDBid:4Y12).

Con el fin de explorar la movilidad del Rbx y ver si es posible que este regule la actividad bloqueando el acceso al sitio activo, se lo incluyó en el modelo, junto con el KD. El dominio TPR fue excluido del análisis. Cabe destacar que en los tres cristales disponibles (Scherr et al. 2007a; Lisa et al. 2015), el *loop* de activación de PknG posee una conformación abierta y extendida, correspondiente al estado activo de las quinasa (Nolen, Taylor, and Ghosh 2004), con lo cual no fue necesario modelarlo. Por consiguiente, construimos el complejo PknG-ATP-Mg-sustrato con la Thr 21 en posición reactiva, a partir del cristal de PknG 4Y12 (Lisa et al., 2015), que posee un análogo al sustrato peptídico, y se corrieron 5 réplicas de DM de 50 ns cada una. El sustrato usado fue 19VTTSVF25.

3.2.1.5. Dinámica molecular clásica de PknG con GarA

Una vez armada la estructura inicial, para comprender las interacciones entre las dos proteínas se corrieron 5 réplicas de dinámica molecular de 50 ns cada una.

3.2.1.5.1. Estabilidad del sistema

En el tiempo simulado (50 ns) el sistema se mantiene estable, lo cual se ve reflejado en el monitoreo de métricas como RMSD y RMSF, aunque se observa una gran movilidad del dominio Rbx (Figura 3.9). Al analizar más detalladamente este dominio, se observan pequeñas fluctuaciones cuando para hacer el *fitting* se usa el dominio Rbx (lo que permite ver movilidad interna), y fluctuaciones más grandes cuando el *fitting* se realiza sobre el KD (lo que permite ver movilidad del dominio Rbx con respecto al KD) (Figura 3.10); esta información señala que el dominio Rbx es estable, pero que presenta grandes movimientos con respecto al dominio quinasa, lo que permitiría la modulación de la entrada de ATP al sitio activo del dominio quinasa en concordancia con lo descrito en la literatura (Scherr et al. 2007; Lisa et al. 2015).

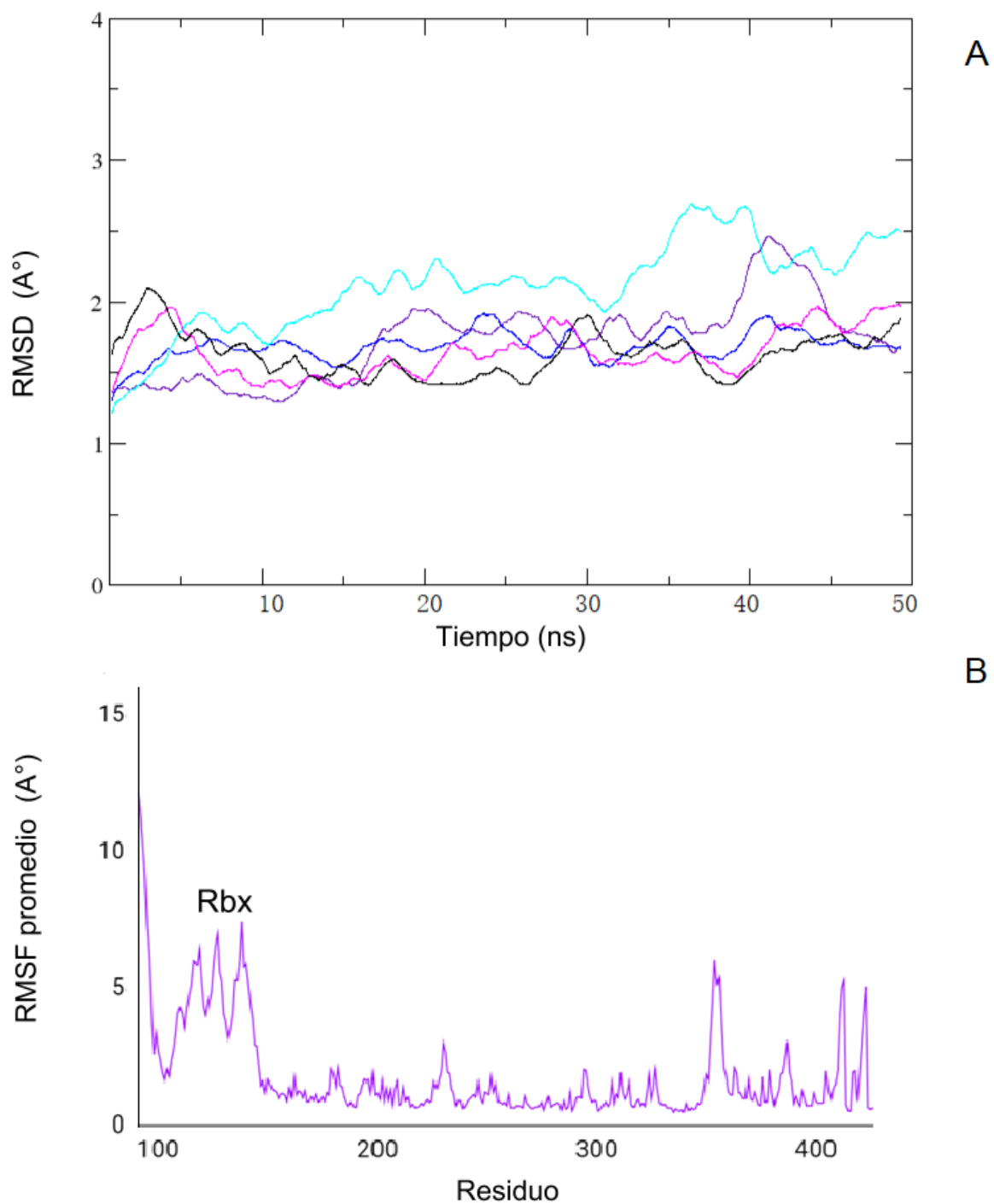


Figura 3.9. Dinámica molecular de PknG A: RMSD. B: RMSF. Se ensayaron 5 réplicas (50 ns). Los RMSD y RMSF informados corresponden a los carbonos alfa del sistema completo.

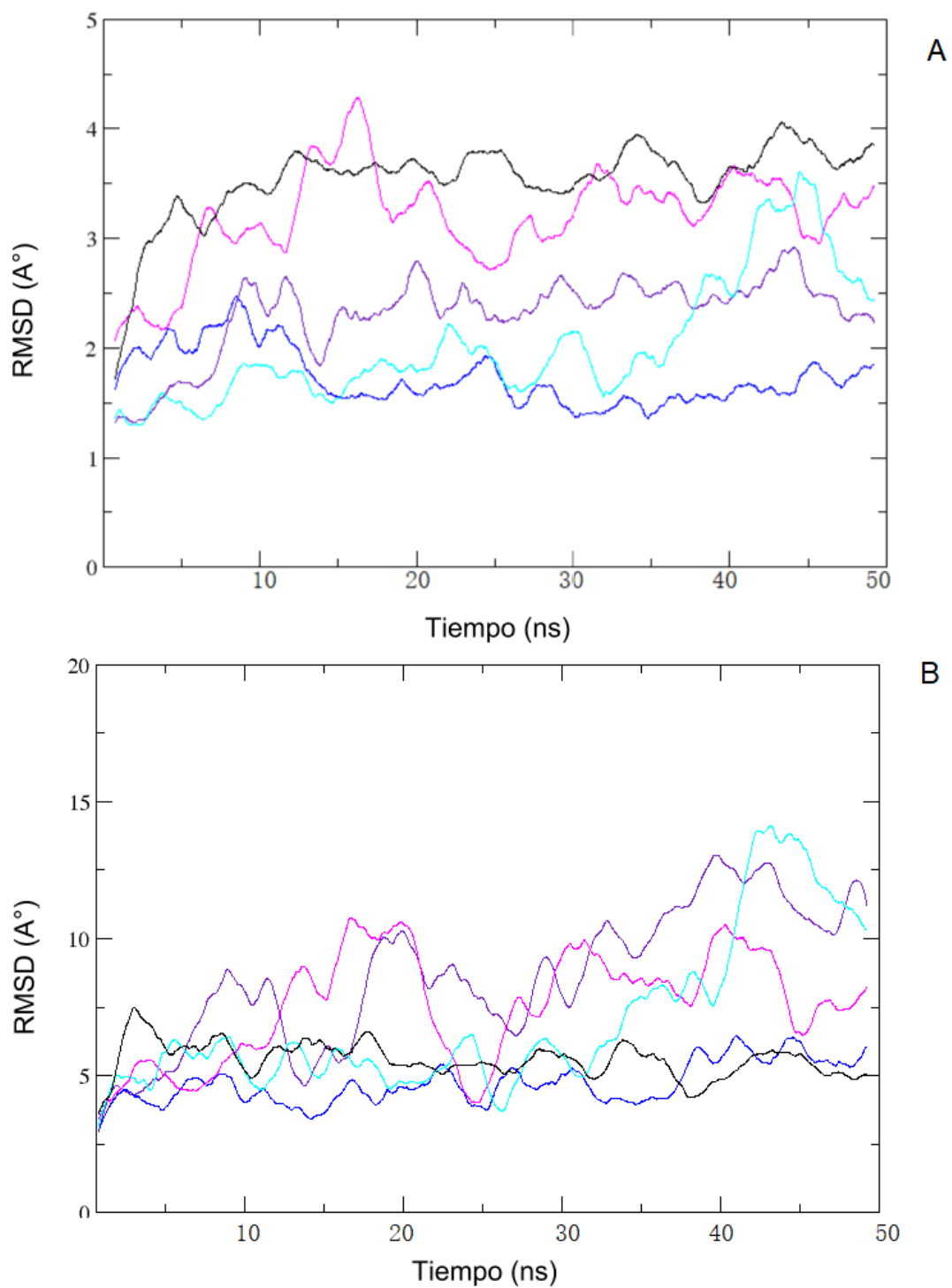


Figura 3.10. Dinámica molecular de PknG A. RMSD con el *fitting* realizado sobre el dominio Rbx. B. RMSD con el *fitting* realizado sobre el KD. En ambos casos los cálculos fueron realizados sobre los carbonos alfa.

3.2.1.5.2. Bases moleculares de reconocimiento de GarA por PknG

Las interacciones observadas en el complejo a lo largo de las DM ensayadas se resumen en la Figura 3.11. Los residuos Val 24 y Phe 25 de GarA establecen interacciones no polares con un bolsillo hidrofóbico de PknG (conformado por la Phe 303, la Leu 306, la Ile 317 y la Va 318). Además, se observan algunas interacciones polares que han sido descritas previamente (Lisa et al. 2015): el nitrógeno de la cadena carbonada de la Val 19 de GarA interactúa con el carboxilo de la cadena lateral del Glu 280, mientras que el carboxilo de la cadena carbonada interactúa con la cadena lateral de la Lys 278; a su vez el hidroxilo de la cadena lateral de la Thr 309 está unido por un puente de hidrógeno con el Glu 20 de GarA; y el grupo amida y carbonilo de la Gly 308 interactúan con el *backbone* de la Thr 22 de GarA.

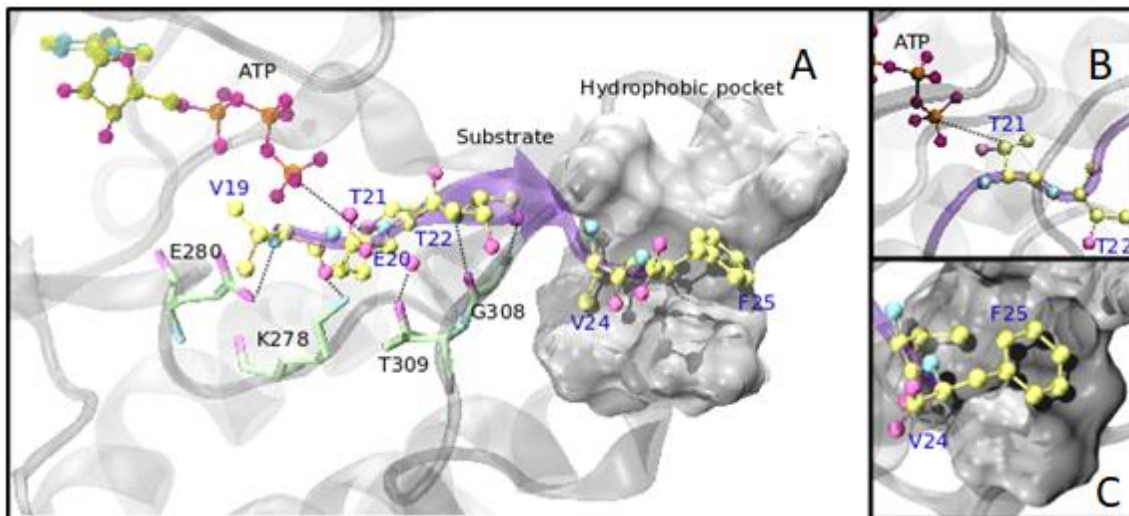


Figura 3.11. Bases moleculares del reconocimiento de GarA por PknG. A. Los residuos de la quinasa que participan en el reconocimiento se hayan esquematizados con un modelo de varillas, mientras que los residuos de GarA claves para la interacción, así como el ATP, se muestran utilizando un modelo de esferas y varillas. B: Detalle de la disposición de los residuos Thr 21 y Thr 22. C: Otra vista de la interacción de la Val 24 y la Phe 25 con el bolsillo hidrofóbico de la quinasa.

En la Figura 3.12 se analiza la interacción entre la Val 24 y la Phe 25 de Gar A con el bolsillo hidrofóbico de PknG. Para ello, se midió a lo largo de cada réplica de DM la distancia entre el carbono CG de la Leu 306 de la quinasa y el carbono CB de la Val 24 y la Phe 25 del sustrato. Distancias hasta los 5°A indican interacción. Se observa en todo momento al menos uno de los dos residuos (Val 24 o Phe 25 de GarA) interactúa con el bolsillo hidrofóbico de PknG, sugiriendo que estas interacciones son de suma importancia para anclar el sustrato a la quinasa,

permitiendo que sólo la Thr 21 se posicione en la posición reactiva. *Por consiguiente, proponemos que estas son las interacciones que aportan en forma mayoritaria a la especificidad de PknG y analizaremos este punto en más detalle.*

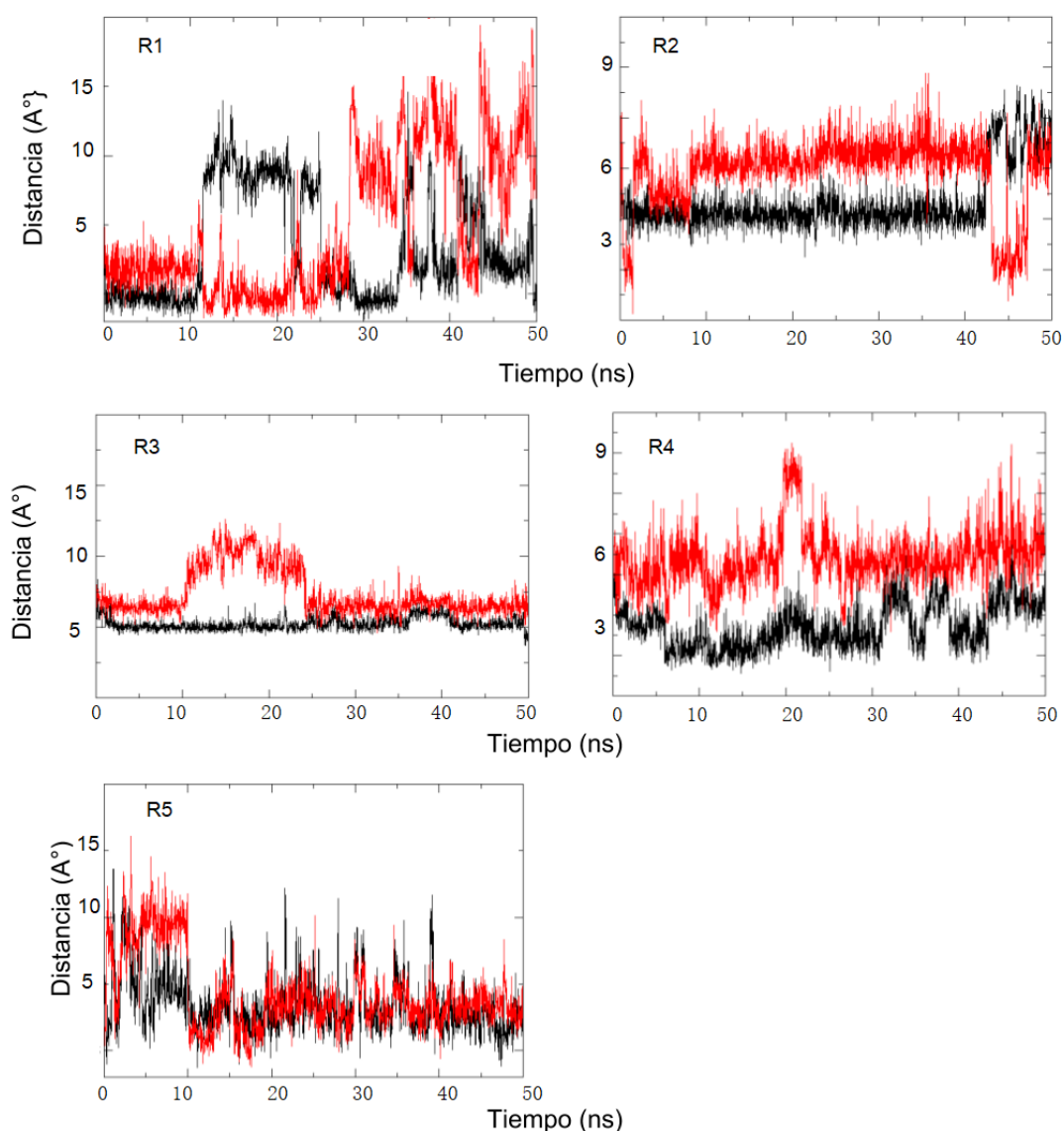


Figura 3.12. Interacciones hidrofóbicas entre GarA y PknG. Se observa la distancia de la Val 24 (rojo) y la Phe 25 (negro) de GarA al bolsillo hidrofóbico de PknG (puntualmente, se midió la distancia entre el CG de la Leu 306 de la quinasa al CB de la Val 24 y Phe 25 del sustrato) para cada una de las 5 réplicas de DM ensayadas.

Otra interacción que vale la pena destacar es la que se da entre el hidroxilo de la Thr 309 de PknG y carboxilo del Glu 20 de GarA. La Thr 309 se encuentra en el P+1 *loop* (Figura 1.5), y su relevancia fue puesta de manifiesto en estudios previos en los

cuales se ensayó la actividad quinasa *in-vitro* de distintos mutantes para PknG, observándose pérdida total de actividad cuando esta Thr fue sustituida por Ala, Glu o Asp, mientras que al ser sustituida por Ser la pérdida de actividad fue solo parcial (Tiwari et al. 2009). Estos datos resaltan la importancia de la interacción establecida por el grupo hidroxilo de la Thr 309, que fue descrita también por Lisa et al. (Lisa et al. 2015). Esta interacción es una de las más estables observada durante las DM, lo cual valida nuestro modelo (Figura 3.13).

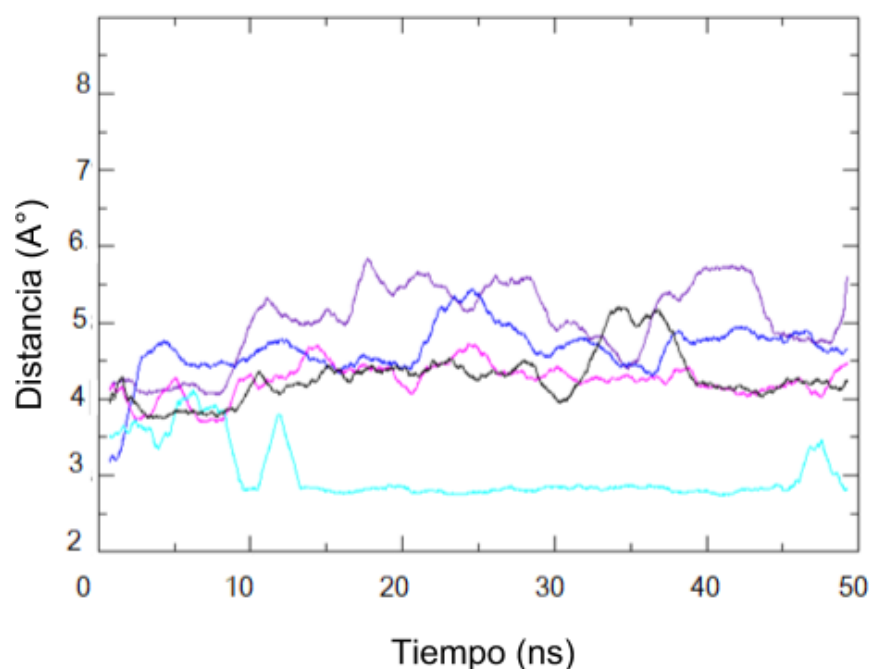


Figura 3.13. Distancia entre hidroxilo de la Thr 309 de PknG y el Glu 20 de GarA a lo largo de 5 DM de 50 ns.

3.2.2. Comparación con otros sustratos de PknG

Hasta la fecha, GarA así como la propia PknG (en su región de sitios autofosforilables Thr 23, 32, 63 y 64) son los sustratos más estudiados de la quinasa (O'Hare et al. 2008; Tiwari et al. 2009; Scherr et al. 2009; Prusic et al. 2010; Mueller and Pieters 2017); de todos modos se han reportado también otros sustratos (Qu et al. 2007; Baugh et al. 2015; Gee et al. 2012; Gil et al. 2018; Deng et al. 2014; Wu et al. 2017). Dado que nuestro modelo sugiere que para que PknG forme un complejo estable con su sustrato son necesarios residuos hidrofóbicos en las posiciones P+3 y P+4, se realizó un alineamiento con todos los sustratos reportados de la quinasa,

para ver si este tipo de residuos aparecen en las posiciones mencionadas (Figura 3.13).

		P			+3	+4	
GarA	V E	T ₂₁	T S	V F	R		
PknG	T A	T ₂₃	S A	T V	R		
PknG	L S	T ₃₂	Q A	V F	R		
PknG	M A	T ₆₃	T S	R V	R		
PknG	A T	T ₆₄	S R	V R	P		
L13	G D	T ₁₁	R S	W Y	V		
RmlA	S G	T ₁₂	R L	Y P	I		
RmlA	P I	T ₁₈	M G	I S	K		
EchA8	T A	T ₂₀₄	T I	S Q	M		
GD	N T	T ₇₇	A R	I D	P		
FhaA	E Q	T ₁₈	V G	D A	F		
FhaA	L H	T ₁₁₆	G Q	F R	A		

Figura 3.14. Comparación de las secuencias de los sustratos conocidos de PknG. Se analizó la región que va desde el residuo P -2 hasta el residuo P+4.

Se observa que que la mayoría de los sustratos posee un residuo hidrofóbico en las posiciones P+3 y/o P +4, lo cual confirma la importancia de la presencia de residuos hidrofóbicos en estas posiciones.

3.2.3. Desempeño del campo de fuerzas FoldX sobre mutantes puntuales

A continuación, nos preguntamos si el campo de fuerzas de *FoldX* (Schymkowitz et al. 2005) es capaz de reproducir lo observado hasta el momento en relación al modelo propuesto PknG-sustrato-ATP-Mg, es decir, la preferencia de residuos hidrofóbicos en las posiciones P+3 y P+4. Para ello, sobre fotos procedentes de la DM, se escaneó la secuencia del sustrato peptídico, cambiando cada residuo de la secuencia WT (*wild type*) por los otros 19 aminoácidos en forma secuencial.

El protocolo empleado se detalla en la sección materiales y métodos, pero básicamente se computó " $\Delta\Delta G$ " del cambio aminoacídico (ecuación 3.1). A continuación, para cada valor de "energía" se computó un cociente de afinidad entre

el péptido mutante y el péptido WT (ecuación 3.2) a fin de tener una métrica que describa cuánto afecta la mutación a la unión del péptido a PknG. Luego con estos datos se calculó un logo con el servidor Seq2Logo-2.0 (Thomsen and Nielsen 2012). El tipo de logo usado fue el Kullback-Leibler, construido a partir de una matriz de probabilidades (Thomsen and Nielsen 2012). Los logos condensan información cuantitativa sobre la conservación de una secuencia de forma gráfica, la altura de la letra muestra la preferencia por ese aminoácido en esa posición (Figura 3.15).

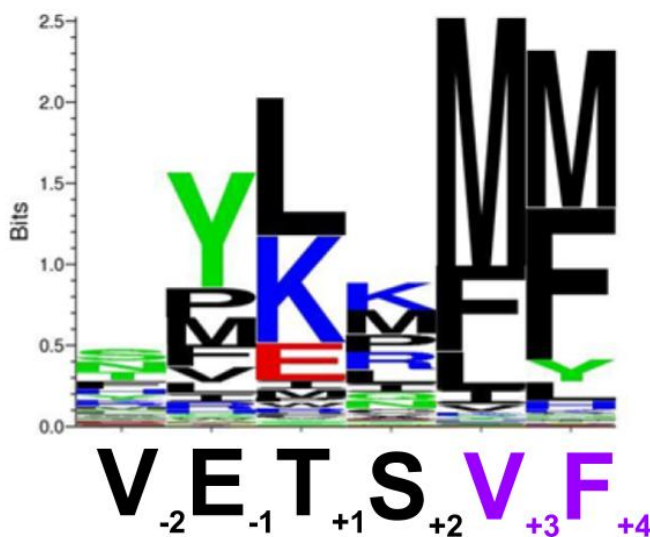


Figura 3.15. Arriba: Logo obtenido a partir de las energías de interacción de mutantes puntuales sobre la secuencia del péptido derivado de garA acomplejado con PknG (ver sección materiales y métodos). Abajo: secuencia del péptido derivado de garA mostrando motivo hidrofóbico (violeta). Para una mejor comprensión, la Thr 21 no fue incluida en el logo.

En general el programa FoldX tiende a sobreestimar los residuos metionina, pero el análisis de los resultados muestra claramente que

existe una gran predilección por aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones P+3 y P+4. Asimismo se observa que estas dos posiciones son las que más contribuyen a la energía libre de unión.

3.2.4. Determinación de actividad quinasa de PknG sobre péptido WT y péptido mutante.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, nos preguntamos si la actividad de PknG sobre GarA se vería afectada al mutar la Val 24 y la Phe 25 del sustrato. Por lo tanto, realizamos ensayos *in vitro*, en los que medimos la actividad quinasa de PknG sobre un péptido mutante en el cual estos dos residuos fueron mutados por alaninas (14SDEVTVETTSAAARADFL30). La versión *wild type* de este sustrato (14SDEVTVETTSFRRADFL30) ya ha sido utilizado en investigaciones previas (O'Hare et al 2018, Lisa et. al 2015). Se optó por trabajar con un péptido en lugar de con la

proteína completa para poder estudiar cambios en la actividad debidos a modificaciones en el *binding* del sustrato en el sitio activo, independizándonos de las interacciones que se dan entre el dominio FHA de GarA y la región N-terminal de PknG (O'Hare et al. 2008). Para ello, fue necesario poner a punto la purificación de PknG y GarA. Además, se verificó que la estructura secundaria de la quinasa sea la correcta y que la misma sea activa, para lo cual realizamos un experimento de dicroísmo circular, y medimos la actividad sobre GarA *full-length* utilizando dos técnicas distintas (ver secciones siguientes).

3.2.4.1. Purificación de PknG y GarA

Las proteínas fueron clonadas, expresadas y purificadas como se indica en el Capítulo 2.

En el caso de GarA, la proteína se expresó correctamente y no fue necesario realizar cambios con respecto a lo descrito anteriormente (Gil et al. 2013); a excepción de la eliminación del DTT del buffer B (ver sección 2.2.4), ya que el mismo interfiere con el kit comercial utilizado para medir actividad de la quinasa (sección 2.2.9.1).

Por otro lado, para la purificación de PknG (además de la eliminación del DTT del buffer B) fue necesario agregar IPTG en el momento de inducción, ya que en ausencia del mismo la expresión de la quinasa era muy pobre (Figura 3.16). El resto del protocolo es idéntico al descrito anteriormente (Gil et al. 2013).

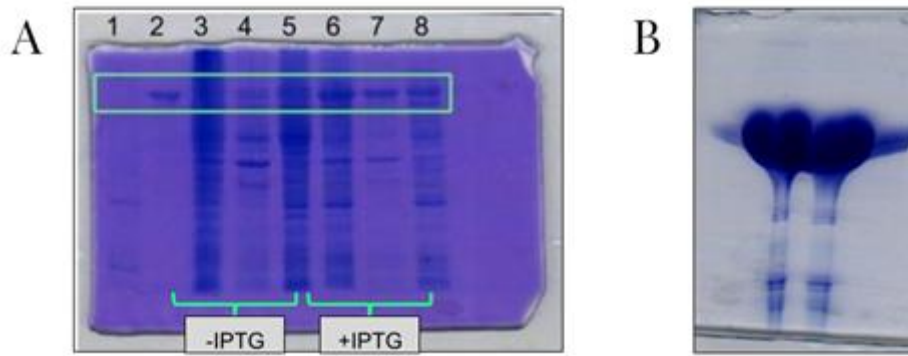


Figura 3.16. Efecto del IPTG en expresión de PknG clonada en el plásmido pET28a. A. Prueba de expresión: Se analizó el efecto del agregado de IPTG en la expresión de PknG. El clonado y la expresión fueron realizados según se detalla en materiales y métodos. 1: Marcador de peso molecular de proteínas (Ruller II, Thermofisher); 2: Proteína patrón purificada en el Instituto Pasteur de Montevideo (PU) 3: T (-IPTG); 4: S (-IPTG); 5: P (-IPTG); 6: T (+IPTG); 7: S (+IPTG); 8: P (+IPTG) B. Fracciones obtenidas luego de dializar para un cultivo inducido con IPTG conteniendo PknG.

Se observa que el agregado de IPTG aumenta la expresión de la quinasa, algo esperable dado que el promotor de pet28a se encuentra regulado por lactosa.

3.2.4.2. Análisis de la integridad estructural

Durante el proceso de purificación, las proteínas pueden sufrir desnaturalización parcial o total, lo que conduciría a una disminución de la actividad. Para determinar la integridad estructural y el correcto plegamiento de PknG, se llevaron a cabo ensayos de dicroísmo circular (Missiakas et al. 1990). En particular, se compararon los espectros de la proteína nativa y de la proteína desnaturalizada. Para cada medición se utilizó un volumen de 1 ml de proteína 5 μ M. La proteína fue desnaturalizada mediante la incubación de urea 8 M *over night*. Las mediciones de dicroísmo circular (CD) se realizaron utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810. Los espectros se registraron en una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso a 25 °C, en el rango de longitudes de onda comprendido entre 200–320 nm. La velocidad de escaneo fue de 20 nm/min con una constante de tiempo de 1 s.

En el espectro de dicroísmo circular obtenido en la región del ultravioleta lejano se observan dos mínimos (208 y 222 nm), lo que se corresponde con una estructura secundaria en la que predominan las alfa hélices (Figura 3.17 A), correspondientes al dominio TPR y al lóbulo C-terminal del dominio quinasa.

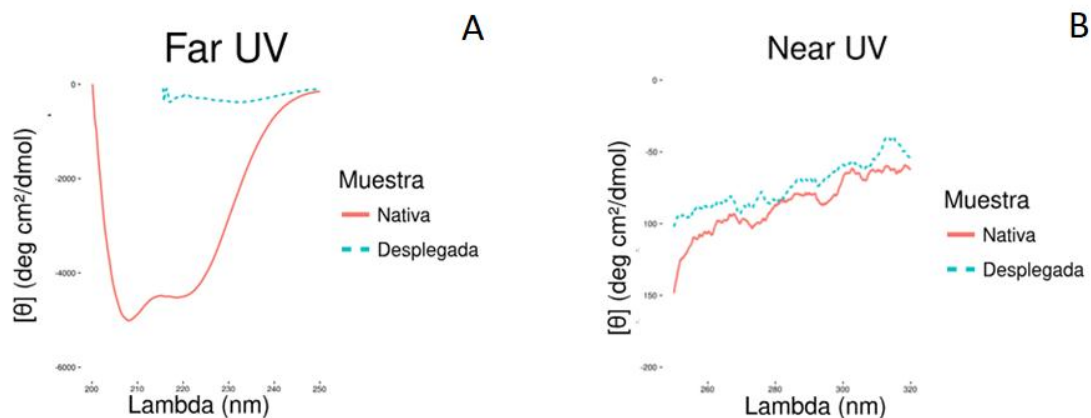


Figura 3.17. Análisis espectroscópico de la estructura de PknG. A. El espectro obtenido corresponde con lo esperado para una proteína en la que predominan las alfa hélices. B. Análisis espectroscópico del entorno de los residuos aromáticos de PknG: los espectros registrados en el UV cercano son similares para la proteína nativa y la proteína desplegada, indicando que los triptofanos se encuentran en un entorno asimétrico en la proteína nativa.

Por otro lado, se midió el espectro en la región del ultravioleta cercano para explorar el entorno de los aminoácidos aromáticos. Dado que la forma y la magnitud del espectro de dicroísmo circular cercano a UV de una proteína dependen del número de cada tipo de aminoácido aromático presente, su movilidad, la naturaleza de su entorno (enlaces H, grupos polares y polarización) y su disposición espacial (Kelly, Jess, and Price 2005), y que PknG posee 8 triptófanos y 11 fenilalaninas, esta técnica fue candidata para monitorear cambios estructurales en la quinasa. Sin embargo, no se observan grandes cambios en el espectro entre la proteína nativa y la desnaturalizada, indicando que en la proteína nativa los residuos aromáticos se encuentran en un entorno asimétrico (Figura 3.17 B), por lo que hubo que descartar la técnica.

3.2.4.3. Actividad quinasa de PknG sobre GarA

Para constatar que la quinasa se encuentre en estado activo, se realizaron ensayos de actividad quinasa *in vitro*.

3.2.4.3.1. SDS-PAGE

Puesto que la electroforesis en geles de poliacrilamida es un método rápido y sencillo para analizar muestras proteicas, y que la forma fosforilada y sin fosforilar de GarA presentan movilidades electroforéticas diferentes (O'Hare et al. 2008;

Bhattacharyya et al. 2018), se utilizó esta técnica para analizar la actividad de PknG sobre GarA. Para ello, realizamos ensayos de actividad quinasa. Se trabajó con las siguientes concentraciones: PknG 3,5 μ M, GarA 25 μ M, ATP 100 μ M, $MnCl_2$ 2 mM, Tris pH=7,4 25 mM (Gil et al. 2013) . Como controles se corrió una reacción sin ATP, otra sin sustrato, y otra sin quinasa. Para las reacciones propiamente dichas, se realizó una solución madre de la que se fueron tomando (y crackeando) alícuotas en los tiempos indicados. La incubación se realizó a 37°C.

Como puede observarse en la Figura 3.18, la quinasa producida es capaz de fosforilar a GarA, observándose fosforilación total a los 15 minutos de reacción; no obstante resultó llamativo el hecho de que GarA posea una corrida electroforética retardada con respecto a lo esperado a una proteína de su tamaño (21 kDa). Para asegurar que efectivamente se estaba trabajando con GarA, las bandas correspondientes a la proteína de las calles 3 y 8 fueron cortadas, y mandadas a analizar por espectrometría de masa al Instituto Pasteur de Montevideo; dicho análisis permitió confirmar la identidad de la proteína (O'Hare et al. 2008). Además, en el caso la calle 8, se observó un corrimiento de masa correspondiente a la incorporación de un grupo fosfato (80 Da, Figura 3.19), confirmando nuevamente la fosforilación de GarA.

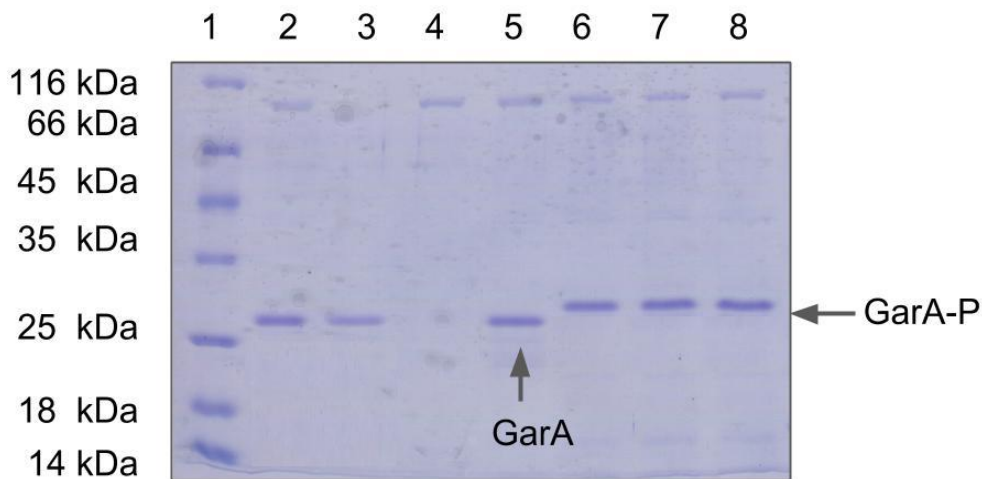


Figura 3.18. Ensayo de actividad quinasa usando una relación molar de PknG:Gar a de 1:20. 1. Marcador de peso molecular de proteínas (Ruler II, Thermofisher); 2. Reacción sin ATP; 3. GarA; 4. PknG; 5. Reacción a tiempo 0; 6. Reacción a tiempo=15 min. 7. Reacción a tiempo= 30 min; 8. Reacción a tiempo=45 min.

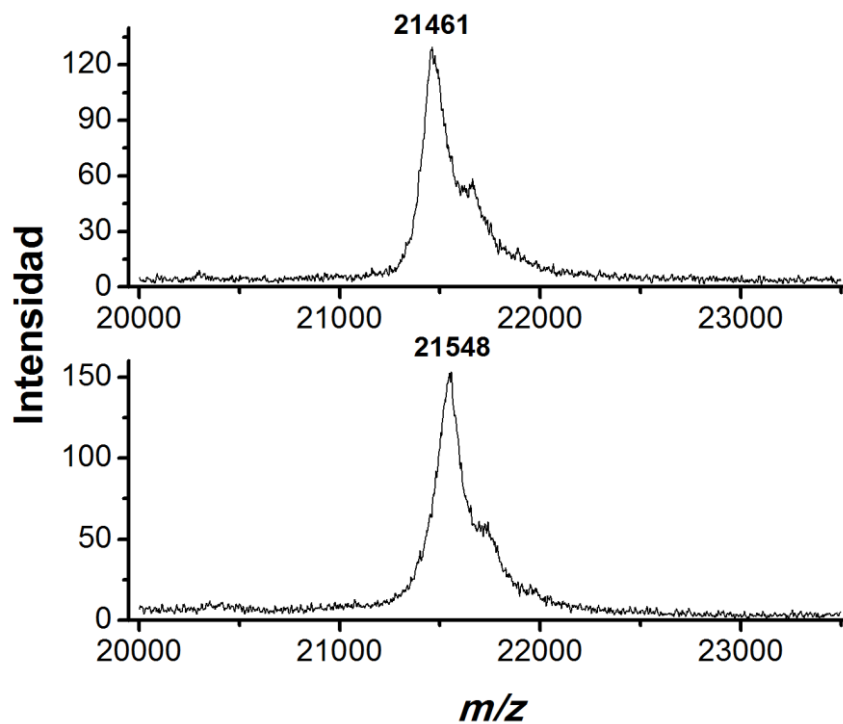


Figura 3.19. Fosforilación de GarA por PknG. Arriba: espectro de masas lineal MALDI-TOF de GarA; Abajo: espectro de masas lineal MALDI-TOF de GarA fosforilada por PknG.

3.2.4.3.2 Kinase Glo

Una vez purificadas ambas proteínas, confirmada la identidad del sustrato y la actividad de la quinasa, nos propusimos utilizar un método cuantitativo para analizar la actividad quinasa de PknG. Para ello, se empleó el kit comercial Kinase Glo (Promega), que ya había sido utilizado previamente para este sistema (Gil et al. 2013). El fundamento teórico del mismo se encuentra detallado en la sección materiales y métodos, brevemente: se corre la reacción, la cual es finalizada agregando el buffer del kit. Dicho buffer posee una enzima luciferasa que, empleando el ATP remanente, emite una señal luminiscente, la cual ha de ser leída en un luminómetro. Así, la señal es inversamente proporcional a la actividad.

Si bien el kit ya se había usado para medir actividad quinasa de PknG, fue necesario optimizar las condiciones de reacción, es decir, encontrar las condiciones que magnifiquen la diferencia entre la señal obtenida al correr la reacción sin sustrato (en la que el consumo de ATP se debe a la actividad ATPasa de PknG), y la señal obtenida al correr la reacción en presencia de sustrato, se ensayó la actividad utilizando distintos buffers de reacción (HEPES 50 mM pH=7; TRIS 25 mM pH=7,6, NaCl 100-500 mM), así como distintas concentraciones de quinasa (0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 2 y 10 μ M), de sustrato (0,1, 0,3, 1, 5, 8, 10, 12, 20 y 30 μ M), de de ATP (1, 2, 6, 8 y 10 μ M), y distintos tiempos de incubación (30, 60, 120 y 180 min).

Se determinó que las mejores condiciones para medir actividad quinasa son las siguientes: PknG 0,8 μ M, GarA 25 μ M, ATP 2 μ M, $MnCl_2$ 2 mM, buffer TRIS 25 mM, pH=7,6, 60 minutos de incubación a 37°C. Con estas condiciones, se obtienen actividades del 95% (en la sección 2.2.9.1 se explica como se realiza el cálculo de actividad)(Figura 3.20).

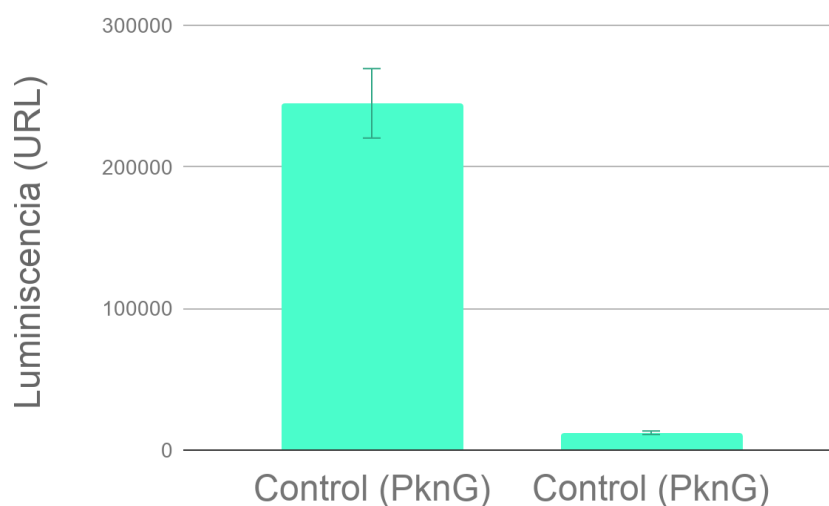


Figura 3.20. Fosforilación de GarA por PknG: se midió la actividad quinasa de PknG sobre GarA mediante la cuantificación del ATP remanente en función de las unidades relativas de luz emitidas (URL). Columna de la derecha: reacción sin sustrato, columna de la izquierda: reacción completa. La actividad calculada es de 95%.

3.2.4.4. Actividad de PknG sobre péptido *wild type* y mutante

Con el propósito de evaluar la relevancia de la interacción hidrofóbica entre PknG y GarA observada en las DM se realizaron ensayos de actividad *in vitro* utilizando el kit Kinase Glo. Para ello se utilizó un péptido mimético (14SDEVTVETTSVFRADFL30) derivado de GarA (residuos 14-30), centrado alrededor de la treonina fosforilable (Thr 21) (péptido *wild type*, WT) y un péptido mutante, en el que la Val 24 y la Phe 25 fueron sustituidas por alaninas (14SDEVTVETTTSAARADFL30). Para trabajar con los mismos se prepararon soluciones madres de 2,5 mM de cada uno. El péptido WT fue solubilizado en un buffer TRIS 100 mM, ph 7,36, NaCl 60 mM, mientras que el mutante en 3% amonio, NaCl 60 mM.

Como control positivo de actividad, se utilizó *GarA full-length*. Las reacciones se realizaron dos veces por duplicado (Figura 3.21).

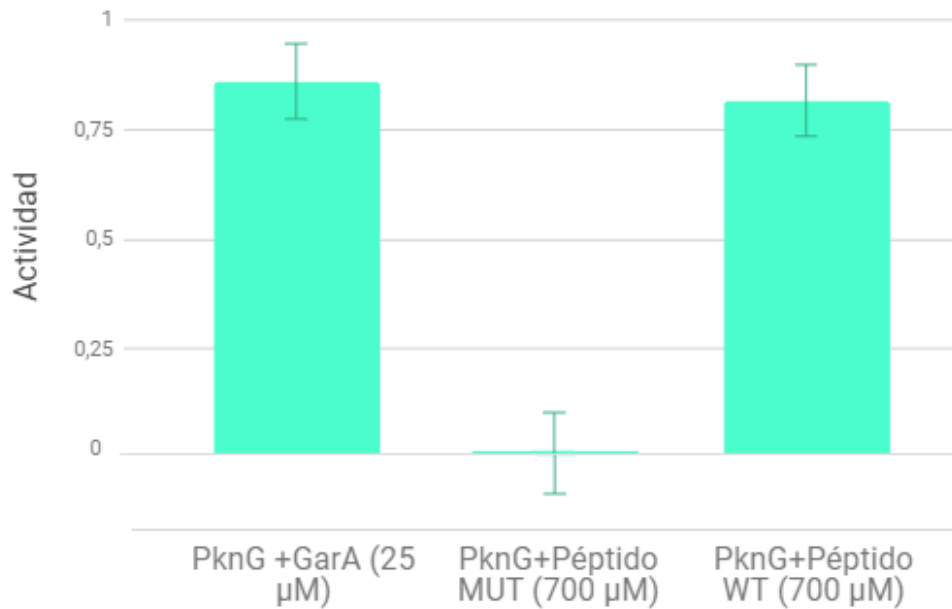


Figura 3.21. Actividad de PknG en GarA y dos péptidos miméticos. La actividad sobre GarA y sobre el péptido WT es la misma, mientras que el doble mutante (Val24Ala y Phe25Ala) tiene actividad significativamente menor (valor de $p < 0,005$).

Cabe destacar que ambos péptidos carecen del dominio FHA. Se ha informado que gracias al acoplamiento selectivo otorgado por el dominio FHA, la actividad de PknG es 45 veces mayor sobre PknG *full-length* que sobre el péptido WT (Lisa et al. 2015). En ese sentido, en nuestro laboratorio se obtuvieron resultados de actividad similares utilizando 30 veces más de sustrato en el caso de las mediciones realizadas sobre los péptidos. Se empleó una concentración final de 25 μM para las reacciones realizadas sobre GarA *full-length*, y 700 μM para los péptidos.

Se observa que al mutar la Val 24 y la Phe 25 por alaninas se produce una drástica caída en la capacidad del péptido de ser fosforilado, lo que sugiere que estos residuos son importantes para la unión del péptido derivado de GarA a PknG.

3.2.4.5. Análisis de la actividad de PknG sobre péptido WT y mutante por espectrometría de masa

Finalmente, se utilizó espectrometría de masa para analizar la actividad de PknG sobre los péptidos WT y mutante.

En esta sección se quisieron poner a prueba dos hipótesis: i) se espera que ante la ausencia de los dos residuos que postulamos como los principales responsables

de la fosforilación específica de GarA por PknG en la Thr 21 (Val 24, Phe 25) la actividad quinasa de PknG sea menor, al igual que se observó en el apartado anterior; ii) se espera que la quinasa sea capaz de fosforilar tanto la Thr 21 como la Thr 22.

Dado que la actividad registrada en el péptido mutante en el ensayo realizado con el Kinase Glo fue muy baja, para este experimento se aumentó 10 veces la cantidad de PknG empleada, 500 veces la cantidad de ATP y tres veces el tiempo de incubación, a fin de maximizar la señal. El resto de las variables no sufrieron modificaciones con respecto a los ensayos anteriores.

En total se realizaron 4 reacciones (volumen final 30 μ L), cada una por duplicado, conteniendo PknG 5 μ M, GarA 50 μ M, ATP 1 mM; PknG 5 μ M, ATP 1 mM; PknG 5 μ M, péptido wt 700 μ M, ATP 1 mM; PknG 5 μ M, péptido mutante 700 μ M, ATP 1 mM. El buffer empleado fue TRIS 50 mM, pH=7,4, MnCl₂ 2 mM, NaCl 60 mM. Se incubó a 37°C durante 3 hs, luego se crackeó, se congeló a -20°C, y las muestras fueron enviadas para su análisis al Instituto Pasteur de Montevideo.

En la Figura 3.22 se observan los espectros de masa de ambos péptidos. En el caso del péptido WT se observan 3 picos: el relativo al péptido sin fosforilar (1915,90 m/z), otro que presenta el corrimiento propio de la incorporación de un grupo fosfato (1995,86 m/z), y otro que presenta un corrimiento de -18 Da. Este último corrimiento es usual en muestras fosforiladas: está bien establecido que los péptidos de fosfoserina y fosfotreonina se fragmentan principalmente a través de la eliminación de H₃PO₄. Esta pérdida de ácido fosfórico puede originarse a partir de una pérdida directa de H₃PO₄, o pérdidas combinadas de HPO₃ y una molécula de agua de la cadena lateral de un residuo que contiene un grupo hidroxilo. El resultado de estas pérdidas es el corrimiento de -80 y -98 Da con respecto al péptido fosforilado, respectivamente (Potel, Lemeer, and Heck 2018). En resumen, teniendo en cuenta la intensidad de los 3 picos, podemos decir que el péptido WT fue mayoritariamente fosforilado.

Por otro lado, en el caso del péptido mutante, se observan también tres picos: uno de mayor intensidad correspondiente al péptido sin fosforilar (1811,83 m/z), y dos muy tenues correspondientes al péptido fosforilado (1793,86 y 1898,78 m/z). En concordancia con el ensayo de medición de ATP remanente, el péptido mutante

presenta una fosforilación menor con respecto al WT, incluso pese al aumento de la concentración de quinasa y ATP, y del tiempo de incubación, confirmando que efectivamente la quinasa es capaz de fosforilar a este péptido, pero con una menor afinidad.

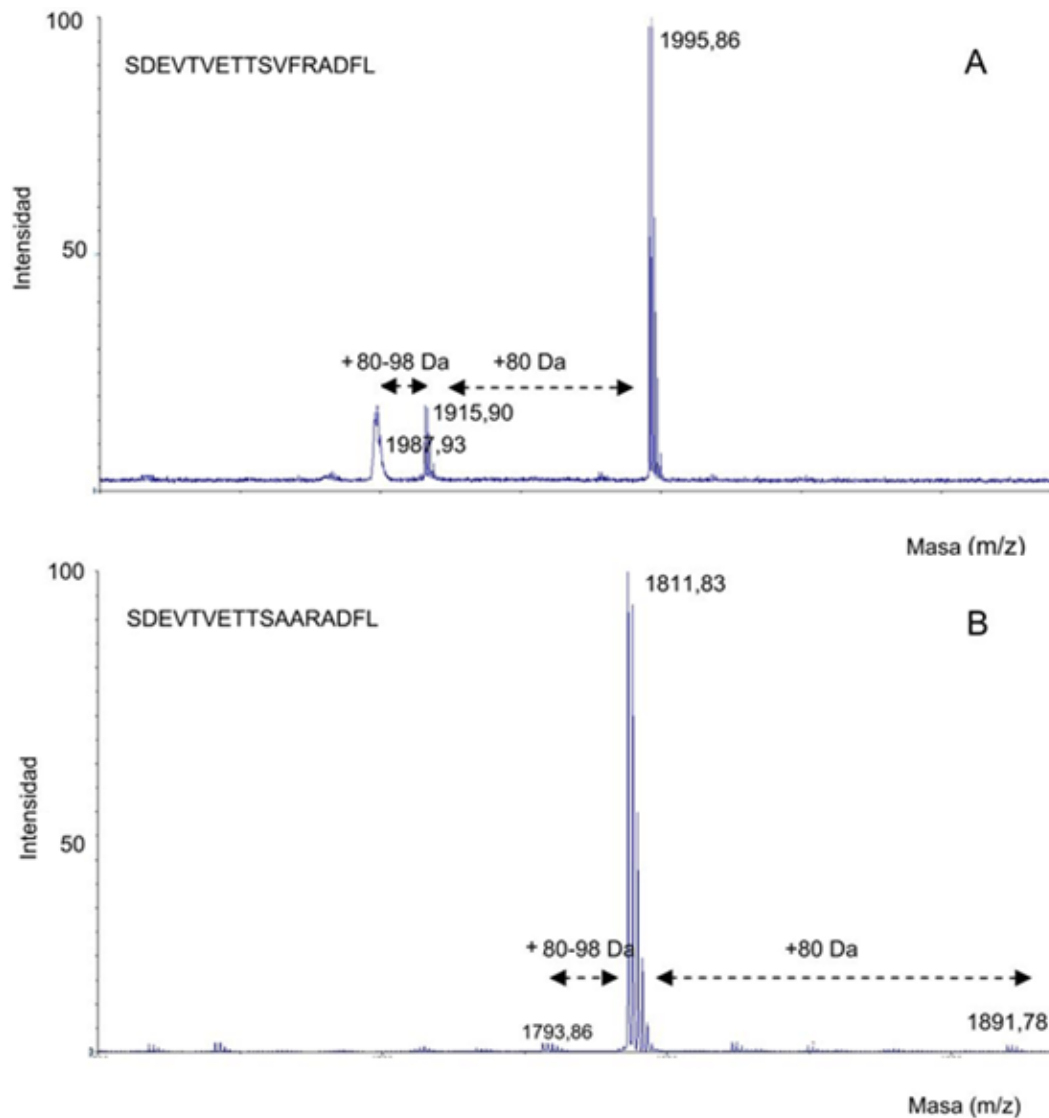


Figura 3.22. Espectros de masa de péptido WT (A) y mutante (B).

Luego, para identificar los residuos que se fosforilaron, se analizaron los espectros MS/MS provenientes de la digestión con tripsina de las reacciones de ambos péptidos.

En el caso del péptido WT, se identificaron dos señales correspondientes a la Thr 21 fosforilada (1138,9 y 1236,9 m/z), mientras que no se detectaron los fragmentos teóricos estimados para el residuo sin fosforilar (ver Tabla 3.1 de información

suplementaria), indicando que el péptido fue fosforilado en su totalidad en esta treonina. Por otro lado, para la Thr 22 se observó lo inverso: se detectó el ión correspondiente al residuo sin fosforilar (1055,9 m/z), pero no los iones correspondientes al residuo fosforilado. Concordantemente con lo descrito en trabajos previos (O'Hare et al. 2008), PknG muestra una gran especificidad, incluso en alta concentración, exceso de ATP y el largo tiempo de incubación (Figura 3.22).

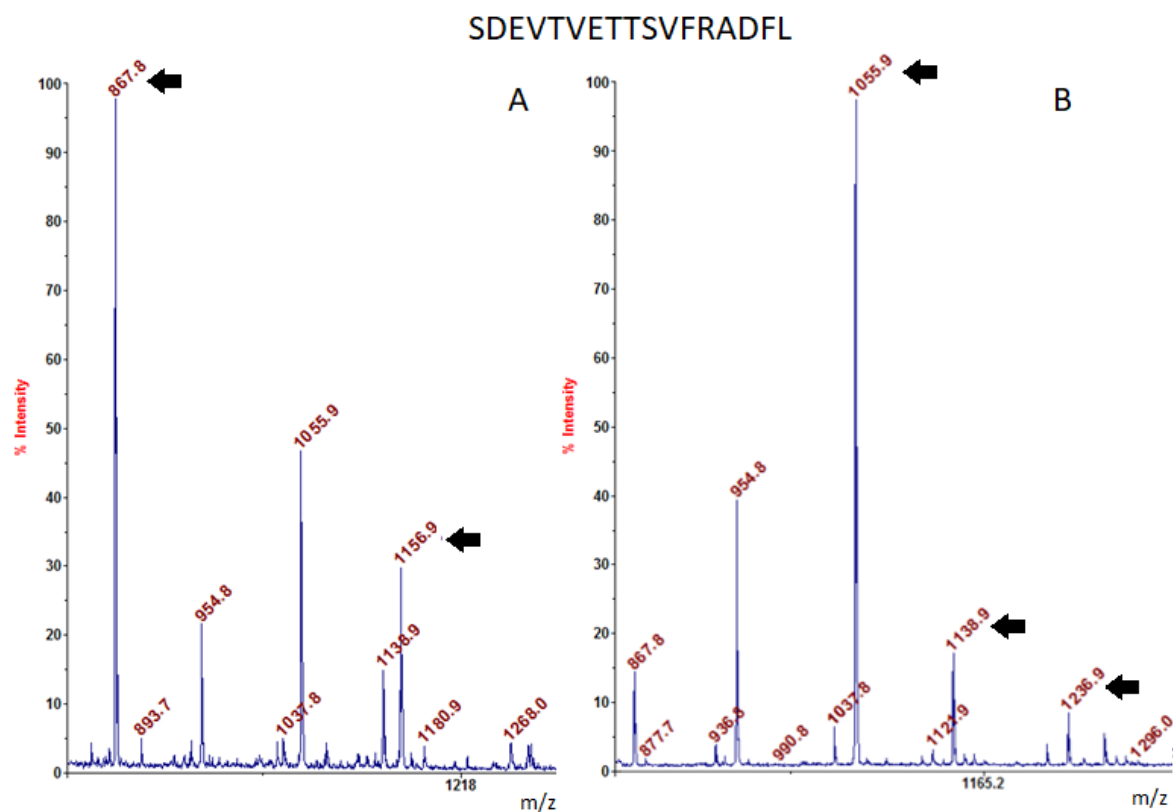


Figura 3.23. Espectros de fragmentación MS/MS de péptido WT nativo y fosforilado. A: Péptido WT nativo. Las flechas indican los iones correspondientes a la Thr 21 sin fosforilar (877, 8 y 1156,9 m/z). B: Péptido WT fosforilado. Las flechas indican los iones correspondientes a la Thr 21 fosforilada (1138,9 y 1236,9 m/z) y a la Thr 22 sin fosforilar (1055,9 m/z).

Por otro lado, en el caso del péptido mutante se pudo identificar inequívocamente la fosforilación de la Thr 21 (ver tabla 3.2 en información suplementaria), mientras que otras señales muy tenues sugieren que de la reacción se obtuvo una mezcla de péptidos monofosforilados (información no mostrada), sin embargo con los resultados obtenidos no es posible identificarlos debido a la poca intensidad de las bandas.

3.3. Conclusiones

A pesar de la identificación de STPKs mediante el análisis de genomas bacterianos y la demostración de la actividad de fosforilación *in vitro* de un número significativo de sustratos de STPKs, existe información muy limitada con respecto a su especificidad. En lo que se refiere a la misma, podemos establecer dos niveles: i) uno vinculado a la secuencia consenso, es decir, a los aminoácidos en la vecindad del sitio P que a menudo contribuyen sustancialmente a la energía de unión (Rust and Thompson 2011), y otro, ii) que implica interacciones entre los motivos de unión del sustrato con dominios de interacción en la quinasa (Holland and Cooper 1999; Biondi and Nebreda 2003), como por ejemplo los que se dan entre la región N-terminal de PknG y el dominio FHA de GarA (O'Hare et al. 2008). Para otras quinasas, el primero ha sido bien descrito (Ubersax and Ferrell 2007), no siendo así en el caso de PknG y PknB, dos de las STPKs más estudiadas, claves en la regulación de la fisiología de *Mtb*. (Walburger et al. 2004; Pablo Fernandez et al. 2006; Sharma et al. 2006; Dasgupta et al. 2006; Parikh et al. 2009; Tiwari et al. 2009; Bhattacharyya et al. 2018; Paroha et al. 2018). En particular, se han dilucidado los efectos de la fosforilación en GarA, un importante regulador del metabolismo (O'Hare et al. 2008; Ventura et al. 2013; Nott et al. 2009; Rieck et al. 2017; Khan et al. 2017; Bhattacharyya et al. 2018), pero hasta el momento los detalles a nivel atómico de la especificidad de cada quinasa no han sido determinados.

La mayoría de las quinasas establecen contactos con al menos cuatro residuos en cada lado del sitio P, pero también secuencias más distales pueden contribuir a la unión y especificidad al interactuar con las porciones que están fuera del sitio activo (Biondi and Nebreda 2003). **En este capítulo se demostró que los aminoácidos en la vecindad del sitio P que contribuyen a la unión de GarA a PknB o PknG son diferentes, así como la naturaleza de interacciones que establecen.**

Por un lado, el modelo de anclaje de PknG propuesto requiere de la presencia de dos residuos hidrofóbicos en las posiciones P+3 y P+4, que interactúan con un bolsillo hidrofóbico de la quinasa, lo que posiciona a la Thr 21 en el sitio reactivo. Este mecanismo de anclaje que implica interacciones hidrofóbicas entre residuos

del sustrato posicionados en la región C-terminal con respecto al sitio P ha sido ampliamente descrito en la literatura (Johnson, Noble, and Owen 1996; Johnson et al. 1998; Biondi and Nebreda 2003; Kornev and Taylor 2010). Incluso, se observa en la quinasa $C\alpha$ (Lee et al. 2017), una proteína de mamíferos estrechamente relacionada con PknG (Tiwari et al. 2009), así como en PKA (Krupa and Srinivasan 2005).

En los ensayos de actividad quinasa *in vitro* realizados se observa que las mutaciones del péptido GarA en las posiciones P+3 y P+4 reducen drásticamente la fosforilación por PknG, mientras que la comparación con otros sustratos, así como las mutaciones realizadas *in silico* ponen de manifiesto la importancia de residuos hidrofóbicos en estas posiciones. Además, el análisis de espectrometría de masas sugiere una pérdida parcial de especificidad sobre el péptido mutante, reforzando nuestro modelo.

Como se mencionó anteriormente la importancia de la Thr 309 de PknG para el reconocimiento de sustrato fue reportada previamente (Tiwari et al. 2009). Lisa et al. (Lisa et al. 2015) por su parte, propusieron que esta treonina estaría interactuando con el Glu 20 de GarA. Mediante el análisis de las DM, hemos podido establecer que, efectivamente, la Thr 309 aporta una gran estabilidad al complejo PknG-GarA mediante la interacción con el Glu 20 del sustrato.

Por otro lado, la principal contribución a la interacción GarA-PknB es el puente salino establecido por la Arg 26 de GarA una de las con treoninas fosforiladas del *loop* de activación de PknB. Este tipo de interacción se observa también en CDK2, una quinasa que tiene preferencia por residuos básicos en la posición P+3, los cuales interactúan con la pThr 160 de la quinasa. Se ha observado que al mutar esta treonina por alanina, la quinasa pierde actividad. (Brown et al. 1999; Holmes and Solomon 2001). Del mismo modo, se ha reportado una preferencia de la quinasa 2PHK por argininas en la posición P+2, de modo que pueda interactuar con el Glu 182 (Lowe et al. 1997), en un tipo de interacción similar al señalado en PknB.

Las interacciones hidrofóbicas en PknB tampoco pueden ser descartadas, aunque en nuestras DM parecen contribuir poco a la especificidad, debido a la labilidad de las mismas. Como ya ha sido mencionado, otros autores consideran que estas interacciones podrían ser centrales en el reconocimiento de sustrato por

parte de PknB (Kang et al. 2005; Prisic et al. 2010). De hecho, se ha postulado que la presencia de un residuo hidrofóbico en las posiciones P+2 y P+3 es clave para el reconocimiento de sustrato de las quinasas PknB, PknD, PknE y PknF (Prisic et al. 2010), todas ellas STPKs con *loops* de activación con sitios fosforilables, capaces de fosforilar a GarA (Villarino et al. 2005).

Vale la pena destacar la interacción observada entre la Arg 101 de PknB y el Glu en la posición P-2 de GarA, cuya importancia ha sido señalada previamente. (Prisic et al. 2010). Notar, que éste residuo (P-2) también participa en el reconocimiento de GarA por PknG; mientras que en la primer quinasa este interactúa con un residuo del lóbulo N del dominio quinasa (Arg 101), en PknG la interacción se da con un residuo del lóbulo C (Thr 309).

Un aspecto interesante y que vale la pena resaltar es que hasta el momento se ha reportado un solo sustrato que es fosforilado tanto por PknB como por PknG en el mismo sitio, la proteína FhaA, que regula el crecimiento celular y la síntesis de peptidoglicanos mediante la unión a MviN (Roumestand et al. 2011; Gee et al. 2012; Gil et al. 2018). Dicho sustrato, posee una Phe en la posición P+3, y una Arg en la posición P+4. Es decir, presenta en forma simultánea tanto un residuo hidrofóbico en la posición P+3 (clave para la fosforilación mediada por PknG según nuestro modelo) como una Arg en la posición P+4 (clave para la fosforilación mediada por PknB según nuestro modelo).

En otro orden de cosas, como mencionamos anteriormente, se ha postulado que el dominio Rbx podría modular la entrada del sustrato al sitio activo por impedimento estérico (Lisa et al. 2015), en este sentido en nuestros ensayos de DM, en los cuales PknG se encuentra en estado activo, se observa una gran movilidad de este dominio. Esto sugiere que cambios en el Rbx podrían generar fácilmente cambios en su locación y quizás interferir con la entrada de sustrato o modificar el sitio activo de la quinasa.

Otro hecho observado en la dinámica de PknB que merece la pena ser mencionado es la disposición del parche básico que estabiliza a la Thr 171. Cuando se compara con un grupo similar en PKA (Knighton et al. 1991), se encuentra que la región cargada positivamente en PknB cubre una superficie más amplia, lo que nos permite suponer que esta región es capaz de unir indistintamente al grupo fosfato de

la pThr 171 como el de la pThr 173. En este trabajo se le asignó en forma arbitraria el rol de fosfato primario a la Thr 171, pero es probable que la Thr 173 pueda cumplir este rol también.

3.4. Información suplementaria

b+80-98	b+80	b				y	y+80	y+80-98
		---	1	S	17			
		203,0662	2	D	16	1828,8963	1908,8963	1810,8963
		332,1088	3	E	15	1713,8694	1793,8694	1695,8694
		431,1773	4	V	14	1584,8268	1664,8268	1566,8268
		532,2249	5	T	13	1485,7584	1565,7584	1467,7584
		631,2933	6	V	12	1384,7107	1464,7107	1366,7107
		760,3359	7	E	11	1285,6423	1365,6423	1267,6423
843,3836	941,3836	861,3836	8	T	10	1156,5997	1236,5997	1138,5997
944,4313	1042,4313	962,4313	9	T	9	1055,552	1135,552	1037,552
1031,4633	1129,4633	1049,4633	10	S	8	954,5043		
1130,5317	1228,5317	1148,5317	11	V	7	867,4723		
1277,6002	1375,6002	1295,6002	12	F	6	768,4039		
1433,7013	1531,7013	1451,7013	13	R	5	621,3355		
1504,7384	1602,7384	1522,7384	14	A	4	465,2344		
1619,7653	1717,7653	1637,7653	15	D	3	394,1973		
1766,8337	1864,8337	1784,8337	16	F	2	279,1703		
		---	17	L	1	132,1019		

Tabla 3.1 Fragmentación teórica de péptido WT, iones principales teóricos predichos con Mascot en negro. En rojo, los iones detectados por el espectro

b+80-98	b+80	b				y	y+80	y+80-18
		---	1	S	17	---		
		203,0662	2	D	16	1724,8337	1804,8337	1706,8337
		332,1088	3	E	15	1609,8068	1689,8068	1591,8068
		431,1773	4	V	14	1480,7642	1560,7642	1462,7642
		532,2249	5	T	13	1381,6958	1461,6958	1363,6958
		631,2933	6	V	12	1280,6481	1360,6481	1262,6481
		760,3359	7	E	11	1181,5797	1261,5797	1163,5797
843,3836	941,3836	861,3836	8	T	10	1052,5371	1132,5371	1034,5371
944,4313	1042,4313	962,4313	9	T	9	951,4894	1031,4894	933,4894
1031,4633	1129,4633	1049,4633	10	S	8	850,4417	930,4417	832,4417
1102,5004	1200,5004	1120,5004	11	A	7	763,4097		
1173,5376	1271,5376	1191,5376	12	A	6	692,3726		
1329,6387	1427,6387	1347,6387	13	R	5	621,3355		
1400,6758	1498,6758	1418,6758	14	A	4	465,2344		
1515,7027	1613,7027	1533,7027	15	D	3	394,1973		
1662,7711	1760,7711	1680,7711	16	F	2	279,1703		
		---	17	L	1	132,1019		

Tabla 3.2. Fragmentación teórica de péptido WT, iones principales teóricos predichos con Mascot en negro. En rojo, los iones detectados por el espectro.

3.5. Materiales y métodos

3.5.1. Mutagénesis *in silico* utilizando el software FoldX

En el Capítulo 2 se explican los detalles de la implementación del campo de fuerzas de FoldX. En este apartado explicaremos los parámetros empleados para la evaluación del complejo PknG-GarA. Como primer paso se mutó en forma secuencial cada aminoácido del sustrato peptídico por los otros 19 posibles, utilizando el módulo *BuildModel*, luego se estimó la energía de unión entre la quinasa y el péptido tanto para el complejo WT como para los mutantes, utilizando la herramienta *Analyze complex*.

El cambio en la energía de interacción para cada mutante se computó como:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{mut} - \Delta G_{WT} \text{ (ecuación 3.1)}$$

(ecuación 3.1)

donde mut es la mutante y wt es la secuencia original.

El cociente de afinidades entre un péptido mutante y uno WT se computó como:

$$\text{Cociente de afinidades} = e^{\frac{-\Delta\Delta G}{RT}} \text{ (ecuación 3.2)}$$

(ecuación 3.2)

donde R = cte universal de los gases y T la temperatura en K.

3.5.2. Puesta a punto de purificación de PknG

Para analizar la expresión de PknG en los distintos ensayos de expresión, se tomó una muestra de cada cultivo ("T"), y luego se sonicó hasta lisis total utilizándose pulsos de 25% de amplitud durante 15 segundos (Vibracell, Sonic), con pausas de 1 minuto entre pulso y pulso. Los restos bacterianos fueron centrifugados durante 20 minutos a 4°C a 20.000 G (Hanil, Combi 514R). El pellet fue resuspendido en Buffer A en el mismo volumen que el cultivo original. Así, se sembraron T, sobrenadante (S) y pellet resuspendido (P) para cada cultivo según se indica en el Capítulo 2.

3.6. Bibliografía

- Allnér, Olof, Lennart Nilsson, and Alessandra Villa. 2012. "Magnesium Ion–Water Coordination and Exchange in Biomolecular Simulations." *Journal of Chemical Theory and Computation* 8 (4): 1493–1502.
- Av-Gay, Y., and M. Everett. 2000. "The Eukaryotic-like Ser/Thr Protein Kinases of Mycobacterium Tuberculosis." *Trends in Microbiology* 8 (5): 238–44.
- Barik, Subhasis, Kamakshi Sureka, Partha Mukherjee, Joyoti Basu, and Manikuntala Kundu. 2010. "RseA, the SigE Specific Anti-Sigma Factor of Mycobacterium Tuberculosis, Is Inactivated by Phosphorylation-Dependent ClpC1P2 Proteolysis." *Molecular Microbiology* 75 (3): 592–606.
- Barthe, Philippe, Christian Roumestand, Marc J. Canova, Laurent Kremer, Corinne Hurard, Virginie Molle, and Martin Cohen-Gonsaud. 2009. "Dynamic and Structural Characterization of a Bacterial FHA Protein Reveals a New Autoinhibition Mechanism." *Structure* 17 (4): 568–78.
- Baugh, Loren, Isabelle Phan, Darren W. Begley, Matthew C. Clifton, Brianna Armour, David M. Dranow, Brandy M. Taylor, et al. 2015. "Increasing the Structural Coverage of Tuberculosis Drug Targets." *Tuberculosis* 95 (2): 142–48.
- Bellon, S., M. J. Fitzgibbon, T. Fox, H. M. Hsiao, and K. P. Wilson. 1999. "The Structure of Phosphorylated p38 γ Is Monomeric and Reveals a Conserved Activation-Loop Conformation." *Structure* .
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212699801737>.
- Bhattacharyya, Nabanita, Irene Nailain Nkumama, Zaccheus Newland-Smith, Li-Ying Lin, Wen Yin, Rebecca E. Cullen, Jack S. Griffiths, et al. 2018. "An Aspartate-Specific Solute-Binding Protein Regulates Protein Kinase G Activity To Control Glutamate Metabolism in Mycobacteria." *mBio* 9 (4).
<https://doi.org/10.1128/mBio.00931-18>.
- Biondi, Ricardo M., and Angel R. Nebreda. 2003. "Signalling Specificity of Ser/Thr Protein Kinases through Docking-Site-Mediated Interactions." *Biochemical Journal* 372 (Pt 1): 1–13.
- Boitel, Brigitte, Miguel Ortiz-Lombardía, Rosario Durán, Frédérique Pompeo, Stewart T. Cole, Carlos Cerveñansky, and Pedro M. Alzari. 2003. "PknB Kinase Activity Is Regulated by Phosphorylation in Two Thr Residues and Dephosphorylation by PstP, the Cognate Phospho-Ser/Thr Phosphatase, in Mycobacterium Tuberculosis." *Molecular Microbiology* 49 (6): 1493–1508.
- Brown, N. R., M. E. Noble, J. A. Endicott, and L. N. Johnson. 1999. "The Structural Basis for Specificity of Substrate and Recruitment Peptides for Cyclin-Dependent Kinases." *Nature Cell Biology* 1 (7): 438–43.
- Carvalho, Alexandra T. P., Ana F. S. Teixeira, and Maria J. Ramos. 2013. "Parameters for Molecular Dynamics Simulations of Iron-Sulfur Proteins." *Journal of Computational Chemistry* 34 (18): 1540–48.
- Case, D. Amerr, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, et al. n.d. "AMBER 12; University of California: San Francisco, 2012." *There Is No Corresponding Record for This Reference*, 1–826.
- Chawla, Yogesh, Sandeep Upadhyay, Shazia Khan, Sathya Narayanan Nagarajan, Francesca Forti, and Vinay Kumar Nandicoori. 2014. "Protein Kinase B (PknB) of Mycobacterium Tuberculosis Is Essential for Growth of the Pathogen in Vitro as Well as for Survival within the Host." *The Journal of*

- Biological Chemistry* 289 (20): 13858–75.
- Craft, John W., Jr, and Glen B. Legge. 2005. “An AMBER/DYANA/MOLMOL Phosphorylated Amino Acid Library Set and Incorporation into NMR Structure Calculations.” *Journal of Biomolecular NMR* 33 (1): 15–24.
- Dasgupta, Arunava, Pratik Datta, Manikuntala Kundu, and Joyoti Basu. 2006. “The Serine/threonine Kinase PknB of Mycobacterium Tuberculosis Phosphorylates PBPA, a Penicillin-Binding Protein Required for Cell Division.” *Microbiology* 152 (Pt 2): 493–504.
- Deng, Jiaoyu, Lijun Bi, Lin Zhou, Shu-Juan Guo, Joy Fleming, He-Wei Jiang, Ying Zhou, et al. 2014. “Mycobacterium Tuberculosis Proteome Microarray for Global Studies of Protein Function and Immunogenicity.” *Cell Reports* 9 (6): 2317–29.
- Durán, Rosario, Andrea Villarino, Marco Bellinzoni, Annemarie Wehenkel, Pablo Fernandez, Brigitte Boitel, Stewart T. Cole, Pedro M. Alzari, and Carlos Cerveñansky. 2005. “Conserved Autophosphorylation Pattern in Activation Loops and Juxtamembrane Regions of Mycobacterium Tuberculosis Ser/Thr Protein Kinases.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (3): 858–67.
- Durocher, D., J. Henckel, A. R. Fersht, and S. P. Jackson. 1999. “The FHA Domain Is a Modular Phosphopeptide Recognition Motif.” *Molecular Cell* 4 (3): 387–94.
- England, P., A. Wehenkel, S. Martins, and S. Hoos. 2009. “The FHA- containing Protein GarA Acts as a Phosphorylation- dependent Molecular Switch in Mycobacterial Signaling.” *FEBS*.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.febslet.2008.12.036>.
- Fernandez, Pablo, Brigitte Saint-Joanis, Nathalie Barilone, Mary Jackson, Brigitte Gicquel, Stewart T. Cole, and Pedro M. Alzari. 2006. “The Ser/Thr Protein Kinase PknB Is Essential for Sustaining Mycobacterial Growth.” *Journal of Bacteriology* 188 (22): 7778–84.
- Fernandez, P., B. Saint-Joanis, N. Barilone, M. Jackson, B. Gicquel, S. T. Cole, and P. M. Alzari. 2006. “The Ser/Thr Protein Kinase PknB Is Essential for Sustaining Mycobacterial Growth.” *Journal of Bacteriology*.
<https://doi.org/10.1128/jb.00963-06>.
- Gee, Christine L., Kadamba G. Papavinasasundaram, Sloane R. Blair, Christina E. Baer, Arnold M. Falick, David S. King, Jennifer E. Griffin, et al. 2012. “A Phosphorylated Pseudokinase Complex Controls Cell Wall Synthesis in Mycobacteria.” *Science Signaling* 5 (208): ra7.
- Gil, Magdalena, Martín Graña, Francisco J. Schopfer, Tristan Wagner, Ana Denicola, Bruce A. Freeman, Pedro M. Alzari, Carlos Batthyány, and Rosario Durán. 2013. “Inhibition of Mycobacterium Tuberculosis PknG by Non-Catalytic Rubredoxin Domain Specific Modification: Reaction of an Electrophilic Nitro-Fatty Acid with the Fe-S Center.” *Free Radical Biology & Medicine* 65 (December): 150–61.
- Gil, Magdalena, Analía Lima, Bernardina Rivera, Jessica Rossello, Estefanía Urdániz, Alessandro Cascioferro, Federico Carrión, et al. 2018. “New Substrates and Interactors of the Mycobacterial Serine/Threonine Protein Kinase PknG Identified by a Tailored Interactomic Approach.” *Journal of Proteomics*, September. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.013>.
- Gupta, Meetu, Andaleeb Sajid, Gunjan Arora, Vibha Tandon, and Yogendra Singh. 2009. “Forkhead-Associated Domain-Containing Protein Rv0019c and

- Polyketide-Associated Protein PapA5, from Substrates of Serine/Threonine Protein Kinase PknB to Interacting Proteins of Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.058834>.
- Holland, P. M., and J. A. Cooper. 1999. "Protein Modification: Docking Sites for Kinases." *Current Biology: CB* 9 (9): R329–31.
- Holmes, J. K., and M. J. Solomon. 2001. "The Role of Thr160 Phosphorylation of Cdk2 in Substrate Recognition." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 268 (17): 4647–52.
- Johnson, L. N., E. D. Lowe, M. E. M. Noble, and D. J. Owen. 1998. "The Structural Basis for Substrate Recognition and Control by Protein Kinases 1." *FEBS Letters*. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/S0014-5793\(98\)00606-1](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/S0014-5793(98)00606-1).
- Johnson, L. N., M. E. Noble, and D. J. Owen. 1996. "Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation." *Cell* 85 (2): 149–58.
- Kang, Choong-Min, Derek W. Abbott, Sang Tae Park, Christopher C. Dascher, Lewis C. Cantley, and Robert N. Husson. 2005. "The Mycobacterium Tuberculosis Serine/threonine Kinases PknA and PknB: Substrate Identification and Regulation of Cell Shape." *Genes & Development* 19 (14): 1692–1704.
- Khan, Mehak Zahoor, Ashima Bhaskar, Sandeep Upadhyay, Pooja Kumari, Raju S. Rajmani, Preeti Jain, Amit Singh, Dhiraj Kumar, Neel Sarovar Bhavesh, and Vinay Kumar Nandicoori. 2017. "Protein Kinase G Confers Survival Advantage to Mycobacterium Tuberculosis during Latency-like Conditions." *The Journal of Biological Chemistry* 292 (39): 16093–108.
- Kelly, Sharon M., Thomas J. Jess, and Nicholas C. Price. 2005. "How to Study Proteins by Circular Dichroism." *Biochimica et Biophysica Acta* 1751 (2): 119–39.
- Kieser, Karen J., Cara C. Boutte, Jemila C. Kester, Christina E. Baer, Amy K. Barczak, Xavier Meniche, Michael C. Chao, et al. 2015. "Phosphorylation of the Peptidoglycan Synthase PonA1 Governs the Rate of Polar Elongation in Mycobacteria." *PLoS Pathogens* 11 (6): e1005010.
- Knighton, D. R., J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, and J. M. Sowadski. 1991. "Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase." *Science* 253 (5018): 407–14.
- Kornev, Alexandr P., and Susan S. Taylor. 2010. "Defining the Conserved Internal Architecture of a Protein Kinase." *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (3): 440–44.
- Krupa, A., and N. Srinivasan. 2005. "Diversity in Domain Architectures of Ser/Thr Kinases and Their Homologues in Prokaryotes." *BMC Genomics* 6 (September): 129.
- Lee, Sangbae, Titu Devamani, Hyun Deok Song, Manbir Sandhu, Adrien Larsen, Ruth Sommese, Abhinandan Jain, Nagarajan Vaidehi, and Sivaraj Sivaramakrishnan. 2017. "Distinct Structural Mechanisms Determine Substrate Affinity and Kinase Activity of Protein Kinase C α ." *The Journal of Biological Chemistry* 292 (39): 16300–309.
- Lisa, María-Natalia, Magdalena Gil, Gwénaëlle André-Leroux, Nathalie Barilone, Rosario Durán, Ricardo M. Biondi, and Pedro M. Alzari. 2015. "Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from Mycobacterium Tuberculosis." *Structure* 23 (6): 1039–48.

- Lombana, T. Noelle, Nathaniel Echols, Matthew C. Good, Nathan D. Thomsen, Ho-Leung Ng, Andrew E. Greenstein, Arnold M. Falick, David S. King, and Tom Alber. 2010. "Allosteric Activation Mechanism of the Mycobacterium Tuberculosis Receptor Ser/Thr Protein Kinase, PknB." *Structure* 18 (12): 1667–77.
- Lowe, E. D., M. E. Noble, V. T. Skamnaki, N. G. Oikonomakos, D. J. Owen, and L. N. Johnson. 1997. "The Crystal Structure of a Phosphorylase Kinase Peptide Substrate Complex: Kinase Substrate Recognition." *The EMBO Journal* 16 (22): 6646–58.
- Meagher, Kristin L., Luke T. Redman, and Heather A. Carlson. 2003. "Development of Polyphosphate Parameters for Use with the AMBER Force Field." *Journal of Computational Chemistry* 24 (9): 1016–25.
- Mieczkowski, Carl, Anthony T. Iavarone, and Tom Alber. 2008. "Auto-Activation Mechanism of the Mycobacterium Tuberculosis PknB Receptor Ser/Thr Kinase." *The EMBO Journal* 27 (23): 3186–97.
- Mir, Mushtaq, Jinkeng Asong, Xiuru Li, Jessica Cardot, Geert-Jan Boons, and Robert N. Husson. 2011. "The Extracytoplasmic Domain of the Mycobacterium Tuberculosis Ser/Thr Kinase PknB Binds Specific Muropeptides and Is Required for PknB Localization." *PLoS Pathogens* 7 (7): e1002182.
- Missiakas, D., J. M. Betton, P. Minard, and J. M. Yon. 1990. "Unfolding-Refolding of the Domains in Yeast Phosphoglycerate Kinase: Comparison with the Isolated Engineered Domains." *Biochemistry* 29 (37): 8683–89.
- Mueller, Philipp, and Jean Pieters. 2017. "Identification of Mycobacterial GarA as a Substrate of Protein Kinase G from M. Tuberculosis Using a KESTREL-Based Proteome Wide Approach." *Journal of Microbiological Methods* 136 (May): 34–39.
- Munshi, Tulika, Antima Gupta, Dimitrios Evangelopoulos, Juan David Guzman, Simon Gibbons, Nicholas H. Keep, and Sanjib Bhakta. 2013. "Characterisation of ATP-Dependent Mur Ligases Involved in the Biogenesis of Cell Wall Peptidoglycan in Mycobacterium Tuberculosis." *PloS One* 8 (3): e60143.
- Nott, Timothy J., Geoff Kelly, Lasse Stach, Jiejun Li, Sarah Westcott, Dony Patel, Debbie M. Hunt, et al. 2009. "An Intramolecular Switch Regulates Phospho-independent FHA Domain Interactions in Mycobacterium Tuberculosis." *Science Signaling* 2 (63): ra12.
- Nolen, Brad, Susan Taylor, and Gourisankar Ghosh. 2004. "Regulation of Protein Kinases; Controlling Activity through Activation Segment Conformation." *Molecular Cell* 15 (5): 661–75.
- O'Hare, Helen M., Rosario Durán, Carlos Cerveñansky, Marco Bellinzoni, Anne Marie Wehenkel, Otto Pritsch, Gonzalo Obal, et al. 2008. "Regulation of Glutamate Metabolism by Protein Kinases in Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 70 (6): 1408–23.
- Ortiz-Lombardía, M., F. Pompeo, and B. Boitel. 2003. "Crystal Structure of the Catalytic Domain of the PknB Serine/threonine Kinase from Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Biological Chemistry*.
<http://www.jbc.org/content/278/15/13094.short>.
- Parikh, Amit, Sunil Kumar Verma, Shazia Khan, Balaji Prakash, and Vinay Kumar Nandicoori. 2009. "PknB-Mediated Phosphorylation of a Novel Substrate, N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Uridyltransferase, Modulates

- Its Acetyltransferase Activity." *Journal of Molecular Biology* 386 (2): 451–64.
- Paroha, Ruchi, Rashmi Chourasia, Rajesh Mondal, and Shivendra K. Chaurasiya. 2018. "PknG Supports Mycobacterial Adaptation in Acidic Environment." *Molecular and Cellular Biochemistry* 443 (1-2): 69–80.
- Potel, Clement M., Simone Lemeer, and Albert J. R. Heck. 2018. "Phosphopeptide Fragmentation and Site Localization by Mass Spectrometry; an Update." *Analytical Chemistry*, November. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04746>.
- Price, Daniel J., and Charles L. Brooks 3rd. 2004. "A Modified TIP3P Water Potential for Simulation with Ewald Summation." *The Journal of Chemical Physics* 121 (20): 10096–103.
- Prigozhin, Daniil M., Kadamba G. Papavinasundaram, Christina E. Baer, Kenan C. Murphy, Alisa Moskaleva, Tony Y. Chen, Tom Alber, and Christopher M. Sassetti. 2016. "Structural and Genetic Analyses of the Mycobacterium tuberculosis Protein Kinase B Sensor Domain Identify a Potential Ligand-Binding Site." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.731760>.
- Prisic, Sladjana, Selasi Dankwa, Daniel Schwartz, Michael F. Chou, Jason W. Locasale, Choong-Min Kang, Guy Bemis, George M. Church, Hanno Steen, and Robert N. Husson. 2010. "Extensive Phosphorylation with Overlapping Specificity by Mycobacterium Tuberculosis Serine/threonine Protein Kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (16): 7521–26.
- Qu, Hong, Yi Xin, Xu Dong, and Yufang Ma. 2007. "An rmlA Gene Encoding D-Glucose-1-Phosphate Thymidyltransferase Is Essential for Mycobacterial Growth." *FEMS Microbiology Letters* 275 (2): 237–43.
- Rieck, Barbara, Giulia Degiacomi, Michael Zimmermann, Alessandro Cascioferro, Francesca Boldrin, Natalie R. Lazar-Adler, Andrew R. Bottrill, et al. 2017. "PknG Senses Amino Acid Availability to Control Metabolism and Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *PLoS Pathogens* 13 (5): e1006399.
- Roe, Daniel R., and Thomas E. Cheatham 3rd. 2013. "PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data." *Journal of Chemical Theory and Computation* 9 (7): 3084–95.
- Roumestand, Christian, Jade Leiba, Nathalie Galophe, Emmanuel Margeat, André Padilla, Yannick Bessin, Philippe Barthe, Virginie Molle, and Martin Cohen-Gonsaud. 2011. "Structural Insight into the Mycobacterium Tuberculosis Rv0020c Protein and Its Interaction with the PknB Kinase." *Structure* 19 (10): 1525–34.
- Rust, Heather L., and Paul R. Thompson. 2011. "Kinase Consensus Sequences: A Breeding Ground for Crosstalk." *ACS Chemical Biology* 6 (9): 881–92.
- Sajid, Andaleeb, Gunjan Arora, Meetu Gupta, Sandeep Upadhyay, Vinay K. Nandicoori, and Yogendra Singh. 2011. "Phosphorylation of Mycobacterium Tuberculosis Ser/Thr Phosphatase by PknA and PknB." *PloS One* 6 (3): e17871.
- Scherr, Nicole, Srinivas Honnappa, Gabriele Kunz, Philipp Mueller, Rajesh Jayachandran, Fritz Winkler, Jean Pieters, and Michel O. Steinmetz. 2007a. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12151–56.
- . 2007b. “Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of Mycobacterium Tuberculosis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12151–56.
- Scherr, Nicole, Rajesh Jayachandran, Philipp Mueller, and Jean Pieters. 2009. “Interference of Mycobacterium Tuberculosis with Macrophage Responses.” *Indian Journal of Experimental Biology* 47 (6): 401–6.
- Schymkowitz, Joost W. H., Frederic Rousseau, Ivo C. Martins, Jesper Ferkinghoff-Borg, Francois Stricher, and Luis Serrano. 2005. “Prediction of Water and Metal Binding Sites and Their Affinities by Using the Fold-X Force Field.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29): 10147–52.
- Sharma, Kirti, Meetu Gupta, Ananth Krupa, Narayanaswamy Srinivasan, and Yogendra Singh. 2006. “EmbR, a Regulatory Protein with ATPase Activity, Is a Substrate of Multiple Serine/threonine Kinases and Phosphatase in Mycobacterium Tuberculosis.” *The FEBS Journal* 273 (12): 2711–21.
- Thomsen, Martin Christen Frølund, and Morten Nielsen. 2012. “Seq2Logo: A Method for Construction and Visualization of Amino Acid Binding Motifs and Sequence Profiles Including Sequence Weighting, Pseudo Counts and Two-Sided Representation of Amino Acid Enrichment and Depletion.” *Nucleic Acids Research* 40 (Web Server issue): W281–87.
- Tiwari, Divya, Rajnish Kumar Singh, Kasturi Goswami, Sunil Kumar Verma, Balaji Prakash, and Vinay Kumar Nandicoori. 2009. “Key Residues in Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinase G Play a Role in Regulating Kinase Activity and Survival in the Host.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27467–79.
- Turapov, Obolbek, Francesca Forti, Baleegh Kadhim, Daniela Ghisotti, Jad Sassine, Anna Straatman-Iwanowska, Andrew R. Bottrill, et al. 2018. “Two Faces of CwIM, an Essential PknB Substrate, in Mycobacterium Tuberculosis.” *Cell Reports* 25 (1): 57–67.e5.
- Ubersax, Jeffrey A., and James E. Ferrell Jr. 2007. “Mechanisms of Specificity in Protein Phosphorylation.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (7): 530–41.
- Ventura, Marcello, Barbara Rieck, Francesca Boldrin, Giulia Degiacomi, Marco Bellinzoni, Nathalie Barilone, Faisal Alzaidi, Pedro M. Alzari, Riccardo Manganelli, and Helen M. O’Hare. 2013. “GarA Is an Essential Regulator of Metabolism in Mycobacterium Tuberculosis.” *Molecular Microbiology* 90 (2): 356–66.
- Villarino, A., R. Duran, A. Wehenkel, P. Fernandez, P. England, P. Brodin, S. T. Cole, et al. 2005. “Proteomic Identification of M.tuberculosis Protein Kinase Substrates: PknB Recruits GarA, a FHA Domain-Containing Protein, Through Activation Loop-Mediated Interactions.” *Journal of Molecular Biology* 350 (5): 953–63.
- Walburger, Anne, Anil Koul, Giorgio Ferrari, Liem Nguyen, Cristina Prescianotto-Baschong, Kris Huygen, Bert Klebl, Charles Thompson, Gerald Bacher, and Jean Pieters. 2004. “Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival within Macrophages.” *Science* 304 (5678): 1800–1804.
- Webb, Benjamin, and Andrej Sali. 2016. “Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER.” *Current Protocols in Bioinformatics / Editorial*

- Board, Andreas D. Baxevanis ... [et Al.]* 54 (June): 5.6.1–5.6.37.
- Wu, Fan-Lin, Yin Liu, He-Wei Jiang, Yi-Zhao Luan, Hai-Nan Zhang, Xiang He, Zhao-Wei Xu, et al. 2017. "The Ser/Thr Protein Kinase Protein-Protein Interaction Map of *M. Tuberculosis*." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 16 (8): 1491–1506.
- Yeats, Corin, Robert D. Finn, and Alex Bateman. 2002. "The PASTA Domain: A β -Lactam-Binding Domain." *Trends in Biochemical Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02164-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02164-3).
- Young, T. A., B. Delagoutte, J. A. Endrizzi, T. Alber, and TB Structural Genomics Consortium. 2003. "Intracellular Ser/Thr Protein Kinase Domain of *Mycobacterium Tuberculosis* PknB." <https://doi.org/10.2210/pdb1mru/pdb>.
- Young, Tracy A., Benedicte Delagoutte, James A. Endrizzi, Arnold M. Falick, and Tom Alber. 2003. "Structure of *Mycobacterium Tuberculosis* PknB Supports a Universal Activation Mechanism for Ser/Thr Protein Kinases." *Nature Structural Biology* 10 (3): 168–74.
- Zheng, J., E. A. Trafny, D. R. Knighton, N. -H. Xuong, S. S. Taylor, L. F. Teneyck, and J. M. Sowadski. 1993. "2.2 ANGSTROM REFINED CRYSTAL STRUCTURE OF THE CATALYTIC SUBUNIT OF CAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE COMPLEXED WITH MNATP AND A PEPTIDE INHIBITOR." <https://doi.org/10.2210/pdb1atp/pdb>.

Capítulo 4

4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE PKNG

4.1. Introducción

4.1.1. Proteínas Fe–S

Los grupos de Fe–S son componentes ubicuos y esenciales de las células vivas. Las proteínas que contienen sitios activos de Fe–S fueron detectadas por primera vez como huellas de resonancia paramagnética electrónica en membranas mitocondriales (Sands and Beinert 1960), y poco después se aislaron pequeñas ferredoxinas solubles (Mortenson, Valentine, and Carnahan 1962). En solo unos pocos años, se caracterizó una gran variedad de proteínas pequeñas Fe–S, y pronto se encontró que contenían hierro y sulfuro inorgánico (Malkin and Rabinowitz 1966). Durante las siguientes décadas, los estudios que implementaron la cristalografía de rayos X, la síntesis química de análogos estructurales y la espectroscopia revelaron los marcos estructurales y las propiedades químicas y magnéticas de una variedad de grupos Fe–S (Jackson et al. 1993; Vickery and Cupp-Vickery 2007; Rochet 2007).

Mientras que la mayoría de los grupos Fe–S contienen de uno a cuatro átomos de hierro, algunos más grandes contienen hasta ocho (Ventura and Villaverde 2006). Además, otros metales pueden conformar o estar unidos a grupos Fe–S, por ejemplo, níquel o molibdeno (Martin et al. 1991; Ventura and Villaverde 2006). Los *clusters* Fe–S tienen una marcada preferencia por la unión de tiolatos (P. V. Rao, Venkateswara Rao, and Holm 2004), y en consecuencia el cisteinil azufre es, con mucho, el ligando más frecuentemente implementado de los sitios activos de Fe–S (Bian and Cowan 1999). No obstante, la histidina y, en menor medida, la ligadura de glutamina, serina o arginina se ha evidenciado en varios casos (Moulis et al. 1996)

Las proteínas Fe–S actualmente conocidas son muy diversas: su tamaño puede ir desde 6 kDa hasta más de 500 kDa, pueden contener hasta nueve grupos Fe–S (Sazanov and Hinchliffe 2006), están presentes en todo tipo de células y compartimentos celulares, y participan en todo tipo de funciones celulares (E. S. Johnson 2004; Meyer 2008; M. K. Johnson and Smith 2011).

Si bien los grupos de Fe–S son intrínsecamente sensibles al oxígeno, su estabilidad en las proteínas depende en gran medida de la matriz del polipéptido: algunos son estables en el aire durante semanas, por ejemplo, la ferredoxina de *Aquifex aeolicus* (Mitou et al. 2003), mientras que otros se destruyen en decenas de segundos (Eady et al. 1972).

4.1.2. Dominio Rubredoxina

El dominio Rubredoxina (Rbx) es un dominio pequeño y soluble (Herriott et al. 1970; Bryan 2002). Los elementos estructurales comunes de estos dominios incluyen una hoja β , hélices 310, *turns* con glicinas y un núcleo hidrofóbico que está formado principalmente por aminoácidos aromáticos (Schweimer et al. 2000).

El sitio activo del dominio Rbx incluye un átomo de hierro coordinado a sulfuros de cisteinilo que se agrupan en dos motivos Cys-X-X-Cys-Gly (Herriott et al. 1970; Bryan 2002). Su función está relacionada con el transporte de electrones en varias cadenas redox, muchas de las cuales están relacionadas con reacciones de oxigenación o protección contra el daño oxidativo (Bryan 2002).

Si bien la distribución de Rbx es bastante escasa, las proteínas y dominios de tipo Rbx son muy diversas. Algunas bacterias contienen Rbx que constan de 130-160 residuos (Bryan 2002), mientras que ciertas algas expresan Rbx con un anclaje de membrana C-terminal de tan solo 30 residuos (Bryan 2002).

La estructura del dominio Rbx es similar al de otros dominios que coordinan unión de metales; la desulfiredoxina, por ejemplo, es un homodímero en el cual cada subunidad (36 residuos) asume un *fold* similar a un Rbx corto, con un *loop* de unión al hierro formado por un motivo Cys-X-X-Cys y dos cisteínas contiguas (Herriott et al. 1970). Por su lado, la rubrerythrin y la superóxido reductasa, además de sus dominios catalíticos, contienen dominios similares a Rbx (deMaré, Kurtz, and Nordlund 1996; Yeh et al. 2000). Además, se han observado dominios similares a Rbx de funciones indeterminadas, quizás regulatorias, en las estructuras de proteínas grandes (Yeh et al. 2000).

Otro *fold* similar al de la Rbx se observa en el sitio activo de la proteína Rieske. Las proteínas Rieske se caracterizaron por primera vez como subunidades de complejos de transferencia de electrones respiratorios (citocromo bc 1) y

fotosintéticos (citocromo b6f) (Rieske, MacLennan, and Coleman 1964), pero posteriormente se encontraron en oxigenasas, ya sea como subunidades o dominios, o como pequeños portadores de electrones (Bertini and Sigel 2001; Lebrun et al. 2006). El marco estructural básico (aproximadamente 120 residuos) de las proteínas Rieske consta de tres hojas β apiladas, de las cuales la superior incluye los dos bucles de unión al ligando que sostienen al grupo 2Fe-2S (Bertini and Sigel 2001).

Por otro lado, el dominio Rbx muestra sorprendentes similitudes con los *fold*s de proteínas que contienen Zn pertenecientes a familias de dedos de zinc. El dominio Rbx en sí tiene afinidades similares para el hierro y el zinc, y el contenido de metal de Rbx *in vivo* parece estar determinado, al menos en *Escherichia coli*, por las concentraciones relativas de los dos metales en el medio de cultivo (Dauter et al. 1996a; Raab 2002). Los metales más pesados de la misma serie (cadmio, mercurio) también pueden unirse al sitio activo de Rbx (Maher et al. 2004).

4.1.3. El dominio Rbx de PknG de *Mtb*

Como se mencionó anteriormente, PknG es una proteína multidominio (Scherr et al. 2007a; Lisa et al. 2015). El dominio quinasa canónico está flanqueado por dominios N y C-terminales cuyos roles funcionales aún no han sido totalmente caracterizados. El dominio C-terminal de PknG contiene un motivo de repetición de tetratricopéptidos (TPR), el cual normalmente participa en interacciones proteína-proteína, tanto eucariotas como procariontes (Scherr et al. 2007b). La secuencia N-terminal que precede al dominio quinasa contiene tanto sitios de autofosforilación (O'Hare et al. 2008) como un dominio Rbx. Análisis genéticos y estructurales revelan que PknG es la única quinasa de *Mycobacterium* en la que el dominio catalítico está flanqueado por un dominio Rbx, con dos motivos Cys-X-X-Cys-Gly involucrados en la unión de metales (Av-Gay and Everett 2000; Scherr et al. 2007c, Lista et al. 2015).

Aunque el papel del dominio Rbx en PknG es todavía incierto, diversos autores han sugerido que podría regular la actividad quinasa mediante un mecanismo redox dependiente (Scherr et al. 2007; Tiwari et al. 2009; Gil et al. 2013; Wittwer et al. 2016).

Con el fin de profundizar los conocimientos existentes en cuanto al rol del dominio Rbx en la regulación de la actividad quinasa de PknG, se procedió a realizar un estudio fisicoquímico *in vitro*.

4.2. Resultados

4.2.1. Análisis del metal coordinado al dominio Rubredoxina

Como ya fue señalado, lo más frecuente es que las cuatro cisteínas del dominio Rbx coordinen un ión de hierro (Sieker, Stenkamp, and Legall 1994), pero otros iones metálicos tales como cobalto, níquel y zinc pueden reemplazarlo (Dauter et al. 1996b). En particular, el dominio Rbx de PknG puede coordinar, *in vitro* metales divalentes como cadmio, zinc y hierro. Sin ir más lejos, el hecho de los cristales existentes contengan Zn o Cd y no Fe, sugiere una preferencia de PknG por los dos primeros metales (Scherr et al. 2007a; Lisa et al. 2015).

Para evaluar qué metal une a nuestra proteína expresada en medio rico (PknG-MR), se utilizó espectrometría de absorción atómica, una técnica que permite cuantificar iones en el rango de concentraciones de las partes por billón (ppb) y partes por millón (ppm) de manera muy precisa (Begum et al. 2016) (Tabla 4.1). Se determinó que la proteína de la muestra contenía un 49% de Fe, un 12% de Zinc. El 39% restante puede estar unido a uno o más metales, el sitio de unión puede estar vacío, o una mezcla de las anteriores.

En vista de la composición heterogénea del centro del grupo Fe-4S, nos preguntamos si podíamos modular el metal que se une al mismo cambiando las condiciones de expresión de la proteína, para lo cual sustituimos al medio LB por medio mínimo (M9), y se agregó el metal de interés al momento de la inducción (ver MyM) (M. Wittwer et al. 2016). Este cambio de medio de cultivo, implicó numerosas pruebas de expresión, dado que se reduce fuertemente la expresión de proteína. De este modo se expresó PknG enriquecida en Cadmio (PknG-Cd), en hierro (PknG-Fe) y en Zinc (PknG-Zn).

Muestra	Zn/Proteína	Fe/Proteína
PknG-MR	12%	49%
Pkng-Fe	12%	60%
PknG-Zn	45%	-

Tabla 4.1. Porcentaje de Fe y Zn unido a PknG-MR, PknG-Fe, y Pkng-Zn, cuantificados por espectrometría de absorción atómica. El error de la metodología utilizada es del 3%

Se analizaron por espectrometría atómica PknG-Fe y PknG-Zn. Se observa, por un lado, enriquecimiento de Fe en PknG-Fe con respecto a PknG-MR, y por el otro, que PknG-Zn no incorpora Fe en cantidades detectables, con lo cual nuestro intento de modular la unión al metal cambiando las condiciones de expresión resultó exitoso. Estos datos indican que la proteína expresada en *E. coli* tiene una alta afinidad por metales diferentes a Fe, lo cual dificulta fuertemente la obtención de la proteína unida mayoritariamente a Fe.

4.2.1. Actividad comparada de Pkng-MR/Fe/Zn

A continuación, se midió y comparó la actividad de PknG-MR, PknG-Cd, PknG-Zn y PknG-Fe utilizando el kit comercial Kinase Glo (Gil et al. 2013). Como puede observarse en la Figura 4.1 todas las proteínas presentan una actividad similar al momento de ser purificadas. Una diferencia notable, sin embargo, se observa en el hecho de que mientras que la actividad de PknG-MR/Cd/Zn se mantiene estable incluso en el transcurso de meses, la actividad de PknG-Fe decae abruptamente en pocos días.

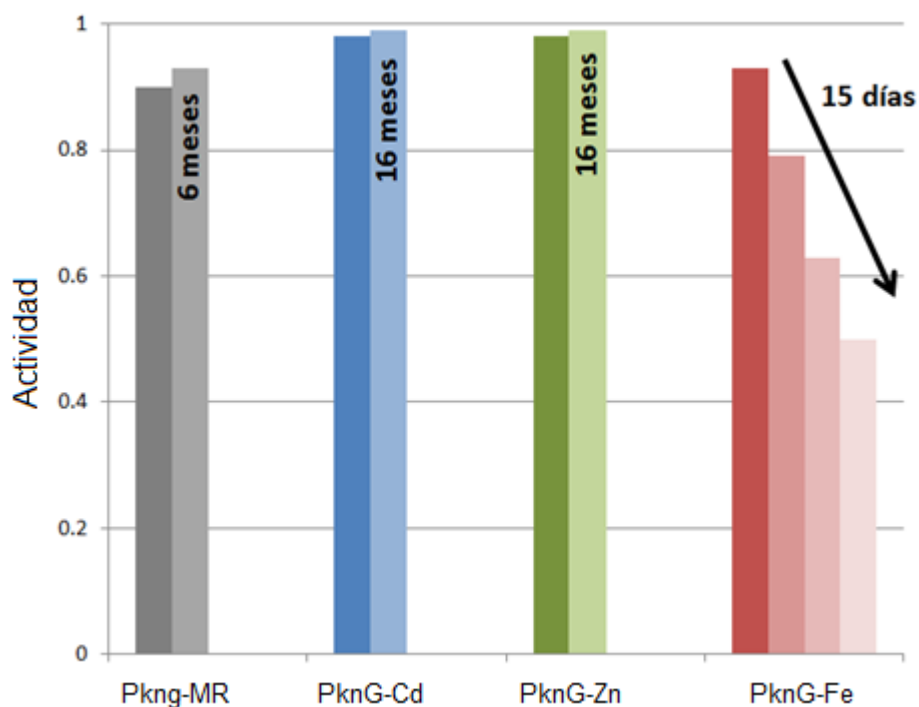


Figura 4.1. Actividades de PknG-MR (gris) , PknG-Cd (azul), PknG-Zn (verde) y PknG-Fe (rojo). La columna de la izquierda representa la actividad tomada al día siguiente de la purificación. Para PknG-Fe se midió la actividad en los días 1, 3, 7 y 15.

4.2.3. Estado de oxidación del Fe del dominio Rbx de PknG-Fe

Mientras que el zinc y el cadmio son elementos redox-inertes y presentan un solo estado de valencia en organismos vivos, (II) (Krężel and Maret 2016; Maret and Moulis 2013), el hierro puede encontrarse tanto en su forma reducida, Fe(II), como en su forma oxidada, Fe(III) (Z. Xiao et al. 1998; Halliwell 2006; Outten and Theil 2009).

Si bien hasta el momento se desconoce qué metal se une al dominio Rbx *in vivo*, se ha reportado que la actividad de PknG es regulada por su entorno redox (Scherr et al. 2007a; Tiwari et al. 2009; Gil et al. 2013; M. Wittwer et al. 2016). Dado que para proporcionar una regulación en respuesta a los cambios redox en el entorno celular se requiere un sensor sensible a tales cambios, y que el metal más frecuente unido al dominio Rbx es el Fe (Herriott et al. 1970; Bryan 2002) es lógico pensar que éste es el metal que une *in vivo* al dominio Rbx, por lo que para el resto de los ensayos se utilizó PknG-Fe.

La primer incógnita a revelar fue el estado de oxidación que presenta el hierro en

el dominio Rbx de PknG.

Para determinar la proporción de Fe(II)/Fe(III) se utilizó una técnica colorimétrica. Los detalles pueden verse en materiales y métodos, pero resumidamente se usó la capacidad de la 1,10-fenantrolina para formar un complejo coloreado en presencia de Fe(II), el cual posee un máximo de absorbancia a 480 nm (Bandemer and Schaible 1944; Niazi 2006). Como primer paso, se incubó la quinasa con 1,10-fenantrolina, y se midió el espectro en el UV-VIS. Luego, se redujo a la proteína utilizando ácido ascórbico, se repitió el procedimiento anterior (Figura 4.2), y la proporción de Fe(III) se calculó por diferencia.

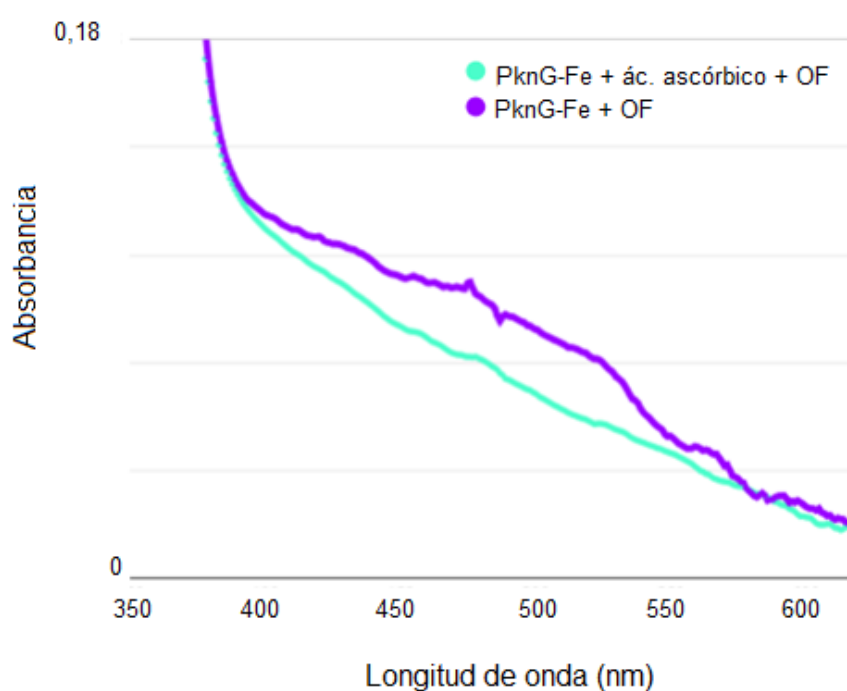


Figura 4.2 Espectros UV-VIS de PknG incubada con 1,10-fenantrolina (determinación de Fe(II), curva violeta) y de la reacción de la proteína reducida con ácido ascórbico, disgregada e incubada con 1,10-fenantrolina (determinación de Fe(III), curva cian).

Se determinó que al momento de expresar la proteína bajo nuestras condiciones la misma presenta una mezcla de las dos formas de Fe, siendo mayoritario el Fe(III) (aproximadamente 90%), no pudiendo cuantificarse fehacientemente las proporciones de cada especie, debido a la complejidad del sistema. (Mandal et al. 2016).

4.2.4. Regulación redox de la actividad quinasa de PknG-Fe

A fin de entender mejor la relevancia de la regulación redox de PknG, y de complementar y resolver resultados parcialmente contradictorios de la literatura (Scherr et al. 2007a, 2009; Gil et al. 2013; Tiwari et al. 2009; M. Wittwer et al. 2016), se evaluó la actividad de PknG-Fe en presencia de un agente reductor (ácido ascórbico) y un agente oxidante (H_2O_2), utilizando el kit comercial Kinase Glo (Gil et al. 2013) (Figura 4.3).

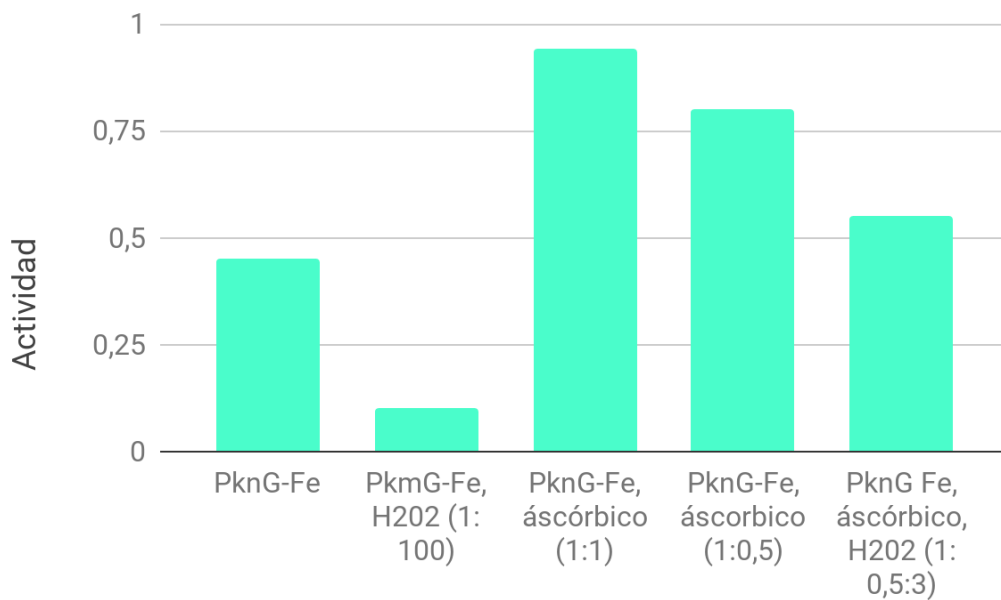


Figura 4.3. Regulación redox de la actividad de PknG. Efecto del H_2O_2 y del ácido ascórbico sobre la actividad de PknG.

Se observa un descenso de actividad en condiciones oxidantes, y un aumento en condiciones reductoras, el cual puede ser parcialmente revertido por el agregado de H_2O_2 , indicando que los eventos vinculados a la regulación redox de PknG son al menos parcialmente reversibles.

4.2.5. Recuperación de actividad quinasa de PknG mediante reducción

Dado que la actividad de PknG-Fe desciende a medida que pasan los días, y que la misma es mayor en condiciones reductoras, nos preguntamos si sería posible revertir la pérdida de actividad vinculada al paso del tiempo utilizando un agente reductor. Para responder esta interrogante, medimos la actividad de PknG-Fe a distintos tiempos, pre incubándola con distintas concentraciones de ácido ascórbico

(Figura 4.4).

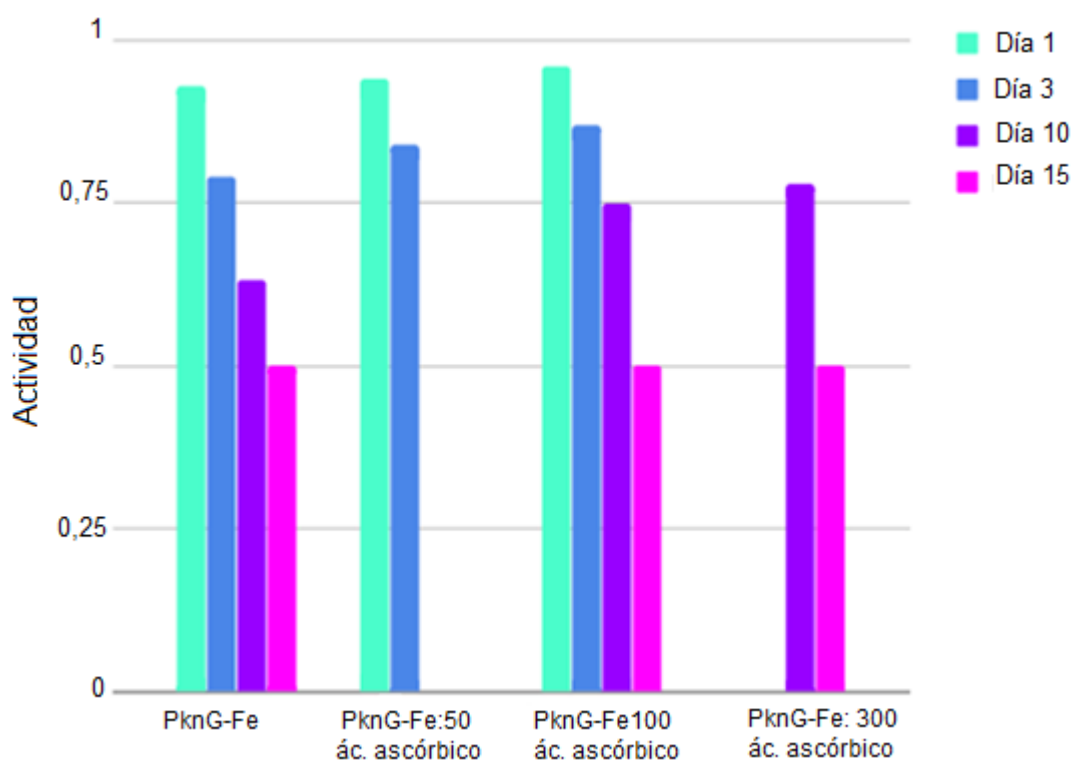


Figura 4.4. Recuperación de actividad de PknG-Fe. Se midió la actividad de la proteína a distintos tiempos: día 1 (día de purificación), 3, 10 y 15, pre incubando con distintas relaciones de ácido ascórbico (PknG: ascórbico: 1:50; 1:100; 1:300).

Como puede observarse en la Figura 4.4, la actividad de PknG-Fe puede recuperarse parcialmente por medio del agregado de un agente reductor incluso hasta el día 10 con respecto al día de su purificación; ya luego de los 15 días la pérdida de actividad es permanente, y no puede recuperarse siquiera ante el agregado de grandes cantidades de ácido ascórbico.

4.2.6. Contenido de sulfhidrilos de PknG-MR

Como se mencionó anteriormente, se requieren de 4 cisteínas para la unión del hierro en dominios Rbx (Herriott et al. 1970; Bryan 2002). PknG posee en total 5 cisteínas (Figura 4.5), para explorar el estado de oxidación de los sulfhidrilos de cisteínas se sometió a PknG a distintos tratamientos, y el contenido de sulfhidrilo se determinó por reacción con DTNB (Rahman, Kode, and Biswas 2006). Los resultados, relativizados al control, se encuentran resumidos en la Tabla 4.2.

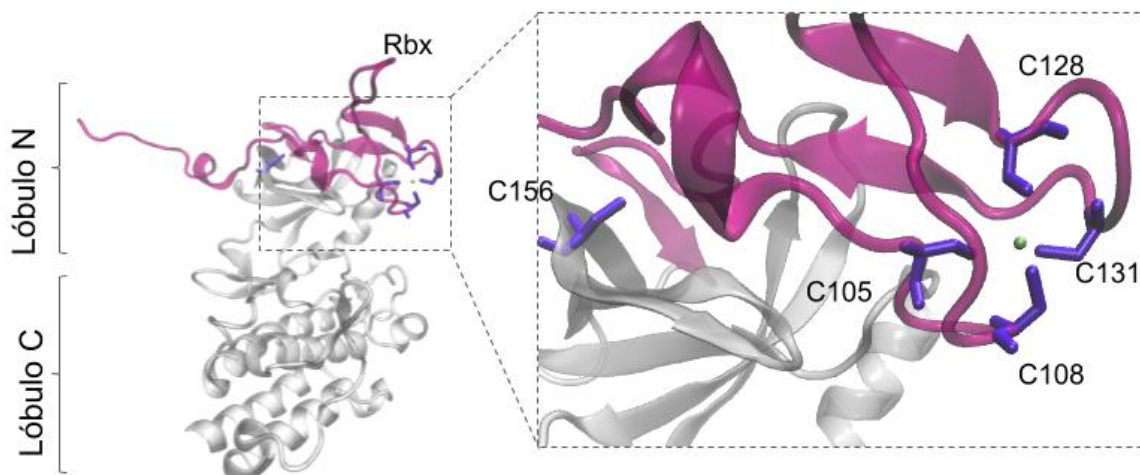


Figura 4.5. Cisteínas de PknG. Derecha: ubicación de las 5 cisteínas de PknG. Izquierda: detalle de las 5 cisteínas (representadas en “varillas”), 4 conforman el dominio Rbx (105, 108, 128, 131) y coordinan al ión metálico (representado como una esfera), la quinta (156) se encuentra en el lóbulo N del dominio quinasa

Tratamiento	Cisteínas libres relativas
PknG 10 uM	1
PknG 10 uM + DTT 1 mM (30 min)	1
PknG 10 uM + DTT 10 mM (30 min)	1
PknG 10 uM + EDTA 1 mM (30 min)	1
PknG 10 uM + EDTA 10 mM (30 min)	1
PknG 10 uM + EDTA 1 mM (anoxia) (30 min)	1
PknG 10 uM + EDTA 10 mM (anoxia) (30 min)	1
PknG 10 uM + Urea 8 M	4

Tabla 4.2. Promedio de cisteínas libres por proteína luego de distintos tratamientos.

Cómo puede apreciarse en la tabla 4.2, no se observan cambios con respecto al control al exponer a PknG a DTT, lo que nos indica que las cisteínas se encuentran reducidas. Por otro lado, al exponer a la quinasa ante un quelante (EDTA), ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (para evitar la formación de puentes disulfuro), tampoco se observan cambios, lo cual podría hablarnos de la estabilidad del dominio Rbx, la cual ha sido reportada por otros autores (Bonomi et al. 1998; Bryan 2002) Finalmente, al exponer a PknG a un agente desnaturizante, se observa un aumento de las cisteínas libres, aunque no se llegan a contabilizar las 5 esperadas, con lo cual no puede descartarse la formación de puentes disulfuro.

4.2.7. Espectrometría UV-VIS y Raman resonante

Como se señaló anteriormente, se sugiere que el dominio Rbx de PknG regula la actividad de la quinasa sensando el estado redox del microambiente que la rodea (Scherr et al. 2007a; Tiwari et al. 2009; Gil et al. 2013; M. Wittwer et al. 2016). Los ensayos de colorimetría realizados, nos indican que el dominio Rbx se encuentra mayoritariamente oxidado. A su vez, hemos visto que efectivamente la actividad de la proteína puede ser modulada por su entorno redox, aumentando en condiciones reductoras, y descendiendo en condiciones oxidantes. A continuación, utilizamos dos técnicas (UV-VIS y espectrometría de Raman resonante) para analizar los cambios sufridos por el hierro del dominio Rbx en un ambiente u otro.

4.2.8. UV-VIS

El espectro UV-VIS de PknG-Fe a las 12 hs de ser purificada se corresponde con el espectro del dominio Rbx en su forma oxidada, en la que destacan los picos a 370 y 480 nm (Lode and Coon 1971; K. K. Rao et al. 1972) (Figura 4.6).

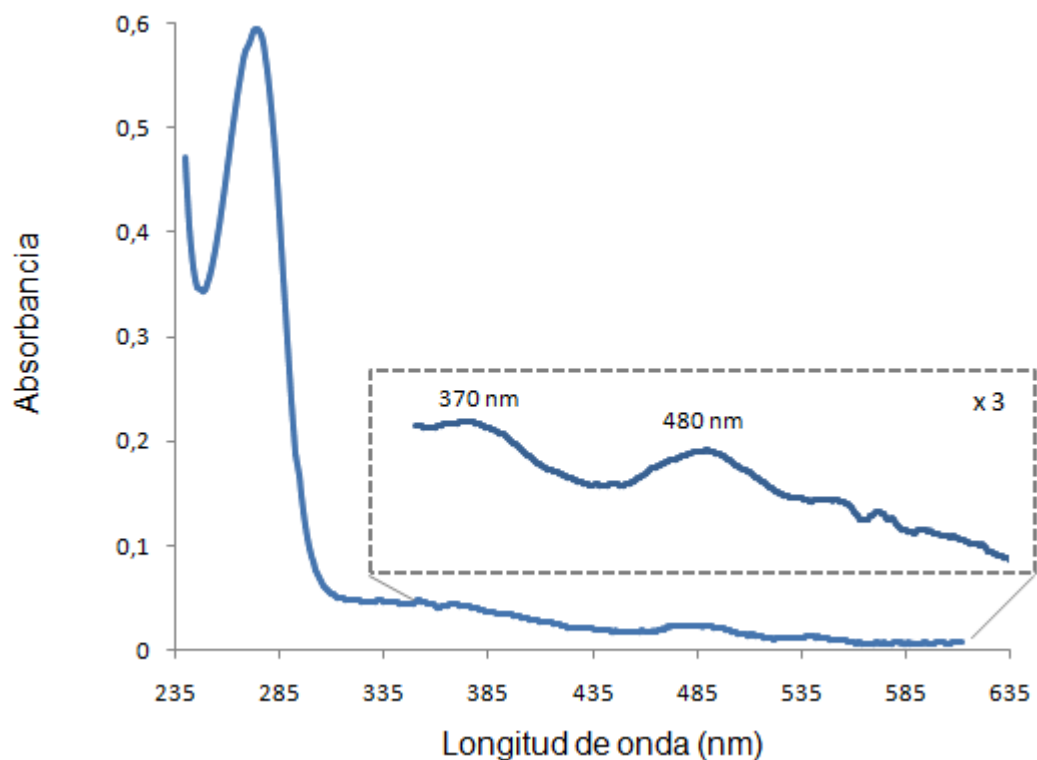


Figura 4.6. Espectro de absorción de PknG-Fe. En el zoom se aprecian los dos máximos asociados al dominio Rbx en su forma oxidada (370 y 480 nm) (Lode and Coon 1971; K. K. Rao et al. 1972).

Vale la pena destacar que la coloración rojiza que presenta PknG-Fe (480 nm) puede apreciarse a simple vista al ser purificada (Figura 4.7 A), y se va perdiendo a lo largo del transcurso de los días. Si bien la sustitución espontánea por otros metales presentes, tales como cadmio y zinc ha sido reportada para otros dominios Rbx (Bonomi et al. 1998), la disminución de la actividad que acompaña la decoloración, junto con los resultados exhibidos en la Figura 4.1 sugieren que este no sería el caso. Por otro lado, se observa un aumento en el pico de 480 nm, correspondiente al dominio Rbx oxidado, 12 hs luego de ser purificada (Figura 4.7).

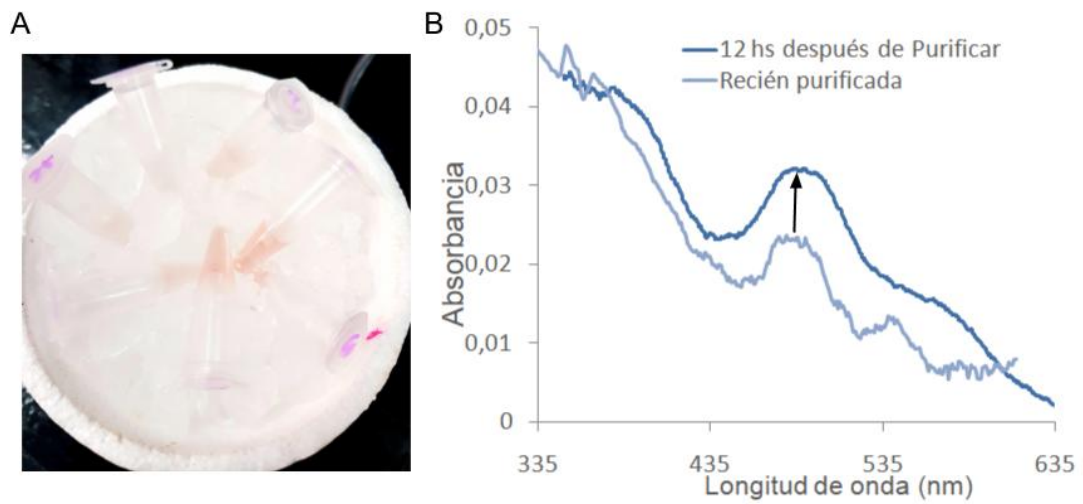


Figura 4.7. A. Fracciones de la elución de la columna his-tag con PknG-Fe. B. Espectro de absorción UV-VIS de PknG-Fe recién purificada (celestite), y 12 hs después de ser purificada (azul).

Con el fin de evaluar los efectos del H_2O_2 y del ácido ascórbico sobre el dominio Rbx, se analizó el efecto de agregados secuenciales de H_2O_2 , y luego de ácido ascórbico sobre la misma muestra. En ambos casos se tituló hasta que se dejaron de observar cambios en el espectro. Los resultados se hallan resumidos en la Figura 4.8, en la que se observa el pico de absorción a 480 nm típico del *cluster* Fe(III)-4S de la proteína recién purificada y cómo éste varía frente al agregado del oxidante y del reductor.

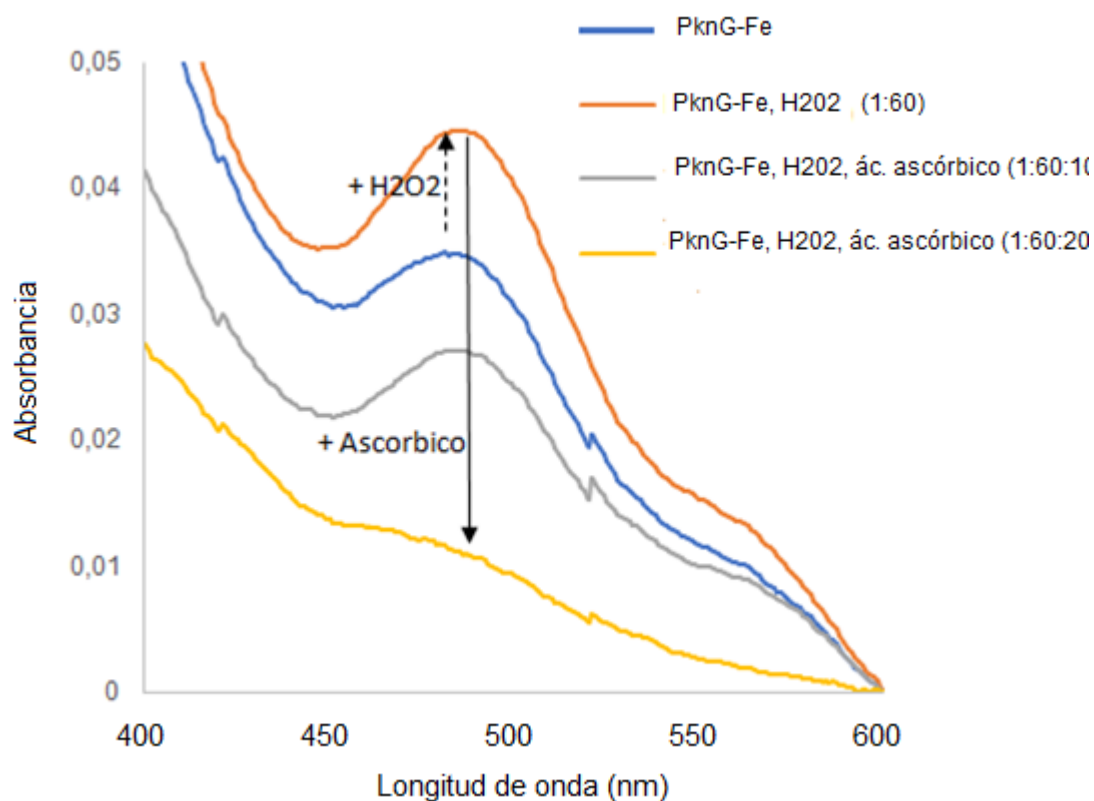


Figura 4.8 Espectro de absorción UV-VIS de PknG-Fe tratada con H₂O₂ y ácido ascórbico. La curva azul corresponde a las condiciones iniciales.

Como puede observarse en la Figura 4.8, la adición de H₂O₂ provoca un aumento del pico a 480 nm, oxidando en su totalidad al FeS₄, este evento no obstante puede revertirse mediante el agregado de un agente reductor. El proceso inverso, es también posible. Al incubar proteína en una relación PknG-Fe, ácido ascórbico, H₂O₂ (1:1:6) se ve un aumento en el pico de 480 nm con respecto a la proteína tratada con ácido ascórbico en la misma relación, sin embargo el cambio es más sutil (información no mostrada).

4.2.9. Espectroscopía de Raman resonante (RR)

La espectroscopia RR es un monitor útil de la estructura biológica y se aplica a una variedad de proteínas con *clusters* hierro-azufre, debido a que proporciona huellas vibratorias de cromóforos, las cuales son sensibles a los detalles de la estructura local (Czernuszewicz et al. 1986).

Las proteínas Fe-S son de color rojizo o marrón, debido a las bandas de absorción visibles que se asocian con la transición de transferencia de carga S→Fe .

La espectrometría RR aprovecha esta transición electrónica, amplificando la señal del cromóforo, obteniendo patrones espectrales característicos de los diferentes tipos estructurales, los cuales han sido asignados y analizados con la ayuda de sustitución isotópica, de estudios de compuestos modelos y con el análisis de coordenadas normales (Czernuszewicz et al. 1994).

En particular el espectro RR del cluster Fe–S₄ del dominio Rbx oxidado se encuentra bien caracterizado: mientras que los modos de vibración para el modo reducido no dan señal, debido a la pérdida de las bandas visibles de transferencia de carga de S→Fe cuando se reduce la proteína (Y. Xiao et al. 2005).

En la Figura 4.9 se observa el espectro obtenido para PknG-Fe recién purificada (control), así como los espectros de la proteína pre incubada con ácido ascórbico y H₂O₂.

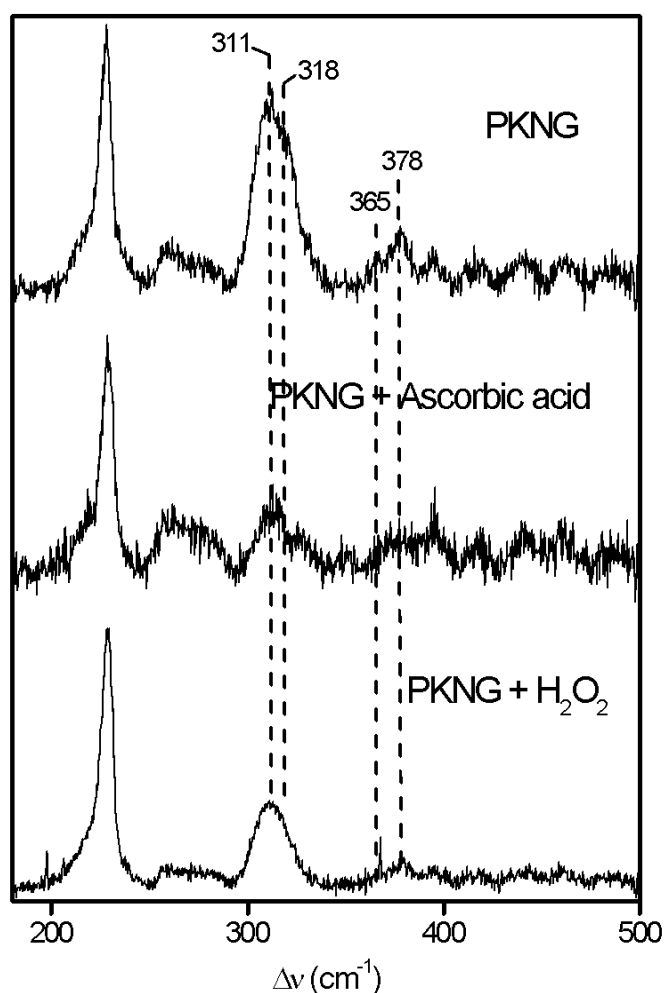


Figura 4.9. Espectros RR PknG-Fe (control) y, con agregado de ascórbico y de H₂O₂.

En el control, se visualizan claramente dos picos mayoritarios (además del cercano a 200 cm⁻¹, propio de las muestras congeladas) a 311 y 318 cm⁻¹, y dos picos más débiles a 365 y 378 cm⁻¹, lo cual se condice con lo esperado para *clusters* Fe-4S del dominio Rbx oxidados, siendo consistente con una coordinación tetraédrica del Fe (Mapolelo et al. 2012). Por otro lado, sólo se observan pequeñas variaciones con

respecto a la Rbx de *Desulfovibrio gigas* (Czernuszewicz et al. 1987, 1994). Estos resultados nos indican que el dominio Rbx de la proteína recién purificada se encuentra oxidado (concordantemente con lo observado en los experimentos de colorimetría), y, dada la sensibilidad de estos espectros a variaciones en el entorno al cluster Fe-4S podemos asegurar que el plegado es el correcto para dominios de este tipo.

El agregado de ácido ascórbico produce la pérdida de la señal RR (no total probablemente debido a un control estequiométrico de la reacción deficiente, o a una reacción lenta), lo cual es esperable ya que como se mencionó anteriormente el clúster Fe-S4 reducido no da señal RR; esta decoloración además concuerda con la decoloración observada en el UV-VIS al tratar con el reductor.

4.2.10. Espectrometría de fluorescencia de triptófanos

Con el fin de abordar si el efecto del estado de oxidación del hierro podría afectar a la estructura tridimensional de la proteína, se analizaron los cambios globales en la estructura de la misma tras la incubación con ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno mediante espectrometría de fluorescencia de triptófanos.

PknG posee 9 triptófanos en total, dos de ellos en el dominio Rbx (Trp 127 y 106), y uno en la región N-terminal del dominio quinasa (Trp 164); si el estado de oxidación del Fe va acompañado de grandes cambios estructurales, es esperable que el espectro de fluorescencia de estos tres últimos aminoácidos cambie. Los Trp restantes se encuentran en el dominio TPR (Figura 4.10).

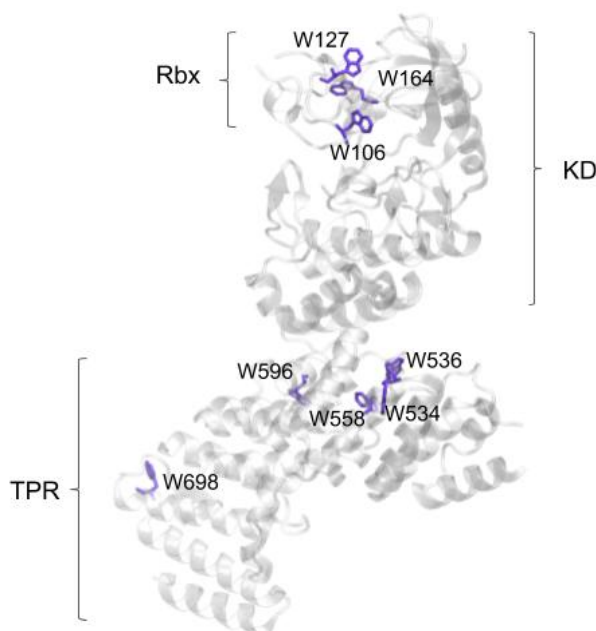


Figura 4.10. Distribución espacial de Trp en PknG.

Como puede observarse en la Figura 4.11, no se observan cambios ante la exposición de de ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno. Estos resultados podrían indicar que los cambios en la actividad

observados en los apartados anteriores no se deben a grandes cambios estructurales (como por ejemplo desplazamiento del dominio Rbx). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente (Gil et al. 2013).

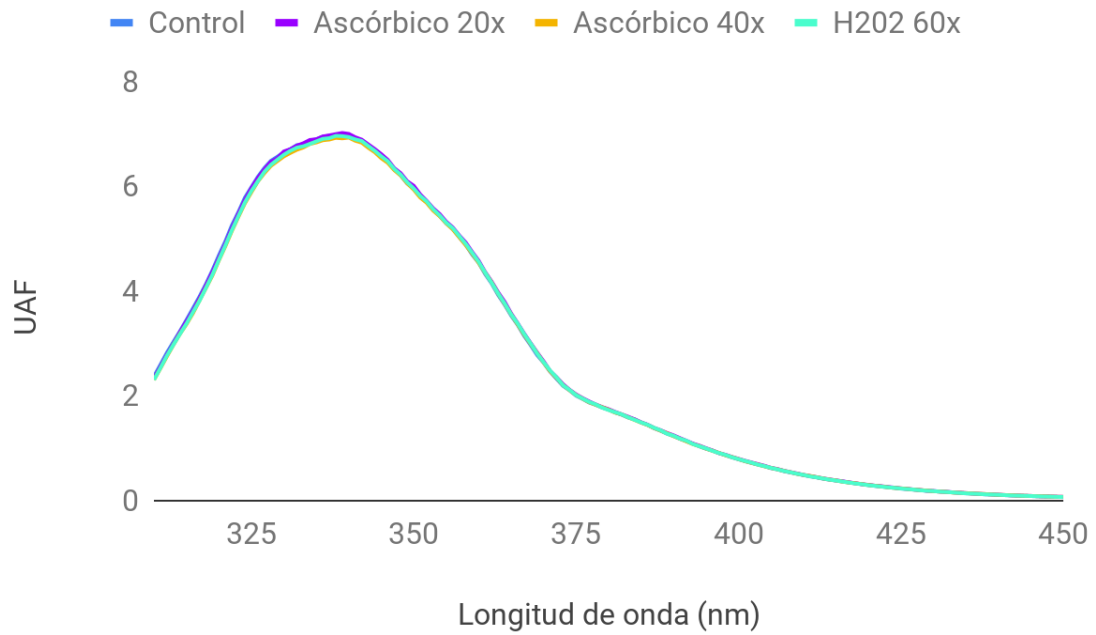


Figura 4.11. Espectroscopia de Trp de PknG-Fe bajo distintos tratamientos.

4.3. Conclusiones

Al analizar por medio de absorción atómica los metales unidos al dominio Rbx de PknG, se ha observado que éstos varían según la composición del medio, lo cual es concordante con lo descrito anteriormente para otros dominios Rbx expresados en *E. coli* (Dauter et al. 1996a; Raab 2002), así como lo observado en los cristales depositados en el PDB (Scherr et al. 2007a; Lisa et al. 2015).

Podría resultar tentador pensar que entre PknG-MR y PknG-Zn no hay diferencias significativas, ya que ambas poseen la misma proporción de zinc unido, y PknG-Fe solo posee un 11% más de hierro que PknG-MR (Tabla 4.1). Sin embargo la diferencia entre ambas poblaciones de quinasas se pone de manifiesto al analizar la actividad de las mismas a lo largo del tiempo (Figura 4.1), ya que la actividad de PknG-Fe decae a los pocos días, mientras que PknG-MR se mantiene estable incluso 6 meses después de su purificación. Asimismo, al comparar los resultados de actividad de PknG-Fe, PknG-Cd y PknG-Zn, podemos apreciar que ante la unión de metales divalentes, pero redox inactivos (Krężel and Maret 2016; Maret and Moulis 2013), la actividad de la proteína se mantiene estable por muchos meses, mientras que al unir hierro la actividad decae a los pocos días, lo que da indicios de que la actividad quinasa está siendo regulada negativamente por algún evento redox.

A su vez, gracias a los ensayos de colorimetría, hemos visto que el hierro unido al Rbx en PknG-Fe se encuentra en una mayor proporción oxidado al momento de la purificación (Figura 4.2), lo cual es concordante con lo descrito en literatura para el estado de oxidación del hierro unido al Rbx (Goodfellow et al. 2010); y que el pico de absorción de 480 nm, correspondiente al cluster Fe(III)-S4 (Bandemer and Schaible 1944; Niazi 2006) aumenta tras 12 horas de purificación, indicando un evento de oxidación (Figura 4.7). Además, la actividad quinasa cae a lo largo de los días, hecho que puede ser parcialmente revertido por el agregado de un agente reductor (Figura 4.4), sugiriendo que la proteína es inactiva en estado oxidado. Sin embargo, tras 15 días con respecto al momento de purificación, el agregado de ácido ascórbico, incluso en grandes cantidades, no permite recuperar la actividad, implicando que además de la oxidación de la población de Fe(II) a Fe(III) (evento reversible), está ocurriendo un evento irreversible. Por otro lado, los ensayos

realizados en condiciones reductoras y oxidantes revelan un aumento de actividad en condiciones reductoras, y un descenso en condiciones oxidantes (Figura 4.3). Con esta información en mente, proponemos el siguiente esquema de caracterización biofísico del dominio Rbx de PknG:

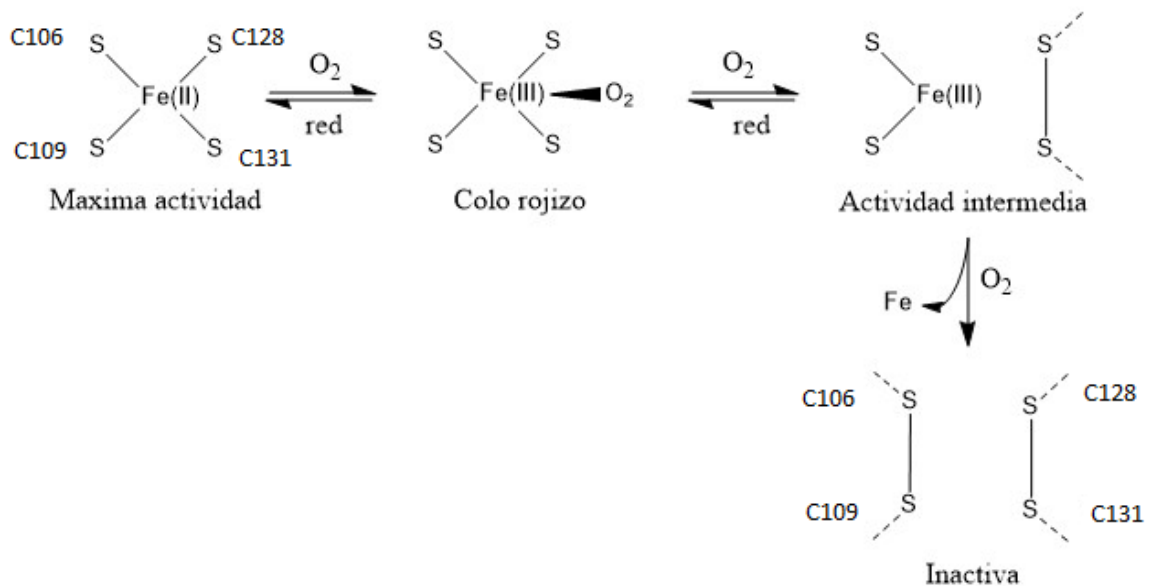


Figura 4.12. Esquema de caracterización biofísico del dominio Rbx unido a Fe de PknG. Cuando PknG se encuentra reducida (izquierda) se observa máxima inactividad, la cual se va perdiendo a medida que se oxida el hierro y las cisteínas del dominio Rbx.

Así, se plantea un modelo de oxidación (y disminución de actividad) secuencial: en el momento de purificación, hay una proporción del hierro unido al dominio Rbx que se encuentra como Fe(II), estado en que la proteína tiene su máxima actividad, mientras que el restante se encuentra como Fe(III). Conforme pasan los días, el hierro se oxida en su totalidad. Parte de esta oxidación puede ser revertida mediante el agregado de un agente reductor (lo que se traduce como una recuperación parcial de la actividad quinasa), hasta llegado un punto, en el cual todo el hierro se perdió, y el agregado de ácido ascórbico no produce efecto. Esto no sucedería en los casos de PknG-Zn y PknG-Cd, ya que además de ser redox inactivos, estos dos metales unen al dominio Rbx con mayor afinidad que el Fe (Bonomi et al. 1998).

Un caso similar de regulación se observa en la nitrogenasa de *Klebsiella pneumoniae*, una proteína con dos *clusters* hierro-azufre (Eady et al. 1972; Rees et al. 2005). Esta nitrogenasa es estable hasta por 50 hs a temperatura ambiente en

condiciones anaeróbicas, mientras que al ser expuesta al oxígeno ambiental su actividad decae a menos del 40% en tan solo 10 minutos, debido a modificaciones reversibles en el cluster 4Fe-4S (Kavanagh and Hill 1993).

Con respecto a los resultados de los ensayos de tioles libres (Tabla 4.2), es probable que el hierro se desprenda e inmediatamente se formen puentes disulfuro entre las cisteínas, dejándolas inactivas frente al mismo (lo cual justificaría que no se detecte un mayor número de tioles libres). Para determinar si esto es así, serán necesarios nuevos ensayos.

Como se mencionó, la regulación de la actividad de la actividad quinasa en función del estado redox, es un tema en actual discusión. Por un lado, Lisa et. (Lisa et al. 2015) han reportado que la delección de los primeros 137 aminoácidos del sitio N-Terminal (NORS, y Rbx casi en su totalidad), aumenta la actividad de PknG sobre un péptido de 17 aminoácidos derivado de GarA que contiene la treonina fosforilable (SDEVTVETTSVFRADFL). En principio, estos resultados se contraponen con lo aquí expuesto, dado que según nuestro modelo (que aún no comprendemos en su totalidad) el desensamble del dominio Rbx produciría una disminución de la actividad quinasa de PknG, con lo cual sería esperable que su delección tenga el mismo efecto.

Por su lado, Tiwari et al. (Tiwari et al. 2009), utilizando a GarA como sustrato, han propuesto que la exposición de PknG a un oxidante (DTT oxidado) aumenta 2.5 veces la actividad quinasa, también en contraposición con el modelo aquí expuesto. Por otro lado, este mismo autor ha descrito que la delección de los primeros 150 aminoácidos del sitio N-Terminal (NORS, Rbx) produce una pérdida del 95% de actividad frente al *wild type*, lo cual sí se condice con nuestro modelo. Sin embargo, la actividad de la mutante de PknG en la cual las cisteínas que conforman el dominio Rbx por alaninas (C106A, C109A, C128A, C131A) reportada por este autor solo demuestra una caída del 50-75% (Tiwari et al. 2009). Basados en el modelo aquí propuesto, lo esperable hubiera sido que la actividad se anule completamente, *tal cual lo observado por Scherr et al.* al mutar esas mismas cisteínas por serinas (C106S, C109S, C128S, C131S) (Scherr et al. 2007a).

Más aún, y coincidiendo nuevamente con nuestro modelo, Gil et al. (Gil et al. 2013) han publicado un trabajo en el cual se emplea un ácido graso nitrogenado (ácido 9- y 10-nitro-octadeca-9-cis-enoico) el cual nitroalquila las cisteínas,

disminuyendo la actividad de PknG sobre GarA, sin provocar grandes cambios conformacionales en la quinasa. Si bien la nitroalquilación es reversible, la pérdida de la actividad no lo es, probablemente debido al desprendimiento irreversible del hierro.

Finalmente, Wittwer et al. (Wittwer et al. 2016) proponen que el estado de oxidación del dominio Rbx está relacionado con cambios en la selectividad del sustrato, y no con la actividad quinasa intrínseca, lo cual con los ensayos hasta aquí expuestos no puede descartarse.

Como puede observarse, hasta el momento, los resultados que vinculan al estado redox del dominio Rbx con la actividad quinasa son contradictorios. Empero, nuestros resultados de actividad quinasa de PknG sobre GarA, acompañados por los resultados obtenidos utilizando espectrometría UV-VIS (Figura 4.8) y Raman resonante (Figura 4.9) son indicadores robustos de que la actividad de la proteína aumenta en un ambiente reductor, mientras que desciende en un ambiente oxidante.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Absorción atómica

Las proteínas, almacenadas a -80°C fueron colocadas en hielo hasta descongelación; a continuación se las centrifugó por 15 minutos a 4°C a 20.000 G (Hanil, combi 514R), conservándose el sobrenadante. Luego se utilizó una columna de desalado para bajar la fuerza iónica del buffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5% glicerol, $\text{pH}=7,4$) (ver sección 2.2.6), y se cuantificó la proteína (ver sección 2.2.8). Este segundo buffer fue utilizado como blanco para las mediciones de absorción atómica. Para cada medición se utilizó 1 ml de proteína $10\ \mu\text{M}$.

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu modelo AA-6800, irradiando con lámparas de hierro y zinc respectivamente (ver sección 2.2.7). Se realizaron sendas curvas de calibración (Figura 4.13), para luego obtener las concentraciones totales de ambos analitos.

Considerando una concentración de proteína $10\ \mu\text{M}$ y una proporción 1 a 1 con el metal correspondiente, se espera una concentración máxima de Fe y Zn en el rango de las partes por billón:

$10\ \mu\text{M}$ proteína \rightarrow $10\ \mu\text{M}$ de metal máximo

Por ejemplo para Fe ($M_r = 56\ \mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

$10\ \mu\text{moles/l} \times 56\ \mu\text{g}/\mu\text{mol} = 560\ \mu\text{g/l} = 560\ \text{ppb}$

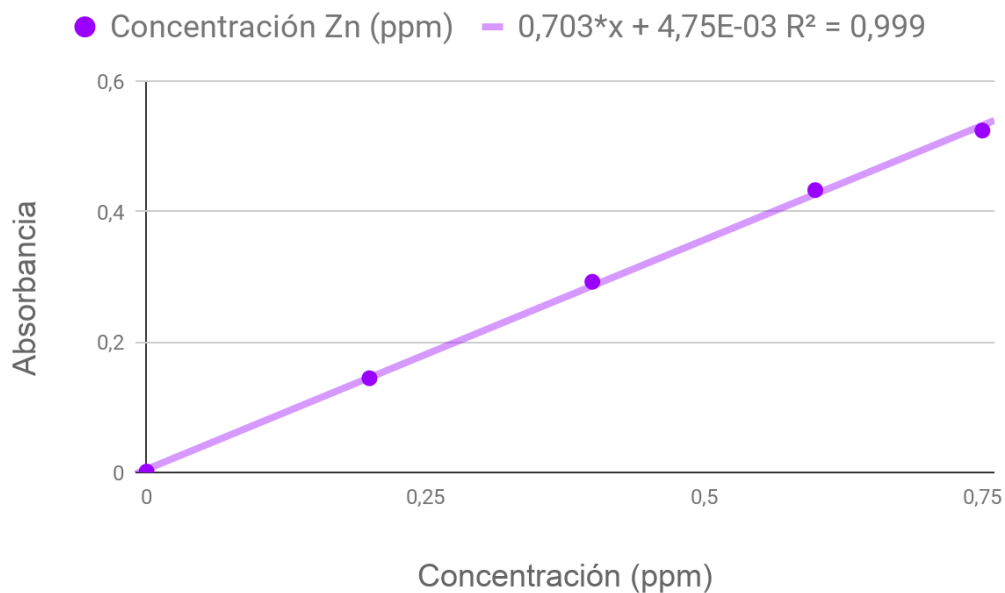
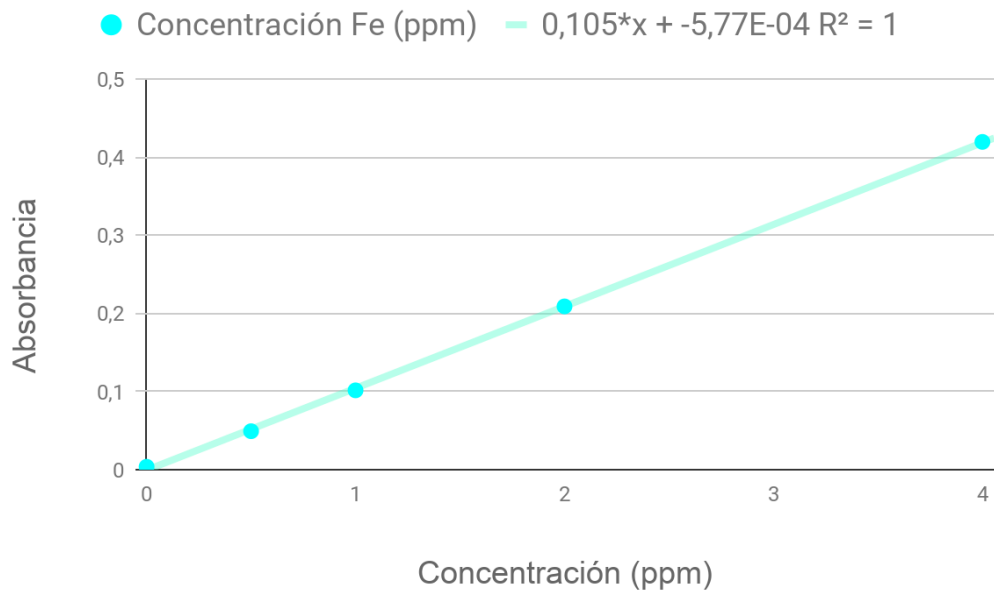


Figura 4.13. Curvas de calibración para hierro (arriba) y zinc (abajo) determinados por espectroscopia de absorción atómica.

4.4.2. Ensayos de actividad quinasa, Kinase Glo

Las proteínas, almacenadas a -80°C fueron colocadas en hielo el día de la medición de la actividad hasta descongelación; a continuación se las centrifugó por 15 minutos a 4°C a 20.000 G (Hanil, combi 514R), conservándose el sobrenadante. Se cuantificó la proteína (ver sección 2.2.8). Luego se procedió a cuantificar

actividad (ver sección 2.2.10). Cada ensayo de actividad fue realizado por duplicado.

4.4.3. Ensayos colorimétricos

Preparación de reactivos:

- 1,10-fenantrolina: se disolvieron aplicándose calor mediante un baño térmico 0,1 g de 1,10-fenantrolina monohidratada en 100 mL de agua destilada.
- Solución de ácido ascórbico: se disolvieron 0,4 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua destilada.
- Solución de citrato de sodio: se disolvieron 25 g de citrato de sodio en 100 mL de agua destilada.
- Solución de 1000 ppm Fe(II): se disolvieron 0,700 g de sulfato de amonio y hierro(II) en agua destilada y se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL. Se agregó 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se enrasó con agua destilada.

Preparación de patrones:

- Se pipeteó 1 mL de la solución patrón de Fe(II), se transfirió el volumen a un matraz de 100 mL y enrasó con agua destilada.
- Se transfirieron 1, 2, 5, 10 y 20 mL de la solución anterior a cinco matraces de 100 mL. A cada uno de los matraces se le adicionaron 10 mL de la solución de 1,10-fenantrolina y 8 mL de la solución de citrato de sodio. Luego se enrasaron todos los matraces con agua destilada, se homogenizó y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, se midió el espectro UV-VIS (350-700 nm), y se realizó la curva de calibración (Figura 4.14).

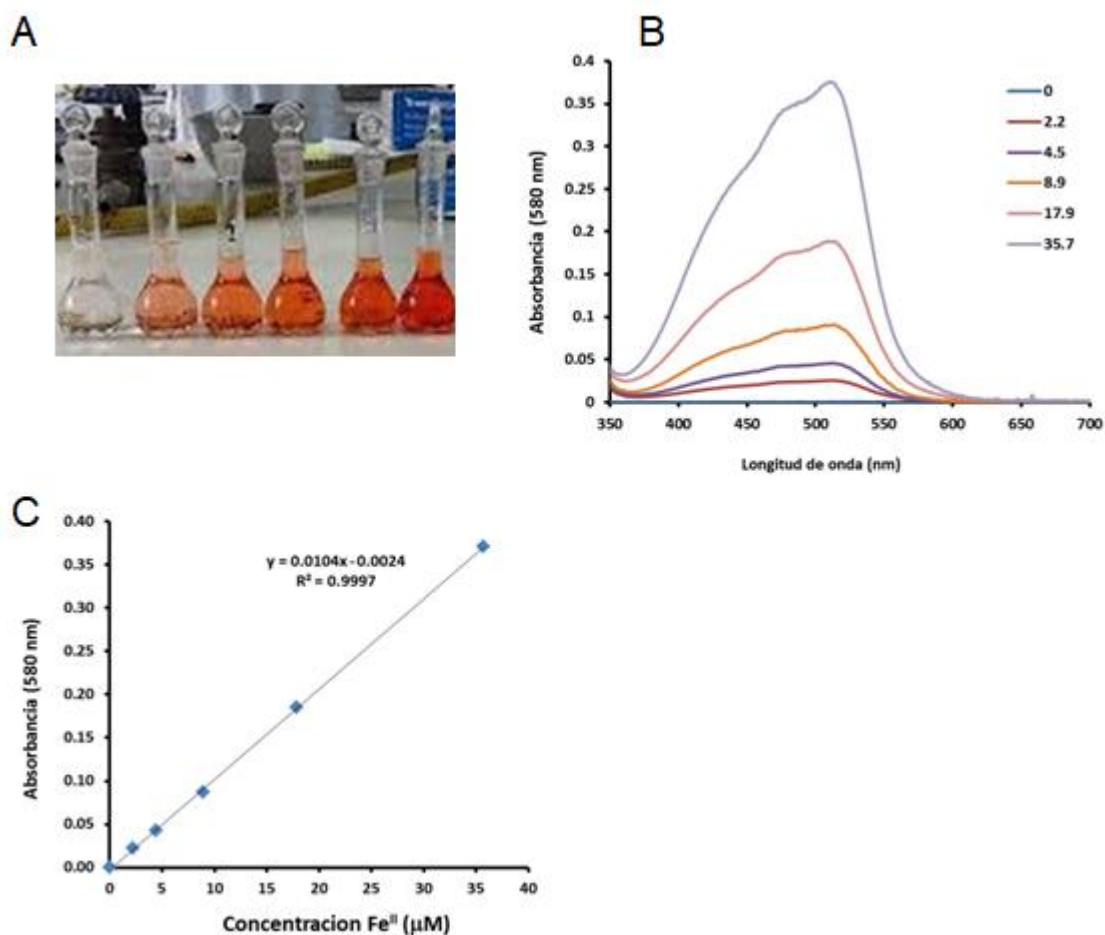


Figura 4.14. A. Patrones (color desarrollado en la reacción). B. Espectros de absorción de los patrones preparados (mM). C) Curva de calibración a 510 nm.

Determinación Fe:

- Fe(II). Se transfirió 1 ml de proteína 50 μM a un matraz de 10 ml, se agregaron 1 ml de 1, 10-fenantrolina y 0,8 ml de de la solución de citrato de sodio. Luego se enrasaron todos los matraces con agua destilada, se homogenizó y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se midió el espectro UV-VIS (350-700 nm).
- Para la determinación de Fe(III), se repitió el mismo protocolo pero añadiendo 1 mL de la solución de ácido ascórbico.

Las concentraciones de ambos analitos fueron determinadas mediante la curva de calibración.

4.4.4. Ensayos de actividad regulación redox

Antes de realizar las reacciones, se controló que tanto el ácido ascórbico como el H_2O_2 no afectaran la actividad luciferasa del kit empleado para medir actividad (ver sección 2.2.10). Para ello, se midió la luminiscencia producida por una muestra de 50 μL de buffer 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM $MnCl_2$, 2 μM ATP, así como la luminiscencia producida por el mismo buffer en presencia de H_2O_2 100 μM y ácido ascórbico 30 μM , y la combinación de ambos (es decir, en las mismas concentraciones máximas finales utilizadas en las reacciones). Se observó que ni el H_2O_2 ni el ácido ascórbico interfieren con la actividad luciferasa (Figura 4.15).

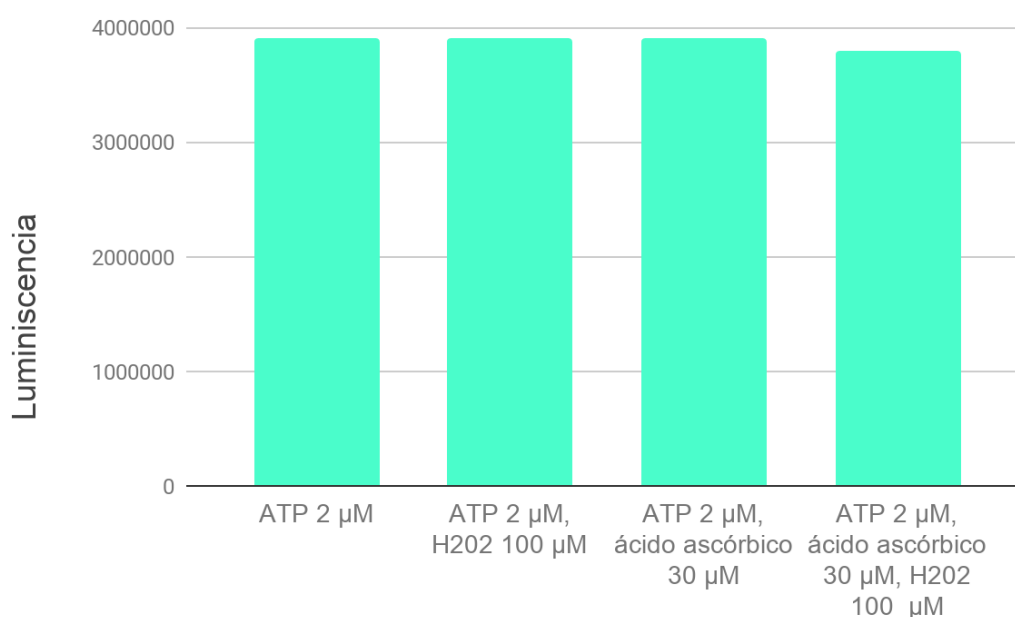


Figura 4.15 Control de actividad luciferasa en presencia de ácido ascórbico y/o H_2O_2

La proteína, almacenada a $-80^\circ C$ fue colocada en hielo hasta descongelación; a continuación se la centrifugó por 15 minutos a $4^\circ C$ a 20.000 G (Hanil combi 514R), conservándose el sobrenadante, se cuantificó la proteína (ver sección 2.2.7.1), se la pre incubó con el agente reductor y/u oxidante, según correspondiere (ver sección 2.2.11), y se midió actividad por duplicado (ver sección 2.2.9.1).

En todos los casos, las proteínas fueron descongeladas en el día a realizar la medición, descartándose el excedente (es decir, cada ensayo fue realizado con proteínas que se fueron descongeladas por primera y única vez desde el día de su purificación).

4.4.5. Cuantificación de tioles libres

Las proteínas, almacenadas a -80°C fueron colocadas en hielo hasta descongelación; a continuación se las centrifugó por 15 minutos a 4°C a 20.000 G (Hanil combi 514R), conservándose el sobrenadante, y luego cuantificadas (ver sección 2.2.7.1). Posteriormente, se incubó en hielo en presencia de EDTA, DTT o úrea, en un eppendorf sellado con parafilm. Luego del tiempo de incubación, se pasó por columna de desalado (ver sección 2.2.6), eluyéndose con buffer 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% glicerol, $\text{pH}=7,4$, se volvió a cuantificar la proteína, y se procedió a realizar la reacción de Ellman's (ver sección 2.2.10). Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

4.4.6. Espectrometría UV-VIS

Las mediciones se realizaron en las condiciones señaladas en la sección 2.2.7.1).

Para cada ensayo se utilizaron muestras de 200 μL de proteína 50 μL 12 hs después de ser purificada.

Para la titulación se utilizaron soluciones de ácido ascórbico 500 y 5000 μM preparadas en buffer 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), y diluciones de H_2O_2 500 y 5000 μM realizadas con el mismo buffer.

4.4.7. Espectrometría Raman resonante

Se utilizó un centrífugo (Amicon Ultra, 0.5ml) para concentrar la proteína (tras 12 hs de su purificación), así como para cambiar el buffer por uno con menor cantidad de glicerol ya que este interfiere con la espectroscopia raman resonante (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% glicerol, $\text{pH}=7,4$). Se obtuvo una muestra de concentración superior a 500 μM .

Los espectros Raman fueron realizados en colaboración con el Dr. Murgida (DQIAyQF), adquiridos a -80°C empleando un microscopio Raman confocal (Jobin Yvon XY 800) equipado con un detector CCD retro-iluminado refrigerado con nitrógeno líquido.

4.4.8. Espectroscopía de fluorescencia de triptófanos

Las mediciones de fluorescencia a presión atmosférica fueron realizadas utilizando un espectrofluorímetro JASCO FP-6500. Los espectros fueron registrados en una cubeta de cuarzo de 1,8 ml a 25 °C. Por cada muestra se promediaron 4 espectros utilizando una longitud de onda de excitación a 295 nm, y tomando los espectros de emisión en el rango de 310-450 nm a una velocidad de barrido de 1 nm/s utilizando aperturas de excitación y emisión de 4 nm

4.5. Bibliografía

- Av-Gay, Y., and M. Everett. 2000. "The Eukaryotic-like Ser/Thr Protein Kinases of Mycobacterium Tuberculosis." *Trends in Microbiology* 8 (5): 238–44.
- Bandemer, Selma L., and P. J. Schaible. 1944. "Determination of Iron. A Study of the O-Phenanthroline Method." *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition* 16 (5): 317–19.
- Begum, Most Champa, Mohammad Saiful Islam, Monirul Islam, Ruhul Amin, Mohammad Sarwar Parvez, and Ahmad Humayan Kabir. 2016. "Biochemical and Molecular Responses Underlying Differential Arsenic Tolerance in Rice (*Oryza Sativa* L.)." *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale* 104 (July): 266–77.
- Bertini, Ivano, and Astrid Sigel. 2001. *Handbook on Metalloproteins*. CRC Press.
- Bian, Shumin, and J. A. Cowan. 1999. "Protein-Bound Iron–sulfur Centers. Form, Function, and Assembly." *Coordination Chemistry Reviews* 190-192 (September): 1049–66.
- Bonomi, F., Stefania Iametti, Donald M. Kurtz Jr., Kimberly A. Richie, E. Ragg, and Enzo M. Ragg. 1998. "Direct Metal Ion Substitution at the [M(SCys)₄]₂-Site of Rubredoxin." *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 3 (6): 595–605.
- Bryan, Robert F. 2002. "Handbook of Metalloproteins. Vols. 1 & 2. Edited by Albrecht Messerschmidt, Robert Huber, Thomas Poulos and Karl Wieghardt. Chichester: John Wiley & Sons, 2001. Pp. Xxviii + 1472. Price US\$945.00. ISBN 0-471-62743-7." *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 58 (6 Part 2): 1084.
- Czernuszewicz, Roman S., Latonya K. Kilpatrick, Stephen A. Koch, and Thomas G. Spiro. 1994. "Resonance Raman Spectroscopy of Iron (III) Tetrathiolate Complexes: Implications for the Conformation and Force Field of Rubredoxin." *Journal of the American Chemical Society* 116 (16): 7134–41.
- Czernuszewicz, Roman S., Jean LeGall, Isabel Moura, and Thomas G. Spiro. 1986. "Resonance Raman Spectra of Rubredoxin: New Assignments and Vibrational Coupling Mechanism from Iron-54/iron-56 Isotope Shifts and Variable-Wavelength Excitation." *Inorganic Chemistry* 25 (5): 696–700.
- Czernuszewicz, Roman S., Kathleen A. Macor, Michael K. Johnson, Andrew Gewirth, and Thomas G. Spiro. 1987. "Vibrational Mode Structure and Symmetry in Proteins and Analogs Containing Fe₄S₄ Clusters: Resonance Raman Evidence That HiPIP Is Tetrahedral While Ferredoxin Undergoes a D_{2d} Distortion." *Journal of the American Chemical Society* 109 (23): 7178–87.
- Dauter, Z., K. S. Wilson, L. C. Sieker, J. M. Moulis, and J. Meyer. 1996a. "RUBREDOXIN (ZN-SUBSTITUTED) AT 1.2 ANGSTROMS RESOLUTION." <https://doi.org/10.2210/pdb1irn/pdb>.
- . 1996b. "Zinc- and Iron-Rubredoxins from *Clostridium Pasteurianum* at Atomic Resolution: A High-Precision Model of a ZnS₄ Coordination Unit in a Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (17): 8836–40.
- deMaré, Fredrick, Donald M. Kurtz Jr, and Pär Nordlund. 1996. "The Structure of *Desulfovibrio Vulgaris* Rubrerythrin Reveals a Unique Combination of Rubredoxin-like FeS₄ and Ferritin-like Diiron Domains." *Nature Structural Biology* 3 (June): 539.

- Eady, R. R., B. E. Smith, K. A. Cook, and J. R. Postgate. 1972. "Nitrogenase of *Klebsiella Pneumoniae*. Purification and Properties of the Component Proteins." *Biochemical Journal* 128 (3): 655–75.
- Gil, Magdalena, Martín Graña, Francisco J. Schopfer, Tristan Wagner, Ana Denicola, Bruce A. Freeman, Pedro M. Alzari, Carlos Batthyány, and Rosario Durán. 2013. "Inhibition of *Mycobacterium Tuberculosis* PknG by Non-Catalytic Rubredoxin Domain Specific Modification: Reaction of an Electrophilic Nitro-Fatty Acid with the Fe-S Center." *Free Radical Biology & Medicine* 65 (December): 150–61.
- Goodfellow, Brian J., Iven C. N. Duarte, Anjos L. Macedo, Brian F. Volkman, Sofia G. Nunes, I. Moura, John L. Markley, and José J. G. Moura. 2010. "An NMR Structural Study of Nickel-Substituted Rubredoxin." *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 15 (3): 409–20.
- Halliwell, Barry. 2006. "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life." *Plant Physiology* 141 (2): 312–22.
- Herriott, J. R., L. C. Sieker, L. H. Jensen, and W. Lovenberg. 1970. "Structure of Rubredoxin: An X-Ray Study to 2.5 Å Resolution." *Journal of Molecular Biology* 50 (2): 391–406.
- Jackson, G. S., R. A. Staniforth, D. J. Halsall, T. Atkinson, J. J. Holbrook, A. R. Clarke, and S. G. Burston. 1993. "Binding and Hydrolysis of Nucleotides in the Chaperonin Catalytic Cycle: Implications for the Mechanism of Assisted Protein Folding." *Biochemistry* 32 (10): 2554–63.
- Johnson, Erica S. 2004. "Protein Modification by SUMO." *Annual Review of Biochemistry* 73: 355–82.
- Johnson, Michael K., and Archer D. Smith. 2011. "Iron--Sulfur Proteins." *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119951438.eibc0109>.
- Kavanagh, E. P., and S. Hill. 1993. "Oxygen Inhibition of Nitrogenase Activity in *Klebsiella Pneumoniae*." *Journal of General Microbiology* 139 Pt 6 (June): 1307–14.
- Kreżel, Artur, and Wolfgang Maret. 2016. "The Biological Inorganic Chemistry of Zinc Ions." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 611 (December): 3–19.
- Lebrun, Evelyne, Joanne M. Santini, Myriam Brugna, Anne-Lise Ducluzeau, Soufian Ouchane, Barbara Schoepp-Cothenet, Frauke Baymann, and Wolfgang Nitschke. 2006. "The Rieske Protein: A Case Study on the Pitfalls of Multiple Sequence Alignments and Phylogenetic Reconstruction." *Molecular Biology and Evolution* 23 (6): 1180–91.
- Lisa, María-Natalia, Magdalena Gil, Gwénaëlle André-Leroux, Nathalie Barilone, Rosario Durán, Ricardo M. Biondi, and Pedro M. Alzari. 2015. "Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from *Mycobacterium Tuberculosis*." *Structure* 23 (6): 1039–48.
- Lode, E. T., and M. J. Coon. 1971. "Enzymatic ω -Oxidation V. Forms of *Pseudomonas Oleovorans* Rubredoxin Containing One or Two Iron Atoms: Structure and Function in ω -Hydroxylation." *The Journal of Biological Chemistry*. <http://www.jbc.org/content/246/3/791.short>.
- Maher, Megan, Maddalena Cross, Matthew C. J. Wilce, J. Mitchell Guss, and Anthony G. Wedd. 2004. "Metal-Substituted Derivatives of the Rubredoxin from *Clostridium Pasteurianum*." *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 60 (2): 298–303.

- Malkin, R., and J. C. Rabinowitz. 1966. "The Reconstitution of Clostridial Ferredoxin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 23 (6): 822–27.
- Mandal, Biswajit, Prasanta Kumar Sinha, Ranjan Sen, and Ashis Kumar Mandal. 2016. "A Comparative Spectrophotometric Study Using Ferrozine and 1, 10-Ortho-Phenanthroline to Evaluate the Iron Redox Ratio ($\text{Fe}^{2+}/\Sigma\text{Fe}$) in Glass Prepared by Microwave Heating." *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 32 (5): 571–76.
- Mapolelo, Daphne T., Bo Zhang, Sunil G. Naik, Boi Hanh Huynh, and Michael K. Johnson. 2012. "Spectroscopic and Functional Characterization of Iron-Bound Forms of *Azotobacter Vinelandii* (Nif)IscA." *Biochemistry* 51 (41): 8056–70.
- Maret, Wolfgang, and Jean-Marc Moulis. 2013. "The Bioinorganic Chemistry of Cadmium in the Context of Its Toxicity." *Metal Ions in Life Sciences* 11: 1–29.
- Martin, J., T. Langer, R. Boteva, A. Schramel, A. L. Horwich, and F. U. Hartl. 1991. "Chaperonin-Mediated Protein Folding at the Surface of groEL through a 'Molten Globule'-like Intermediate." *Nature* 352 (6330): 36–42.
- Meyer, Jacques. 2008. "Iron–sulfur Protein Folds, Iron–sulfur Chemistry, and Evolution." *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 13 (2): 157–70.
- Mitou, Géraldine, Catherine Higgins, Pernilla Wittung-Stafshede, Richard C. Conover, Archer D. Smith, Michael K. Johnson, Jacques Gaillard, Audria Stubna, Eckard Münck, and Jacques Meyer. 2003. "An Isc-Type Extremely Thermostable [2Fe-2S] Ferredoxin from *Aquifex Aeolicus*. Biochemical, Spectroscopic, and Unfolding Studies." *Biochemistry* 42 (5): 1354–64.
- Mortenson, L. E., R. C. Valentine, and J. E. Carnahan. 1962. "An Electron Transport Factor from *Clostridium pasteurianum*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 7 (6): 448–52.
- Moulis, J-M, Valérie Davasse, Marie-Pierre Golinelli, Jacques Meyer, and Isabelle Quinkal. 1996. "The Coordination Sphere of Iron-Sulfur Clusters: Lessons from Site-Directed Mutagenesis Experiments." *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 1 (1): 2–14.
- Niazi, Ali. 2006. "Simultaneous Spectrophotometric Determination of FeII and FeIII in Pharmaceuticals by Partial Least Squares with Chromogenic Mixed Reagents." *Croatica Chemica Acta. Arhiv Za Kemiju* 79 (4): 573–79.
- O'hare, H. M., R. Durán, and C. Cerveñansky. 2008. "Regulation of Glutamate Metabolism by Protein Kinases in *Mycobacteria*." *Molecular*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2008.06489.x>.
- Outten, F. Wayne, and Elizabeth C. Theil. 2009. "Iron-Based Redox Switches in Biology." *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (5): 1029–46.
- Pandelia, Maria-Eirini, Nicholas D. Lanz, Squire J. Booker, and Carsten Krebs. 2015. "Mössbauer Spectroscopy of Fe/S Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1853 (6): 1395–1405.
- Raab, Andrea. 2002. "Edited by A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos and K. Wieghardt: Handbook of Metalloproteins, Vols 1 & 2. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2001, 1st Edn, xiv+?1472 Pp; Price £645. ISBN 0-471-62743-7." *Applied Organometallic Chemistry* 16 (7): 397–397.
- Rahman, Irfan, Aruna Kode, and Saibal K. Biswas. 2006. "Assay for Quantitative

- Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Levels Using Enzymatic Recycling Method." *Nature Protocols* 1 (6): 3159–65.
- Rao, K. K., M. C. Evans, R. Cammack, D. O. Hall, C. L. Thompson, P. J. Jackson, and C. E. Johnson. 1972. "Mössbauer Effect in Rubredoxin. Determination of the Hyperfine Field of the Iron in a Simple Iron-Sulphur Protein." *Biochemical Journal* 129 (5): 1063–70.
- Rao, P. Venkateswara, P. Venkateswara Rao, and R. H. Holm. 2004. "Synthetic Analogues of the Active Sites of Iron—Sulfur Proteins." *ChemInform* 35 (21). <https://doi.org/10.1002/chin.200421274>.
- Rees, Douglas C., F. Akif Tezcan, Chad A. Haynes, Mika Y. Walton, Susana Andrade, Oliver Einsle, and James B. Howard. 2005. "Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation." *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences* 363 (1829): 971–84; discussion 1035–40.
- Rieske, John S., David H. MacLennan, and Roger Coleman. 1964. "Isolation and Properties of an Iron-Protein from the (reduced Coenzyme Q)-Cytochrome C Reductase Complex of the Respiratory Chain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15 (4): 338–44.
- Rochet, Jean-Christophe. 2007. "Novel Therapeutic Strategies for the Treatment of Protein-Misfolding Diseases." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 9 (17): 1–34.
- Sands, R. H., and Helmut Beinert. 1960. "Studies on Mitochondria and Submitochondrial Particles by Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 3 (1): 47–52.
- Sazanov, Leonid A., and Philip Hinchliffe. 2006. "Structure of the Hydrophilic Domain of Respiratory Complex I from *Thermus thermophilus*." *Science* 311 (5766): 1430–36.
- Scherr, Nicole, Srinivas Honnappa, Gabriele Kunz, Philipp Mueller, Rajesh Jayachandran, Fritz Winkler, Jean Pieters, and Michel O. Steinmetz. 2007a. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of *Mycobacterium tuberculosis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12151–56.
- . 2007b. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of *Mycobacterium tuberculosis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12151–56.
- . 2007c. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of *Mycobacterium tuberculosis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12151–56.
- Scherr, Nicole, Philipp Müller, Damir Perisa, Benoît Combaluzier, Paul Jenö, and Jean Pieters. 2009. "Survival of Pathogenic *Mycobacteria* in Macrophages Is Mediated through Autophosphorylation of Protein Kinase G." *Journal of Bacteriology* 191 (14): 4546–54.
- Schweimer, Kristian, Silke Hoffmann, Paul Rösch, Heinrich Sticht, Jürgen Wastl, and Uwe G. Maier. 2000. "Solution Structure of a Zinc Substituted Eukaryotic Rubredoxin from the Cryptomonad Alga *Guillardia theta*." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 9 (8): 1474–86.
- Sieker, Larry C., Ronald E. Stenkamp, and Jean Legall. 1994. "[14] Rubredoxin

- in Crystalline State.” In *Methods in Enzymology*, 243:203–16. Academic Press.
- Tiwari, Divya, Rajnish Kumar Singh, Kasturi Goswami, Sunil Kumar Verma, Balaji Prakash, and Vinay Kumar Nandicoori. 2009. “Key Residues in Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinase G Play a Role in Regulating Kinase Activity and Survival in the Host.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27467–79.
- Ventura, Salvador, and Antonio Villaverde. 2006. “Protein Quality in Bacterial Inclusion Bodies.” *Trends in Biotechnology* 24 (4): 179–85.
- Vickery, Larry E., and Jill R. Cupp-Vickery. 2007. “Molecular Chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and Their Roles in Iron-Sulfur Protein Maturation.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 42 (2): 95–111.
- Wittwer, Matthias, Qi Luo, Ville R. I. Kaila, and Sonja A. Dames. 2016. “Oxidative Unfolding of the Rubredoxin Domain and the Natively Disordered N-Terminal Region Regulate the Catalytic Activity of Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinase G.” *The Journal of Biological Chemistry* 291 (53): 27062–72.
- Wittwer, M., Q. Luo, V. R. I. Kaila, and S. A. Dames. 2016. “Oxidative Unfolding of the Rubredoxin Domain and the Natively Disordered N-Terminal Region Regulate the Catalytic Activity of M. Tuberculosis Protein Kinase G.” *The Journal of Biological Chemistry*.
<http://www.jbc.org/content/early/2016/11/03/jbc.M116.747089.short>.
- Xiao, Yuming, Hongxin Wang, Simon J. George, Matt C. Smith, Michael W. W. Adams, Francis E. Jenney Jr, Wolfgang Sturhahn, et al. 2005. “Normal Mode Analysis of Pyrococcus Furiosus Rubredoxin via Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy (NRVS) and Resonance Raman Spectroscopy.” *Journal of the American Chemical Society* 127 (42): 14596–606.
- Xiao, Zhiguang, Megan J. Lavery, Mustafa Ayhan, Sergio D. B. Scrofani, Matthew C. J. Wilce, J. Mitchell Guss, Peter A. Tregloan, Graham N. George, and Anthony G. Wedd. 1998. “The Rubredoxin from Clostridium Pasteurianum: Mutation of the Iron Cysteinylligands to Serine. Crystal and Molecular Structures of Oxidized and Dithionite-Treated Forms of the Cys42Ser Mutant.” *Journal of the American Chemical Society* 120 (17): 4135–50.
- Yeh, A. P., Y. Hu, F. E. Jenney Jr, M. W. Adams, and D. C. Rees. 2000. “Structures of the Superoxide Reductase from Pyrococcus Furiosus in the Oxidized and Reduced States.” *Biochemistry* 39 (10): 2499–2508.

Capítulo 5

5. EFECTO DEL NO Y DEL HNO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PKNG

5.1. Introducción

5.1.1 .Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

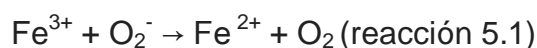
Las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERON), como el superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, óxido nítrico y el peroxinitrito desempeñan un papel importante en la fisiopatología de las infecciones clínicas (R. A. Miller and Britigan 1997; Radi 2018). Estos compuestos exhiben un amplio espectro de biotoxicidad y son cruciales para la defensa del huésped para la actividad microbicida óptima de los neutrófilos y otros fagocitos (Riddell, Graham, and Owen 1997; Barry Halliwell 2006; Ximenes et al. 2007; Ferrari et al. 2011; H. Kumar and Choi 2015). En respuesta, los microorganismos han desarrollado estrategias complejas no solo para evitar el contacto con oxidantes derivados de fagocitos, sino también para defenderse de lesiones una vez expuestos a los mismos (Hasset and Cohen 1989; Gusarov and Nudler 2005).

A continuación se revisa brevemente el rol de algunas de las ERON más relevantes fisiológicamente.

5.1.1.1. Superóxido y peróxido de hidrógeno

El superóxido (O_2^-) es un compuesto moderadamente reactivo capaz de actuar como oxidante o reductor en sistemas biológicos. Esta relativa inactividad permite que el O_2^- pueda difundir distancias considerables antes de ejercer sus efectos tóxicos. El O_2^- es generado extracelularmente, y puede acceder a *targets* intracelulares a través de canales aniónicos celulares (Nauseef 2014). Sus dianas incluyen enzimas bacterianas, particularmente aquellas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos ramificados (Haas and Goebel 1992; Benov 2001).

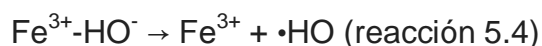
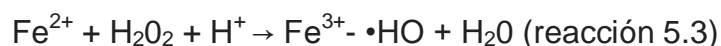
Se ha propuesto que el radical superóxido causa daño celular indirectamente, participando en la llamada reacción de Haber-Weiss (reacciones 5.1 y 5.2), que genera al radical hidroxilo, altamente reactivo (McCord and Day 1978; B. Halliwell 1978).



De acuerdo con el mecanismo anterior, el único papel de O_2^- en la producción del radical hidroxilo es reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Por supuesto, O_2^- sería importante para la reacción de Haber-Weiss solo si no hay otros reductores de hierro.

En ambientes ácidos, como en sitios de inflamación o dentro del fagosoma, el O_2^- se protona para formar el radical perhidroxilo ($\text{HO}_2\cdot$). Debido a su carga neutra, el $\text{HO}_2\cdot$ es más permeable a la membrana y es más probable que reaccione para formar H_2O_2 (R. A. Miller and Britigan 1997; Benov 2001).

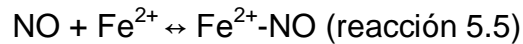
El peróxido de hidrógeno es un oxidante más reactivo que el O_2^- , y difunde fácilmente a través de las membranas celulares. Imlay y Linn (Imlay, Chin, and Linn 1988) probaron que la exposición de *Escherichia coli* durante la fase de crecimiento a peróxido de hidrógeno conduce a dos modos de destrucción celular cinéticamente distinguibles. La muerte en Modo 1 sucede cerca de la concentración 1 mM de H_2O_2 y es causada por daño en el ADN, mientras que la muerte en Modo 2 requiere una mayor concentración (> 10 mM), y parece ser esencialmente debida a daño generalizado de macromoléculas. En particular, el daño a ADN está mediado por la interacción del H_2O_2 con Fe^{2+} para formar el radical tóxico ferrilo (FeO^\cdot), un producto intermediario en la formación de OH^\cdot (Imlay, Chin, and Linn 1988):



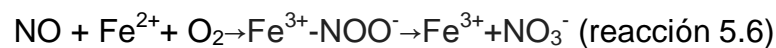
5.1.1.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es citostático o citotóxico tanto para células procariontas como eucariotas (Kovacevic et al. 2017; Pant et al. 2018). El NO posee dos mecanismos principales de lesión. El primero involucra su interacción con enzimas que contienen hierro, claves en ciclo respiratorio, y el segundo mutagénesis de las células diana (Moncada and Higgs 1993).

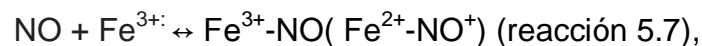
El NO puede unirse reversiblemente al Fe(II), con distintas tasas de asociación, las cuales son dependientes del sistema biológico (Cooper 1999) mediante la siguiente reacción:



Este tipo de reacción se da por ejemplo entre el NO y la enzima respiratoria citocromo oxidasa; existe clara evidencia de que niveles bajos de NO generan un complejo NO-citocromo oxidasa ferrosa, inhibiendo la respiración, la cual es restaurada en segundos tras la remoción del NO del medio (Cooper 1999). A su vez, en presencia de oxígeno la reacción puede dar lugar a:



El NO también puede unirse reversiblemente a Fe(III), y en este caso las tasas de asociación también serán dependientes del sistema biológico (Cooper 1999) mediante la siguiente reacción:



la cual es seguida por:



o:



Por otro lado, cuando el ADN se expone *in vitro* a NO, las aminos exocíclicas de las nucleobases forman derivados inestables de N-nitroso (-N-N=O) que conducen a la desaminación. Así, la adenina se desamina a hipoxantina, la guanina se desamina a xantina y la citosina se desamina a uracilo. Los productos desaminados se emparejan con bases diferentes a las de sus hebras molde. Por lo tanto, casi siempre producen mutaciones durante la replicación posterior (Weiss 2006). El óxido nítrico también puede reaccionar con otras biomoléculas para formar nuevos

compuestos que también pueden ser tóxicos. Por ejemplo, la formación de grupos nitrosotiol en proteínas puede conducir a la inactivación de enzimas o cambios en la función de la proteína (Moncada and Higgs 1993). Estos grupos pueden reaccionar más para reticular grupos sulfhidrilo y así iniciar una reacción en cadena (Rockett et al. 1991). Además, el NO y sus derivados pueden formar agentes alquilantes tóxicos al reaccionar con aminas secundarias (Weiss 2006).

5.1.1.3. Nitroxilo

Mientras que la bioquímica, farmacología y toxicidad del NO han sido ampliamente estudiadas (citas), aún queda mucho por estudiar acerca de su forma reducida, el nitroxilo (HNO, azanona) (Augustyniak, Skolimowski, and Błaszczuk 2013). Probablemente, el desinterés por los los congéneres reducidos de NO se debe a la creencia de que el destino biológico de NO es principalmente oxidativo (Fukuto et al. 2005). Además, los informes de que reportan una actividad biológica relevante en tejidos de mamíferos asociados con especies reducidas de NO han surgido recién en los últimos años (Fukuto et al. 2005). Por lo tanto, las especies de óxido de nitrógeno como el nitroxilo (HNO) han recibido mucha menos atención que los óxidos de nitrógeno más oxidados.

Históricamente, el HNO entró a la luz como una posible sustancia biológicamente activa, a mediados de los años ochenta, con estudios relacionados con la cianamida (H_2NCN), un medicamento contra el alcoholismo. (E. C. DeMaster, Shirota, and Nagasawa 1984; Demaster, Nagasawa, and Shirota 1983). La cianamida genera HNO en una reacción oxidativa (con catalasas o peroxidasas) (Reisz, Bechtold, and King 2010), que a su vez inhibe la enzima aldehído deshidrogenasa (ADH). Este último paso de inhibición sucede por la reacción del HNO generado, con el residuo tiolato de la cisteína en el sitio activo de la ADH, y fue por lo tanto una de las primeras evidencias que indican una alta reactividad de HNO con tiolatos (RS^-) (E. G. DeMaster, Shirota, and Nagasawa 1985; E. G. DeMaster, Redfern, and Nagasawa 1998). Hoy en día, se cree que los tioles son un blanco importante del HNO (Fukuto et al. 2005).

El HNO ha demostrado una química y una biología distintas de la de NO (Elsevier n.d.). Al igual que NO, se sugiere que el HNO es producido endógenamente (E. Shoman and M. Aly 2016).

Otra característica biológica clave del HNO, es su alta reactividad con las hemoproteínas, férricas y ferrosas (T. W. Miller et al. 2009; M. R. Kumar et al. 2010; Shi and Zhang 2018).

El HNO podría ser un nuevo mensajero producido endógenamente que media respuestas fisiológicas específicas, muchas de las cuales se atribuyeron a los efectos NO•(Hamer et al. 2015). El mecanismo subyacente de esta interacción NO• - HNO y sus efectos posteriores en diferentes contextos siguen siendo una incógnita, donde la química básica de estos compuestos debería desempeñar un papel importante. También quedan lagunas considerables en el conocimiento con respecto al papel de NO in vivo, particularmente en humanos, y la investigación profunda de los mecanismos implicados en la conversión de NO • a HNO por alcoholes, tioles y otras moléculas en ausencia y presencia de posibles dianas biológicamente relevantes es una materia pendiente pendiente (Sebastián A. Suarez et al. 2015; Sebastian A. Suarez et al. 2017).

5.1.1.4. Peroxinitrito

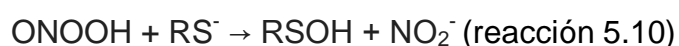
El descubrimiento del peroxinitrito como oxidante biológico nació el análisis de datos combinados de la bibliografía fisiológica (Gryglewski, Palmer, and Moncada 1986; Rubanyi and Vanhoutte 1986; Ignarro et al. 1988) y química (Bartesaghi and Radi 2018).

El anión peroxinitrito está en equilibrio con el ácido peroxinitroso (ONOOH): el pK_a es de 6,8 a 37°C (Radi et al. 1991). Por lo tanto, bajo condiciones de pH fisiológicamente relevantes, ambas especies coexisten, una consideración importante dado que ONOO⁻ y ONOOH poseen propiedades químicas diferentes(Ferrer-Sueta et al. 2018). Además, ONOOH es inestable en solución acuosa y en ausencia de dianas moleculares se isomeriza a nitrato (NO₃⁻); vale la pena destacar que un informe inicial propuso que la isomerización de ONOOH involucra la intermediación de los radicales de •HO y dióxido de nitrógeno (•NO₂) (Mahoney 1970), en consonancia con la nitración de compuestos fenólicos dependiente de ONOOH (Halfpenny and Robinson 1952).

El peroxinitrito fue propuesto inicialmente como un intermediario citotóxico biológicamente relevante por Beckman et al. (Beckman et al. 1990). Este documento

histórico exploró la reactividad química del peroxinitrito en presencia de sequestradores de •OH, y como tal atribuyó la toxicidad potencial del peroxinitrito a la formación de •OH o a especies similares. La formación del producto putativo •OH se debió a la homólisis catalizada por protones del peroxinitrito; y se estima que la formación de •OH a partir de ONOOH ocurre con un $\leq 30\%$ de rendimiento (Ferrer-Sueta et al. 2018), y el resto se isomeriza directamente a nitrato.

Los estudios mecanísticos sobre la reacción directa del peroxinitrito con tioles indican que los tioles se oxidan por oxidación de dos electrones para producir el ácido sulfénico correspondiente (Ferrer-Sueta et al. 2018):



En general, la evaluación cinética de las reacciones del peroxinitrito lleva a la conclusión de que la formación de •OH en los sistemas biológicos es un proceso cuantitativamente marginal. Aún así, los derivados de peroxinitrito •OH y •NO₂ pueden jugar un papel en la oxidación de biomembranas y lipoproteínas y bioestructuras hidrófobas donde los niveles de reactantes directos con peroxinitrito son escasos y las oxidaciones de un electrón se propagan por reacciones en cadena que involucran radicales derivados de lípidos (Bartesaghi et al. 2017).

5.1.2. ERON y *Mtb*.

El éxito de las micobacterias como patógenos depende de su capacidad para infectar y persistir dentro de los macrófagos de su huésped (Russell et al. 1997), en donde se enfrenta a una serie de condiciones hostiles, como por ejemplo la exposición a ERON (Abdallah et al. 2007) y a un medio ácido (Paroha et al. 2018).

Las respuestas al ácido se han estudiado ampliamente en patógenos entéricos, tales como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori*, las cuales se encuentran con el pH extremadamente bajo del estómago durante la ingestión (pH 2 a 3). En contraste, se sabe mucho menos acerca de cómo los patógenos bacterianos intracelulares obligados o facultativos como *Mtb*. responden, resisten y persisten en el ambiente moderadamente ácido del fagosoma o fagolisosoma. El pH del compartimiento de macrófagos en el que reside oscila en un rango de pH 4.5 a

6.2, dependiendo del estado de activación del macrófago (Via et al. 1998; Schaible et al. 1998; J. D. MacMicking, Taylor, and McKinney 2003).

Varios estudios han demostrado que la interferencia con la acidificación del compartimento fagosómico favorece la supervivencia de las micobacterias (J. D. MacMicking, Taylor, and McKinney 2003). Es tentador concluir que el ácido fagosómico en sí es bactericida; sin embargo, otra interpretación es que la acidez del fagosoma apoya y sinergiza con los mecanismos antibacterianos adicionales de los fagocitos, como las hidrolasas lisosomales dependientes de los ácidos, las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Stuehr and Nathan 1989; Tews et al. 2005; Jakkett, Aber, and Lowrie 1978). Por ejemplo, el NO es el producto principal de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), una enzima necesaria para el control de la tuberculosis en ratones en condiciones experimentales (J. D. MacMicking, Taylor, and McKinney 2003). En ambientes acuosos oxigenados, el NO se auto oxida rápidamente, produciendo cantidades aproximadamente equivalentes de nitrito y nitrato, los cuales difunden lejos de la enzima, tanto fuera del macrófago como presumiblemente hacia el fagosoma. Sin embargo, el pH de un fagolisosoma que contiene *Mtb.* en un macrófago activado está lo suficientemente cerca del pKa del ácido nitroso (3.8) para permitir que el nitrito protonado (es decir, el ácido nitroso) mantenga su propia dismutación, formando NO y otro radical tóxico, el dióxido de nitrógeno. Por lo tanto, la difusión de nitrito en un compartimento acidificado genera otra ronda de ERON bactericida (J. MacMicking, Xie, and Nathan 1997). El medio fagosómico en el macrófago activado se asemeja, en cierta medida, al entorno intragástrico, cuya eficacia microbicida depende de la acción combinada del ácido y las especies reactivas de nitrógeno (Benjamin et al. 1994; McKnight et al. 1997; Zhu et al. 2006).

Por otro lado, gran parte de la la capacidad de *Mtb.* de sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos se debe a su capacidad para inhibir la fusión de fagosomas con lisosomas, un proceso conocido como maduración fagosómica (Armstrong and Hart 1971; Russell et al. 1997). Como ya hemos mencionado, el genoma de ésta bacteria codifica once serin-treonin quinasas (STPKs) que sirven como reguladoras claves de la virulencia, del proceso metabólico, de la interacción huésped-patógeno, del crecimiento y del desarrollo (Cole et al. 1998; Av-Gay and Everett 2000; O'Hare et al. 2008; Ventura et al. 2013; Rieck et al. 2017). Algunas de

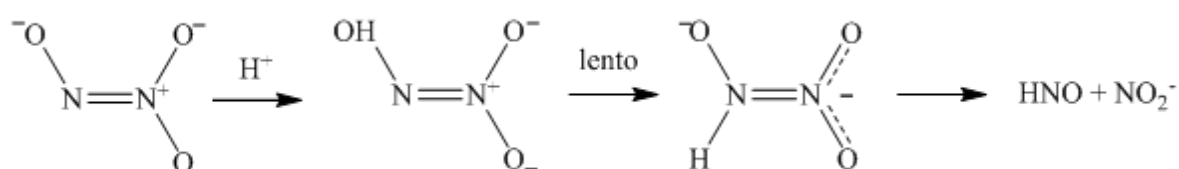
estas STPKs son esenciales para *Mtb.* dentro de los macrófagos del huésped. Se ha sugerido que PknG se secreta a través del sistema de secreción SecA2 (van der Woude et al. 2014) en el citosol de los macrófagos (Walburger et al. 2004), donde se propone que interfiere con las vías de señalización del huésped que controlan la síntesis de fagolisosomas (Walburger et al. 2004), alterando la fagocitosis de las micobacterias por regulación negativa de la PKC- α de los macrófagos (Chaurasiya and Srivastava 2008, 2009). La PKC- α es una proteína quinasa involucrada en la fagocitosis, en la maduración del fagosoma, en la inmunidad a la infección, en la apoptosis y en la producción de citoquinas/quimiocinas (St-Denis et al. 1999; Zheleznyak and Brown 1992; Webb, Hirst, and Giembycz 2000; Holm et al. 2003) . Además, se ha reportado que la interrupción de PknG aumenta la susceptibilidad de las micobacterias a antibióticos (Wolff et al. 2009), a medios ácidos (Khan et al. 2017), atenúa el crecimiento durante la fase estacionaria (Cowley et al. 2004), altera la formación de biofilms (vinculada con la resistencia a antibióticos) (Ojha et al. 2008), aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo, y produce acumulación de NADH y FAD durante dicho estrés (Wolff et al. 2015). Además, recientemente se demostró que la disponibilidad de aminoácidos actúa como un estímulo para la fosforilación de GarA mediada por PknG, lo que vincularía a PknG con el sentido de aminoácidos disponibles, y, en última instancia, de nutrientes (Rieck et al. 2017; Bhattacharyya et al. 2018). Todos estos factores sugieren que PknG desempeña un rol fundamental en el estado de latencia, en el cual *Mtb.* se encuentra bajo estrés oxidativo; es por esto que en este capítulo estudiaremos el efecto de ERON fisiológicamente relevantes sobre la actividad quinasa de PknG.

5.2. Resultados

Dada la relevancia de las ERON como señales externas para la regulación del metabolismo del bacilo, en ésta sección de la tesis nos propusimos analizar en detalle cómo es la potencial regulación de la actividad quinasa de PknG por parte de NO, HNO/NO⁻ y H₂O₂. Para ello se realizaron ensayos de actividad quinasa de PknG purificada en medio mínimo enriquecido con hierro (PknG-Fe) pre incubada en presencia de dichas ERON.

En una primera instancia, se midió y se comparó la actividad de PknG-Fe pre incubada con ácido ascórbico (como control positivo de reducción), NO y HNO en una relación proteína: reductor 1:1. En todos los casos se midió el espectro UV-VIS. También, se midió el espectro Raman Resonante para la proteína pre incubada con NO y HNO (Figura 5.1).

El efecto del NO se determinó utilizando concentración en “bolo” de NO gas, generado *in-situ* (por reducción de Nitrito y Sulfato Ferroso) (ver Materiales y métodos de este capítulo). Por su parte, el efecto de la Azanona (HNO/NO-) se evaluó utilizando Sal de Angeli. El mecanismo aceptado para la descomposición espontánea para dar HNO y nitrito, implica la monoprotonación del anión de sal de Angeli entre pH 4 y 8, como se muestra a continuación:



(reacción 5.11)

La sal de Angeli se usa comúnmente como un dador confiable de HNO en medios casi neutros, con una constante de descomposición pH-dependiente y de primer orden. De pH 4 a 8 la constante de velocidad es prácticamente invariable, siendo $6,8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a 25 °C, equivalente a un $t_{1/2}$ de 17 minutos (Huges and Wimbledon 1976; Vepřek-Šiška, Šmirous, and Pliška 1959).

Tanto el HNO como el NO reaccionan con el Fe(III) en una reacción nitrosativa reductora, pero mientras que el primero reacciona rápida y eficientemente, el segundo forma complejos de nitrosilo férricos lábiles que, al final, pueden no producir eficazmente el producto de nitrosilación reductora, lo que provoca que la reacción sea más lenta (Bari et al. 2003).

Se aprecia que la pre incubación de PknG-Fe con HNO, al igual que el control con ácido ascórbico, provoca la desaparición del pico a 480 nm en el espectro UV-VIS, correspondiente al cluster Fe-4S oxidado (Lode and Coon 1971; Rao et al.

1972), visibles tanto en la quinasa sin tratamiento, como en el caso de la proteína pre-incubada con NO (Figura 5.1 A); lo que concuerda con lo observado en los espectros RR, en donde se observan los picos correspondientes al *cluster* oxidado (311 y 316 cm^{-1}) (Mapolelo et al. 2012) en el caso del control y de la proteína pre incubada con NO, con una notable disminución del mismo en el caso de la proteína pre incubada con HNO (Figura 5.1 B).

Cabe destacar que dado que la reducción del Fe por parte del NO es más lenta, el espectro UV-VIS de la quinasa pre incubada con NO fue tomado luego de 24 hs de incubación, tiempo que resultó insuficiente para apreciar cambios en el pico de 480 nm. Por otro lado, se observa una actividad similar a la de la proteína sin pre tratar, mientras que se hay un marcado aumento tanto al preincubar con HNO como con ácido ascórbico (Figura 5.1 C).

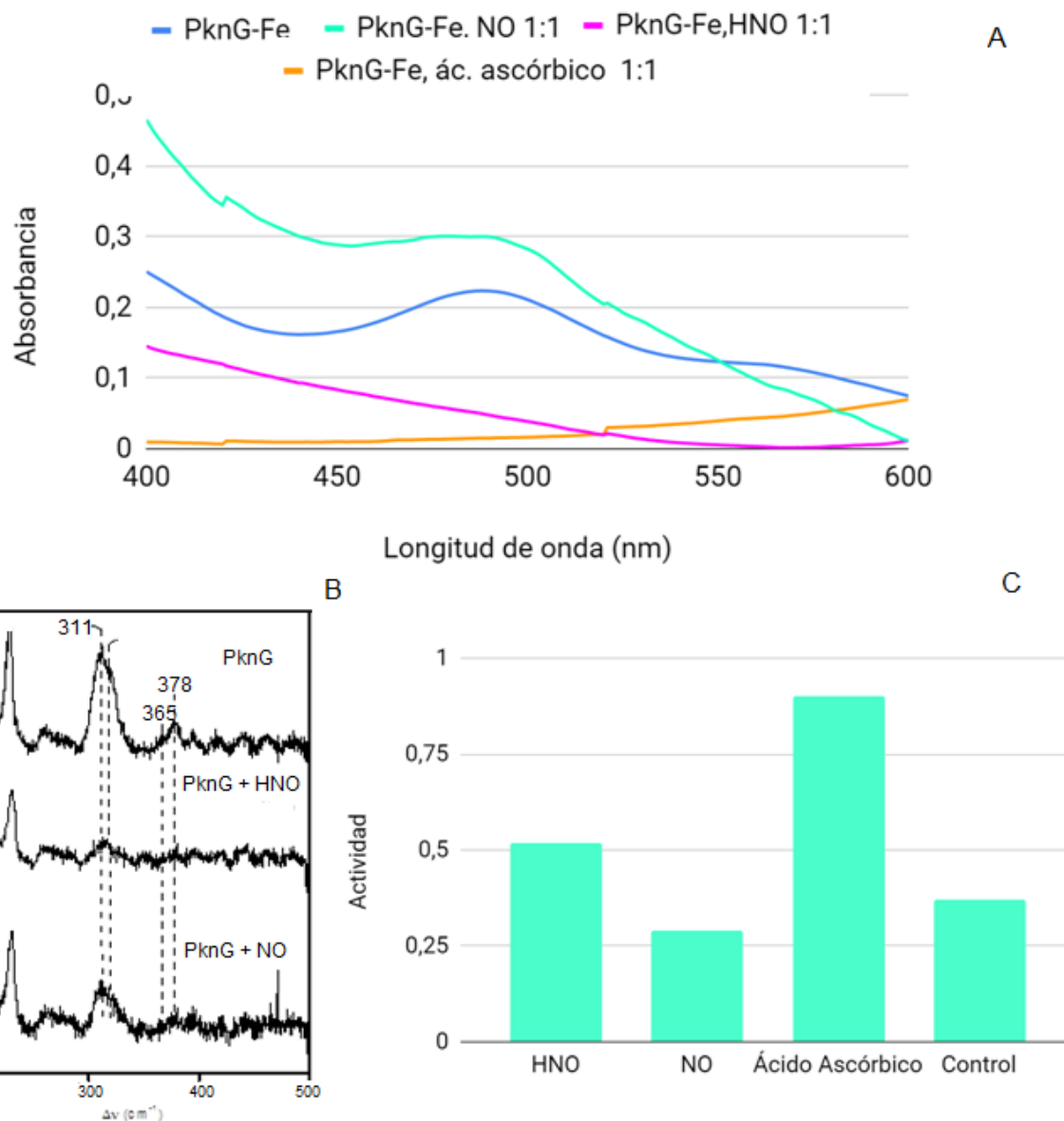


Figura 5.1. A. Espectros UV-VIS de PknG-Fe (curva celeste) y de PknG-Fe pre incubada con ácido ascórbico (1:1), (curva naranja), con HNO (1:50) (curva magenta), y NO (1:1) (curva cian). B. Espectros RR PknG-Fe (control) y, con agregado de HNO y NO₂. C. Actividades de PknG-Fe tras la pre incubación con reductores.

En resumen, estos resultados indican que, en las relaciones proteína:reductor utilizados en los ensayos, el HNO es capaz de reducir al hierro del dominio Rbx (lo cual se observa reflejado en los espectros de UV-VIS y RR), lo que se correlaciona con un aumento de la actividad (en coherencia con los resultados presentados en el capítulo anterior), mientras que el NO es incapaz de reducir al hierro en una proporción suficiente como para que pueda apreciarse en los ensayos realizados. Como fue señalado anteriormente, la nitrosilación reductora del hierro catalizada por

el NO, posee una cinética más lenta que la que presenta el HNO (Bari et al. 2003), por lo que los resultados se encuentran dentro de lo esperado.

A continuación, nos preguntamos si modificando las relaciones proteína:NO podríamos ver cambios, tanto en la actividad como en el espectro UV-VIS. Por consiguiente, realizamos nuevos ensayos de actividad y medidas en el UV-VIS. Esta vez, la actividad fue medida mediante ATP radiactivo, el cual es utilizado frecuentemente para medir actividad quinasa, debido a la robustez del método (Inglese et al. 2007; Burkhard et al. 2009; Olsson et al. 2010).

Para validar la técnica, se realizaron ensayos de actividad con distintas concentraciones de ácido ascórbico, así como un ensayo de reducción y oxidación (empleando ácido ascórbico y H₂O₂, respectivamente), similares a los presentados en el capítulo anterior. También se midió el efecto de la preincubación con HNO.

En la figura 5.2 pueden verse los espectros UV-VIS de PknG-Fe; en el panel A podemos apreciar los efectos de dos concentraciones diferentes de HNO (1,5x y 2x, con respecto a la proteína), así como el efecto del NO (6x, con respecto a la proteína). Mientras que el NO no afecta al pico a 480 nm correspondiente al *cluster* Fe(III)-4S (Lode and Coon 1971; Rao et al. 1972), al preincubar con HNO 1,5X el pico desaparece casi totalmente, y al preincubar con HNO 2X resulta indetectable. Por otro lado, en el panel B vemos los efectos de la preincubación con tres concentraciones de ácido ascórbico (0,3x, 0,5x y 1x, con respecto a la proteína), así como el efecto de la reoxidación por H₂O₂ en una de las muestras previamente reducida. Se observa desaparición del pico a 480 nm en las muestras tratadas con 0,5x y 1x de reductor, mientras que las muestras tratadas con 0,3x de ácido ascórbico, o con 0,5x y luego oxidada con H₂O₂ (6X con respecto a la proteína) presentan picos similares, de menor amplitud que el control.

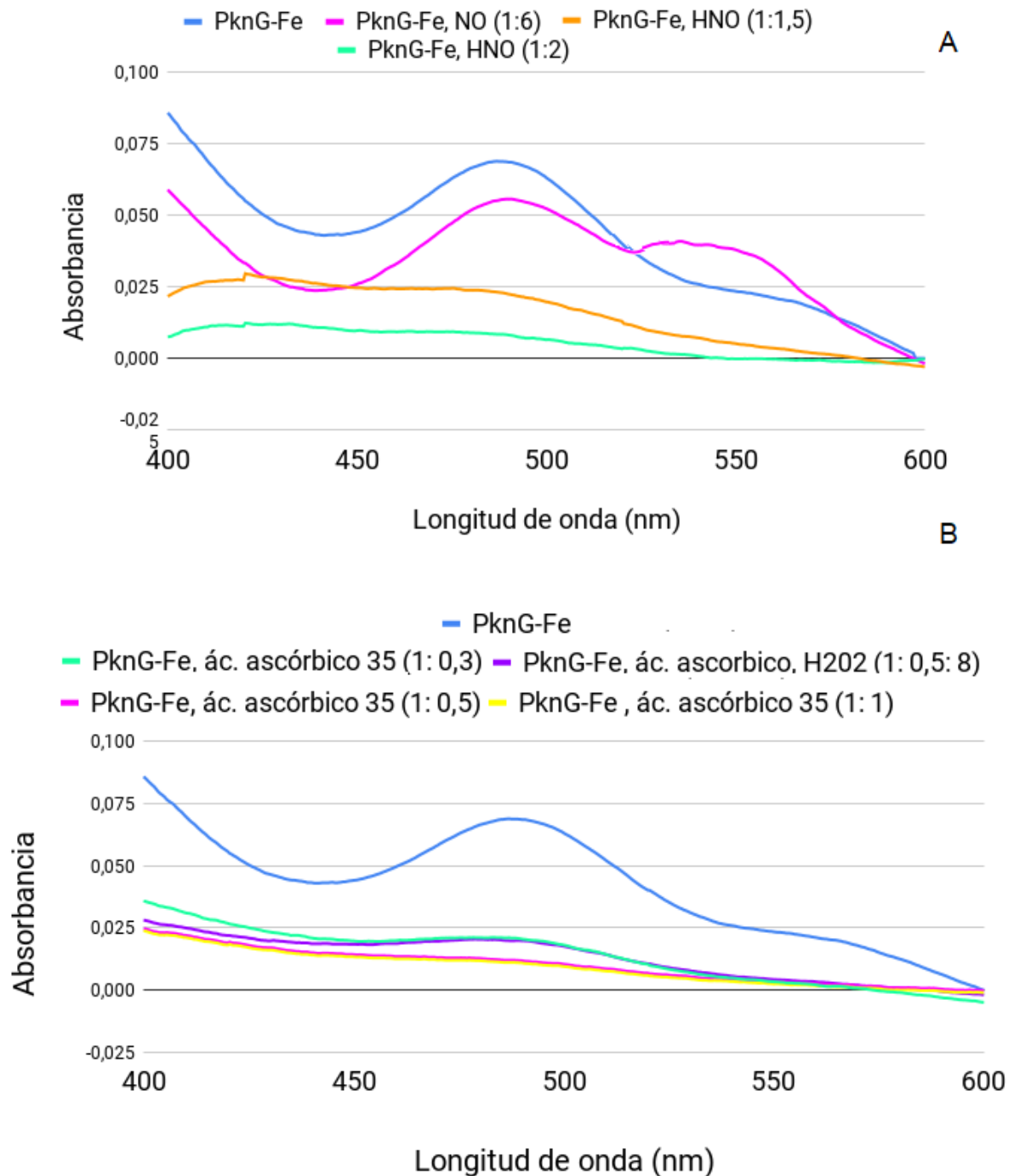


Figura 5.2. Espectros UV-VIS PknG-Fe. A. Efecto del HNO y NO. B. Efecto del ácido ascórbico y del H₂O₂.

En la Figura 5.3 pueden verse los datos correspondientes a la actividad medida con ATP radiactivo. A modo ilustrativo, en el panel A se muestra un gel representativo; en los paneles B y C se encuentra graficada la actividad quinasa de PknG (sobre GarA y sobre sí misma) en forma cuantitativa. La cuantificación de la

intensidad de bandas se realizó utilizando el programa ImageJ, y los resultados fueron relativizados al control (proteína sin tratamiento).

Con respecto a la proteína pre tratada con ácido ascórbico, se observa un incremento de la actividad quinasa a medida que aumenta la concentración del reductor. Por otro lado, al igual que lo observado en el capítulo anterior al utilizar el Kinase Glo, se observa una disminución de la actividad al tratar a la quinasa previamente reducida con un agente oxidante (H_2O_2).

En concordancia con lo registrado en la sección previa, se observa que la preincubación con HNO aumenta la actividad quinasa. Por otro lado, al pre incubar a la quinasa con una concentración mayor de NO se observa también un aumento de actividad. Cabe destacar que en este último caso, pese a haber pre incubado con una concentración 5 veces superior a la utilizada en el caso de HNO, la actividad registrada fue menor, lo que es concordante con la cinética de reducción más lenta nombrada anteriormente (Bari et al. 2003).

Es importante destacar que la actividad quinasa muestra la misma tendencia ante los diferentes pre tratamientos tanto en los eventos de fosforilación de GarA como en los de autofosforilación (Figura 5.3, paneles B y C).

Finalmente, todas las medidas de actividad realizadas con ATP radiactivo, fueron medidas también con el kit Kinase Glo, obteniéndose resultados similares (Figura 5.4).

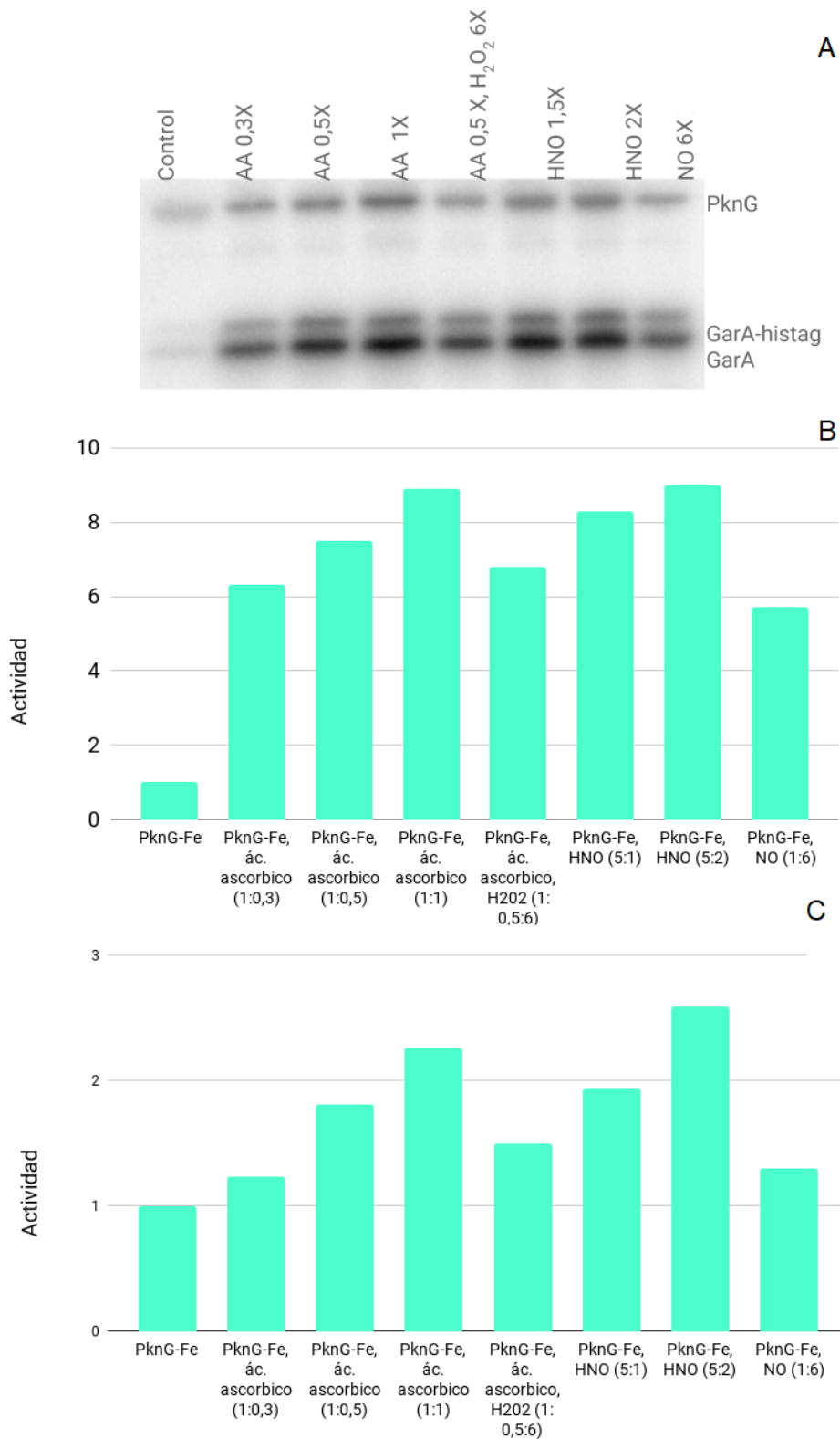


Figura 5.3. .Actividades de PknG-Fe tras la preincubación con reductores. A, Gel ilustrativo. B. Actividad quinasa sobre GarA. C. Autofosforilación,

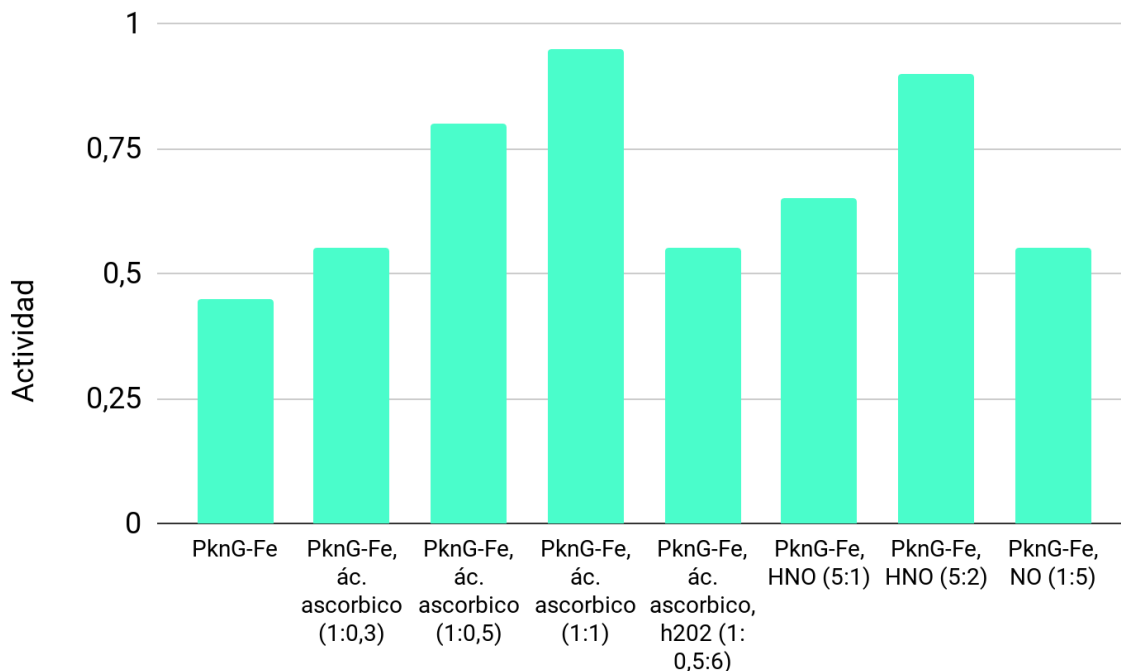


Figura 5.4. .Actividades de PknG-Fe tras la preincubación con reductores utilizando GarA como sustrato medida con Kinase-Glo.

5.3. Conclusiones

Para sobrevivir a las condiciones hostiles que enfrentan durante el estado de latencia, las bacterias reajustan sus circuitos reguladores y el metabolismo redox, especialmente el ciclo TCA (Eoh and Rhee 2013).

La importancia de PknG para la virulencia de *Mtb.* ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios (Cowley et al. 2004; Walburger et al. 2004; Wolff et al. 2015). En particular, Khan et al. (Khan et al. 2017) han demostrado la relevancia de esta quinasa, así como la de GarA, en condiciones de similares a las de latencia, sugiriendo que la capacidad del bacilo para soportar el estrés oxidativo se ve comprometida en ausencia de PknG, evento que ha sido señalado también por otros autores (Wolff et al. 2015). Estos estudios resaltan la importancia fisiológica de la capacidad de PknG para sensor el estado redox en el que se haya inmersa.

En este escenario, los inhibidores de PknG representan una estrategia prometedora para el desarrollo de fármacos, con unos pocos inhibidores de PknG

de actividad moderada descritos hasta el momento (Székely et al. 2008; Scherr et al. 2007; Anand et al. 2012). Éstos inhibidores poseen como blanco el sitio catalítico de la quinasa. Por ejemplo, AX20017, basado en características estructurales del sitio activo de PknG, muestra cierto grado de especificidad hacia dicha quinasa (Scherr et al. 2007). Dado que el sitio activo de las quinasas se encuentra altamente conservado, incluso entre reinos diferentes (Ortiz-Lombardía, Pompeo, and Boitel 2003), su inhibición específica no es sencilla. Una estrategia alternativa para la inhibición selectiva de quinasas es apuntar a otros dominios (diferentes al KD) de la proteína, como el dominio Rbx en el caso de PknG. En particular, hasta el momento no se han reportado otras quinasas con un dominio Rbx, más allá de las relacionadas a PknG (Narayan et al. 2007). Como hemos mencionado anteriormente en las estructuras disponibles de PknG en el PDB (Scherr et al. 2007; Lisa et al. 2015) se observa que el dominio Rbx se encuentra en estrecha relación con el la región N-terminal del dominio quinasa (Figura 3.7), sugiriendo que modificaciones en el dominio Rbx podrían afectar la actividad quinasa. Tanto en este capítulo de la tesis, como en el anterior, se demuestra una relación directa entre la actividad quinasa de PknG y el estado de oxidación del cluster Fe-4S del dominio Rbx, por lo que este podría representar un blanco farmacológico interesante. Específicamente, hemos demostrado mediante la combinación de diferentes técnicas como espectroscopia UV-VIS, Raman Resonante, y medidas de actividad (para las que se usaron tanto ensayos de luminiscencia como ATP radiactivo) que la actividad quinasa de PknG es dependiente del estado redox en el cual se encuentra inmersa, siendo más activa en ambientes reductores, y presentando menor actividad en ambientes oxidantes. Estos resultados se observan tanto con GarA como sustrato como en eventos de autofosforilación (Figura 5.3).

En el capítulo anterior hemos demostrado que podemos manipular a PknG, oxidando y reduciendo el *cluster* Fe-4S, y hemos observado el grado de oxidación de dicho *cluster* correlaciona directamente con su actividad. En este capítulo, nos preguntamos si es posible modificar la actividad con reductores más suaves, de relevancia fisiológica (NO, HNO) (Schnappinger et al. 2003; Miao and King 2016). Hemos observado que tanto el HNO como el NO resultaron ser efectivos para reducir el hierro del dominio Rbx de PknG y regular positivamente la actividad

quinasa, mientras que el H_2O_2 por su parte puede oxidar al hierro de dicho dominio, y reducir la actividad quinasa.

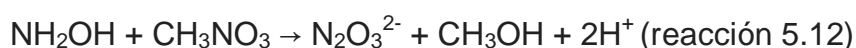
5.4. Materiales y métodos.

5.4.1. Síntesis de NO

El óxido nítrico (NO) gaseoso fue generado por el agregado de 5 ml de agua desgasada sobre una mezcla sólida de FeSO₄ (8,5 g), NaNO₂ (8,5 gr) y NaBr (4 gr). El NO producido fue pasado por una columna de granallas de KOH para remover otros óxidos de nitrógeno, principalmente NO₂.

5.4.2. Síntesis de de sal de Angeli

La síntesis de este dador de HNO se realiza nitrando hidroxilamina según la siguiente reacción:



5.4.2.1. Síntesis de hidroxilamina Nitrato de metilo

Fue necesario preparar ambos reactivos, la hidroxilamina (2 gr, 0,03 moles) debe ser liberada del clorhidrato con metóxido de sodio (CH₃ONa, 4,5 gr, 0,09 moles) el mismo día, mientras que el metóxido fue preparado a partir de metanol y Na^o.



(reacción 5.13)

Por último, el CH₃NO₂ (30 ml, 0.5 moles) se preparó nitrando metanol:

A. HNO₃/H₂SO₄ (c) 1:1

B. MeOH/H₂SO₄ (c) 3:1

5.4.2.2 Procedimiento experimental

Se coloca en una ampolla de decantación 240 ml de la mezcla A (120 ml de HNO₃ y 120 ml de H₂SO₄). Se agrega gota a gota sobre 80 ml de la mezcla B (60 ml de MeOH y 20 ml de H₂SO₄) en baño de hielo (la temperatura no debe superar los 40°C). Luego de agitar durante 15 minutos se forman 2 fases. Se traspasa a otra ampolla y se elimina la fase inferior. Luego se lava con una solución de NaCl, otra

de NaOH y por último con agua destilada. Se seca con CaCl_2 y se filtra. El control de la temperatura es para evitar la formación de NO_2 .

La hidroxilamina libre (1,2 g, 0,035 moles), en 10 ml de metanol, se agrega gota a gota sobre una solución de nitrato de metilo (2,2 ml, 0,035 moles) en 10 ml de metanol bajo atmósfera de nitrógeno. Se realiza a baja temperatura para favorecer la precipitación de la Sal de Angeli. Se obtuvieron 4,06 gr (0,031 moles) del compuesto. El espectro UV-Vis (Figura 5.5) obtenido coincide con lo descrito en literatura, y la pureza de la misma se calcula con el ϵ informado ((Hughes and Cammack 1999):

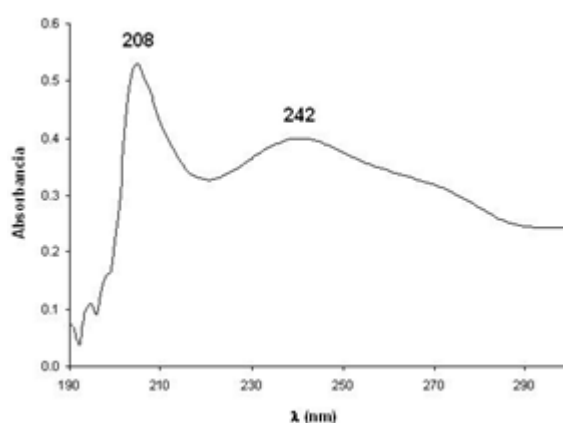


Figura 5.5. Espectro UV de la Sal de Angeli sintetizada

5.4.3. Ensayos de actividad quinasa, Kinase Glo

Los ensayos fueron realizados como se indica en la sección 4.5.

5.4.4. Ensayos espectrometría Raman Resonante

Los ensayos fueron realizados como se indica en la sección 4.5.

5.4.5. ATP radiactivo

Cada medición de actividad fue realizada por duplicado, en un volumen final de 20 μl , conteniendo 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM MnCl_2 , 2 μM ATP, 25 μM de GarA (según corresponda) como sustrato. La concentración de enzima en los ensayos fue de 0,5 μM . Las reacciones fueron iniciadas mediante la adición de ATP, incubadas 1 hora a 37°C, la actividad quinasa fue medida como se comenta en la

sección 2.2.10.3, y se realizaron en colaboración con el Lic. Burastero, perteneciente al mismo grupo de investigación.

5.6. Bibliografía

- Abdallah, Abdallah M., Nicolaas C. Gey Van Pittius, Patricia A. Digiuseppe Champion, Jeffery Cox, Joen Luirink, Christina Mje Vandenbroucke-Grauls, Ben J. Appelmek, and Wilbert Bitter. 2007. "Type VII Secretion—mycobacteria Show the Way." *Nature Reviews. Microbiology* 5 (11): 883.
- Alber, Tom. 2009. "Signaling Mechanisms of the Mycobacterium Tuberculosis Receptor Ser/Thr Protein Kinases." *Current Opinion in Structural Biology* 19 (6): 650–57.
- Anand, Namrata, Priyanka Singh, Anindra Sharma, Sameer Tiwari, Vandana Singh, Diwakar K. Singh, Kishore K. Srivastava, B. N. Singh, and Rama Pati Tripathi. 2012. "Synthesis and Evaluation of Small Libraries of Triazolymethoxy Chalcones, Flavanones and 2-Aminopyrimidines as Inhibitors of Mycobacterial FAS-II and PknG." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (17): 5150–63.
- Armstrong, J. A., and P. D. Hart. 1971. "Response of Cultured Macrophages to Mycobacterium Tuberculosis, with Observations on Fusion of Lysosomes with Phagosomes." *The Journal of Experimental Medicine* 134 (3 Pt 1): 713–40.
- Augustyniak, Aleksandra, Janusz Skolimowski, and Alina Błaszczuk. 2013. "Cytotoxicity of Nitroxyl (HNO/NO-) against Normal and Cancer Human Cells." *Chemico-Biological Interactions* 206 (2): 262–71.
- Av-Gay, Y., and M. Everett. 2000. "The Eukaryotic-like Ser/Thr Protein Kinases of Mycobacterium Tuberculosis." *Trends in Microbiology* 8 (5): 238–44.
- Bari, Sara E., Marcelo A. Martí, Valentín T. Amorebieta, Darío A. Estrin, and Fabio Doctorovich. 2003. "Fast Nitroxyl Trapping by Ferric Porphyrins." *Journal of the American Chemical Society* 125 (50): 15272–73.
- Bartesaghi, Silvina, Daniel Herrera, Débora M. Martinez, Ariel Petruk, Verónica Demicheli, Madia Trujillo, Marcelo A. Martí, Darío A. Estrín, and Rafael Radi. 2017. "Tyrosine Oxidation and Nitration in Transmembrane Peptides Is Connected to Lipid Peroxidation." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 622 (May): 9–25.
- Bartesaghi, Silvina, and Rafael Radi. 2018. "Fundamentals on the Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration." *Redox Biology* 14 (April): 618–25.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, and B. A. Freeman. 1990. "Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (4): 1620–24.
- Benjamin, N., F. O'Driscoll, H. Dougall, C. Duncan, L. Smith, M. Golden, and H. McKenzie. 1994. "Stomach NO Synthesis." *Nature* 368 (6471): 502.
- Benov, L. 2001. "How Superoxide Radical Damages the Cell." *Protoplasma* 217 (1-3): 33–36.
- Bhattacharyya, Nabanita, Irene Nailain Nkumama, Zaccheus Newland-Smith, Li-Ying Lin, Wen Yin, Rebecca E. Cullen, Jack S. Griffiths, et al. 2018. "An Aspartate-Specific Solute-Binding Protein Regulates Protein Kinase G Activity To Control Glutamate Metabolism in Mycobacteria." *mBio* 9 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00931-18>.
- Burkhard, Kimberly, Sarice Smith, Rahul Deshmukh, Alexander D. MacKerell Jr, and Paul Shapiro. 2009. "Development of Extracellular Signal-Regulated

- Kinase Inhibitors." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9 (8): 678–89.
- Chaurasiya, Shivendra K., and Kishore K. Srivastava. 2008. "Differential Regulation of Protein Kinase C Isoforms of Macrophages by Pathogenic and Non-Pathogenic Mycobacteria." *Molecular and Cellular Biochemistry* 318 (1-2): 167–74.
- . 2009. "Downregulation of Protein Kinase C-Alpha Enhances Intracellular Survival of Mycobacteria: Role of PknG." *BMC Microbiology* 9 (December): 271.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, et al. 1998. "Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence." *Nature* 393 (6685): 537–44.
- Cooper, C. E. 1999. "Nitric Oxide and Iron Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 (2-3): 290–309.
- Cossu, Andrea, Leonardo Antonio Sechi, Ennio Bandino, Stefania Zanetti, and Valentina Rosu. 2013. "Expression Profiling of Mycobacterium Tuberculosis H37Rv and Mycobacterium Smegmatis in Acid-Nitrosative Multi-Stress Displays Defined Regulatory Networks." *Microbial Pathogenesis* 65 (December): 89–96.
- Cowley, Siobhan, Mary Ko, Neora Pick, Rayken Chow, Katrina J. Downing, Bhavna G. Gordhan, Joanna C. Betts, et al. 2004. "The Mycobacterium Tuberculosis Protein Serine/threonine Kinase PknG Is Linked to Cellular Glutamate/glutamine Levels and Is Important for Growth in Vivo." *Molecular Microbiology* 52 (6): 1691–1702.
- Demaster, E. G., H. T. Nagasawa, and F. N. Shirota. 1983. "Metabolic Activation of Cyanamide to an Inhibitor of Aldehyde Dehydrogenase in Vitro." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 18 Suppl 1: 273–77.
- DeMaster, Eugene C., Frances N. Shirota, and Herbert T. Nagasawa. 1984. "The Metabolic Activation of Cyanamide to an Inhibitor of Aldehyde Dehydrogenase Is Catalyzed by Catalase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122 (1): 358–65.
- DeMaster, Eugene G., Beth Redfern, and Herbert T. Nagasawa. 1998. "Mechanisms of Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase by Nitroxyl, the Active Metabolite of the Alcohol Deterrent Agent Cyanamide." *Biochemical Pharmacology* 55 (12): 2007–15.
- DeMaster, Eugene G., Frances N. Shirota, and Herbert T. Nagasawa. 1985. "Catalase Mediated Conversion of Cyanamide to an Inhibitor of Aldehyde Dehydrogenase." *Alcohol* 2 (1): 117–21.
- Elsevier. n.d. "The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO) - 1st Edition." Accessed January 29, 2019. <https://www.elsevier.com/books/the-chemistry-and-biology-of-nitroxyl-hno/doctorovich/978-0-12-800934-5>.
- Eoh, Hyungjin, and Kyu Y. Rhee. 2013. "Multifunctional Essentiality of Succinate Metabolism in Adaptation to Hypoxia in Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (16): 6554–59.
- E. Shoman, Mai, and Omar M. Aly. 2016. "Nitroxyl (HNO): A Possible Strategy for Fighting Cancer." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 16 (22): 2464–70.
- Ferrari, Carlos K. B., Paula C. S. Souto, Eduardo L. França, and Adenilda C. Honorio-França. 2011. "Oxidative and Nitrosative Stress on Phagocytes' Function: From Effective Defense to Immunity Evasion Mechanisms."

- Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59 (6): 441–48.
- Ferrer-Sueta, Gerardo, Nicolás Campolo, Madia Trujillo, Silvina Bartesaghi, Sebastián Carballal, Natalia Romero, Beatriz Alvarez, and Rafael Radi. 2018. "Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration." *Chemical Reviews* 118 (3): 1338–1408.
- Fukuto, Jon M., Christopher H. Switzer, Katrina M. Miranda, and David A. Wink. 2005. "Nitroxyl (HNO): Chemistry, Biochemistry, and Pharmacology." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 335–55.
- Gryglewski, R. J., R. M. Palmer, and S. Moncada. 1986. "Superoxide Anion Is Involved in the Breakdown of Endothelium-Derived Vascular Relaxing Factor." *Nature* 320 (6061): 454–56.
- Gusarov, Ivan, and Evgeny Nudler. 2005. "NO-Mediated Cytoprotection: Instant Adaptation to Oxidative Stress in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (39): 13855–60.
- Haas, A., and W. Goebel. 1992. "Microbial Strategies to Prevent Oxygen-Dependent Killing by Phagocytes." *Free Radical Research Communications* 16 (3): 137–57.
- Halfpenny, E., and P. L. Robinson. 1952. "169. The Nitration and Hydroxylation of Aromatic Compounds by Pernitrous Acid." *Journal of the Chemical Society* 0 (0): 939–46.
- Halliwell, B. 1978. "Superoxide-Dependent Formation of Hydroxyl Radicals in the Presence of Iron Chelates: Is It a Mechanism for Hydroxyl Radical Production in Biochemical Systems?" *FEBS Letters* 92 (2): 321–26.
- Halliwell, Barry. 2006. "Phagocyte-Derived Reactive Species: Salvation or Suicide?" *Trends in Biochemical Sciences* 31 (9): 509–15.
- Hamer, Mariana, Sebastian A. Suarez, Nicolás I. Neuman, Lucía Alvarez, Martina Muñoz, Marcelo A. Marti, and Fabio Doctorovich. 2015. "Discussing Endogenous NO(•)/HNO Interconversion Aided by Phenolic Drugs and Vitamins." *Inorganic Chemistry* 54 (19): 9342–50.
- Hasset, D. J., and M. S. Cohen. 1989. "Bacterial Adaptation to Oxidative Stress: Implications for Pathogenesis and Interaction with Phagocytic Cells." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3 (14): 2574–82.
- Holm, Å., K. Tejle, T. Gunnarsson, K-E Magnusson, A. Descoteaux, and B. Rasmusson. 2003. "Role of Protein Kinase C α for Uptake of Unopsonized Prey and Phagosomal Maturation in Macrophages." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302 (4): 653–58.
- Huges, Martin N., and Peter E. Wimbeldon. 1976. "The Chemistry of Trioxodinitrates. Part I. Decomposition of Sodium Trioxodinitrate (Angeli's Salt) in Aqueous Solution." *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. <https://doi.org/10.1039/dt9760000703>.
- Hughes, Martin N., and Richard Cammack. 1999. "[30] Synthesis, Chemistry, and Applications of Nitroxyl Ion Releasers Sodium Trioxodinitrate or Angeli's Salt and Piloty's Acid." In *Methods in Enzymology*, 301:279–87. Academic Press.
- Ignarro, L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga, K. S. Wood, and G. Chaudhuri. 1988. "Pharmacological Evidence That Endothelium-Derived Relaxing Factor Is Nitric Oxide: Use of Pyrogallol and Superoxide Dismutase to Study Endothelium-Dependent and Nitric Oxide-Elicited Vascular Smooth Muscle Relaxation." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*

- 244 (1): 181–89.
- Imlay, J. A., S. M. Chin, and S. Linn. 1988. "Toxic DNA Damage by Hydrogen Peroxide through the Fenton Reaction in Vivo and in Vitro." *Science* 240 (4852): 640–42.
- Inglese, James, Ronald L. Johnson, Anton Simeonov, Menghang Xia, Wei Zheng, Christopher P. Austin, and Douglas S. Auld. 2007. "High-Throughput Screening Assays for the Identification of Chemical Probes." *Nature Chemical Biology* 3 (8): 466–79.
- Jackett, P. S., V. R. Aber, and D. B. Lowrie. 1978. "Virulence and Resistance to Superoxide, Low pH and Hydrogen Peroxide among Strains of Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of General Microbiology* 104 (1): 37–45.
- Khan, Mehak Zahoor, Ashima Bhaskar, Sandeep Upadhyay, Pooja Kumari, Raju S. Rajmani, Preeti Jain, Amit Singh, Dhiraj Kumar, Neel Sarovar Bhavesh, and Vinay Kumar Nandicoori. 2017. "Protein Kinase G Confers Survival Advantage to Mycobacterium Tuberculosis during Latency-like Conditions." *The Journal of Biological Chemistry* 292 (39): 16093–108.
- Kovacevic, Z., S. Sahni, H. Lok, M. J. Davies, D. A. Wink, and D. R. Richardson. 2017. "Regulation and Control of Nitric Oxide (NO) in Macrophages: Protecting the 'professional Killer Cell' from Its Own Cytotoxic Arsenal via MRP1 and GSTP1." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861 (5, Part A): 995–99.
- Kumar, Hemant, and Dong-Kug Choi. 2015. "Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway?" *Mediators of Inflammation* 2015 (September): 584758.
- Kumar, Murugaeson R., Jon M. Fukuto, Katrina M. Miranda, and Patrick J. Farmer. 2010. "Reactions of HNO with Heme Proteins: New Routes to HNO-Heme Complexes and Insight into Physiological Effects." *Inorganic Chemistry* 49 (14): 6283–92.
- Lisa, María-Natalia, Magdalena Gil, Gwénaëlle André-Leroux, Nathalie Barilone, Rosario Durán, Ricardo M. Biondi, and Pedro M. Alzari. 2015. "Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from Mycobacterium Tuberculosis." *Structure* 23 (6): 1039–48.
- Lode, E. T., and M. J. Coon. 1971. "Enzymatic ω -Oxidation V. Forms of Pseudomonas Oleovorans Rubredoxin Containing One or Two Iron Atoms: Structure and Function in ω -Hydroxylation." *The Journal of Biological Chemistry*. <http://www.jbc.org/content/246/3/791.short>.
- MacMicking, John D., Gregory A. Taylor, and John D. McKinney. 2003. "Immune Control of Tuberculosis by IFN-Gamma-Inducible LRG-47." *Science* 302 (5645): 654–59.
- MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan. 1997. "Nitric Oxide and Macrophage Function." *Annual Review of Immunology* 15: 323–50.
- Mahoney, Lee R. 1970. "Evidence for the Formation of Hydroxyl Radicals in the Isomerization of Pernitrous Acid to Nitric Acid in Aqueous Solution." *Journal of the American Chemical Society* 92 (17): 5262–63.
- Mapolelo, Daphne T., Bo Zhang, Sunil G. Naik, Boi Hanh Huynh, and Michael K. Johnson. 2012. "Spectroscopic and Functional Characterization of Iron-Bound Forms of Azotobacter Vinelandii (Nif)IscA." *Biochemistry* 51 (41): 8056–70.
- McCord, Joe M., and Eugene D. Day. 1978. "Superoxide-Dependent Production

- of Hydroxyl Radical Catalyzed by Iron-EDTA Complex." *FEBS Letters* 86 (1): 139–42.
- McKnight, G. M., L. M. Smith, R. S. Drummond, C. W. Duncan, M. Golden, and N. Benjamin. 1997. "Chemical Synthesis of Nitric Oxide in the Stomach from Dietary Nitrate in Humans." *Gut* 40 (2): 211–14.
- Miao, Zhengrui, and S. Bruce King. 2016. "Recent Advances in the Chemical Biology of Nitroxyl (HNO) Detection and Generation." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society* 57 (July): 1–14.
- Miller, R. A., and B. E. Britigan. 1997. "Role of Oxidants in Microbial Pathophysiology." *Clinical Microbiology Reviews* 10 (1): 1–18.
- Miller, Thomas W., Melisa M. Cherney, Andrea J. Lee, Nestor E. Francoleon, Patrick J. Farmer, S. Bruce King, Adrian J. Hobbs, Katrina M. Miranda, Judith N. Burstyn, and Jon M. Fukuto. 2009. "The Effects of Nitroxyl (HNO) on Soluble Guanylate Cyclase Activity: Interactions at Ferrous Heme and Cysteine Thiols." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (33): 21788–96.
- Moncada, S., and A. Higgs. 1993. "The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway." *The New England Journal of Medicine* 329 (27): 2002–12.
- Narayan, Azeet, Preeti Sachdeva, Kirti Sharma, Adesh K. Saini, Anil K. Tyagi, and Yogendra Singh. 2007. "Serine Threonine Protein Kinases of Mycobacterial Genus: Phylogeny to Function." *Physiological Genomics* 29 (1): 66–75.
- Nauseef, William M. 2014. "Detection of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Production by Cellular NADPH Oxidases." *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2): 757–67.
- O'Hare, Helen M., Rosario Durán, Carlos Cerveñansky, Marco Bellinzoni, Anne Marie Wehenkel, Otto Pritsch, Gonzalo Obal, et al. 2008. "Regulation of Glutamate Metabolism by Protein Kinases in Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 70 (6): 1408–23.
- Ojha, Anil K., Anthony D. Baughn, Dhinakaran Sambandan, Tsungda Hsu, Xavier Trivelli, Yann Guerardel, Anuradha Alahari, Laurent Kremer, William R. Jacobs Jr, and Graham F. Hatfull. 2008. "Growth of Mycobacterium Tuberculosis Biofilms Containing Free Mycolic Acids and Harboring Drug-Tolerant Bacteria." *Molecular Microbiology* 69 (1): 164–74.
- Olsson, Henric, Peter Sjö, Oguz Ersoy, Anna Kristoffersson, Joakim Larsson, and Bo Nordén. 2010. "4-Anilino-6-Phenyl-Quinoline Inhibitors of Mitogen Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 (MK2)." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (16): 4738–40.
- Ortiz-Lombardía, M., F. Pompeo, and B. Boitel. 2003. "Crystal Structure of the Catalytic Domain of the PknB Serine/threonine Kinase from Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Biological Chemistry*.
<http://www.jbc.org/content/278/15/13094.short>.
- Pant, Jitendra, Marcus J. Goudie, Sarah M. Chaji, Benjamin W. Johnson, and Hitesh Handa. 2018. "Nitric Oxide Releasing Vascular Catheters for Eradicating Bacterial Infection." *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 106 (8): 2849–57.
- Paroha, Ruchi, Rashmi Chourasia, Rajesh Mondal, and Shivendra K. Chaurasiya. 2018. "PknG Supports Mycobacterial Adaptation in Acidic Environment." *Molecular and Cellular Biochemistry* 443 (1-2): 69–80.
- Radi, Rafael. 2018. "Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Medicine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (12): 6111–16.

- Sciences of the United States of America* 115 (23): 5839–48.
- Radi, Rafael, Joseph S. Beckman, Kenneth M. Bush, and Bruce A. Freeman. 1991. "Peroxynitrite-Induced Membrane Lipid Peroxidation: The Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288 (2): 481–87.
- Rao, K. K., M. C. Evans, R. Cammack, D. O. Hall, C. L. Thompson, P. J. Jackson, and C. E. Johnson. 1972. "Mössbauer Effect in Rubredoxin. Determination of the Hyperfine Field of the Iron in a Simple Iron-Sulphur Protein." *Biochemical Journal* 129 (5): 1063–70.
- Reisz, Julie A., Erika Bechtold, and S. Bruce King. 2010. "Oxidative Heme Protein-Mediated Nitroxyl (HNO) Generation." *Dalton Transactions* 39 (22): 5203–12.
- Riddell, D. R., A. Graham, and J. S. Owen. 1997. "Apolipoprotein E Inhibits Platelet Aggregation through the L-Arginine:nitric Oxide Pathway. Implications for Vascular Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1): 89–95.
- Rieck, Barbara, Giulia Degiacomi, Michael Zimmermann, Alessandro Cascioferro, Francesca Boldrin, Natalie R. Lazar-Adler, Andrew R. Bottrill, et al. 2017. "PknG Senses Amino Acid Availability to Control Metabolism and Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *PLoS Pathogens* 13 (5): e1006399.
- Rockett, K. A., M. M. Awburn, W. B. Cowden, and I. A. Clark. 1991. "Killing of Plasmodium Falciparum in Vitro by Nitric Oxide Derivatives." *Infection and Immunity* 59 (9): 3280–83.
- Rubanyi, G. M., and P. M. Vanhoutte. 1986. "Superoxide Anions and Hyperoxia Inactivate Endothelium-Derived Relaxing Factor." *The American Journal of Physiology* 250 (5 Pt 2): H822–27.
- Russell, D. G., S. Sturgill-Koszycki, T. Vanheyningen, H. Collins, and U. E. Schaible. 1997. "Why Intracellular Parasitism Need Not Be a Degrading Experience for Mycobacterium." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 352 (1359): 1303–10.
- Schaible, U. E., S. Sturgill-Koszycki, P. H. Schlesinger, and D. G. Russell. 1998. "Cytokine Activation Leads to Acidification and Increases Maturation of Mycobacterium Avium-Containing Phagosomes in Murine Macrophages." *Journal of Immunology* 160 (3): 1290–96.
- Scherr, Nicole, Srinivas Honnappa, Gabriele Kunz, Philipp Mueller, Rajesh Jayachandran, Fritz Winkler, Jean Pieters, and Michel O. Steinmetz. 2007. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12151–56.
- Schnappinger, Dirk, Sabine Ehrt, Martin I. Voskuil, Yang Liu, Joseph A. Mangan, Irene M. Monahan, Gregory Dolganov, et al. 2003. "Transcriptional Adaptation of Mycobacterium Tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment." *The Journal of Experimental Medicine* 198 (5): 693–704.
- Shi, Yelu, and Yong Zhang. 2018. "Mechanisms of HNO Reactions with Ferric Heme Proteins." *Angewandte Chemie* 57 (51): 16654–58.
- St-Denis, A., V. Caouras, F. Gervais, and A. Descoteaux. 1999. "Role of Protein Kinase C-Alpha in the Control of Infection by Intracellular Pathogens in Macrophages." *Journal of Immunology* 163 (10): 5505–11.
- Stuehr, D. J., and C. F. Nathan. 1989. "Nitric Oxide. A Macrophage Product

- Responsible for Cytostasis and Respiratory Inhibition in Tumor Target Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 169 (5): 1543–55.
- Suarez, Sebastian A., Martina Muñoz, Lucia Alvarez, Mateus F. Venâncio, Willian R. Rocha, Damian E. Bikiel, Marcelo A. Marti, and Fabio Doctorovich. 2017. “HNO Is Produced by the Reaction of NO with Thiols.” *Journal of the American Chemical Society* 139 (41): 14483–87.
- Suarez, Sebastián A., Nicolás I. Neuman, Martina Muñoz, Lucía Álvarez, Damián E. Bikiel, Carlos D. Brondino, Ivana Ivanović-Burmazović, et al. 2015. “Nitric Oxide Is Reduced to HNO by Proton-Coupled Nucleophilic Attack by Ascorbate, Tyrosine, and Other Alcohols. A New Route to HNO in Biological Media?” *Journal of the American Chemical Society* 137 (14): 4720–27.
- Székely, Rita, Frigyes Wácsek, István Szabadkai, Gábor Németh, Bálint Hegymegi-Barakonyi, Dániel Eros, Bálint Szokol, et al. 2008. “A Novel Drug Discovery Concept for Tuberculosis: Inhibition of Bacterial and Host Cell Signalling.” *Immunology Letters* 116 (2): 225–31.
- Tews, Ivo, Felix Findeisen, Irmgard Sinning, Anita Schultz, Joachim E. Schultz, and Jürgen U. Linder. 2005. “The Structure of a pH-Sensing Mycobacterial Adenylyl Cyclase Holoenzyme.” *Science* 308 (5724): 1020–23.
- Ventura, Marcello, Barbara Rieck, Francesca Boldrin, Giulia Degiacomi, Marco Bellinzoni, Nathalie Barilone, Faisal Alzaidi, Pedro M. Alzari, Riccardo Manganelli, and Helen M. O’Hare. 2013. “GarA Is an Essential Regulator of Metabolism in Mycobacterium Tuberculosis.” *Molecular Microbiology* 90 (2): 356–66.
- Vepřek-Šiška, J., F. Šmirous, and V. Pliška. 1959. “Anorganische Stickstoffverbindungen IV. Über Den Reduktionsmechanismus von Nitriten in Alkalischen Lösungen.” *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 24 (8): 2501–5.
- Via, L. E., R. A. Fratti, M. McFalone, E. Pagan-Ramos, D. Deretic, and V. Deretic. 1998. “Effects of Cytokines on Mycobacterial Phagosome Maturation.” *Journal of Cell Science* 111 (Pt 7) (April): 897–905.
- Walburger, Anne, Anil Koul, Giorgio Ferrari, Liem Nguyen, Cristina Prescianotto-Baschong, Kris Huygen, Bert Klebl, Charles Thompson, Gerald Bacher, and Jean Pieters. 2004. “Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival within Macrophages.” *Science* 304 (5678): 1800–1804.
- Webb, B. L., S. J. Hirst, and M. A. Giembycz. 2000. “Protein Kinase C Isoenzymes: A Review of Their Structure, Regulation and Role in Regulating Airways Smooth Muscle Tone and Mitogenesis.” *British Journal of Pharmacology* 130 (7): 1433–52.
- Wehenkel, Annemarie, Marco Bellinzoni, Martin Graña, Rosario Duran, Andrea Villarino, Pablo Fernandez, Gwénaëlle Andre-Leroux, et al. 2008. “Mycobacterial Ser/Thr Protein Kinases and Phosphatases: Physiological Roles and Therapeutic Potential.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (1): 193–202.
- Weiss, Bernard. 2006. “Evidence for Mutagenesis by Nitric Oxide during Nitrate Metabolism in Escherichia Coli.” *Journal of Bacteriology* 188 (3): 829–33.
- Wolff, Kerstin A., Hoa T. Nguyen, Richard H. Cartabuke, Ajay Singh, Sam Ogwang, and Liem Nguyen. 2009. “Protein Kinase G Is Required for Intrinsic Antibiotic Resistance in Mycobacteria.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8): 3515–19.
- Wolff, Kerstin A., Andres H. de la Peña, Hoa T. Nguyen, Thanh H. Pham, L.

- Mario Amzel, Sandra B. Gabelli, and Liem Nguyen. 2015. "A Redox Regulatory System Critical for Mycobacterial Survival in Macrophages and Biofilm Development." *PLoS Pathogens* 11 (4): e1004839.
- Woude, Aneek D. van der, Esther J. M. Stoop, Michael Stieess, Sen Wang, Roy Ummels, Gunny van Stempvoort, Sander R. Piersma, et al. 2014. "Analysis of SecA2-Dependent Substrates in Mycobacterium Marinum Identifies Protein Kinase G (PknG) as a Virulence Effector." *Cellular Microbiology* 16 (2): 280–95.
- Ximenes, Valdecir F., Marília P. P. Kanegae, Sandra R. Rissato, and Mário S. Galhiane. 2007. "The Oxidation of Apocynin Catalyzed by Myeloperoxidase: Proposal for NADPH Oxidase Inhibition." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 457 (2): 134–41.
- Zheleznyak, A., and E. J. Brown. 1992. "Immunoglobulin-Mediated Phagocytosis by Human Monocytes Requires Protein Kinase C Activation. Evidence for Protein Kinase C Translocation to Phagosomes." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (17): 12042–48.
- Zhu, H., C. A. Hart, D. Sales, and N. B. Roberts. 2006. "Bacterial Killing in Gastric Juice--Effect of pH and Pepsin on Escherichia Coli and Helicobacter Pylori." *Journal of Medical Microbiology* 55 (Pt 9): 1265–70.

Capítulo 6

6. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

6.1. Conclusiones generales

En el presente trabajo de tesis se estudiaron los mecanismos de regulación (activación/inhibición) de la actividad quinasa de la serin treonin quinasa G (PknG) de *Mycobacterium tuberculosis*. Para ello, se utilizaron técnicas de modelado y simulación computacionales, así como técnicas biofísicas (espectrometría de masa, de absorción atómica, UV-VIS y Raman resonante) y medidas de actividad quinasa.

Como mencionamos anteriormente, GarA es un regulador del metabolismo, cuya actividad a su vez está regulada mayoritariamente por PknG (O'Hare et al. 2008; Nott et al. 2009; Ventura et al. 2013; Rieck et al. 2017; Khan et al. 2017; Bhattacharyya et al. 2018). GarA influye en la distribución del α -cetoglutarato entre el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y la síntesis del glutamato (Ventura et al. 2013). En condiciones de estrés, cuando el bacilo se encuentra en la fase estacionaria/latencia dentro del macrofago, y la actividad de PknG es baja, GarA sin fosforilar activa la síntesis de glutamato e inhibe al ciclo de los TCA; mientras que cuando PknG es estimulada, por ejemplo por abundancia de nutrientes, se revierte la inhibición sobre el ciclo de los TCA y se promueve el catabolismo del glutamato (Figura 1.10) (Ventura et al. 2013; Rieck et al. 2017; Bhattacharyya et al. 2018). En otras palabras, durante la fase estacionaria PknG se encontraría mayoritariamente inactiva, mientras que en la fase de crecimiento, la quinasa se encontraría mayoritariamente activa.

En el Capítulo 3, exploramos a nivel atómico mediante dinámica molecular la especificidad de PknG por la Thr 21 de GarA. Para ello, utilizamos como punto de comparación otra quinasa de *Mtb.*, PknB, capaz de fosforilar a GarA en la Thr 22. Ambos eventos, son excluyentes (O'Hare et al. 2008). Observamos que *los aminoácidos en la vecindad del sitio P que contribuyen a la unión de GarA a PknB o PknG son diferentes, así como la naturaleza de las interacciones que establecen.* Según nuestro modelo, el anclaje a PknG requiere de la presencia de dos residuos hidrofóbicos en las posiciones P+3 y P+4, los cuales interactúan con un bolsillo

hidrofóbico de la quinasa, lo que posiciona a la Thr 21 en el sitio reactivo (Figuras 3.11 y 3.12); mientras que la principal contribución a la interacción GarA-PknB viene dada por el puente salino establecido por la Arg 26 de GarA con una de las treoninas fosforiladas del *loop* de activación de PknB, lo que posiciona a la Thr 22 en el sitio reactivo (Figuras 3.5 y 3.6). Asimismo, exploramos la actividad de PknG sobre un péptido derivado de GarA con las treoninas fosforilables (14SDEVTVETTSVFRADFL30), así como la actividad sobre un péptido mutante en el cual los residuos hidrofóbicos correspondientes a las posiciones P+3 y P+4 se habían mutados por alaninas (14SDEVTVETTTSAARADFL30). Por un lado, esperábamos que la actividad sobre el péptido mutante sea menor que la observada en el *wild type*, y por el otro, esperábamos que PknG sea capaz de fosforilar tanto el residuo 21 como el 22 en el mutante. Mediante ensayos de actividad quinasa, confirmamos nuestra primer hipótesis (Figura 3.21). En cuanto a la segunda, los ensayos de espectrometría en masa permitieron identificar inequívocamente a la Thr 21 en ambos péptidos. Para el péptido mutante, se observaron además indicios de que otro residuo, distinto a la Thr 21, podría estar fosforilándose. Sin embargo la señal obtenida fue demasiado débil como para poder identificarlo. Estos resultados indican que, efectivamente, los residuos Val 24 y Phe 25 de GarA son importantes para el reconocimiento por PknG, y que regulan en parte la especificidad, y entonces otras interacciones no exploradas en esta tesis estarían contribuyendo también a la especificidad. Otra pregunta pendiente a resolver, es el rol biológico de la fosforilación en cada residuo y el hecho de que son excluyentes en estas quinasas.

En los siguientes dos capítulos, exploramos la relación entre la actividad de PknG y su entorno redox, sensado por el dominio rubredoxina (Rbx) . Hasta la fecha las publicaciones vinculadas a este aspecto ofrecen resultados contradictorios (Scherr et al. 2007; Tiwari et al. 2009; Gil et al. 2013; Lisa et al. 2015; Wittwer et al. 2016). Empero, *nuestros resultados son indicadores robustos que la actividad de la proteína aumenta en un ambiente reductor, mientras que desciende en un ambiente oxidante*. Los resultados observados son consistentes tanto cuando se utiliza un reductor fuerte, como ácido ascórbico, como otros más suaves, como NO y HNO. Hemos visto, además, que los eventos de reducción y oxidación, con su consecuente aumento/disminución de la actividad quinasa son, dentro de cierto

marco, reversibles. Basados en los resultados obtenidos, hemos propuesto un modelo que vincula el grado de oxidación del dominio Rbx con su actividad (Figura 4.12). En dicho modelo, se propone una oxidación secuencial reversible, con un último paso irreversible que implica la pérdida del átomo del hierro. En este último paso la actividad se pierde completamente y no puede recuperarse, incluso ante el agregado de grandes cantidades de reductor.

El entorno fagosómico se sugiere nitrosativo, oxidativo, bajo en tensión de oxígeno y limitado en nutrientes (Schnappinger et al. 2003). Tras la fagocitosis por parte de las células huésped, *Mycobacterium tuberculosis* experimenta cambios ambientales drásticos y, por lo tanto, tiene que reacomodar su metabolismo para asegurar su supervivencia. El catabolismo del glutamato plantea el desafío de mantener el equilibrio entre el metabolismo del carbono y el del del nitrógeno, particularmente dadas las estrategias del huésped para privar a las bacterias intracelulares de aminoácidos (Zhang et al. 2013). El glutamato es el principal donante para las transaminaciones, por lo que su concentración intracelular debe ser finamente regulada. En este contexto, el control ejercido por PknG-GarA para una utilización balanceada de los nutrientes disponibles, resulta crucial para la supervivencia (Rieck et al. 2017). Así, bajo condiciones oxidantes como las que enfrenta el bacilo dentro de los macrófagos, y según lo expuesto en esta tesis, PknG se encontraría inactiva. Por lo tanto, GarA inhibiría al ciclo de los TCA, preservando la concentración de glutamato intracelular.

6.2. Perspectivas

Como en todo trabajo científico, cuando se responden algunas preguntas se abren nuevos interrogantes. En nuestro caso, en lo que respecta al modelo de especificidad de reconocimiento de GarA por PknG y PknB, sería interesante probar la actividad quinasa de PknB sobre los péptidos derivados de GarA utilizados en esta tesis y comparar los resultados con los obtenidos para PknG.

En cuanto a los ensayos de oxidación-reducción, posibles pasos a seguir serían, en primera instancia, realizar ensayos que permitan esclarecer los resultados obtenidos en cuanto a la cuantificación de tioles (sección 4.2.6). Acorde al modelo propuesto, se espera que ante la exposición de un agente quelante las 4 cisteínas que conforman el dominio Rbx liberen al hierro. Como se señaló, los resultados no

permiten distinguir si la liberación del Fe no está ocurriendo debido a la alta estabilidad del grupo Rbx, o si en simultáneo se están formando puentes disulfuro entre las cisteínas cercanas. Un ensayo posible para develar esta incógnita, sería exponer a la proteína en simultáneo a un agente desnaturizante, como urea, y a iodoacetamida, un agente alquilante que reacciona con las cisteínas (Begum et al. 2016; Speziale and Detwiler 1990), y luego analizar por espectrometría de masa. Otro ensayo que podría arrojar luz sobre este asunto sería realizar análisis de espectrometría atómica y colorimetría (tal cual como se realizó en la sección 4.2.1 y 4.2.3) sobre PknG-Fe recién purificada, y tras 15 días de la purificación (para lo que sería necesario previamente pasar por una columna de desalado remover del medio al hierro que podría haberse desprendido). Si nuestro modelo es correcto, tras estos ensayos, en el segundo caso se esperaría una menor proporción proteína:hierro, y todo el hierro unido a la proteína debería estar oxidado. Para distinguir entre Fe(II) y Fe(III), también podría utilizarse espectroscopía Mössbauer, una técnica mucho más sensible (Pandelia et al. 2015). También, una DM de los dominios quinasa y Rbx de PknG, pero carente del metal que coordina a las cisteínas de este último dominio, podría ayudar a comprender mejor qué sucede si se pierde el hierro.

Otro aspecto interesante a evaluar sería repetir los ensayos de actividad de la sección 4.2.4 utilizando un sustrato diferente a GarA *full-length*. Para ello, se podría usar el péptido derivado de GarA con la treonina a fosforilar empleado en el capítulo 3. Este ensayo permitiría distinguir si, efectivamente, PknG es más activa en estado reducido, o si por el contrario, como propone Wittwer (Wittwer et al. 2016) el estado de oxidación del dominio Rbx sólo regula la selectividad por el sustrato, y lo que estamos viendo en este trabajo es simplemente una mayor afinidad por GarA en el estado reducido. De todas formas, vale la pena destacar que en los ensayos de óxido-reducción realizados con ATP radiactivo en el Capítulo 5 la actividad de PknG tanto en eventos de autofosforilación como medida sobre GarA muestra la misma tendencia.

En cuanto al impacto de las ERON sobre la actividad quinasa de PknG, en una primera instancia, se podría probar el efecto de otras ERON (como por ejemplo peroxinitrito y superóxido) sobre la proteína tal cual los ensayos realizados en esta tesis. También, sería interesante realizar un control de estos ensayos, a fin de asegurar que los oxidantes y reductores no estén afectando alguna otra región de la

proteína además del dominio Rbx. Para esto, podría utilizarse tanto PknG-Zn como una construcción de PknG que carece del dominio Rbx.

6.3. Bibliografía

- Begum, Most Champa, Mohammad Saiful Islam, Monirul Islam, Ruhul Amin, Mohammad Sarwar Parvez, and Ahmad Humayan Kabir. 2016. "Biochemical and Molecular Responses Underlying Differential Arsenic Tolerance in Rice (*Oryza Sativa* L.)." *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale* 104 (July): 266–77
- Bhattacharyya, Nabanita, Irene Nailain Nkumama, Zaccheus Newland-Smith, Li-Ying Lin, Wen Yin, Rebecca E. Cullen, Jack S. Griffiths, et al. 2018. "An Aspartate-Specific Solute-Binding Protein Regulates Protein Kinase G Activity To Control Glutamate Metabolism in Mycobacteria." *mBio* 9 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00931-18>.
- Gil, Magdalena, Martín Graña, Francisco J. Schopfer, Tristan Wagner, Ana Denicola, Bruce A. Freeman, Pedro M. Alzari, Carlos Batthyány, and Rosario Durán. 2013. "Inhibition of Mycobacterium Tuberculosis PknG by Non-Catalytic Rubredoxin Domain Specific Modification: Reaction of an Electrophilic Nitro-Fatty Acid with the Fe-S Center." *Free Radical Biology & Medicine* 65 (December): 150–61.
- Khan, Mehak Zahoor, Ashima Bhaskar, Sandeep Upadhyay, Pooja Kumari, Raju S. Rajmani, Preeti Jain, Amit Singh, Dhiraj Kumar, Neel Sarovar Bhavesh, and Vinay Kumar Nandicoori. 2017. "Protein Kinase G Confers Survival Advantage to Mycobacterium Tuberculosis during Latency-like Conditions." *The Journal of Biological Chemistry* 292 (39): 16093–108.
- Nott, Timothy J., Geoff Kelly, Lasse Stach, Jiejun Li, Sarah Westcott, Dony Patel, Debbie M. Hunt, et al. 2009. "An Intramolecular Switch Regulates Phosphoindependent FHA Domain Interactions in Mycobacterium Tuberculosis." *Science Signaling* 2 (63): ra12.
- Lisa, María-Natalia, Magdalena Gil, Gwénaëlle André-Leroux, Nathalie Barilone, Rosario Durán, Ricardo M. Biondi, and Pedro M. Alzari. 2015. "Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from Mycobacterium Tuberculosis." *Structure* 23 (6): 1039–48.
- O'Hare, Helen M., Rosario Durán, Carlos Cerveñansky, Marco Bellinzoni, Anne Marie Wehenkel, Otto Pritsch, Gonzalo Obal, et al. 2008. "Regulation of Glutamate Metabolism by Protein Kinases in Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 70 (6): 1408–23.
- Pandelia, Maria-Eirini, Nicholas D. Lanz, Squire J. Booker, and Carsten Krebs. 2015. "Mössbauer Spectroscopy of Fe/S Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1853 (6): 1395–1405.
- Ventura, Marcello, Barbara Rieck, Francesca Boldrin, Giulia Degiacomi, Marco Bellinzoni, Nathalie Barilone, Faisal Alzaidi, Pedro M. Alzari, Riccardo Manganelli, and Helen M. O'Hare. 2013. "GarA Is an Essential Regulator of Metabolism in Mycobacterium Tuberculosis." *Molecular Microbiology* 90 (2): 356–66.
- Rieck, Barbara, Giulia Degiacomi, Michael Zimmermann, Alessandro Cascioferro, Francesca Boldrin, Natalie R. Lazar-Adler, Andrew R. Bottrill, et al. 2017. "PknG Senses Amino Acid Availability to Control Metabolism and Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *PLoS Pathogens* 13 (5): e1006399.
- Scherr, Nicole, Srinivas Honnappa, Gabriele Kunz, Philipp Mueller, Rajesh Jayachandran, Fritz Winkler, Jean Pieters, and Michel O. Steinmetz. 2007. "Structural Basis for the Specific Inhibition of Protein Kinase G, a Virulence Factor of Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12151–56.

- Schnappinger, Dirk, Sabine Ehrt, Martin I. Voskuil, Yang Liu, Joseph A. Mangan, Irene M. Monahan, Gregory Dolganov, et al. 2003. "Transcriptional Adaptation of Mycobacterium Tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment." *The Journal of Experimental Medicine* 198 (5): 693–704.
- Speziale, M. V., and T. C. Detwiler. 1990. "Free Thiols of Platelet Thrombospondin. Evidence for Disulfide Isomerization." *The Journal of Biological Chemistry* 265 (29): 17859–67.
- Tiwari, Divya, Rajnish Kumar Singh, Kasturi Goswami, Sunil Kumar Verma, Balaji Prakash, and Vinay Kumar Nandicoori. 2009. "Key Residues in Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinase G Play a Role in Regulating Kinase Activity and Survival in the Host." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27467–79.
- Wittwer, Matthias, Qi Luo, Ville R. I. Kaila, and Sonja A. Dames. 2016. "Oxidative Unfolding of the Rubredoxin Domain and the Natively Disordered N-Terminal Region Regulate the Catalytic Activity of Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinase G." *The Journal of Biological Chemistry* 291 (53): 27062–72.
- Zhang YJ, Rubin EJ. Feast or famine: the host-pathogen battle over amino acids. *Cellular microbiology*. 2013; 15(7):1079–87. Epub 2013/03/26. <https://doi.org/10.1111/cmi.12140> PMID: 23521858