



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**CREACIÓN DE UNA FOSFOGLICERATO
CINASA CAPAZ DE SINTETIZAR
N⁶-BENCIL-ATP**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
CARLOS ENRIQUE GUERRERO BELTRÁN



Dirige: DR. RUY ENRIQUE PÉREZ MONTFORT

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Creación de una fosfoglicerato cinasa capaz de sintetizar N⁶-bencil-ATP”

Esta tesis se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort en el laboratorio 201- Ote, en el departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Ruy Pérez Montfort

Dra. Rosario Muñoz Clares

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Se reconoce a la Biól. Nallely Cabrera, del departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular por su valiosa asesoría técnica.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto: G27551-M. Durante los estudios de maestría y del desarrollo del presente trabajo se recibió una beca otorgada por el CONACYT.

El jurado de examen de grado estuvo formado por:

PRESIDENTE	Dr. Diego González Halphen
VOCAL	Dr. Wilhelm Hansberg Torres
SECRETARIO	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
SUPLENTE	Dra. Bertha González Pedrajo
SUPLENTE	Dr. Alejandro Zentella Dehesa

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi Amor a:

Mis Papás, Carlos y Eddy.

Mamá: Gracias por hacerme un hombre responsable, alegre, coherente y lleno de vida. Gracias a ti y siguiendo tu ejemplo, he aprendido a ser mejor todos los días de mi vida. Eres la mejor Mamá del mundo...siempre te lo he dicho.

Papá: Gracias por enseñarme a ser un hombre luchador, perseverante, inteligente en lo académico y en la vida diaria y por impulsarme a no rendirme ante las adversidades. Eres el mejor Papá que pueda haber.

Arturo: Te Amo con todo mi corazón Cabezón, siempre fuiste y serás mi ejemplo a seguir, mi modelo y mi máximo. Eres el mejor hermano de todos lo que existen: un hombre bueno, recto y brillante.

Antonio: No tengo palabras para agradecer todo tu Amor, Apoyo y Compañía en los momentos alegres y difíciles. Por estar siempre a mi lado cuando más lo necesitaba y por demostrarme de mil y una formas todo el amor que sientes por mi...Te Amo Antonio, aaaaiiiiiii.

Mi abue Guadalupe: Gracias por ser tan linda, cariñosa y tierna, conmigo y mi familia, por pensar en todos y ayudarnos. Te Quiero Mucho Abue, *You Rock*.

Cecy Castillo: Gracias por todos los consejos que me diste, antes y después estando en México, por ser tan linda y solidaria conmigo y toda la familia. Gracias.

Mirra y Pulga: Mis gatitas consentidas, por permitirme tener una infancia, adolescencia y vida adulta con chispa, diversión y ternura. Descansa Mirrita †.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Ruy Pérez Montfort, gracias por todo el apoyo académico y económico que me brindaste, así como por permitirme realizar en tu laboratorio este proyecto tan bonito, complicado y enriquecedor en mi formación como científico y como persona. Gracias por las pláticas tan amenas y enriquecedoras sobre música y arte. Ruy, de nuevo, muchas gracias.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química**, por permitirme crecer académicamente y vivir muchas experiencias dentro de esta, mi segunda casa.

Dra. Rosario Muñoz y **Dr. Alejandro Zentella**, por haberme asesorado y permitirme aprender de ustedes.

Nallely Cabrera, Gracias por compartir los valiosos e innumerables tips de ciencia, por ser profesional y dedicada en tu trabajo. Sobre todo por ser entregada con todos los alumnos que llegamos a este gran laboratorio.

Leticia Olvera (IBT), por toda la asesoría, interés puro y profesional en mi trabajo. Gracias por ayudarme en uno de los momentos más difíciles y tensos de mi maestría. Gracias por todo.

A todos mis amigos del laboratorio 201-Ote con quienes he compartido todo este tiempo (por orden alfabético):

Alejandro Flores, Gracias por tu ayuda, tu compañía, tu excelente trabajo y todos los detalles para con nosotros. Sin tu labor, nada de lo que nosotros hacemos día a día saldría bien.

Angélica Zamudio, Ash contigo jajaja. Amiga, gracias por todos los momentos de diversión, ñoñés y confianzas en el labo. Me reí muchísimo contigo y me permitiste conocer a la primera biomédico buena onda.

Gloria Hernández, Gracias por ser tan linda, interesada en mis cosas, súper buena amiga y un amor de mujer. Desde que te conocí supe que eras de esas personas sencillas e inteligentes de quién debo aprender. Gracias Glo.

Itzhel García, tantas pláticas vespertinas, consejos, chismes, bromas, lágrimas y carcajadas contigo hicieron de mi estancia en este laboratorio fabulosa. Pero sobre todo, Amiga, gracias por aguantarme aquí a lado tuyo todos los días jajaja.

Marcela Varela, Gracias por enseñarme a ser cuidadoso, metódico, respetuoso y ordenado en mi quehacer científico. Amiga, eso no solo lo he aplicado en la ciencia sino en mi vida diaria. Gracias por ser mi amiga.

Marilú Torres, Gracias por todas tus ocurrencias, la diversión, los gritos y las actualizaciones noticiosas del país y el mundo jajaja. Amiga, eres de las chicas con chispa que motivan a trabajar felizmente y con armonía.

Nallely Cabrera, No tengo manera de agradecerte por todas las interminables y valiosas sugerencias, consejos académico-personales y los momentos tan padres que pasamos juntos en mi estancia en el laboratorio. Amiga, eres la mejor técnico académico y la más inteligente que conozco en Fisiología Celular.

Rosalía Lira, Gracias por enseñarme que a pesar de los momentos difíciles por los que pasemos, personales o académicos, debemos tener una actitud positiva, luchar por alcanzar la meta y no derrotarse ante las adversidades. Gracias Amiga.

Muchas Gracias a: Leticia García y Adelina González, por su excelentísimo trabajo, todas las facilidades, las cartas y solicitudes que me sacaron de muchos apuros. Gracias sobre todo, por los momentos de plática y sana distracción.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Proteínas cinasas	2
2.1.1 Generalidades	2
2.1.2 Características básicas de las proteínas cinasas	3
2.2 Proteínas blanco de las cinasas	3
2.3 Estrategia químico-genética	4
2.3.1 Antecedentes	4
2.4 Fosfoglicerato cinasa	9
2.4.1 Antecedentes	9
2.4.2 Propiedades bioquímicas	10
2.4.3 Propiedades estructurales	11
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivo particular	22
5. Materiales y Métodos	23
5.1 Obtención del gen de la fosfoglicerato cinasa de <i>Thermotoga maritima</i> (<i>TmPGK</i>)	23
5.2 Amplificación del gen mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
5.3 Optimización de las condiciones de la PCR	25
5.4 Clonación en un vector de expresión	26
5.5 Expresión de la <i>TmPGK</i>	28
5.6 Purificación de la <i>TmPGK</i>	29
5.7 Determinación de la actividad	30
5.8 Caracterización de la <i>TmPGK</i>	32
5.9 Mutación puntual de la <i>TmPGK</i> y diseño de oligonucleótidos	32
5.10 Mutagénesis mediante la PCR y optimización de condiciones	33
5.11 Clonación en un vector de expresión	34
5.12 Sobreexpresión y purificación de la mutante <i>TmPGKF223G</i>	34
5.13 Determinación de la actividad y caracterización cinética	34
6. Resultados y discusión	35
6.1 Obtención del gen de la <i>TmPGK</i>	35
6.2 Obtención de la mutante <i>TmPGK F223G</i>	40
6.3 Sobre expresión y purificación de la <i>TmPGK</i> y <i>TmPGKF223G</i>	41
6.4 Purificación de las enzimas silvestre y mutante	42
6.5 Determinación de la actividad específica de la <i>TmPGK</i> y <i>TmPGKF223G</i>	44
6.5.1 Ensayo de defosforilación de ATP	44
6.5.2 Ensayo de síntesis de ATP	48
6.5.3 Ensayo de defosforilación de N ⁶ -bencil-ATP	51
6.5.4 Ensayo de síntesis de N ⁶ -bencil-ATP y caracterización cinética	53
7. Conclusiones	57
8. Perspectivas	58
9. Referencias bibliográficas	59

ABREVIATURAS

3-PGA:	3-fosfoglicerato
ADP:	adenosina difosfato
AMP-PNP:	adenilil-imido difosfato
ATP:	adenosina trifosfato
BCA:	ácido bicinconínico
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
GAP:	gliceraldehído 3-fosfato
GAPDH:	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
IPTG:	isopropil-D-tiogalactopiranosido
KDa:	kilodaltones
K_m :	constante de Michaelis-Menten
LB:	medio Luria-Bertani
NAD ⁺ :	nicotinamida-adenina dinucleótido (oxidado)
NADH:	nicotinamida-adenina dinucleótido (reducido)
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PGK:	fosfoglicerato cinasa
SDS:	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
TIM:	triosafosfato isomerasa
T_m :	temperatura media de desnaturalización
T_m PGK:	fosfoglicerato cinasa de <i>Thermotoga maritima</i>
Tris:	tris-(hidroximetil)-aminometano
U/mg	unidad Internacional: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{prot}}$
V_{max} :	velocidad máxima

1. RESUMEN

La fosfoglicerato cinasa (PGK) es una enzima glicolítica que es esencial en la mayoría de las células para la producción del ATP. Esta enzima transfiere el grupo fosfato, del 1,3-bifosfoglicerato al ADP para formar 3-fosfoglicerato y ATP. La PGK monomérica de *Thermotoga maritima* (*TmPGK*) es una proteína con 399 residuos de aminoácidos que está plegada en dos dominios de aproximadamente el mismo tamaño, unidos entre sí por una hélice. Ambos dominios están involucrados en la unión de los sustratos. El dominio amino terminal une al fosfoglicerato y el dominio carboxilo terminal al nucleótido.

Este proyecto de investigación tuvo como finalidad crear una PGK capaz de sintetizar N⁶-bencil-ATP. Este sustrato se está utilizando para conocer los sustratos fisiológicos de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (mutantes) que son capaces de reconocerlo específicamente como sustrato ortólogo. Considerando los datos de la *TmPGK* y otras cinasas a la fecha, para este trabajo se decidió obtener el gen de la PGK usando oligonucleótidos basados en dos secuencias distintas reportadas para el mismo gen, se amplificó éste y se clonó en un vector de expresión. Asimismo se generó una mutante F223G que permitiera el acomodo del grupo bencilo cerca del sitio de unión al ATP.

Se optimizaron las condiciones de purificación de las proteínas recombinantes y se hizo su caracterización cinética. Las enzimas silvestre y mutante mostraron actividades adecuadas conforme a las reportadas en los ensayos de defosforilación con ATP, más no usando N⁶-bencil-ATP como sustrato. Se observó que la actividad se mantuvo elevada con ATP, pero al usar el análogo del ATP, la mutante no presentó una actividad elevada como se esperaba de la hipótesis. En el ensayo de síntesis de N⁶-bencil-ATP con las enzimas silvestre y mutante, se observó que la enzima mutante presentó ligeramente mejor afinidad por el sustrato análogo que la enzima silvestre.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 PROTEÍNAS CINASAS

2.1.1 Generalidades

La fosforilación reversible de las proteínas se encuentra entre las modificaciones postraduccionales más importantes que ocurren en las células eucariontes y procariontes. Desde las últimas décadas, la fosforilación de las proteínas ha pasado de ser una simple curiosidad durante los estudios del metabolismo glicolítico a ser un mecanismo universal para la adaptación y para el control celular (Hunter, 1995; Graves y Krebs, 1999). Hoy en día es difícil discutir algún proceso bioquímico en las células vivas que no esté directa o indirectamente relacionado con la fosforilación de proteínas. El descubrimiento de que una gran familia de proteínas llamadas proteínas cinasas que cataliza la fosforilación de las proteínas blanco y por lo tanto la regulación de las vías metabólicas, es ahora una piedra angular en el campo de la transducción de señales (Adams, 2001).

Hasta 1990, se habían enlistado 117 distintas secuencias de proteínas cinasas habían sido anexadas a las bases de datos. Setenta y cinco de estas son serín/treonín cinasas y 42 tirosín cinasas. Sesenta y ocho de las secuencias son de especies de vertebrados, 24 de levadura, 18 de *Drosophila*, 2 de nemátodos y 1 de *Aplasia*, *Aspergillus*, *Hydra*, *Phaseolus* y virus S13 (eritoblastosis), respectivamente. Se estima que hay un número mayor a 120 en *Sacharomyces cerevisiae*, más de 500 en el humano y que el 2.1% del genoma de *C. elegans* codifica para proteínas cinasas (Hanks y Quinn, 1991). Estas proteínas, se encuentran en muchos compartimentos celulares, en las membranas, en el citosol, asociadas al citoesqueleto o en el núcleo, y regulan una amplia variedad de procesos incluyendo el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos, la biosíntesis de los neurotransmisores, la transcripción y la replicación del DNA, el movimiento de los organelos, la contracción del músculo liso y la diferenciación celular. Dada esta diversidad,

no es de sorprender que se estime que el genoma de los vertebrados codifique aproximadamente 2000 proteínas cinasas que lleven a cabo estos numerosos procesos bioquímicos (Hunter, 1995).

2.1.2 Características básicas de las proteínas cinasas

Las proteínas cinasas, son una superfamilia de enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato γ del ATP a residuos de serina, treonina, tirosina o histidina de la proteína blanco. Esta superfamilia de proteínas, presenta características conservadas en la secuencia de aminoácidos así como a nivel estructural. La mayoría de las cinasas se clasifican dentro de dos grandes clases de proteínas, con base en su habilidad de fosforilar residuos de serina y treonina o de tirosina. Las proteínas cinasas que fosforilan las serinas y treoninas se llaman serín/treonín cinasas y las que fosforilan tirosina: tirosín cinasas. Además hay una tercera clase de cinasas que fosforilan serina y tirosina (Ben-David *et al.*, 1991).

Estructuralmente, las cinasas presentan tres dominios principales denominados: SH1, SH2 y SH3. El dominio SH1 o dominio catalítico es una región altamente conservada formada por 200-250 residuos de aminoácidos aproximadamente y es responsable de la unión del nucleótido y de la proteína sustrato, así como de la transferencia del grupo fosfato (Adams, 2001). Este dominio presenta una secuencia consenso o motivo Rossmann (Gly-xxx-Gly-xxx-xxx-Gly), en donde los residuos hidrofóbicos se repiten en casi todas las secuencias estudiadas (Hanks y Quinn, 1991). Los dominios SH2 y SH3 están formadas de 140-250 y 55-75 residuos de aminoácidos, respectivamente. Estos dominios permiten el reconocimiento de las proteínas que tienen las secuencias consenso (SH2) y la interacción con la proteína sustrato, así como la localización de la proteína en la célula (SH3) (Yu *et al.*, 1992).

2.2 PROTEÍNAS BLANCO DE CINASAS

Numerosas investigaciones se han enfocado en la descripción de proteínas cinasas nuevas y más interesantes, con el fin de entender y evaluar

las vías de señalización tan complejas de las que forman parte. La asignación del mecanismo de fosforilación en las proteínas sustrato, la determinación de la estructura tridimensional de las cinasas, el desarrollo de algunas drogas que son específicas, el establecimiento de los métodos genéticos y de clonación, entre otras estrategias, ha permitido conocer más a fondo las proteínas cinasas, sin embargo la identificación de los sustratos directos de estas proteínas ha sido sumamente difícil debido al elevado número de cinasas, a la redundancia y solapamiento de la especificidad de los sustratos.

Algunos estudios sobre la expresión de la proteína tirosín cinasa v-Src en los fibroblastos demostraron que esta enzima fosforiló al menos 50 proteínas celulares (Taylor y Shalloway, 1993) e incluso, que el mismo sustrato se fosforila por otras proteínas, en los fibroblastos sin transformar (Kamps y Sefton, 1988). Las técnicas bioquímicas y genéticas más sofisticadas (incluyendo: inmunodetección de proteínas anti-tirosina en fibroblastos transformados, transfección de fibroblastos v-Src mutantes, estudios de Knock-out de genes en células Src, inmunoprecipitaciones anti-v-Src, y el uso de inhibidores específicos de las cinasas) no han permitido la identificación sin ambigüedad de los sustratos directos de v-Src (Brown y Cooper, 1996). Entre otras metodologías empleadas para la identificación de los sustratos, podemos mencionar: el mapeo de péptidos combinados y con bibliotecas de fagos, la modulación de metales divalentes y la tecnología con chips de proteínas. Hasta 1995, la mayoría de los sustratos directos de las cinasas permanecen sin identificar (Hunter, 1995).

2.3 ESTRATEGIA QUÍMICO-GENÉTICA

2.3.1 Antecedentes

Con el fin de determinar los sustratos directos de las cinasas, se han desarrollado varias estrategias que permitirán comprender detalladamente muchas de las vías de señalización celular. La combinación de estrategias químicas y la genética como síntesis química de inhibidores y de análogos de

nucleótidos y la mutagénesis dirigida de cinasas, tiene como objetivo generar compuestos que se unan de manera específica con algunas cinasas mutantes.

Uno de los métodos químico-genético utilizados para determinar los sustratos de las cinasas, es mediante el uso de inhibidores específicos. La estrategia consiste en generar mutaciones silenciosas en el sitio activo de la cinasa que unan pequeñas moléculas que se diseñan para inhibir la cinasa mutantes sin afectar las cinasas silvestres (Bishop *et al.*, 1998). La mutación silenciosa genera un hueco en una región cercana al sitio de unión del ATP, al sustituir un residuo grande por uno pequeño, sin que este cambio afecte su actividad (Fig. 1). El tratamiento con inhibidores no permite a la célula adaptarse a la falta de actividad en la cinasa blanco. Además, las moléculas pequeñas pueden administrarse en distintas concentraciones, permitiendo observar los efectos de una inhibición parcial y total de la cinasa blanco. La inhibición en la actividad de la cinasa no debe interferir en su localización celular ni la unión de la proteína con su blanco (Shokat, 1995).

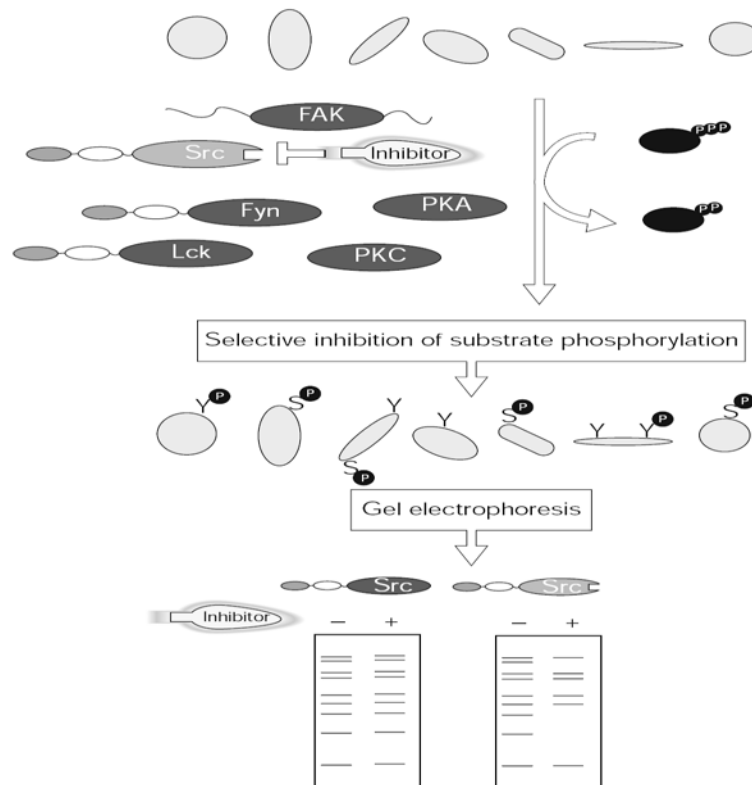


Fig.1 Identificación de sustratos de proteínas cinasas mediante inhibidores (Bishop *et al.*, 1998)

La otra estrategia para identificar los sustratos de las proteínas cinasas utiliza análogos del ATP que puedan ser utilizados eficazmente por las cinasas modificadas. Estas características radican en cambios o alteraciones en la estructura, adición o eliminación de algún sustituyente o cambio de carga en la molécula (Fig. 2). Los análogos pueden funcionar como sustrato, inhibidor o activador ya que con la mutagénesis dirigida en un cinasa en particular se genera una nueva superficie de interacción proteína-ligando específica (Shah *et al.*, 1997).

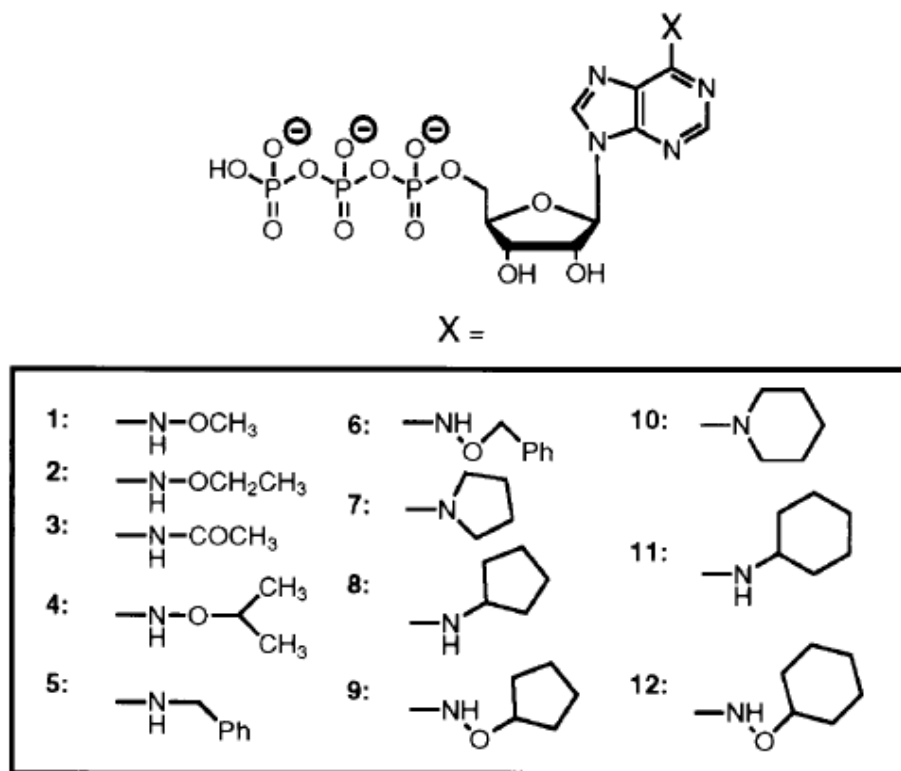


Fig. 2 Estructura química del ATP y sus análogos (Shan *et al.*, 1997).

Para llevar a cabo esta estrategia, varios grupos de investigación establecieron algunos criterios en el diseño de la proteína cinasa para poder diferenciarla de las cinasas silvestres y autentificar la selectividad de los sustratos. Las proteínas modificadas debían (Fig. 3):

1. Aceptar el análogo del ATP, pero éste debía ser un sustrato no reconocido por las proteínas cinasas silvestres.
2. Usar el análogo de ATP con alta eficiencia catalítica.

3. Tener una eficiencia catalítica reducida con sustratos nucleotídicos naturales (ATP), de tal manera que, en la presencia de concentraciones celulares de ATP (1-2 mM) la cinasa mutada usaría preferentemente el análogo del ATP como fosfodonador.
4. Tener la misma especificidad por el sustrato que las cinasas no modificadas (Shan *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998).

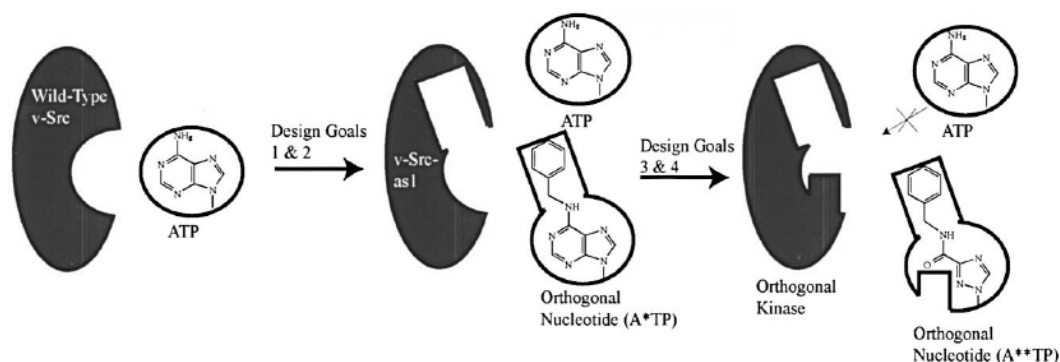


Fig. 3 Especificidad del ATP y sus análogos (Ulrich *et al.*, 2000)

Estas dos estrategias han demostrado ser buenas herramientas para la detección de los sustratos específicos de las cinasas, especialmente la que usa los análogos del ATP. En estudios de afinidad e inhibición, los compuestos N⁶-bencil-ATP, N⁶-2-Feniletilamina-ATP y 3-Metil-N⁶-bencil-ATP fueron los sustratos con mayor afinidad por las proteínas mutantes diseñadas especialmente para reconocerlos (Fig. 4). Una limitante de esta estrategia es que la síntesis química de estos compuestos es compleja, tardada y con bajos rendimientos (Shah *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998, Ulrich *et al.*, 2000), por lo que obtenerlos mediante una reacción enzimática, sería mucho más fácil, rápido y eficiente, y, de esta forma, poder realizar un sin fin de estudios sin la limitante del sustrato.

Con el objetivo de producir los análogos del ATP, se ha pensado en utilizar una enzima que se capaz de sintetizar el ATP y producir con ella, cualquier compuesto nucleotídico. En la glicólisis hay enzimas que producen ATP: la fosfoglicerato cinasa y la piruvato cinasa.

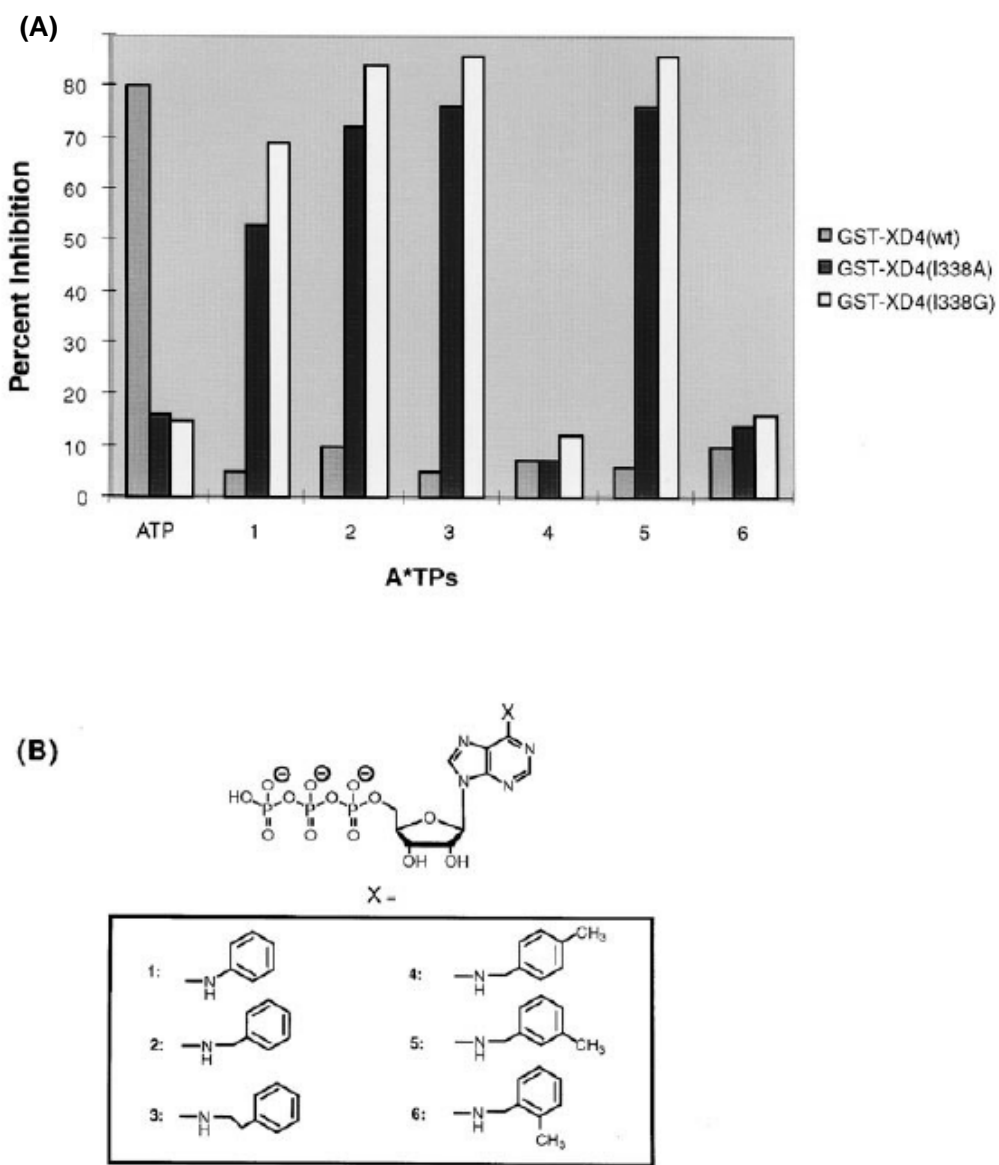


Fig. 4 Evaluación de la eficiencia de unión de 6 análogos del ATP en las proteínas cinasas v-Src: GST-XD4 (silvestre), GST-XD4 (I138A) y GST-XD4 (I138G). (A) Inhibición de la fosforilación del ATP [γ - 32 P] que es dependiente del sustrato peptídico IYGEFKKK por la GST-XD4 (silvestre), GST-XD4 (I138A) y GST-XD4 (I138G) con ATP marcado y los 6 análogos de ATP. (B): Estructura de los análogos de ATP; 1, N⁶- 2-Fenil-ATP; 2, N⁶-bencil-ATP; 3, N⁶-Feniletilamina-ATP; 4, 4-Metil-N⁶-bencil-ATP; 5, 5-Metil-N⁶-bencil-ATP; 6, 6-Metil-N⁶-bencil-ATP (Liu *et al.*, 1998).

Dadas las características de estas enzimas, en este trabajo se decidió trabajar con la fosfoglicerato cinasa, enzima que se describirá detalladamente a continuación.

2.4 FOSFOGLICERATO CINASA

2.4.1 Antecedentes

La fosfoglicerato cinasa es una enzima esencial para el metabolismo básico de varios organismos: glicólisis, interviene en la fermentación y la fijación de carbono. Es una de las dos enzimas requeridas para la formación de ATP en la glicólisis (Fig. 5).

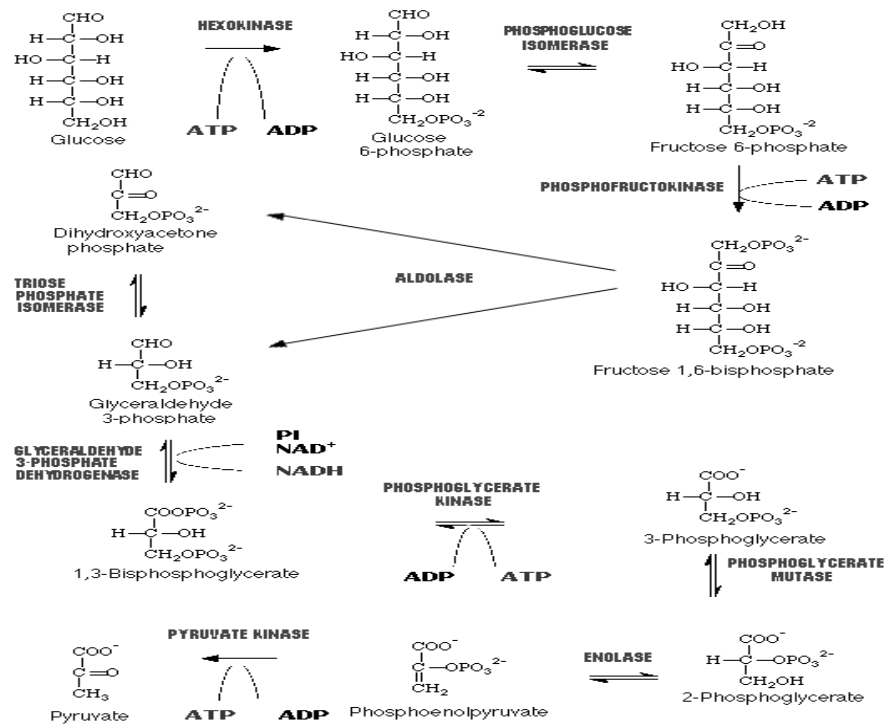


Fig. 5 Esquema de la glicólisis.

El aislamiento del 1, 3-bifosfoglicerato como intermediario en la oxidación de gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato, fue el primer indicio de que dos enzimas estaban involucradas en este punto de la vía glicolítica. Theodor Bücher aisló (Bücher, 1942) y cristalizó (Bücher, 1947) por primera vez la enzima fosfoglicerato cinasa (PGK) de levadura. A la fecha se han cristalizado las PGK de varias fuentes: de caballo (Banks *et al*, 1979), de *Bacillus stearothermophilus* (Davies *et al*, 1994), de cerdo (May *et al*, 1996), de *Thermotoga maritima* (Fleming *et al*, 1996), entre otras.

2.4.2 Propiedades bioquímicas

Mecanismo de reacción

La fosfoglicerato cinasa (ATP: 3-fosfo-D-glicerato-1-fosfotransferasa, EC 2.7.2.3) cataliza la formación del ATP y del 3-fosfoglicerato mediante la transferencia del grupo fosfato γ del 1, 3-bifosfoglicerato al ADP (Fig. 6).

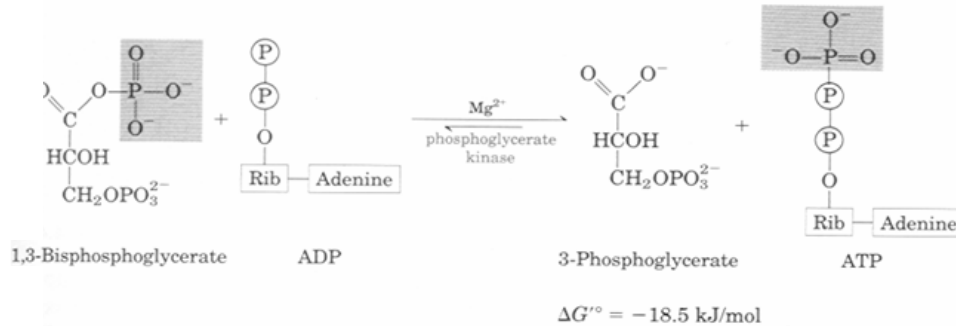


Fig. 6 Transferencia del grupo fosfato del 1, 3-bifosfoglicerato al ADP, formando ATP y 3-fosfoglicerato (Lehninger, 2000).

Cuando la reacción va en la dirección de la formación de ATP, se denomina dirección de reacción “*Forward*” o en sentido derecho. En el equilibrio, la reacción que es esencialmente independiente del pH, favorece la formación del ATP. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, y con los procedimientos usuales del ensayo cinético, la reacción acoplada a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se encuentra más cercana al equilibrio (Fig. 7):

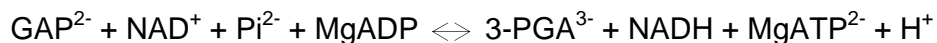


Fig. 7 Ensayo acoplado de la PGK y de la GAPDH. Abreviaturas: GAP, gliceraldehído 3-fosfato; NAD^{+} , nicotinamida-adenina dinucleótido (oxidado); 3-PGA, 3-fosfoglicerato; NADH, Nicotinamida-adenina dinucleótido (reducido).

Cuando la reacción va en sentido de la defosforilación de ATP se denomina reacción “*Reverse*” o en sentido inverso, el equilibrio de los sustratos es menos favorable. La enzima puede llevar a cabo la transferencia de grupos fosfato en ambas reacciones (Fig. 8):

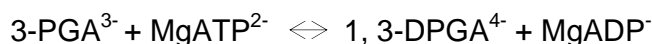


Fig. 8 Reacción reversible de transferencia del grupo fosfato. Abreviaturas: 3-PGA, 3- fosfoglicerato; 1, 3-DPGA, 1, 3-bifosfoglicerato.

Especificidad de los iones metálicos

La PGK requiere iones metálicos para llevar a cabo la reacción, ya que el verdadero sustrato es el complejo Mg^{2+} con ADP o ATP. Estudios cinéticos han mostrado que, como en otras cinasas, el Mn^{2+} puede reemplazar al Mg^{2+} con una K_m aparente del Mn^{2+} ligeramente menor a la del Mg^{2+} lo cual refleja una constante de disociación menor para el MnATP comparado con MgATP . Los complejos CaATP , CoATP , CdATP y NiATP , son sustratos alternativos, aunque este último de manera muy pobre (Larsson-Raznikiewicz, 1970). No se ha mostrado ninguna actividad al utilizar el Zn^{2+} , el Sr^{2+} , el Be^{2+} y el Fe^{2+} .

Especificidad de los nucleótidos

Además del ATP, muchos otros nucleótidos trifosfatados se pueden utilizar en la reacción inversa, pero ninguno de ellos es tan eficiente como el ATP. El orden de reactividad (con 2.5 mM del nucleótido) es: $\text{ATP} > \text{ITP} > \text{GTP} > \text{dATP} > \text{XTP} > \text{CTP} = \text{UTP}$. Cuando se probaron concentraciones de 2 mM del nucleótido con 2.5 mM de MgCl_2 y 6 mM de 3-fosfoglicerato, las velocidades relativas en por ciento (%) fueron: ATP, 100; ITP, 45; GTP, 36; dATP, 27 y XTP, 15. No se observó ninguna reacción con CTP y con UTP. Los nucleótidos difosfatados inhiben la reacción inversa de la misma forma, sólo que el grado de inhibición es en el siguiente orden: $\text{GDP} > \text{ADP} > \text{IDP}$ (Krietsch y Bücher, 1970). Los monofosfatos inhiben de igual forma (Larsson-Raznikiewicz, 1971).

2.4.3 Propiedades estructurales

La PGK, tiene un peso molecular entre 37 y 50 kDa dependiendo del organismo del que proviene (Tabla 1).

Tabla 1. Pesos moleculares reportados para la fosfoglicerato cinasa (Scopes, 1973)

Método de estudio	Músculo (kDa)	Levadura (kDa)	Eritrocito (kDa)
Filtración en gel	38	37	50
	47	47	
	41		
Ultracentrifugación	47	34	50
Análisis de a. a.	45	46	
Contenido de triptofanos	48	46	49
		45	
Electroforesis en gel-SDS	48	50	50

Hasta antes del año de 1995, el análisis de por lo menos 37 distintas secuencias de aminoácidos de PGK indicaban que el tamaño de la “subunidad” por electroforesis en gel (con dodecilsulfato de sodio, SDS) era un monómero de alrededor de 45 kDa. Pero en 1995, dos grupos de investigación (Jones *et al*, 1995., Hess *et al*, 1995) determinaron que las PGK de las especies *Pyrococcus woesei* y *Sulfolobus solfataricus* eran dimérica y tetramérica, respectivamente. Incluso, el grupo de Schurig (Schurig *et al*, 1995) descubrió dos formas distintas de la misma enzima en *T. maritima*, una monomérica de 43 kDa y una tetramérica de 280 kDa, que está fusionada a la triosafosfato isomerasa (TIM).

El análisis de residuos de aminoácidos de las PGK de levadura (Larsson-Raznikiewicz, 1970; Krietsch y Bücher, 1970), de músculo de conejo (Krietsch y Bücher, 1970) y de eritrocito humano (Yoshida y Watanabe, 1972) demostró que son muy similares (Tabla 2). El alineamiento de 22 secuencias de aminoácidos de PGK indicaron que 62 residuos están conservados y que también presenta un gran número de sustituciones conservativas (Watson y Littlechild, 1990) (Fig. 9). Hasta 1997, habían sido publicadas aproximadamente 65 secuencias de aminoácidos de las PGK de distintos organismos.

Tabla 2. Composición de aminoácidos en la fosfoglicerato cinasa (Scopes, 1973)

Aminoácido	Levadura	Levadura	Músculo de conejo	Eritrocito humano
Lisina	44	46	46	40
Histidina	8	9	8	5
Arginina	13	14	12	11
Ácido aspártico	42	41	44	45
Treonina	19	18	17	17
Serina	25	25	24	24
Ácido glutámico	39	38	33	34
Prolina	18	18	18	19
Glicina	39	37	40	41
Alanina	45	43	39	41
Valina	38	38	38	41
Metionina	3	3	13	13
Isoleucina	21	23	18	18
Leucina	41	41	38	40
Tirosina	7	8	4	4
Fenilalanina	18	19	16	15
Cisteina	1	1	8	10
Triptofano	2	2	4	4
Total	423	424	420	422

La PGK monomérica es una molécula bilobular separada en dos dominios de aproximadamente el mismo tamaño unidos por una hélice α . Los dominios corresponden a la división entre las regiones N-terminal y el C-terminal de la molécula con los últimos residuos de la región C-terminal regresando al N-terminal de la proteína. Ambos dominios están involucrados en la unión de los sustratos. El sitio de unión del azúcar se encuentra en la región cargada positivamente del dominio N-terminal, mientras que el sitio de unión del nucleótido se encuentra en la hendidura hidrofóbica del dominio C-terminal (Banks *et al*, 1979) (Fig. 10).

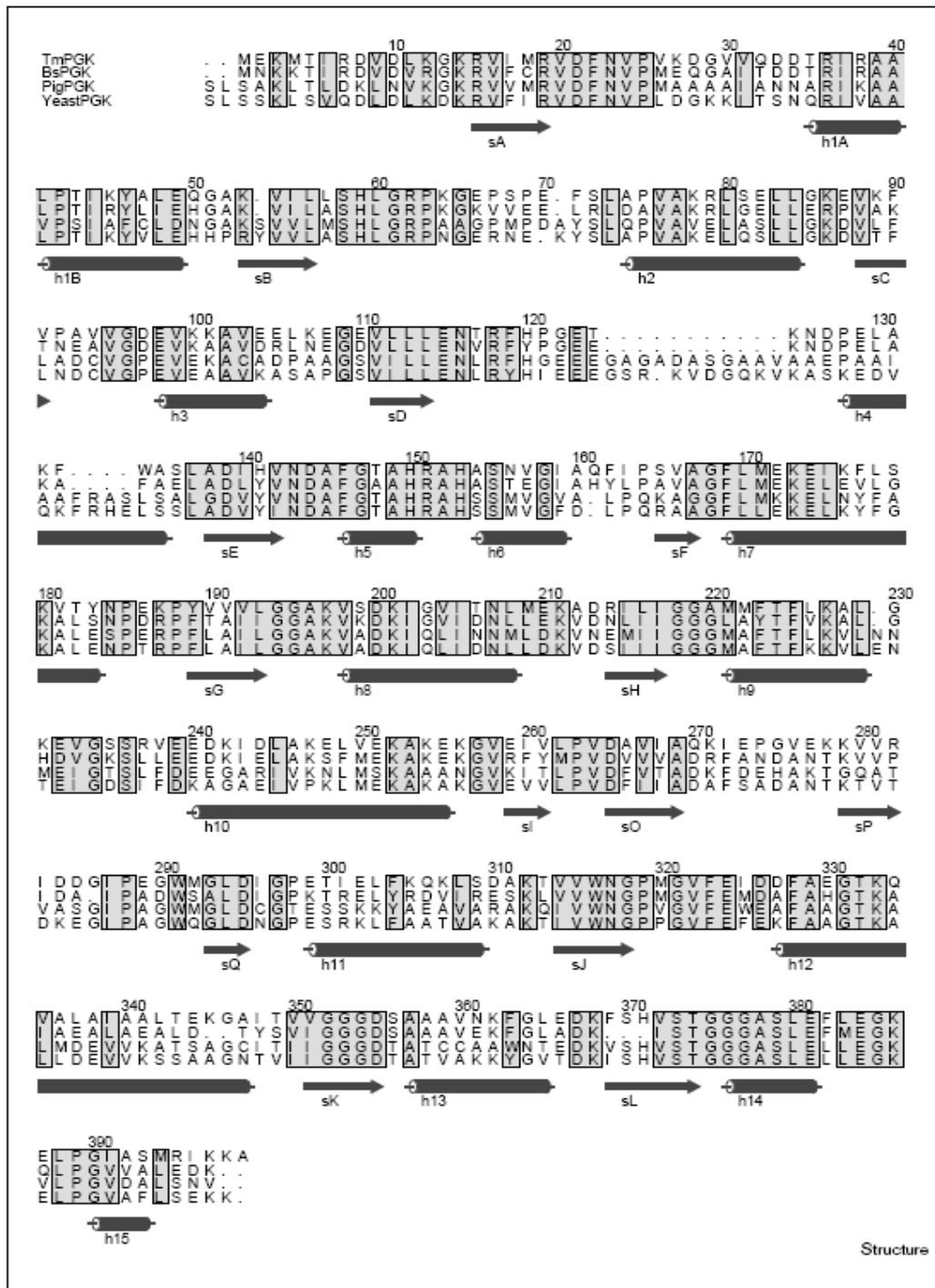


Fig. 9 Alineamiento de secuencias de las PGK de *T. maritima* (TmPGK), *B. stearothermophilus* (BsPGK), Cerdo (PigPGK) y Levadura (YeastPGK). Los aminoácidos conservados están marcados en recuadros grises. La numeración de la secuencia se basa en la secuencia de *TmPGK*. Los elementos de la estructura secundaria se indican con: s (hebras) y h (hélices) (Auerbach, 1997).

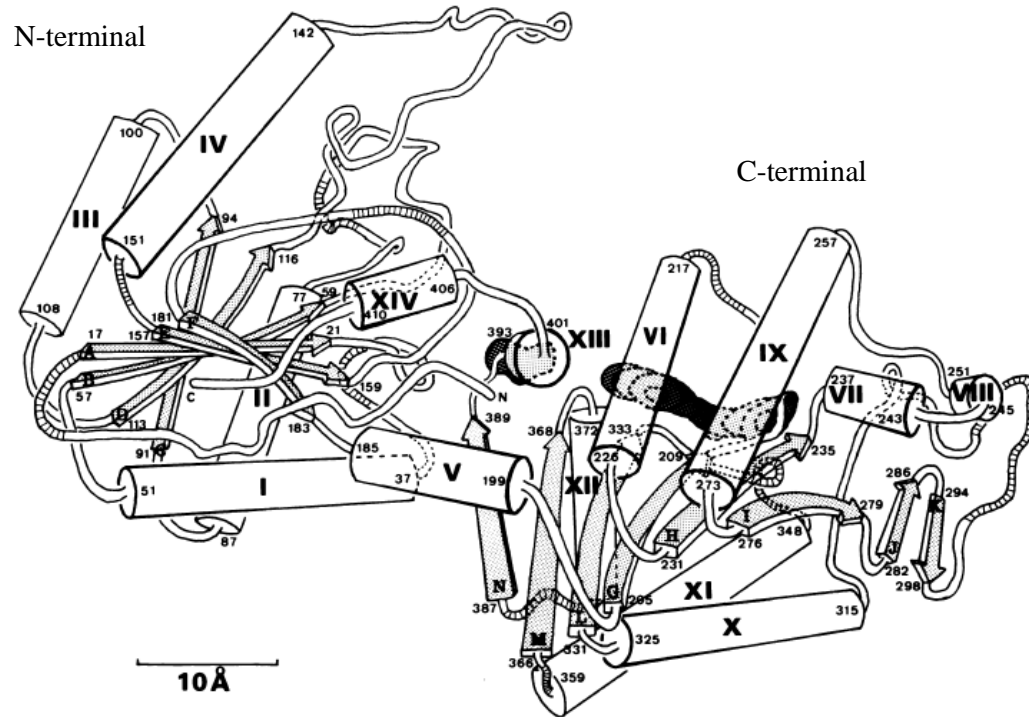


Fig. 10 Dibujo de la estructura en una conformación abierta de la PGK de levadura. Las α hélices se muestran como cilindros y las hebras β como flechas. El sitio de unión del nucleótido se muestra en color negro detrás de las hélices VI y IX (dominio C-terminal), y el sitio de unión del azúcar detrás de la hélice XIII (dominio N-terminal) (Watson, 1982).

La PGK consta de una hoja β central formada por 6 hebras β , rodeadas de hélices α conectadas a las hebras por giros β y secciones de estructura irregular. En términos topológicos, el orden de las hebras β en el dominio C-terminal es CBADEF, mientras que en el dominio N-terminal es CDBAEF, difiriendo solamente en el lugar que ocupa la hebra D. Sin embargo, no hay similitud en la secuencia de ambos dominios, ni en la estructura detallada de la misma. Como en otras enzimas glicolíticas, hay una marcada tendencia a que los elementos de las estructuras secundarias estén organizadas en unidades repetitivas (β - α): en la PGK el motivo (β - α) está repetido 12 veces. En total, la PGK en una molécula con 15 hélices α , 12 hebras β internas y, por lo menos, 5 hebras β superficiales (Banks *et al.*, 1979).

Se ha propuesto a partir de los estudios cristalográficos de las PGK de levadura (Bryant *et al.*, 1974), músculo de caballo (Banks *et al.*, 1979), *T. thermophilus* (Littlechild *et al.*, 1987), *B. stearothermophilus* (Davies *et al.*,

1993) y *T. maritima* (Auerbach *et al.*, 1997) que existen dos conformaciones diferentes, una abierta y una cerrada. Este cambio se lleva a cabo como resultado de un rearrreglo en la región flexible de la bisagra. La evidencia del cambio conformacional se ha confirmado mediante estudios de resonancia magnética nuclear (Tanswell *et al.*, 1976), dispersión de rayos X de bajo ángulo (Pickover *et al.*, 1979) y estudios hidrodinámicos (Roustan *et al.*, 1980) (figura 11).

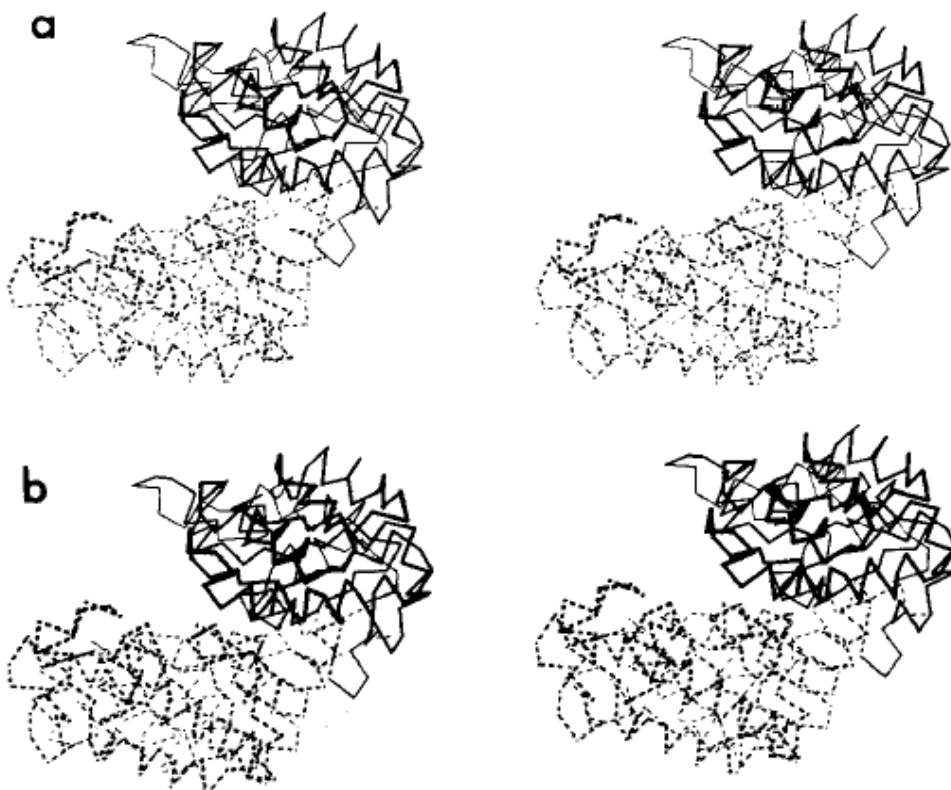


Fig. 11 Dibujo estereográfico de la PGK antes (a) y después (b) de un cambio conformacional (rotación de 8-12°). El dibujo muestra sólo los átomos del carbono β que fueron usados para calcular el radio de giro de las estructuras. Un dominio está representado en líneas continuas, mientras el otro con líneas punteadas. Este último es el que está desplazado en la figura (Pickover, 1979).

La enzima no puede catalizar la transferencia del grupo fosfato al nucleótido en la conformación abierta ya que la distancia entre el nucleótido y el azúcar es de por lo menos 10 Å, por lo que se ha propuesto que en el mecanismo catalítico de esta enzima está involucrado un cambio conformacional, que es activado por la unión de los sustratos y dando como

resultado el cierre de la hendidura del sitio activo con un movimiento tipo bisagra de ambos dominios.

La proximidad de los sitios de unión de los sustratos permite el ataque nucleofílico del átomo del oxígeno del fosfato β del ADP al grupo 1-fosfato del 1,3- bifosfoglicerato. La reacción catalizada involucra una inversión de la configuración en el átomo fosfato γ seguida por un mecanismo de desplazamiento, en el cual el grupo fosfato es transferido directamente vía un estado de transición cargado entre la unión de los sustratos. La carga negativa adicional, que se genera en la reacción S_N2 en el fosfato pentagonal del estado de transición, tiene que ser estabilizada por la enzima.

Este cambio conformacional se lleva a cabo por la formación del complejo binario del fosfoglicerato-PGK, más que por la formación de complejo nucleótido-PGK. Esto concuerda con la estructura del complejo binario, 3-fosfoglicerato (3-PGA) de la PGK porcina (May, 1996) y el complejo binario, ADP de la PGK de *B. stearothermophilus* (*BsPGK*) (McPhillips *et al.*, 1996). La PGK sólo logra adquirir su conformación completamente cerrada luego de la unión de ambos sustratos, como se ha demostrado en los complejos ternarios de las PGK de *T. maritima* (*TmPGK*) (con 3-PGA y AMP-PNP, Adenilil-imido difosfato) (Auerbach *et al.*, 1997) (Fig. 12) y *Trypanosoma brucei* (*TbPGK*) (con 3-PGA y ADP).

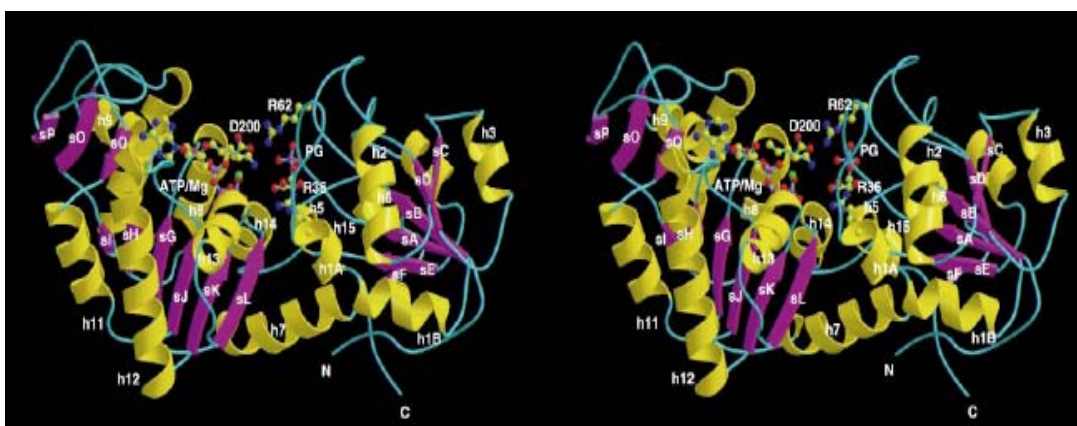


Fig. 12 Diagrama estereográfico de la *TmPGK* con los sustratos 3-fosfoglicerato (3-PGA) y Mg^{2+} -AMP-PNP (ATP/Mg) unidos. Los elementos de las estructuras secundarias están marcados (hélices: h, amarillo; hebras β : s, magenta) y los residuos involucrados en la

formación de los puentes salinos (Arg62, Asp200) o de catálisis (Arg36, Lys197) se muestran en representación de esferas y cilindros con átomos en colores estándar (Auerbach, 1997).

Con el complejo ternario en la estructura de la *Tm*PGK se han dilucidado algunos detalles de la conformación de la enzima durante la transferencia del grupo fosfato, permitiendo describir algunas características esenciales en el mecanismo catalítico. La PGK, contiene un puente salino intradominio entre los residuos Arg62 (dominio N-terminal) y Asp200 (dominio C-terminal) formando una unión que mantiene a los dos dominios en la conformación cerrada. Se sabe que los residuos del sitio catalítico son muy conservados, la Lys197 localizada en el dominio C-terminal está involucrada en el cierre de los dominios al anclar ambos grupos fosfatos del 1, 3-bifosfoglicerato (BPG), que está unido al dominio N-terminal. Además, la Lys197 está en una región en la que se permite la transferencia del grupo fosfato del donador BPG al aceptor ADP, estabilizando así el estado de transición penta-coordinado del grupo fosfato (Auerbach *et al*, 1997) (Fig. 13).

Una molécula de agua bien definida se localiza en la trayectoria propuesta para la transferencia del grupo fosfato, exactamente en la posición propuesta para el estado de transición penta-coordinado (Bernstein *et al.*, 1997). Esta molécula de agua se estabiliza por el residuo Arg36, cuyo grupo guanidino interactúa con el carboxilato del 3-PGA (Fig. 13).

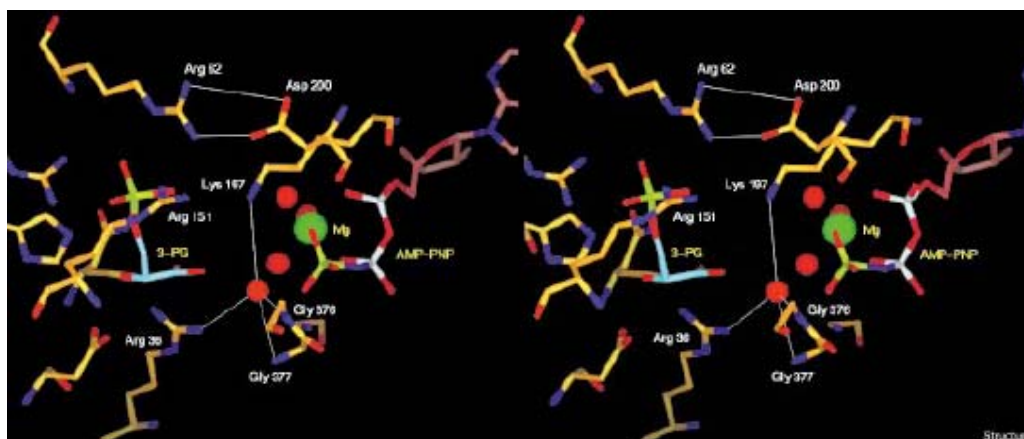


Fig. 13 Vista estereográfica del sitio activo de la *Tm*PGK mostrando la molécula de unión central de agua (esfera roja) en la posición putativa del estado de transición del grupo fosfato.

La Lys197 está bien posicionada para permitir la transferencia del grupo fosfato del donador BPG al aceptor ADP durante la catálisis. Un ión Mg^{2+} (esfera verde) se coordina por 3 átomos de oxígeno del trifosfato (fosfato α , β en blanco, fosfato γ en verde claro) (Auerbach, 1997).

El ión Mg^{2+} se coordina por los tres grupos fosfato del nucleótido vía tres átomos de oxígeno en la *Tm*PGK. Los tres sitios de coordinación, octaedros del ión metálico divalente, se ocupan por moléculas de agua (Szilágyi, 2001) (Fig. 14).

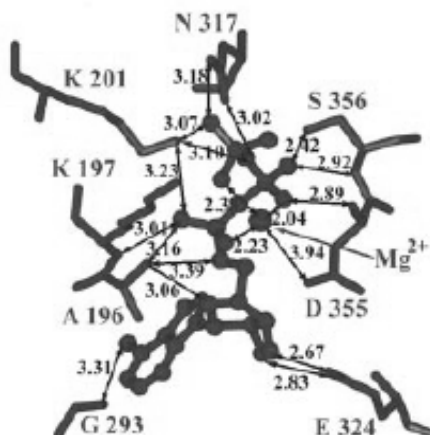


Fig. 14 Interacciones del Mg^{2+} -nucleótido con los residuos de aminoácidos del sitio activo (Szilágyi, 2001).

Además de las interacciones entre los residuos de aminoácidos y los sustratos, hay interacciones dipolo y puentes salinos que estabilizan la proteína y permiten el cambio conformacional de la PGK de un estado abierto a uno cerrado. Una hélice α se puede estabilizar por medio de la compensación de cargas de ambos polos del macrodipolo. Eso ocurre en el N-terminal con un grupo carboxilato adyacente (aspartato o glutamato) o en el C-terminal con un grupo guanidino o amino (arginina o lisina). En las tablas 3, 4 y 5 se muestran a manera de resumen los residuos de aminoácidos del sitio activo que intervienen en la unión de los sustratos, así como una comparación de las interacciones (dipolo y puentes salinos) en distintas PGK.

Tabla 3. Interacciones no covalentes en distintas PGK (Auerbach, 1997)

Fuente de PGK	Puentes salinos	Puentes salinos de superficie	Residuos Dipolo Asp/Glu	Residuos Dipolo Arg/Lys
Cerdo	18	14	9	12
Levadura	17	14	10	9
<i>B. stearothermophilus</i>	29	29	16	13
<i>T. maritima</i>	24	22	17	14

Tabla 4. Residuos del sitio activo y distancias a las que interactúan con el 3-fosfoglicerato en la *Tm*PGK (Auerbach, 1997).

Protein atom	Ligand atom	Distance (Å)
Arg36 NH1	O1	2.71
Arg36 NH2	O1	3.07
Asn23 ND2	O1	3.03
Asn23 ND2	O3	3.05
His59 NE2	O3	2.97
His59 NE2	O1P	3.25
Asp21 OD2	O3	2.78
Arg118 NH1	O3P	2.59
Arg118 NH2	O4P	2.70
Arg151 NE	O4P	2.72
Arg151 NH2	O2P	2.90
Arg62 NH2	O2P	2.59
Arg62 NE	O3P	2.67
Lys197 NZ	O2	3.91

Tabla 5. Residuos del sitio activo y distancias a las que interactúan con el sustrato de unión AMP-PNP en la *Tm*PGK. Las letras griegas se refieren a los fosfatos α , β y γ del AMP-PNP (Auerbach, 1997).

Protein/metal atom	Ligand atom [†]	Distance (Å)
Asn317 OD1	N3 β	3.02
Asn317 ND2	O3 γ	3.18
Ser356 OG	O2 β	2.42
Ser356 N	O2 β	2.92
Lys201 NZ	O3 γ	3.07
Lys201 NZ	O1 α	3.23
Lys197 N	O1 α	3.01
Lys197 NZ	O1 γ	3.66
Ala196 N	O1 α	3.16
Ala196 N	O4'	3.06
Glu324 OE2	O3'	2.67
Glu324 OE1	O2'	2.83
Asp355 N	O1 β	2.89
Gly354 N	O2 γ	2.96
Mg	O2 α	2.23
Mg	O1 β	2.04
Mg	O1 γ	2.38

En este trabajo se propuso confirmar la hipótesis de que la sustitución de un aminoácido grande en una posición cercana al sitio de unión del ATP con un aminoácido pequeño permitirá a la enzima fosfoglicerato cinasa sintetizar N⁶-bencil-ATP como sustrato análogo del ATP.

Considerando los datos obtenidos de la *Tm*PGK a la fecha, en este trabajo se decidió obtener el gen de la PGK usando oligonucleótidos a partir de dos secuencias distintas reportadas para el mismo gen. Además, se analizó la posición idónea para realizar la mutación que permitiera llevar a cabo el acomodo del grupo bencilo cerca del sitio de unión del ATP. Sobre expresó proteína y se purificó usando método cromatográfico. Para comprobar la síntesis y la defosforilación de N⁶-bencil-ATP se llevaron a cabo ensayos cinéticos *ad hoc*.

3. HIPÓTESIS

La mutación de una fenilalanina por una glicina en la posición 223 de la secuencia primaria de la enzima fosfoglicerato cinasa de la bacteria termófila *Thermotoga maritima* (*Tm*) permitirá a la enzima sintetizar N⁶-bencil-ATP.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Sintetizar N⁶-bencil-ATP con la *Tm*PGKF223G

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar el gen de la *Tm*PGK silvestre
- Realizar una mutación puntual dirigida cambiando la fenilalanina 223 por una glicina en la *Tm*PGK (F223G)
- Clonar y sobreexpresar la PGK silvestre y mutante utilizando un vector y un sistema de expresión bacteriano adecuado, para la posterior purificación de las enzimas.
- Caracterizar bioquímicamente las PGK silvestre y mutante (F223G), comparando sus principales parámetros
- Sintetizar, con la enzima mutante, N⁶-bencil-ATP

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de oligonucleótidos y obtención del gen de la PGK de *Thermotoga maritima*

El gen de la PGK se obtuvo a partir de DNA genómico de *Thermotoga maritima* MSB8, ya que éste no se encontraba clonado en ningún vector de expresión. Para obtener el gen del genoma se diseñaron oligonucleótidos con base en dos secuencias reportadas para este gen (Schurig *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1999). Estas dos secuencias codifican para ambas formas de la proteína reportada, la monomérica (PGK) y la tetramérica (PGK-TIM) (ver inciso 6.1). La longitud de los oligonucleótidos diseñados varió entre 28 y 37 nucleótidos, que es un número adecuado para una hibridación específica en DNA genómico, cuidando que estos tuvieran un predominio de G y C en los extremos, permitiendo así, a estas bases que forman puentes de hidrógeno, interaccionar fuertemente con la hebra complementaria. Para amplificar el gen completo se necesitaron un par más de oligonucleótidos, el T7 promotor y T7 terminador. Además, se incluyeron sitios de corte de enzimas de restricción para su clonación direccional (Tabla 6).

Tabla 6. Oligonucleótidos para amplificar el gen de la *Tm*PGK. En negritas y subrayados se muestran los sitios de restricción *Xba*I y *Hind*III.

Secuencia	Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de Restricción	Tm °C	% CG
Schurig, 1995	Directo	5' gct <u>tctagag</u> gcatggagaagatgaccatc 3'	<i>Xba</i> I	61	50
	Reverso	5' ggatcagccc <u>aagctt</u> tatTTTTTTTTTatgcgcatg 3'	<i>Hind</i> III	62	37.8
Nelson, 1999	Directo	5' gct <u>tctagag</u> gcatggaaaaaatgaccataag 3'	<i>Xba</i> I	59	40
	Reverso	5' ccc <u>aagctt</u> tatTTTTTTTTTatccgcatgctggc 3'	<i>Hind</i> III	63	41.6

5.2 Amplificación del gen mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del gen se realizó utilizando la PCR, que es una técnica que permite la síntesis *in vitro* de un fragmento de DNA de tal forma que, en

cada ciclo del proceso, se duplica el número de moléculas. Si partimos de una molécula de DNA, al término de 20 ciclos tendremos cerca de 1 millón de copias de dicha molécula. Para llevar a cabo esta reacción, se necesita el DNA molde, 2 oligonucleótidos (T7 Promotor y T7 Terminador) necesarios para que la DNA polimerasa funcione, una mezcla de deoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), un amortiguador adecuado y la enzima que polimeriza al DNA (DNA Polimerasa).

La amplificación del DNA se lleva a cabo en 3 etapas: 1) la desnaturalización de DNA, necesaria para que las cadenas de DNA se separen; este proceso se consigue al elevar la temperatura a 94°C. 2) Hibridación, se realiza a una temperatura promedio de 55°C, donde los oligonucleótidos reconocen sus secuencias complementarias sobre las hebras del DNA y se hibridan con ellas. Esta etapa dura lo suficiente para dejar que los iniciadores se hibriden pero no para que el resto de la cadena se junte de nuevo, y por último, 3) el alargamiento o polimerización del DNA, donde a 72°C la DNA polimerasa agrega nucleótidos a las dos hebras separadas en sentido 5'-3' Fig. 15 (Erlich, 1992).

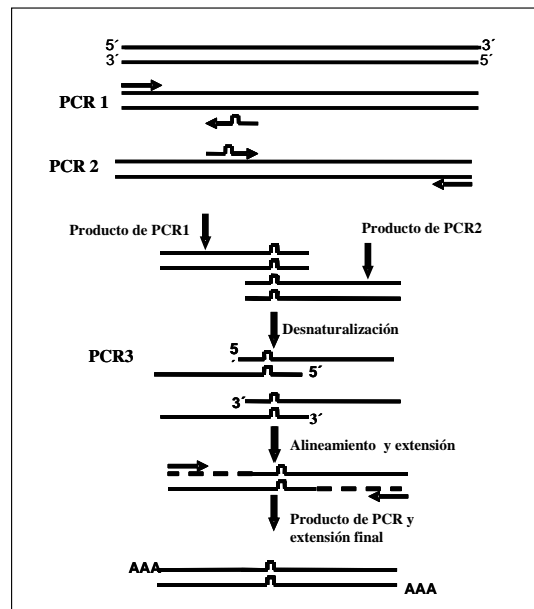


Fig. 15 Reacción en cadena de la polimerasa

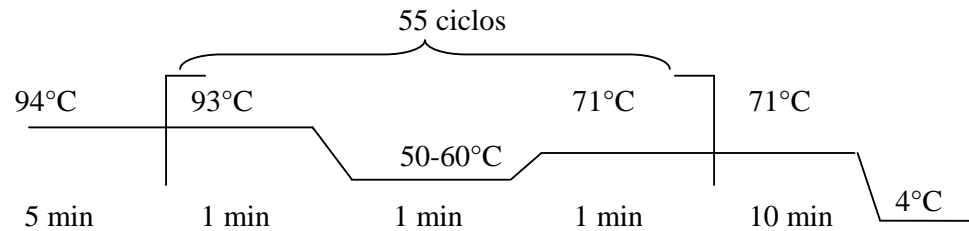
5.3 Optimización de las condiciones de la PCR

Factores como el diseño equívoco de los oligonucleótidos, baja temperatura de alineamiento, los tiempos de alineación y extensión, concentraciones de DNA molde, enzima polimerasa, iniciadores o cofactor de la DNA polimerasa (Magnesio), pueden interferir en la especificidad y eficiencia de la reacción de amplificación. Para determinar las condiciones óptimas de amplificación usando los oligonucleótidos basados en la secuencia de Schurig y colaboradores, se probaron además de las condiciones estándar (Tabla 7), diferentes temperaturas de alineamiento: 50, 51.6, 52.7, 54, 55.4, 56.8, 58 y 60 °C, y se usaron 2 μ L de DMSO para estabilizar el DNA genómico. En la amplificación usando los oligonucleótidos basados en la secuencia de Nelson y colaboradores, se usaron las condiciones estándar de amplificación.

Tabla 7. Condiciones estándar de la PCR

En una reacción de 100 μ L:	Concentración Final
DNA <i>Thermotoga maritima</i>	100ng
T7 Promotor	200ng
T7 Terminador	200ng
Oligonucleótido Forward	200ng
Oligonucleótido Reverse	200ng
dNTP's	2.5 mM
MgCl ₂	50 mM
Amortiguador sin MgCl ₂	10x
Polimerasa "Expand High Fidelity" de Roche®	3.5 U
H ₂ O	-

Los ciclos de amplificación del gen se llevaron a cabo con el sistema "Expand High Fidelity" de Roche® de alta fidelidad, utilizando el programa que se muestra a continuación:



Los productos de la PCR, se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron las bandas de DNA con luz UV.

5.4 Clonación en un vector de expresión

Una vez obtenidos los productos de la PCR, el fragmento del tamaño esperado (1200 pb) se purificó con el Kit de extracción de DNA (Qiagen) y se subclonó en el plásmido pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen) para secuenciar (Fig. 16). La clonación en este vector se llevó a cabo ya que en el DNA genómico hay un sin fin de genes de aproximadamente del mismo tamaño y con secuencias repetidas, debido a esto, fue necesario secuenciar rápidamente el DNA obtenido para asegurarnos que efectivamente correspondía al gen de nuestro interés. El plásmido pCR[®]4-TOPO[®], es un vector que favorece la clonación de productos frescos de PCR, ya que en este sistema la *Taq* polimerasa tiene una actividad de transferasa no dependiente del DNA molde, la cual agrega deoxiadenosina (A) en el extremo 3' del producto de la PCR. El plásmido presenta en su extremo 3' residuos de deoxitimidina (T), lo que permite la inserción eficaz del producto amplificado.

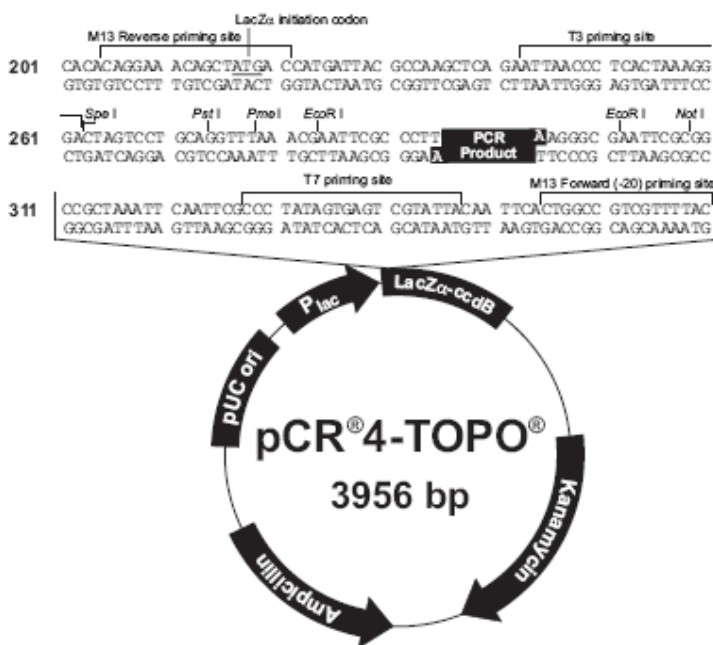


Fig. 16 Mapa del vector pCR⁴-TOPO[®] de Invitrogen

Los productos de la reacción de ligación se usaron para transformar células competentes *E. coli* Top10 mediante choque térmico, las cuales se plaquearon en una caja de Petri con medio Luria-Bertani (LB) con 50 mg/ml de ampicilina y kanamicina. De las colonias transformadas se hicieron pequeños parches en cajas LB y se les extrajo DNA utilizando el Kit QIAprep[®] Spin Miniprep de QIAGEN. Este DNA se utilizó para realizar ensayos de restricción con las enzimas *Xba*I y *Hind*III, corroborando de esta forma que efectivamente las colonias contenían el producto de la PCR (gen de interés). De las clonas positivas, se extrajo DNA y se secuenció para corroborar que la secuencia correspondía al gen de la *Tm*PGK.

El DNA secuenciado cuya secuencia correspondió al gen de nuestro interés, se sometió de nuevo a la reacción de la PCR (ver inciso 4.2) para incorporarle un codón de STOP (término). Basados en la secuencia de Nelson (1999) se diseñó el siguiente oligonucleótido (Reverse): cccaagct**tta**ttttttttttatccgcatgctggg (en negritas se muestra el codón de paro). De nuevo, el producto de la PCR se analizó mediante

electroforesis en gel de agarosa, la banda del peso esperado se purificó y se utilizó para clonarla en el plásmido de expresión pET-28a (Novagen) (Fig. 17).

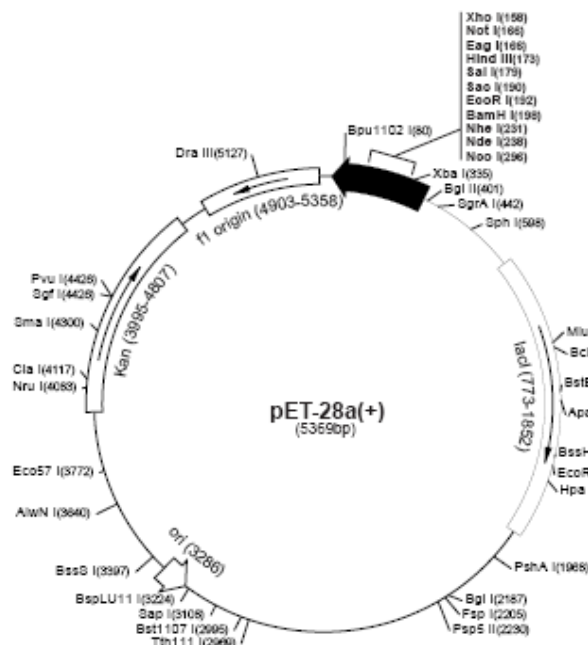


Fig. 17 Mapa del vector de expresión pET-28a de Novagen.

El fragmento de DNA y el plásmido de expresión pET-28a se digirieron con las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*, mediante 5 ciclos de 15 segundos con intervalos de 2 ½ minutos en horno de microondas (Samsung, 2250Mhz). Las digestiones analizadas mediante gel de agarosa, se purificaron y se usaron para la ligación que se llevó a cabo incubando el plásmido y el gen digeridos en una relación 1:3 o 1:4, respectivamente, usando la enzima T4 DNA Ligasa (4 U/μl) a 16°C durante toda la noche.

El producto de la ligación, se usó para transformar células competentes de alta replicación Top10 las cuales se plaquearon en cajas Petri con medio LB/Kanamomicina. A las colonias transformantes, se les extrajo DNA para monitorear mediante enzimas de restricción (*XbaI* y *HindIII*) la presencia del inserto (gen de interés). Aquellas clonas que presentaban el inserto (clonas positivas), se utilizaron para extraerles el DNA el cual fue utilizado para secuenciar (en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y de esta forma confirmar que el gen de la *TmPGK* estaba completo y no tenía ninguna mutación.

5.5 Expresión de la *TmPGK*

Una vez confirmado que el DNA clonado en pET-28a no contenía ningún error, se usó éste para transformar mediante choque térmico, células de expresión *E.coli* ER2566, las cuales contienen una copia cromosómica del gen de la T7 RNA polimerasa insertado en el gen del *lacZ* que es controlado por el promotor *lac*. En ausencia de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), la expresión de la T7 RNA Polimerasa se suprime por la unión del represor *lac I* al promotor *lac*.

Clonadas las cepas de expresión, se siguieron los procedimientos que a continuación se muestran: las células se crecieron en un precultivo (50ml) LB con 50 μ g/ml de kanamicina, el cual fue usado para inocular un cultivo de 250ml (LB/Kan) a una A_{600nm} = 0.08 y se incubó a 30°C hasta alcanzar una A_{600nm} = 0.3-0.4. Alcanzada la absorbancia deseada, se hizo una curva de 0.1, 0.4 y 1 mM de IPTG para inducir la síntesis de la proteína y se dejó creciendo a 30 y 37°C por 16 horas.

5.6 Purificación de la *TmPGK*

La purificación de la *TmPGK*, se hizo siguiendo el protocolo establecido por Grättinger y colaboradores (Grättinger, 1998), con algunas modificaciones del mismo. Un cultivo de 250 ml de medio LB con las bacterias inducidas durante 16 horas (cepa ER2566) se centrifugó (7000 rpm, 15 min, rotor GAIDO, centrifuga Sorvall RC-5B). El botón se resuspendió en 10 ml de amortiguador A (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA), suplementado con una pastilla (50 mg) de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, ROCHE).

Las células se rompieron por sonicación (Branson Sonifier 250) en frío, en 5 ciclos de 40 segundos con 1 minutos de descanso entre cada uno, evitando el aumento de temperatura en la muestra. El lisado, se centrifugó (7000 rpm, 15 min, rotor SS34, centrifuga Sorvall RC-5B). Al sobrenadante, se le agregó 1 ml de 20 μ g/ml DNAsa/RNAsa con 20 mM MgSO₄ y se incubó a

37°C por 60 min con agitación constante. El sobrenadante se centrifugó (18000 rpm, 60 min, rotor SS34, centrífuga SorvallRC-5B) y se diluyó con 5 volúmenes del amortiguador A y se calentó a 80°C por 60 min, seguido por otro paso de centrifugación (15000, 120 min, rotor SS34). El sobrenadante se dializó (Spectrapor, membrana con apertura de poro 12-14 kDa) con 3 L de amortiguador B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) toda la noche. La proteína dializada se concentró en una membrana Amicon 30 kDa y se pasó a través de la columna de intercambio aniónico (Q Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con el amortiguador B. Se aplicó un gradiente de NaCl de 0-500 mM para la elución de la proteína. El eluido se separó en fracciones de 1 ml (con un colector de fracciones) y la cantidad de proteína en cada fracción se monitoreó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 280 nm. La proteína final obtenida en cada fracción se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% y se almacenó a 4°C.

En la figura 18, se muestran ambos protocolos (esquematizados) usados en la purificación de la proteína *TmPGK*.

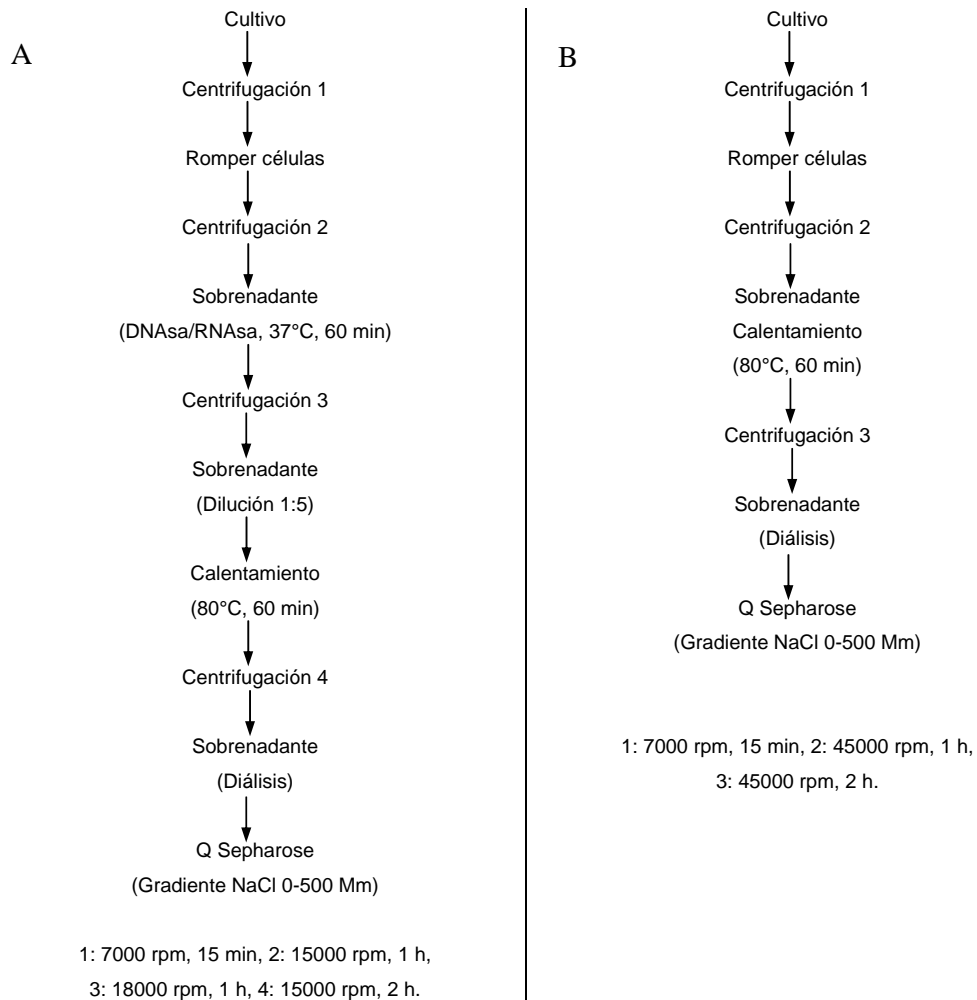


Fig. 18. Protocolos de purificación. A Protocolo de Grättinger, 1998. B Protocolo modificado.

En todos los pasos de purificación se cuantificó la cantidad de proteína por el método del ácido bicinonínico (BSA, Protein Assay Reagent Kit) a 562 nm y se monitoreó la pureza de la proteína mediante geles SDS-PAGE al 12.5%, teñidos con azul de Coomassie.

5.7 Determinación de la actividad

La actividad de la *Tm*PGK se midió espectrofotométricamente de dos formas en ensayos acoplados, una siguiendo la desaparición de la absorbancia a 340 nm por la oxidación del NADH y la otra siguiendo la aparición de absorbancia a 340 nm por la reducción del NAD⁺. La reacción de oxidación del

NADH se mide en sentido de la defosforilación de ATP a ADP (Grättinger, 1998), mientras que la reducción del NAD⁺ se mide en sentido de la síntesis de ATP a partir de ADP (Bücher, 1955) (ver inciso 1.4.2). Ambos ensayos, están acoplados a la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Siguiendo ambos protocolos, se usaron las siguientes condiciones para mediar la actividad de síntesis y defosforilación de ATP (Tabla 8):

Tabla 8. Condiciones experimentales publicadas para los ensayos cinéticos de la PGK.

Grättinger, 1998

Bücher y Saavedra, 1942, 2005

Sustrato	Concentración	Sustrato	Concentración
3-PGA	7 mM	G3P	0.5 mM
ATP	2.2 mM	ADP	6 mM
GAPDH	20µg/ml	GAPDH	20µg/ml
MgCl ₂	5 mM	MgCl ₂	5 mM
Cisteína	5 mM	Pi	3 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM
Amortiguador	pH 6	Amortiguador	pH 7.5
Fosfatos		Tris y Fosfatos	
Temperatura	40°C	Temperatura	40°C

Dado que con estas condiciones no se reprodujeron los valores reportados, se decidió hacer una serie de curvas de concentración de sustratos en ambos ensayos, tanto en el ensayo de defosforilación, como en el de síntesis de ATP (Tabla 9):

Tabla 9. Curvas de concentración de sustratos.

Grättinger, 1998

Bücher, 1945

Sustrato	Curva de Concentración	Sustrato	Curva de Concentración
3-PGA	0.3, 3, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 mM	G3P	0.5, 1, 1.5 y 2 mM
ATP	0.03, 0.3, 2.2, 3, 6	ADP	0.1, 0.25, 0.5, 1,

	y 12 mM		3, 6 y 12 mM
GAPDH	20, 40, 80, 120,	GAPDH	20, 40, 80, 120,
GAPDH	150, 180, 200 y 250 µg/ml		150, 180, 200 y 250 µg/ml
MgCl ₂	5, 12 y 24 mM	MgCl ₂	5, 12 y 24 mM
Cisteína	5 mM	Pi	3, 6 y 12 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM
Amortiguador Tris-HCl	pH 7.5	Amortiguador Tris	pH 7.5
Temperatura	40°C	Temperatura	40°C

5.8 Caracterización cinética de la *Tm*PGK

Se realizaron curvas de concentración de sustrato contra actividad específica con el fin de determinar los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y V_{max}/K_m . Estos experimentos se hicieron por triplicado, ajustando los valores obtenidos al modelo de Michaelis-Menten (Fig. 19) y obteniendo los valores de K_m y V_{max} mediante regresión no lineal.

$$V_0 = V_{max} [S] / K_m + [S]$$

Fig. 19. Ecuación de Michaelis-Menten. La ecuación de Michaelis-Menten es una ecuación de velocidad para una reacción de un solo sustrato, catalizada enzimáticamente que relaciona la velocidad inicial (V_0), la velocidad máxima (V_{max}) y la concentración del sustrato inicial ($[S]$) a través de la constante de Michaelis-Menten (K_m).

5.9 Mutación puntual dirigida del gen de la PGK de *Thermotoga maritima* y diseño de oligonucleótidos mutagénicos

Los oligonucleótidos mutagénicos se diseñaron con base en la secuencia reportada por Nelson (Nelson *et al.*, 1999). Éstos, constaron de 22 pares de bases cada uno y, para diseñarlos, se siguieron las condiciones reportadas en el inciso 4.1. En la tabla 10, se muestran los oligonucleótidos mutagénicos para la obtención de la mutante, que de ahora en adelante se llamará *Tm*PGKF223G (mutación de la PGK en la posición 223, de una

fenilalanina por una glicina, generando así un hueco que permitirá teóricamente el fácil acomodo de grupos voluminosos cerca del sitio de unión del ATP, sin que esta mutación afecte la actividad).

Tabla 10. Oligonucleótidos mutagénicos F223G. En negritas y subrayado se muestra la posición donde se incorpora la mutación.

Mutación realizada	Oligonucleótido mutagénico	Tm °C
F223G	Directo: catgatgggt <u>acc</u> ttcctgaag	55
	Reverso: cttcagga <u>agg</u> tacccatcatg	55

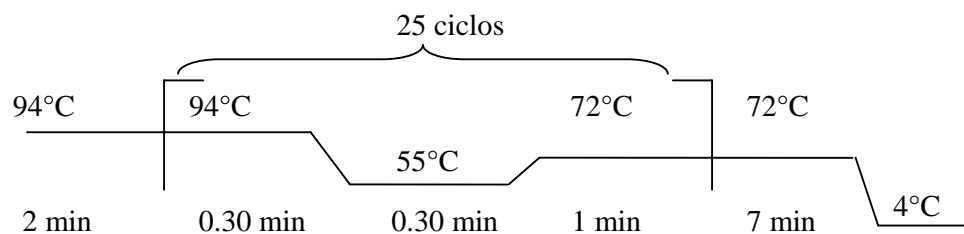
5.10 Mutagénesis mediante la PCR y optimización de las condiciones de amplificación

La mutación puntual dirigida, se llevó a cabo conforme a las características descritas en los incisos 4.2 y 4.3 (ver incisos). Las características de cada PCR, se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de amplificación de los PCR 1, 2 y 3.

En una reacción de 50 µL:	Concentración Final	Concentración		
		PCR 1	PCR 2	PCR 3 (=1+2)
DNA <i>Thermotoga maritima</i>	200 ng	100 ng	100 ng	200 ng
T7 Promotor	200 ng	200 ng	-	200 ng
T7 Terminador	200 ng	-	200 ng	200ng
Oligonucleótido Forward Mutagénico	200 ng	200 ng	-	200ng
Oligonucleótido Reverse Mutagénico	200 ng	-	200 ng	200ng
dNTP's	2.5 mM	-	-	2.5 mM
MgCl ₂	50 mM	-	-	50 mM
Amortiguador sin MgCl ₂	1 x	-	-	1 x
Polimerasa "Expand High Fidelity" de Roche®	3.5 U	-	-	3.5 U
H ₂ O	-	-	-	Llevar a 50 µL

Los ciclos de amplificación que se llevaron a cabo en cada uno de las PCR fueron:



5.11 Clonación en un vector de expresión

Una vez obtenido el producto del tercer PCR, se siguieron los procedimientos de purificación y digestión del DNA (PCR3) con enzimas de restricción, y ligación (en el vector pET-28a, únicamente) descritos en el inciso 4.4.

5.12 Sobreexpresión y Purificación de la mutante *TmPGKF223G*

Para sobreexpresar la *TmPGKF223G*, se usaron las siguientes condiciones: en un cultivo de 250 ml, con $A_{600nm} = 0.35$ se agregó 0.1 mM IPTG y se incubó a 30°C por 16 horas (ver inciso 4.5).

Una vez inducido el cultivo, la enzima se purificó conforme a las condiciones descritas en el inciso 4.6, Figura 18, B (ver inciso 4.6, para detalles).

5.13 Determinación de la actividad y caracterización cinética de la *TmPGKF223G*

La determinación de la actividad y las características cinéticas de la enzima mutante, se llevaron a cabo conforme a las condiciones descritas en el inciso 4.7 y 4.8 (ver los incisos 4.7 y 4.8).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención del gen de la *TmPGK*

Para aislar el gen de la *TmPGK* se usaron los dos pares de cebadores basados en las secuencias distintas reportadas para esta proteína (Schurig, 1995 y Nelson, 1999). En la figura 20, se muestran los productos de la PCR obtenidos con los cebadores de secuencias.

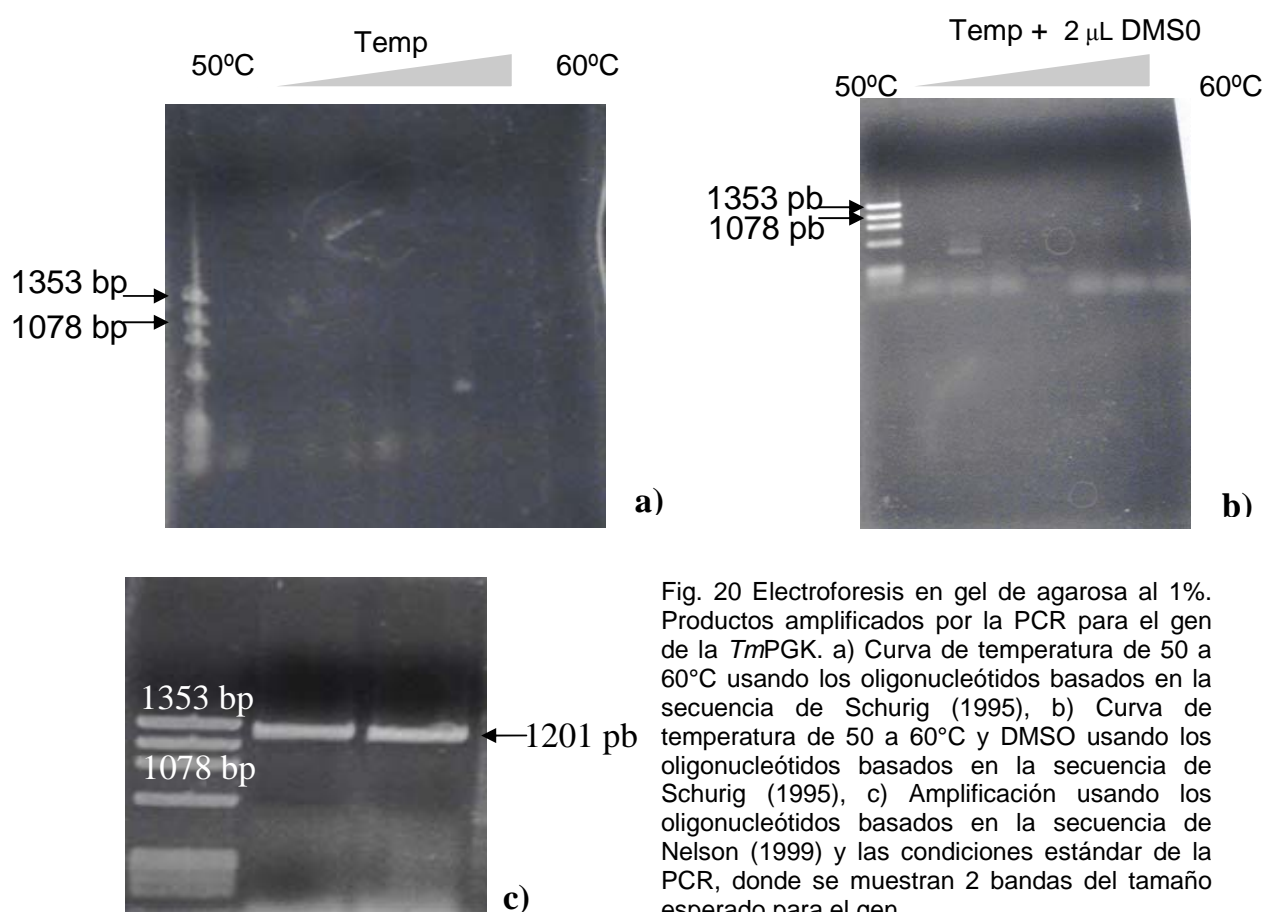


Fig. 20 Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos amplificados por la PCR para el gen de la *TmPGK*. a) Curva de temperatura de 50 a 60°C usando los oligonucleótidos basados en la secuencia de Schurig (1995), b) Curva de temperatura de 50 a 60°C y DMSO usando los oligonucleótidos basados en la secuencia de Schurig (1995), c) Amplificación usando los oligonucleótidos basados en la secuencia de Nelson (1999) y las condiciones estándar de la PCR, donde se muestran 2 bandas del tamaño esperado para el gen.

Con base en estos resultados, podemos observar que usando la secuencia reportada por Nelson y colaboradores se obtuvo un fragmento del tamaño esperado para el gen de la *TmPGK* (Fig. 20). Con ambas secuencias, se hizo la amplificación usando las condiciones estándar (ver inciso 4.3, tabla

7), pero sólo con la del grupo de Nelson se amplificó una banda del tamaño esperado.

En 2001 el grupo de Wassenberg y colaboradores (Wassenberg, 2001) encontraron, con base en estudios comparativos de diferentes DNA y en un análisis de espectrometría de masas de la secuencia de aminoácidos de la *Tm*PGK MSB8, que ésta presentaba una variabilidad local el extremo carboxilo en las variantes estudiadas (Fig. 21).

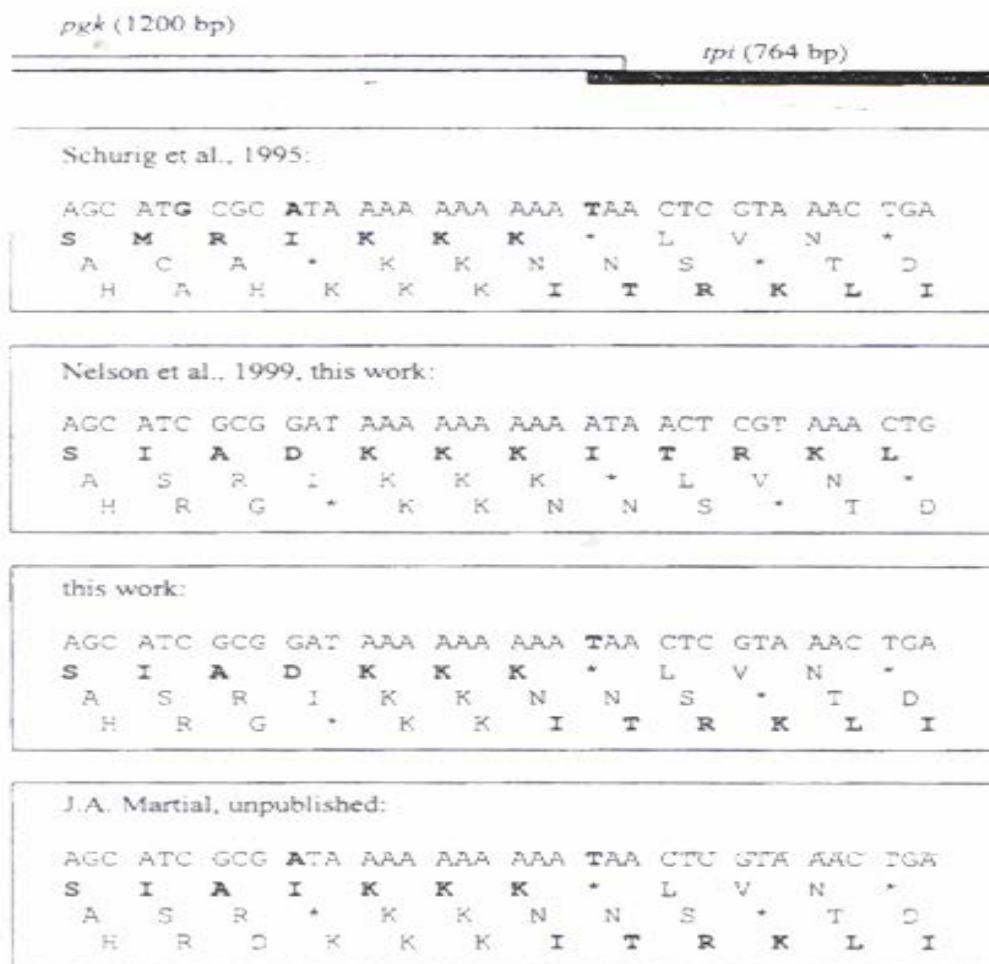


Fig. 21 Secuencias de DNA y deducción de las posibles secuencias de aminoácidos de la región carboxilo de la *Tm*PGK-TIM. Las secuencias de aminoácidos identificados se determinaron por análisis de espectrometría de masas (se muestran en negritas). Los asteriscos representan el codón de paro (Wassenberg, 2001).

Esta variabilidad permite al gen codificar las dos formas distintas de la proteína (PGK o PGK-TIM). Además, las proteínas pueden variar en los residuos de aminoácidos que se encuentran en el carboxilo terminal de la PGK

independientemente de si el gen codifica para la PGK monomérica o la PGK-TIM (Fig. 22). De tal forma que al amplificar el gen de nuestro interés, la variante del DNA de *Tm*PGK MSB8 con la que contamos fue la reportada por Nelson, en la cual el gen codifica para la proteína fusionada (PGK-TIM) (Fig. 22), de esta forma el gen sólo se iba a amplificar usando los oligonucleótidos diseñados con base a la secuencia reportada por Nelson y colaboradores, la cual no cuenta con el codón de paro y presenta los residuos de aminoácidos I, A y D.

MEKMTIRDVLDLKGKRVIMRVDFNVPVKDGVVQDDTRIRAALPTI	<u>xxx</u> :
KYALEQGAQVILLSHLGRPKGEPSPPEFSLAPVAKRLSELLGKEV	
KFVPAVVGDEVKKAVEELKEGEVLLLENTFRHPGETKNDPELAK	MRI (a)
FWASLADIHVNDAFGTAHRAHASNVGIAQFIPSVAGFLMEKEIK	IAD (b, c)
FLSKVTYNPEKPYVVVLGGAKVSDKIGVITNLMEKADRILIGGA	IAI (d)
MMFTFLKALGKEVGS SRVEEDKIDLAKELLEKAKEKGV EIVLPV	
DAVIAQKIEPGVEKKVVRIDDGIPEGWMGLDIGPETIELFKQKL	
SDAKTVVWNGPMPGVFEIDDFAEGTKQVALAIAALTEKGAITVVG	
GGDSAAAVNKFGLLEDKFSHVSTGGGASLEFLEGKELPGIASxxx	
KKK ITRKLILAGNWKMHKTI SEAKKFVSLLVNELHDVKEFEIVV	
CPPFTALSEVGEILSGRNIKLGAQNVFYEDQGAFTGEISPLMLQ	
EIGVEYVIVGHSERRRIFKEDDEFINRKVKAVLEKGMTPILCVG	
ETLEEREKGLTFCVVEKQVREGFYGLDKEEAKRVVIAAYEPVWAI	
GTGRVATPQQAQEVHAFIRKLLSEMYDEETAGSIRILYGGSIKP	
DNFLGLIVQKDIDGGLVGGASLKESFIELARIMRGVIS	

Fig. 22 Secuencia de aminoácidos de la *Tm*PGK-TIM (Schurig, 1995). Los residuos identificados se muestran en negritas. La PGK termina con la K399 (|). En la región de unión entre la PGK y la TIM, (xxx) las 3 secuencias mostradas en la derecha fueron obtenidas de las secuencias reportadas por Schurig (a), Nelson (b), Wassenberg (c) y Martial (d), (Wassenberg, 2001).

Estos datos, explican porqué no se amplificó un producto del tamaño esperado, usando los oligonucleótidos basados en la secuencia de Schurig, pero usando la secuencia de Nelson se obtuvo el gen de interés. Con la secuencia reportada por este último grupo se obtuvo el gen, dado que el DNA genómico presenta numerosos genes con secuencias parecidas, el producto de la PCR se subclonó en el vector pCR[®]4-TOPO[®]. Al plásmido de las colonias positivas se les realizó un ensayo de restricción con las enzimas *Xba*I y *Hind*III para corroborar la presencia gen y se mandó secuenciar para asegurar que el gen correspondiera al de la *Tm*PGK (Fig. 23).

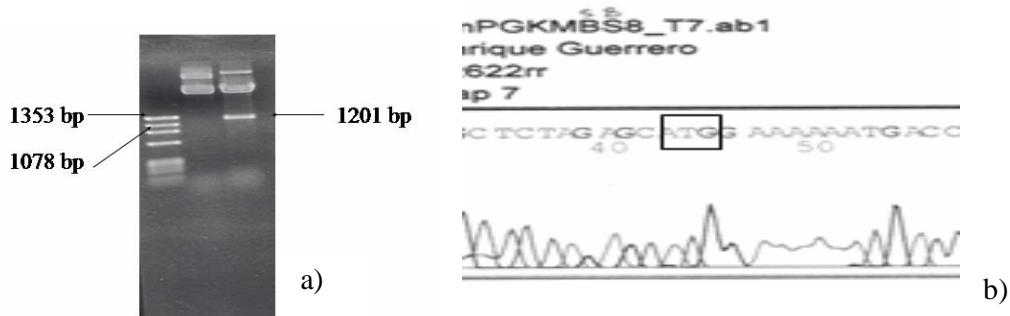


Fig. 23 Ensayo de restricción y electrofluorograma. a) Ensayo de restricción con las enzimas *Xba*I y *Hind*III usando el vector pCR[®]4-TOPO[®] con el fragmento del peso esperado para el gen de interés. b) Electrofluorograma de secuenciación del gen obtenido mediante la PCR. En recuadro pequeño, se muestra el ATG de inicio.

Los resultados de la secuenciación del DNA clonado confirmaron que la secuencia aislada correspondía al de la *Tm*PGK, pero que éste no contenía codón de paro (stop). Recordando algunos de los datos mencionados en la introducción, el grupo de Schurig (1995), descubrió que el gen de la *Tm*PGK codificaba para 2 proteínas distintas: una PGK monomérica de 43 kDa y una PGK tetramérica fusionada a la TIM (PGK-TIM) de 280 kDa. Con la secuencia de Nelson (1999) se obtuvo el gen esperado, pero dado que para amplificar este gen el diseño de oligonucleótidos se basó en la secuencia reportada por Nelson, éstos, se diseñaron tomando parte de la secuencia que codifica a la TIM (PGK-TIM) (Fig. 24).

Marco de lectura programado (frameshift -1).

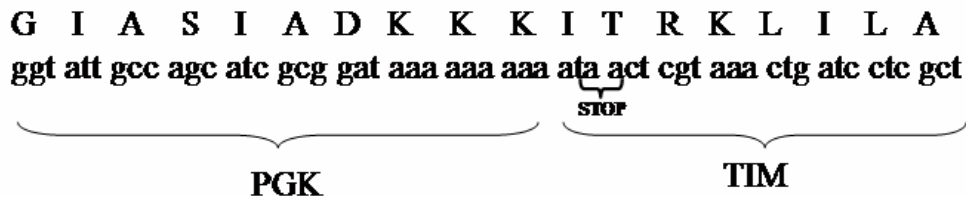


Fig. 24 Secuencia de la PGK-TIM reportada por Nelson (1999), donde se muestran los residuos de aminoácidos y sus respectivas bases tanto del gen de la PGK y la TIM (gen fusionado). Se muestra así, que mediante un marco de lectura -1 (eliminando la primera base "a" de la

Isoleucina, I), se genera el codón de paro (stop) produciéndose la PGK monomérica (terminando la proteína con 3 lisinas, K).

A este respecto, se realizó una PCR extra para agregar un codón de término y así generar la PGK monomérica. El producto obtenido, se clonó en el plásmido pET-28a que fue utilizado para transformar células competentes *E.coli* ER2566. En la figura 25, se muestra el monitoreo mediante digestión con las enzimas *Xba*I y *Hind*III, de las clonas transformantes. Se purificó el DNA de una de las clonas positivas y se mandó secuenciar para confirmar la presencia del codón de paro (Fig. 26).

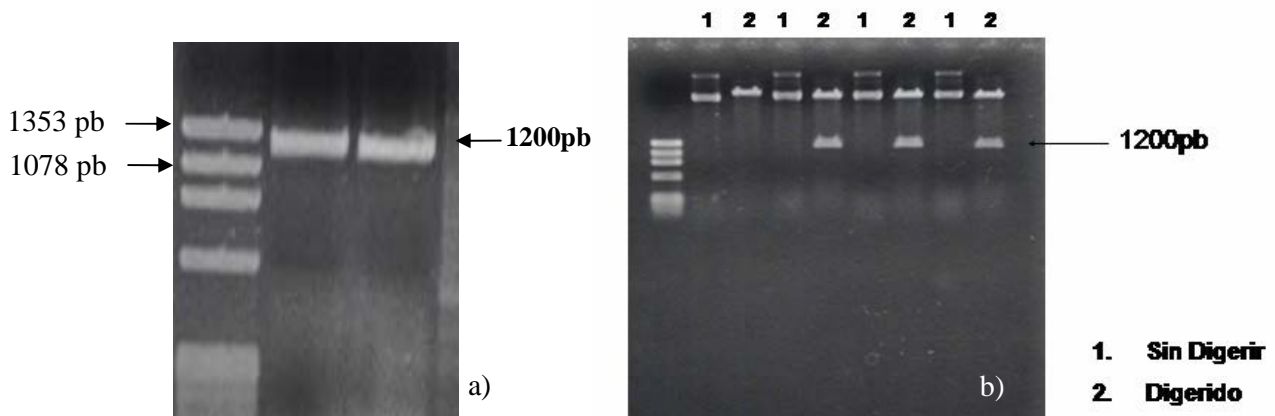


Fig. 25 Inserción del codón de paro en el gen (PGK-TIM) y ensayo de restricción. a) Producto del peso esperado para el gen de la *Tm*PGK. b) Búsqueda de las clonas positivas para el gen de la *Tm*PGK. Los DNA de las colonias de células transformadas se digirieron con *Xba*I y con *Hind*III y se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% buscando el inserto de 1200pb.

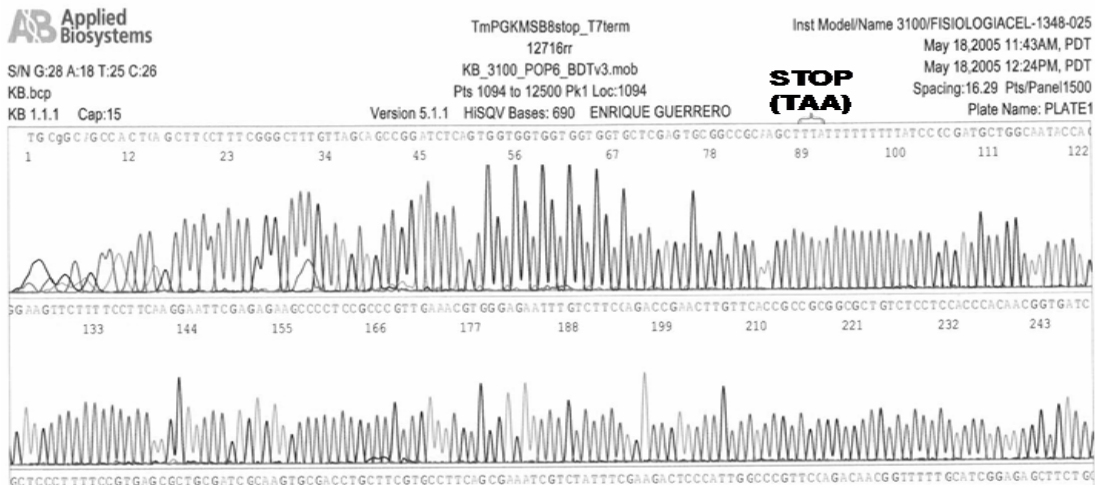
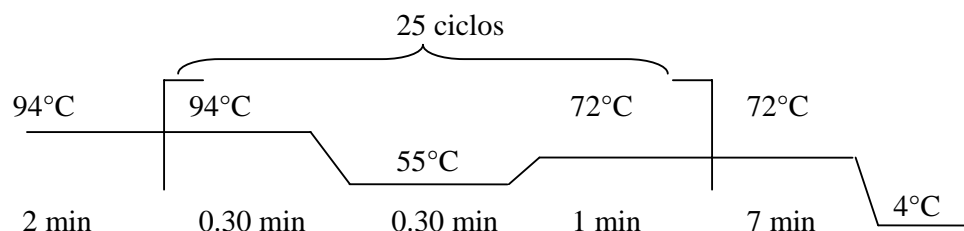


Fig. 26 Electrofluorograma de secuenciación del gen obtenido mediante la PCR. En la llave se muestra el codón de paro (TAA) insertado por la PCR.

6.2 Obtención de la mutante *TmPGK F223G*

Para generar la mutación F223G, se usaron las condiciones estándar de la PCR (ver tabla 11). Siguiendo los siguientes ciclos,



se obtuvieron los fragmentos de los pesos esperados que se muestran en la figura 27.

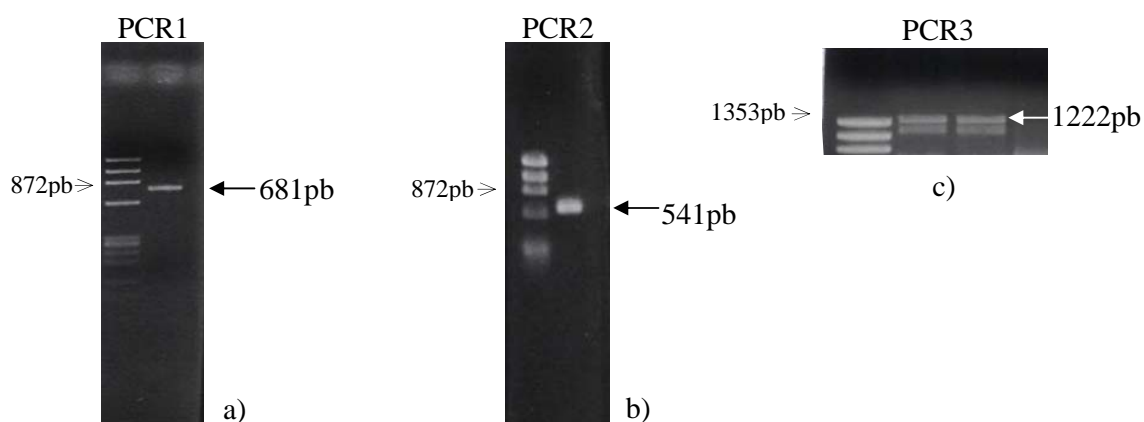


Fig. 27 Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos amplificados para la mutante F223G: a) PCR1, 681pb; b) PCR2, 541pb; c) PCR3, 1222pb.

Una vez obtenido el PCR3 para la F223G, éste se clonó en el vector de expresión pET-28a, el cual fue utilizado para transformar células de *E.coli* ER2566 competentes. En la figura 28 se muestra el análisis mediante digestión con las enzimas *Xba*I y *Hind*III de los productos de la PCR. Se purificó el DNA plasmídico de una de las clonas positivas y se mandó secuenciar para confirmar la presencia de la mutación en la posición 223 (Fig. 29).

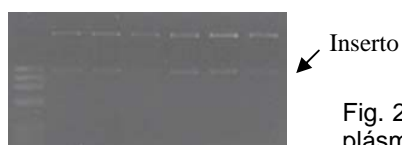


Fig. 28 Clonas transformantes del gen *TmPGKF223G*. El plásmido fue digerido con *Xba*I y *Hind*III.

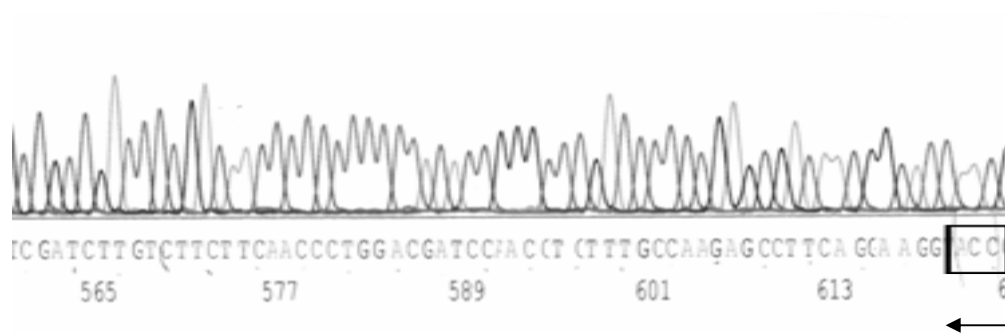


Fig. 29 Electrofluorograma de la secuenciación del gen de la *TmPGKF223G*. En el recuadro se muestra el cambio de codones para el residuo mutagénico, F223G: AAG/CCA.

6.3 Sobre expresión y purificación de la *TmPGK* y de la *TmPGKF223G*

Una vez secuenciado el gen *TmPGK* y *TmPGKF223G* y, comprobada la presencia de la mutación y la ausencia de mutaciones en el gen silvestre, se prosiguió a la determinación de las condiciones de sobre expresión de las enzimas. Se hicieron curvas de concentración de IPTG y temperaturas de inducción a una densidad óptica fija de los cultivos. En la figura 30, se muestra el gel de SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida en donde se observa la inducción de la expresión de la *TmPGK*. Con el fin de disminuir la expresión de otras proteínas sin interés, se determinaron las condiciones óptimas para la expresión de ambas proteínas que fueron: 0.1 mM IPTG y 30°C de incubación con 0.35 unidades de $A_{600 \text{ nm}}$.

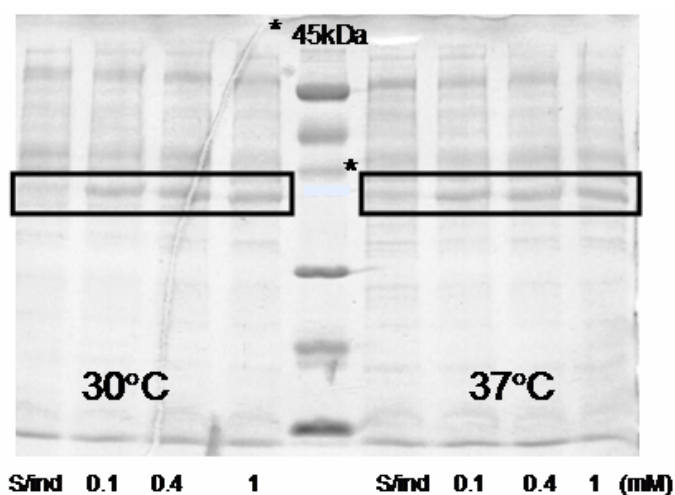


Fig. 30 Gel de acrilamida al 12.5% de una SDS-PAGE en donde se muestran las condiciones de inducción para la *TmPGK* con 0.1, 0.4 y 1 mM IPTG a 30 y 37°C y 0.35 unidades de $A_{600 \text{ nm}}$ durante 16 horas.

6.4 Purificación de la enzima silvestre y la mutante

Las *TmPGK* silvestre y mutante se purificaron de acuerdo con el protocolo descrito para la enzima silvestre (Grättinger, 1998) y con modificaciones al mismo (ver inciso 5.6). En un primer ensayo, la enzima silvestre se purificó con base al protocolo de Grättinger y se tomaron alícuotas a lo largo de la purificación para monitorear cuantitativamente las etapas del proceso (Fig. 31).

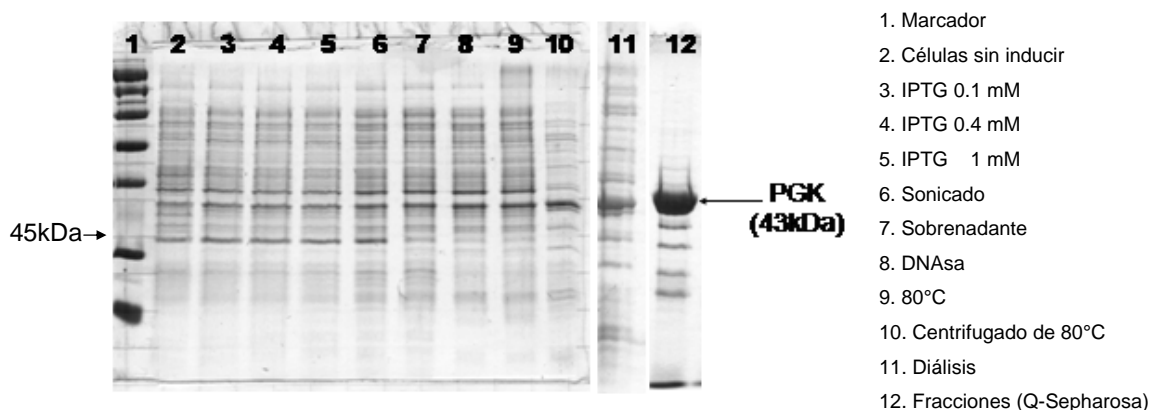


Fig. 31 Pasos de purificación de la *TmPGK*. Gel de una SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida, de los números 1-10 se muestran las condiciones de inducción y cada uno de pasos de purificación que se llevaron a cabo.

Para la purificación de la *TmPGKF223G*, se utilizaron los dos métodos descritos anteriormente con el fin hacer una comparación en ambos procesos de purificación. En la figura 32, se muestran cada uno de los pasos de purificación.

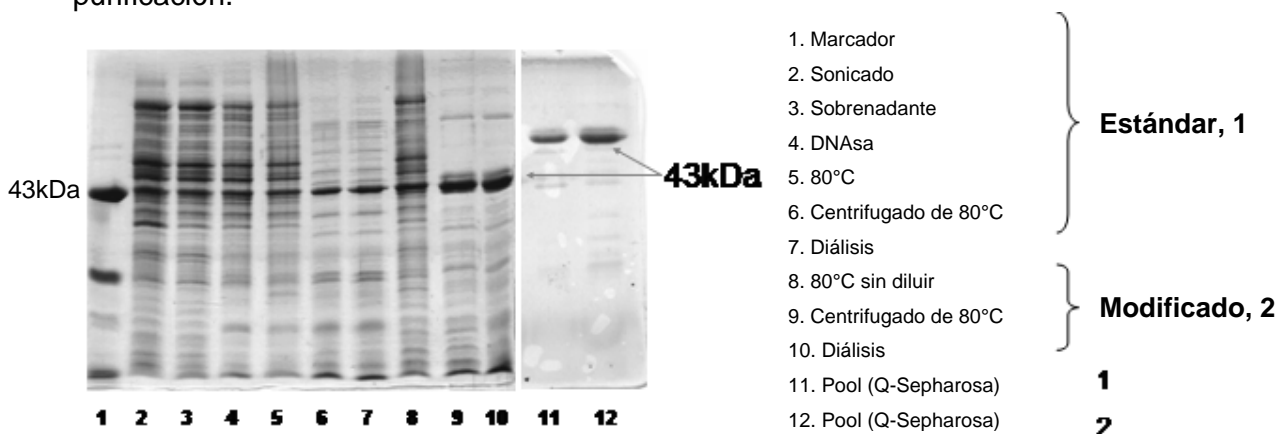


Fig. 32 Pasos de purificación de la *TmPGKF223G*. Gel de una SDS-PAGE al 12.5% de archilamida. De los números 1-12 se muestran cada uno de pasos de purificación que se

llevaron a cabo. En los pasos de purificación 11 y 12 con número 1 y 2, el protocolo usados: 1= Purificación Estándar, 2= Purificación modificada.

En las tablas 12 y 13 se presenta el análisis cuantitativo de la proteína total de cada uno de los pasos de la purificación de las proteínas silvestre y mutante.

Tabla 12. Análisis cuantitativo de la proteína silvestre (*TmPGK*), a partir de 250 ml de cultivo.

<i>TmPGK</i>	
Fracción	Proteína total (mg/ml)
Sonicado	80.32
Sobrenadante	69.99
80°C	47
Centrifugado	22.88
Diálisis	4
Q-Sepharosa	0.98

Tabla 13. Análisis cuantitativo de la proteína mutante (*TmPGKF223G*), a partir de 500 ml de cultivo, dividido en 250 ml para cada protocolo de purificación, 1: Estándar, 2: Modificado.

<i>TmPGKF223G</i>	
Fracción	Proteína total (mg/ml)
Sonicado (1, 2)	133.16
Sobrenadante (1)	83.40
DNAsa (1)	82.35
80°C (1)	82.3
Centrifugado (1)	27.06
Diálisis (1)	16.72
80°C (2)	38.5
Centrifugado (2)	14.43
Diálisis (2)	13.52
Q-Sepharosa (1)	1.99
Q-Sepharosa (2)	3.04

El protocolo de purificación se modificó con el fin de obtener una proteína más pura y con mejor rendimiento. En las figuras 32, podemos observar que efectivamente estos cambios permiten mejorar las condiciones de purificación. El cambio en las velocidades de centrifugación y la omisión de algunos pasos establecidos en el protocolo de Grättinger permitieron obtener una proteína un poco más pura, una mayor actividad específica y un mejor rendimiento. Cabe mencionar que el calentamiento a 80°C como paso de purificación permitió de forma fácil, la eliminación de muchas proteínas endógenas sin afectar la actividad y estabilidad de las *TmPGK*, ya que esta enzima es termoresistente con una vida media de 2h a 100°C (Jaenicke, 1996).

6.5 Determinación de la actividad específica de la *TmPGK* y *TmPGKF223G*

6.5.1 Ensayo de defosforilación de ATP

En los primeros ensayos, para medir la actividad tanto de la *TmPGK* silvestre y de la mutante, se siguieron las condiciones establecidas por Grättinger (Ver tabla 8). Sin embargo, con esas condiciones los resultados obtenidos no reprodujeron los datos reportados (Tabla 14), por lo que se hicieron ensayos a pH (6, 6.5, 7, 7.5 y 8, datos no mostrados) con amortiguadores de fosfatos y de Tris. Este último se usó en todo el proceso de purificación y se ha usado en la medición de la actividad de otras PGK (Flachner *et al.*, 2004; Szilágyi & Vas, 1998). Se concluyó que con Tris 100 mM, pH 7.5, se obtuvo una mejor actividad. La actividad máxima obtenida para nuestra *TmPGK* con las condiciones publicadas por Grättinger (Tabla 8, usando Tris 100 mM, pH 7.5) en el paso de purificación usando Q-Sepharosa, fue de 66.5 U/mg.

Como se puede observar del resultado anterior, al hacer ensayos cinéticos con distintos valores de pH, la actividad siguió baja conforme a las PGK monoméricas reportadas (tabla 14), pero ésta se parece a la actividad reportada para la PGK-TIM. Vale la pena mencionar que la PGK monomérica que obtuvimos por la PCR fue mediante la separación de la *TmPGK*-TIM (Nelson, 1999) y podría tener las características de la PGK-TIM. De cualquier

forma, esperando mejorar la actividad de esta PGK monomérica (PGK sin TIM mediante la PCR), se hicieron curvas de concentración de los distintos sustratos utilizados en los ensayos de actividad.

Tabla 14. Distintas actividades publicadas para la *Tm*PGK, *Tm*PGK-TIM y *Tm*PGK recombinante. 1: Schurig, 1995; 2: Grättinger, 1998; 3: Beaucamp, 1995.

Método de purificación	Actividad específica U/mg ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{prot}}$)					
	PGK-TIM 1	PGK 1	PGK 2	PGK recombinante 2	PGK-TIM 3	PGK-TIM Recombinante 3
Q-Sepharosa	45	300	-	-	-	-
Superdex	190	330	-	-	-	-
No especificado	-	-	350	360	190	170

En la tabla 15, se muestran las actividades obtenidas con las condiciones publicadas por Grättinger (Grättinger, 1998) en cada uno de los pasos de la purificación de la *Tm*PGK.

Tabla 15. Tabla de actividad específica y total y rendimiento de la *Tm*PGK en cada uno de los pasos de purificación. Se usaron las concentraciones establecidas por Grättinger, usando Tris 100 mM, pH 7.5. Actividades de cada paso de purificación (ver tabla 12).

<i>Tm</i>PGK			
Fracción	Actividad específica (U/mg)	Actividad total ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Rendimiento (%)
Sonicado	3.30	265.50	100
Sobrenadante	3.54	247.76	93.3
80°C	4.96	233.12	87.8
Centrifugado	9.96	227.88	85.8
Diálisis	28.35	113	42.5
Q-Sepharosa	66.5	65.17	24.5

Para incrementar la actividad específica de las proteínas, se hicieron curvas de concentración de la enzima (GAPDH), 3-PGA, ATP, MgCl₂ y EDTA. A continuación (Fig. 33 y 34) se muestran algunas gráficas con los valores obtenidos y el resumen de las concentraciones finales (Tabla 16).

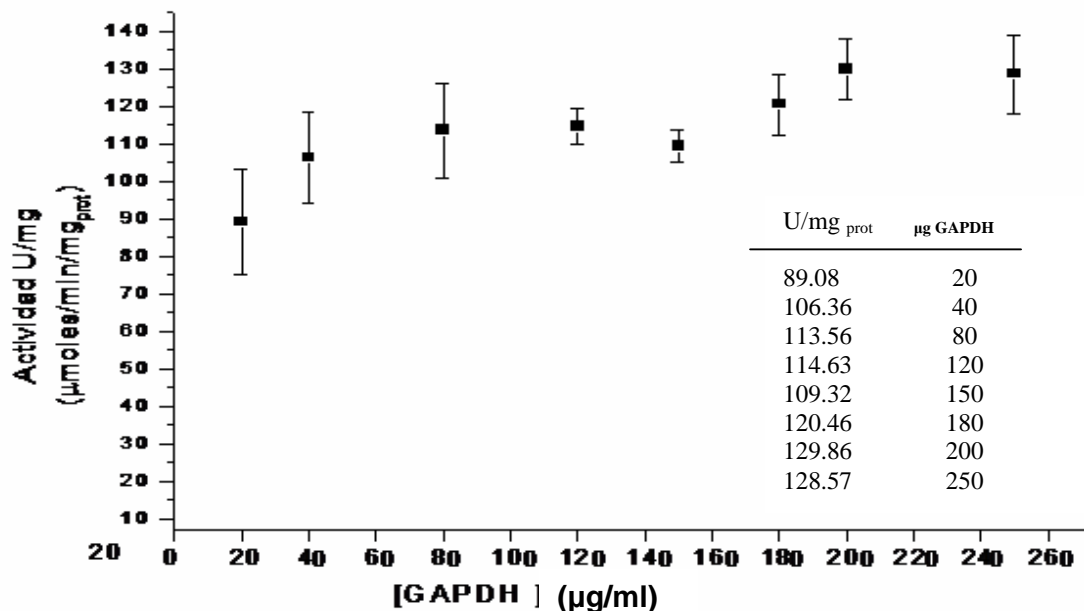


Fig. 33 Curva de concentración de la enzima GAPDH (20, 40, 80,120, 150, 180, 200 y 250 µg) contra la actividad específica. Se observa que a medida que aumenta la concentración de la GAPDH, aumenta la actividad de la PGK en el ensayo acoplado. Ensayo por triplicado.

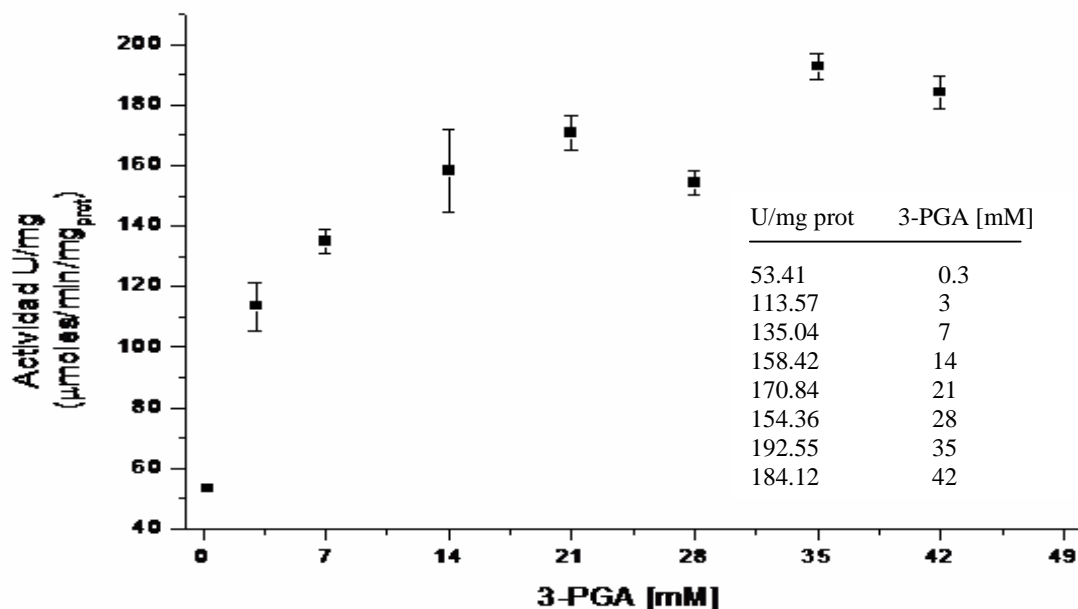


Fig. 34 Curva de concentración del sustrato 3-PGA (0.3, 3, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 mM) contra la actividad específica. Se observa que a medida que se aumenta la concentración del sustrato, aumenta la actividad de la PGK en el ensayo acoplado. Ensayo por triplicado.

Tabla 16. Concentraciones óptimas donde la enzima presenta la mejor actividad.

Sustrato o enzima	Concentración
GAPDH	150-180 $\mu\text{g/ml}$
3-PGA	35 mM
ATP	6 mM
MgCl ₂	5 mM
EDTA	3 mM

Estos resultados muestran que las concentraciones publicadas no eran las óptimas para nuestra enzima. Por ello se tuvo que determinar con estos experimentos las mejores condiciones para la actividad de la *TmPGK* y de la *TmPGKF223G*. Ambas proteínas presentaron la mejor actividad con las concentraciones mostradas en la tabla 16.

Con estas concentraciones se midió la actividad de las fracciones correspondientes a cada uno de los pasos de la purificación de la *TmPGKF223G* (ver tabla 13) y se hizo una comparación entre el método publicado y el modificado por nosotros. En la tabla 17 se muestran las actividades obtenidas usando las concentraciones óptimas de sustratos (ver tabla 16).

Tabla 17. Tabla de purificación de la *TmPGKF223G*. Se muestran las actividades con los dos protocolos de purificación usados: (1) Grättinger (1998), (2) Modificado (ver Fig. 17).

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Actividad total ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	% Rendimiento
Sonicado (1, 2)	133.16	5.89	784.33	100
Sobrenadante (1)	83.40	9.15	763.11	97.29
DNAasa (1)	82.35	8.21	676.09	86.19
80°C (1)	82.3	6.32	520.13	66.31
Centrifugado (1)	27.06	20.35	550.67	-
Diálisis (1)	16.72	28.19	471.33	60.09
80°C (2)	38.5	17.72	682.22	86.98
Centrifugado (2)	14.43	40.58	585.65	-
Diálisis (2)	13.52	38.12	515.53	65.72
Q-sepharosa (1)	1.99	80.73	161.05	20.53
Q-sepharosa (2)	3.04	99.63	303.37	38.67

A pesar de obtener mayores actividades con las enzimas purificadas con las concentraciones óptimas, las actividades no se comportan al 100% como las publicadas. Esto posiblemente se deba al cambio realizado en la proteína (incorporación del codón de paro, para obtener una proteína monomérica). Sin embargo, la actividad en ambas proteínas fue adecuada y permitió continuar con los experimentos restantes.

6.5.2 Ensayo de síntesis de ATP

Para llevar a cabo el ensayo de síntesis de ATP, se usó como referencia el protocolo establecido por Bücher (ver tabla 8) (Fig. 35) y las condiciones experimentales de Saavedra (Saavedra *et al.*, 2005).

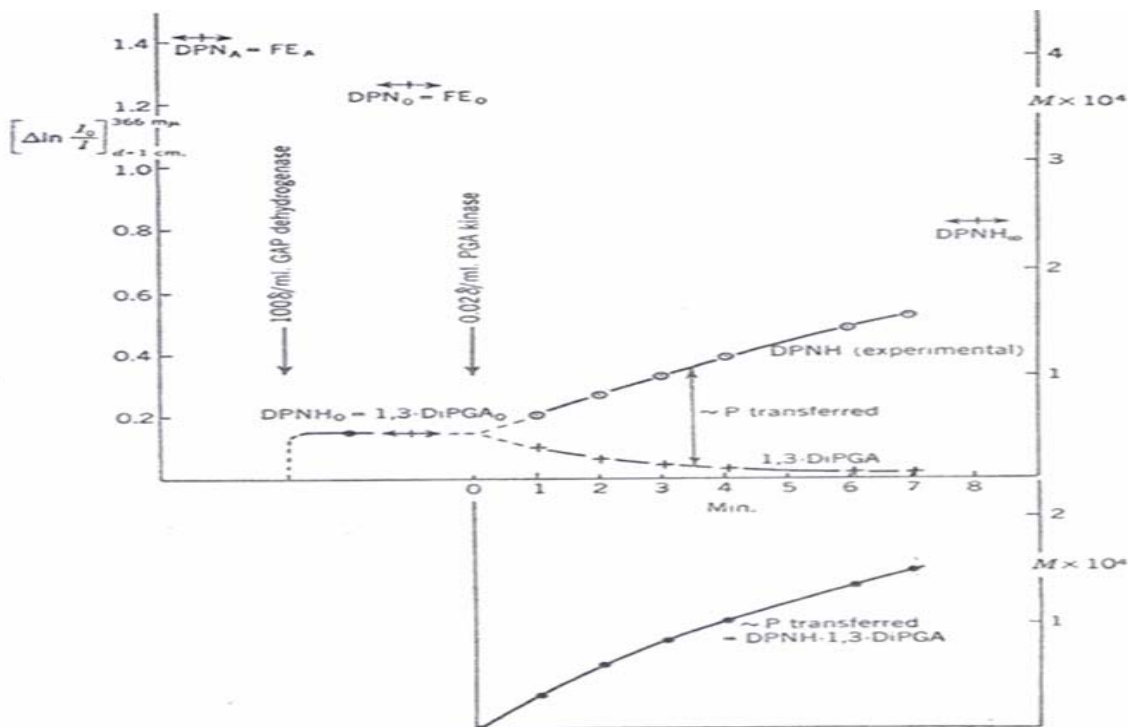


Fig. 35 Ensayo de síntesis de ATP. La aparición de NADH (DPNH en la figura), está directamente relacionada con la transferencia del grupo fosfato del 1, 3- bifosfoglicerato al ADP, formando así ATP (Bücher, 1947).

En los ensayos iniciales siguiendo las condiciones experimentales publicadas (Tabla 8) la actividad obtenida fue muy baja. Se pensó que las concentraciones de sustratos no eran las óptimas y la proteína no alcanzaba su

actividad máxima, por lo que se decidió hacer curvas de concentración de los sustratos. Como se mencionó, en este ensayo la enzima GAPDH está acoplada a la PGK, ya que ésta es la encargada de producir el sustrato necesario (con el sustrato gliceraldehído-3-fosfato (G3P), mediante la enzima GAPDH y grupos fosfatos (Pi) se produce el 1, 3-bifosfoglicerato) para la transferencia del grupo fosfato al ADP y de esta forma producir ATP y 3-fosfoglicerato.

Se ensayó diversas concentraciones de los sustratos G3P, Pi, ADP, EDTA, MgCl₂ y la enzima acoplante GAPDH. En las tablas 18, 19 y 20, se muestran los resultados obtenidos con estos 3 sustratos. A manera de resumen en la tabla 21 se muestran las concentraciones. Estos experimentos se hicieron utilizando Tris 100 mM, pH 7.5.

Tabla 18. Curva de concentración del sustrato G3P. Experimento por triplicado.

G3P (mM)	U/mg _{prot}
0.5	45.78 ± 2.26
1	51.65 ± 1.99
1.5	52.03 ± 0.45
2	49.39 ± 2.46

Tabla 19. Curva de concentración de Pi. Experimento por triplicado.

Pi (mM)	U/mg _{prot}
3	48.71 ± 0.755
6	59.19 ± 1.58
12	57.22 ± 1.66

Tabla 20. Curva de concentración de ADP. Experimento por triplicado.

ADP (mM)	U/mg _{prot}
0.1	19.75 ± 2.17
0.25	56.99 ± 3.98
0.5	78.3 ± 5.8
1	84.45 ± 14.71
3	69.51 ± 4.42
6	54.25 ± 2.85
12	22.72 ± 1.98

Tabla 21. Concentraciones de los sustratos donde la enzima presenta la mejor actividad.

Sustrato y Enzima	Concentración
G3P	1 mM
ADP	0.5 mM
MgCl ₂	5 mM
Pi	6 mM
EDTA	1 mM
GAPDH	180 µg/ml
Tris 100 mM, pH 7.5 a 40°C	

Habiendo determinado las concentraciones para el ensayo en sentido derecho, usando Tris 100 mM, pH 7.5, se repitió el experimento usando amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5, sin Pi (Tabla 20). La actividad máxima obtenida con amortiguador Tris 100 mM, pH 7.5 fue de 78.3 ± 5.8 U/mg_{prot.}, pero al usar fosfatos 50 mM, pH 7.5 la actividad aumentó considerablemente a 110.39 ± 7.52 U/mg_{prot.}. Con estas condiciones (Tabla 22), la actividad de la PGK aumentó favorablemente, por lo que los subsiguientes experimentos se hicieron conforme a esta última.

Tabla 22. Concentraciones finales con las cuales la enzima presenta la mejor actividad.

Sustrato y Enzima	Concentración
G3P	1 mM
ADP	0.5 mM
MgCl ₂	5 mM
EDTA	1 mM
GAPDH	180 µg/ml
Fosfato 50 mM, pH 7.5 a 40°C	

Se ha descrito que la actividad obtenida en los ensayos en sentido de la síntesis de ATP es aproximadamente 3 veces mayor que la obtenida en el ensayo inverso (defosforilación de ATP) (Bücher, 1947; Saavedra *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en nuestros ensayos se pueden explicar por los siguientes factores:

1. Uno de los factores que determinan o no que la *Tm*PGK cuente con una buena actividad catalítica, es la presencia de temperaturas elevadas (de 40 a 80°C aproximadamente, donde a 40°C se obtiene la mitad de su actividad máxima) (Schurig *et al.*, 1995), ya que esta proteína es una enzima termoresistente que se aisló de la bacteria *Thermotoga maritima*.
2. Al bajar la temperatura en los ensayos cinéticos, la actividad de la proteína baja considerablemente pero esto permite que los sustratos usados (sensibles a temperatura) sean más estables. Sin embargo, al elevar la temperatura del ensayo para obtener mejores actividades, los sustratos son inestables impidiendo de esta forma que la proteína pueda hacer uso de ellos eficientemente. Se sabe que el sustrato 1, 3-bifosfoglicerato, que es el encargado de donar el grupo fosfato al ADP y formar así ATP es sumamente inestable (Jakeman *et al.*, 1998) lo que implicaría que con temperaturas elevadas sería más inestable y no se llevaría a cabo la transferencia del grupo fosfato eficientemente por la degradación de este sustrato antes de llevar a cabo la reacción.

De tal forma que con estas condiciones, es de esperarse que la actividad de la proteína no fuese la máxima que alcanzaría en condiciones óptimas: temperaturas elevadas (80°C) y estabilidad de sustratos. Por lo que, habiendo explicado esto, se esquematiza lo que puede suceder en el ensayo de síntesis de ATP por las características de la proteína y sus sustratos:

> Temperatura	> Actividad de la proteína
> Temperatura	< Estabilidad de los sustratos
< Temperatura	< Actividad de la proteína
< Temperatura	> Estabilidad de los sustratos

6.5.3 Ensayo de defosforilación de N⁶-bencil-ATP

Para observar el comportamiento de las enzimas *Tm*PGK y *Tm*PGKF223 usando el análogo de ATP, N⁶-bencil-ATP, se hicieron experimentos basados en las condiciones óptimas descritas anteriormente (Tabla 15) y de esta forma

comparar la actividad obtenida con ATP y su análogo. En la tabla 23, se muestran las actividades comparativas de las proteínas silvestre y mutante usando N⁶-bencil-ATP y ATP.

Tabla 23. Actividades específicas comparativas con ATP y N⁶-bencil-ATP en las enzimas silvestre y mutante. B-ATP = N⁶-bencil-ATP.

Enzima	<i>Tm</i> PGK		<i>Tm</i> PGKF223G	
	ATP	B-ATP	ATP	B-ATP
6 mM				
U/mg _{prot}	144.4 ± 2.3	33.49 ± 3.05	118.28 ± 1.89	55.81 ± 0.7
% Actividad	100%	23%	100%	47%

Con estos resultados observamos que, a pesar de mantenerse una mejor actividad en ambas proteínas con ATP que con N⁶-bencil-ATP la diferencia entre la enzima silvestre y la mutante se comportó como se esperaba. Recordando la hipótesis de este trabajo, al hacer el cambio de un aminoácido grande por uno pequeño en un sitio cercano al de la unión de ATP (sin que este cambio afecte la actividad y afinidad), permitiría a la enzima mutante presentar una mejor actividad usando N⁶-bencil-ATP que el ATP y la enzima silvestre presentaría una mayor actividad con ATP que con N⁶-bencil-ATP. El grupo voluminoso del bencil-ATP no tendría impedimento estérico en la enzima mutante facilitando el acomodo del grupo bencilo del nucleótido en el sitio donde se encontraba el aminoácido voluminoso (Fig. 36).

De estos resultados concluimos que la enzima silvestre presentó una actividad 4 veces menor con N⁶-bencil-ATP que con ATP, mientras la enzima mutante solo 2 veces menor, apoyando parcialmente la hipótesis descrita anteriormente.

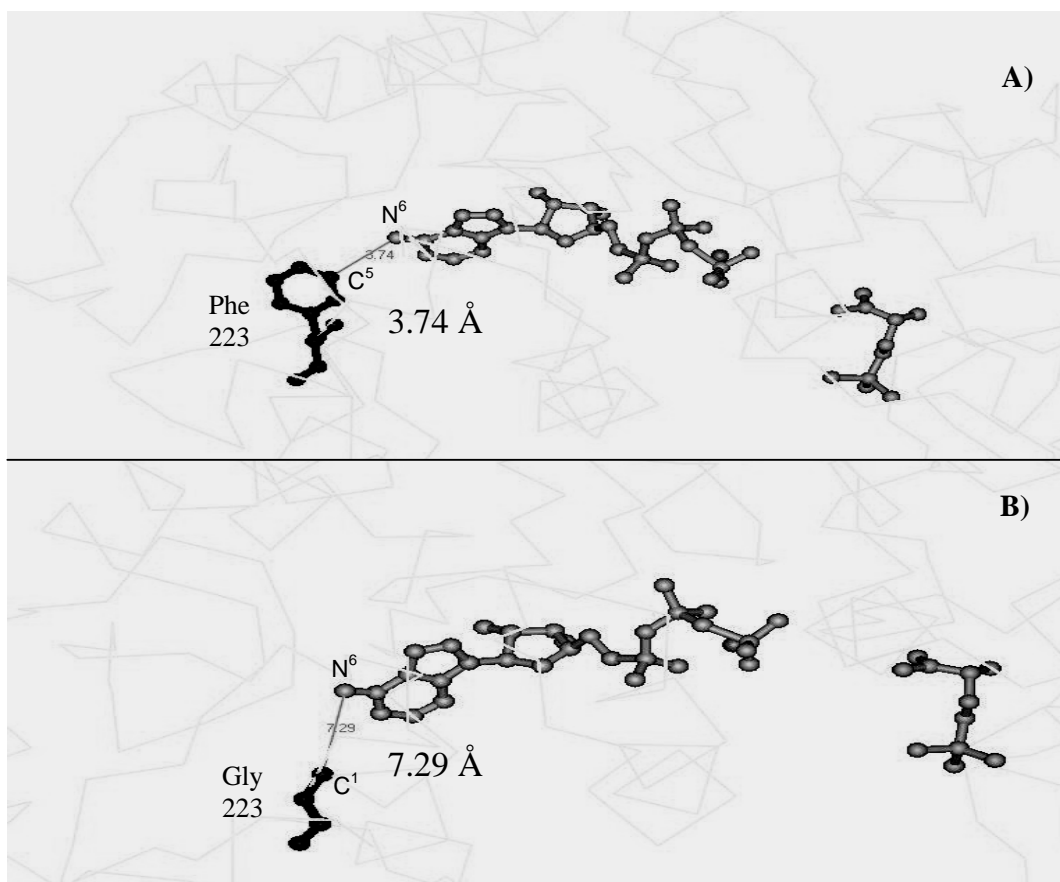


Fig. 36 Esquema de la región de la proteína *TmPGK* donde se muestra el cambio del residuo del aminoácido cercano al sitio de unión del ATP. A) Se muestra la distancia de 3.74 Å que hay entre el N⁶ del nucleótido y el C⁵ de la fenilalanina. B) Se muestra la ampliación (7.29 Å) en la distancia que hay entre el N⁶ del nucleótido y el C¹ de la glicina.

6.5.4 Ensayo de síntesis de N⁶-bencil-ATP y caracterización cinética

Con el fin de demostrar que la mutación en un residuo de aminoácido cercano al sitio de unión del ATP permite a la enzima mutante *TmPGKF223G* sintetizar el análogo del ATP, N⁶-bencil-ATP, se hicieron ensayos de síntesis del nucleótido usando N⁶-bencil-ADP con las condiciones descritas en la tabla 21. Así mismo se hizo una curva con N⁶-bencil-ADP en las enzimas silvestre y mutante para determinar los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y V_{max}/K_m . Las curvas de concentración y los parámetros cinéticos se muestran en la figura 37 y la tabla 24, respectivamente.

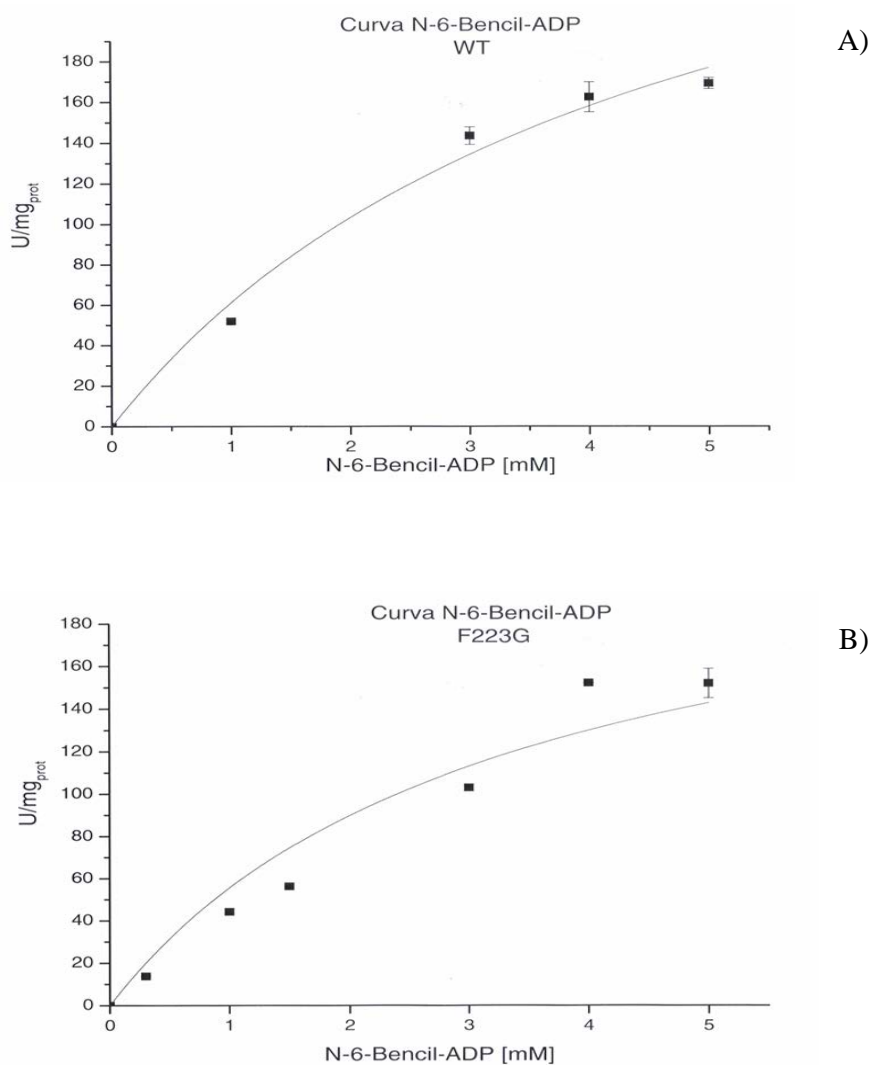


Fig. 37 Curvas de concentración del sustrato N⁶-bencil-ADP. A) Gráfica de concentración de sustrato (N⁶-bencil-ADP) contra la actividad específica de la enzima *TmPGK*. B) Gráfica de concentración de sustrato (N⁶-bencil-ADP) contra actividad específica de la enzima *TmPGKF223G*.

Tabla 24. Tabla de valores de *K_m*, *V_{max}* y *V_{max}/K_m* con N⁶-bencil-ADP como sustrato usando la ecuación de Michaelis-Menten. Los datos se calcularon por un ajuste de regresión no lineal.

Enzima	<i>K_m</i> (mM)	<i>V_{max}</i> (μmol/min)	<i>V_{max}/K_m</i> (min ⁻¹)
<i>TmPGK</i>	4.49	335.61	74.74
<i>TmPGKF223G</i>	3.22	234.84	72.93

Estos datos muestran que tanto la proteína silvestre como la mutante son capaces de utilizar el análogo del ATP. Se observa que la *TmPGKF223G* tiene mayor afinidad que la *TmPGK* para este sustrato, aunque la diferencia no es significativa. Estos resultados concuerdan con las publicaciones en la que se había observado que la serín/treonín cinasa Raf-1 silvestre era una enzima capaz de reconocer el N⁶-bencil-ATP como sustrato natural tanto como su enzima mutante (Hindley *et al.*, 2004).

Esto se puede explicar mediante el análisis de la secuencia de la *TmPGK* (Fig. 36), en la cual se puede ver que cerca del sitio donde se introdujo la mutación (F223G) se encuentran residuos de aminoácidos pequeños (Gly 18, Gly 19 y Ala 20) que producen naturalmente en la enzima silvestre una cavidad que permite el acomodo del grupo voluminoso del análogo del ATP. Se ha descrito, que el sustituyente N⁶-bencil puede rotar libremente permitiendo su acomodo dentro de las cavidades cercanas de la proteína haciéndolo accesible (Ulrich *et al.*, 2000).

Una diferencia que podemos observar en las secuencias de la *TmPGK* y de las cinasas c-Srv y c-Fyn, con las cuales se utilizó la misma estrategia de sustitución de un aminoácido grande por uno pequeño cerca del sitio de unión del nucleótido para conferir reconocimiento específico a los análogos del ATP que tienen grupos voluminosos (Shah *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998), es que en estas últimas los residuos de aminoácidos que se encuentran alrededor del sitio donde se hizo la mutación (posición 338 y 341, respectivamente) no son residuos pequeños (Tyr 335, Ile 336, Val 337) eliminando de esta forma la creación de un hueco natural que permita el acomodo del grupo N⁶-bencil u otro sustituyente del análogo del ATP (Fig. 38).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

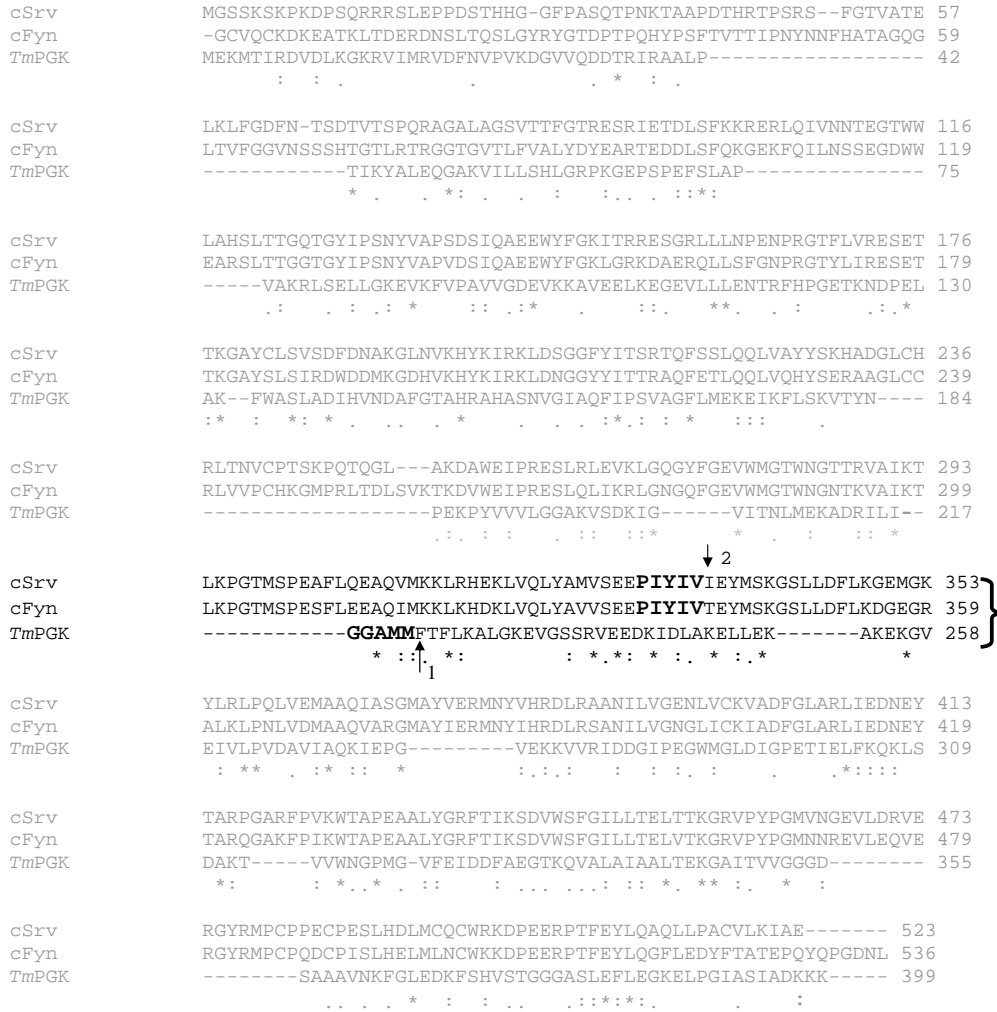


Fig. 38 Alineamiento múltiple en las secuencias de residuos de aminoácidos de las cinasa c-Srv, c-Fyn y TmPGK. Dentro del corchete se muestran los residuos de aminoácidos donde se realizó la mutación en las 3 proteínas. Las flechas marcan la posición exacta de la mutación y los residuos en negritas y de mayor tamaño, los residuos de aminoácidos que rodean a la mutación. La flecha (↑1) corresponde a la F223, y la flecha (↑2) corresponde (I338 y T341).

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró obtener el gen de la *Tm*PGK del genoma de *Thermotoga maritima* MSB8. Se incorporó un codón de paro para generar una proteína monomérica a partir de la fusión *Tm*PGK-TIM y se realizó con éxito la mutación *Tm*PGKF223G. Las enzimas silvestre y mutante se sobreexpresaron en un sistema bacteriano y se purificaron mediante centrifugaciones y el uso de temperaturas elevadas para eliminar las proteínas no específicas.

Dado que nuestra proteína no es idéntica a la publicada por otros grupos, la actividad enzimática medida fue baja por lo que fue necesario realizar una serie de experimentos de concentraciones de los distintos sustratos en los ensayos de síntesis y de defosforilación de ATP para establecer las condiciones óptimas de las enzimas.

Los ensayos realizados con los análogos del ATP, N⁶-bencil-ATP y N⁶-bencil-ADP indicaron que las enzimas silvestre y mutante son capaces de reconocerlos como sustratos. La *Tm*PGKF223G presentó mejor afinidad por el bencil-ATP que la enzima silvestre en el ensayo inverso. En el ensayo directo, no hubo diferencia significativa en la afinidad entre estas dos enzimas por el bencil-ADP.

8. PERSPECTIVAS

En general, la *Tm*PGK presentó actividades favorables en los ensayos de defosforilación de ATP, pero no sucedió lo mismo en los ensayos de síntesis de este nucleótido, así como del N⁶-bencil-ADP tanto en la enzima silvestre como en la mutante. Con las condiciones de temperatura utilizadas en estos ensayos se observó que las enzimas no alcanzaban su actividad máxima debido a la posible degradación de los sustratos a 40°C, por lo que es de interés seguir analizando diversas condiciones en los ensayos para determinar la temperatura a la cual las enzimas presentan una actividad favorable y de igual forma que los sustratos no sean susceptibles a una degradación.

Por otro lado, sería interesante corroborar la presencia de N⁶-bencil-ATP y N⁶-bencil-ADP y cuantificarlos con las condiciones hasta ahora establecidas mediante una cromatografía para los ensayos de síntesis y defosforilación de los nucleótidos.

Dado que la mutación en la posición F223G no resultó tan favorable para usar N⁶-bencil-ATP como se esperaba, ya que los nucleótidos bencilados también fueron reconocidos por la enzima silvestre, se podría hacer uso de nucleótidos más específicos (3-Metil-ATP) y voluminosos (N⁶-2-Feniletilamino-ATP) (Liu *et al.*, 1998; Hindley *et al.*, 2004) para la enzima *Tm*PGKF223G, y de igual forma se podría hacer el análisis de otros residuos de aminoácidos que podrían intervenir en la unión o acomodo favorable de estos análogos del ATP. Un posible candidato que se ha analizado al momento podría ser el residuo de aminoácido, Leu 194 que se encuentra cercano al sitio de unión del nucleótido.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. A. (2001). Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.*, 101: 2217-2290.
- Auerbach, G., Jacob, U., Grättinger, M., Schurig, H., Jaenicke, R. (1997). Crystallographic analysis of phosphoglycerate kinase from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biol. Chem.*, 378: 327-329.
- Banks, R. D., Blake, C. C. F., Evans, P. R., Haser, R., Rice, D. W., Hardy, G. W., Merrett, M., Phillips, A. W. (1979). Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature*, 279: 773-777.
- Ben-David, Y., Letwin, K., Tannok, L., Bernstein, A., Pawson, T. (1991). A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators. *EMBO J.*, 10: 317-325.
- Bernstein, B. E., Michel, P. A. M., Hol, W. G. J. (1997). Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. *Nature*, 385: 275-278.
- Bishop, A. C., Shan, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C., Shokat, K. (1998). Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Current Biol.*, 8: 257-266.
- Brown, M. T., Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochem. Biophys. Acta*, 1287: 121-149.
- Bryant, T. H., Watson, H. C., Wendell, P. L. (1974). Structure of yeast phosphoglycerate kinase. *Nature.*, 271: 626-630.
- Bücher, T. (1942). Isolierung und Kristallisation eines phosphatübertragenden Gärungsferments. *Naturwissenschaften*, 30: 756-767
- Bücher, T. (1947). Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. *Biochim. Biophys. Acta*, 1: 292-314.
- Davies, G. J., Gamblin, S. J., Littlechild., Dauter, J. A., Wilson, K. S., Watson, H. C. (1994). Structure of the ADP complex of the 3-

phosphoglycerate kinase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.65 Å. Acta Cryst., D50: 202-209.

- Davies, G. L., Gamblin, S. J., Littlechild, J. A., Watson, H. C. (1993). The structure of a thermally stable 3-phosphoglycerate kinase and a comparison with its mesophilic equivalent. Proteins: Struct. Funct. Genet., 15: 283-289.
- Erlich, H. A. (1989). Principles and applications for DNA amplification, en PCR technology (edn). Stockton Press, E. U.
- Fleming, T., Littlechild, J. (1997). Sequence and structural comparison of thermophilic phosphoglycerate kinase with a mesophilic equivalent. Comput. Biochem. Physiol. A Physiol., 118: 439-451.
- Flachner, B., Kovári, Z., Varga, A., Gurolya, Z., Vonderviszt, F., Náray-Szabó, G., Vas, M. (2004). Role of phosphate chain mobility of MgATP in completing the 3-phosphoglycerate kinase catalytic site: Binding, kinetic, and crystallographic studies with ATP and MgATP. Biochemistry 43: 3436-3449.
- Grättinger, M., Dankesreiter, A., Schurig, H., Jaenicke, R. (1998). Recombinant phosphoglycerate kinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: catalytic, spectral and thermodynamic properties. J. Mol. Biol., 280: 525-533.
- Graves, J. D., Krebs, E. G. (1999). Protein phosphorylation and signal transduction. Pharmacol. Ther., 82: 111- 21.
- Hanks, S., Quinn, A. M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features or primary structure and classification of family members. Methods Enzimol., 200: 38-62.
- Hess, D., Krüger, K., Knappik, A., Palm, P., Hensel, R. (1995). Dimeric 3-phosphoglycerate kinase from hyperthermophilic Archaea. Cloning, sequencing and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene of *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and characterization of the protein. Structural and functional comparison with the 3-phosphoglycerate kinase of *Methanothermus fervidus*. Eur. J. Biochem., 233: 227-237.

- Hindley, A. D., Park, S., Wang, L., Shah, K., Wang, Y., Hu, X., Shokat, K. M., Kolch, W., Sedivy, J. M., Yeung, K. C. (2004). Engineering the serine/threonine protein kinase Raf-1 to utilise an orthologue of ATP substituted at the N⁶ position. *FEBS lett.*, 556: 26-34.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell*, 80: 225-236.
- Jaenicke, R., Schurig, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R. (1996). Structure and stability of hyperstable proteins: Glycolytic enzymes from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Adv. Prot. Chem.*, 48: 181-269.
- Jakeman, D. L., Ivory, A.J., Williamson, M. P., Blackburn, G. M. (1998). Highly potent biphosphonate ligands for phosphoglycerate kinase. *J. Med. Chem.*, 41: 4439-4452.
- Jones, C., Fleming, T., Cowan, D. A., Litlechild, J. A., Piper, P.W. (1995). The phosphoglycerate kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus* overlap by 8 bp: isolation, sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 233: 800-808.
- Kamps, M. P., Sefton, B. M. (1988). Most of the substrates of oncogenic viral tyrosin protein kinase can be phosphorylated by cellular tyrosin protein kinase in normal cells. *Oncogene Res.*, 3: 105-115.
- Krietsch W. K., Bücher T. (1970). 3-phosphoglycerate kinase from rabbit skeletal muscle yeast. *Eur. J. Biochem.*, 17: 568-580.
- Larsson-Raznikiewics, M. (1970). Electrophoretic purification as well as some physical and chemical characterizations of phosphoglycerate kinase from yeast. *Eur. J. Biochem.*, 15: 574-580.
- Larsson-Raznikiewics, M. (1970). The phosphoglycerate kinase reaction and its metal ion specificity. *Eur. J. Biochem.*, 17: 183-192.
- Larsson-Raznikiewics, M. (1971). Inhibition of phosphoglycerate kinase by products and product homologues. *Eur. J. Biochem.*, 22: 506-512.
- Lehninger (2000). Principles of biochemistry. 3a edit. W. H. Freeman and Company, New York. p. 537.

- Littlechild, J. A., Davies, G. J., Gamblin, S. J., Watson, H. C. (1987). Phosphoglycerate kinase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. FEBS lett., 225: 123-126.
- Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L., Shikat, K. M. (1998). Engineering Src family protein kinase with unnatural nucleotide specificity. Chemistry & Biology, 5: 91-101.
- May, A., Vas, M., Harlos, K., Blake, C. (1996). 2.0 Å Resolution structure of a ternary complex of pig muscle phosphoglycerate kinase containing 3-phospho-D-glycerate and the nucleotide Mn adenylylimidodiphosphate. Proteins: Strut. Funct. Genet., 24: 292-303.
- McPhillips, T. M., Hsu, B. T., Sherman, M. A., Mas, M. T., Rees, D. C. (1996). Structure of the R65Q mutant of yeast 3-phosphoglycerate kinase complex with Mg-AMP-PNP and 3-phosphoglycerate. Biochemistry, 35: 4118-4127.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Lihner, K. D., Garret, M. M., *et al.* (1999). Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. Nature 399: 323-329.
- Pickover, C. A., McKay, D. B., Engelman, D. M., Steitz, T. A. (1979). Substrate binding closes the cleft between the domains of yeast phosphoglycerate kinase. J. Biol. Chem., 254: 11323-11329.
- Roustan, C., Fattoum, A., Jeanneau, R., Pradel, L. A. (1980). Yeast 3-phosphoglycerate kinase: sulfate and substrate binding, their effect on the conformational state of the enzyme. Biochemistry, 19: 5268-5175.
- Saavedra, E., Encalada, R., Pineda, E., Jasso-Chávez, R., Moreno-Sánchez, R. (2005). Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. FEBS J., 272: 1767-1783.
- Schurig, H., Beaucamp, N., Ostendorp R., Jaenicke, R., Adler, E., Knowles, J. R. (1995). Phosphoglycerate kinase and triosephosphate

isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* form a covalente bifunctional anzyme complex. EMBO J., 14: 442-451.

- Scopes, R. K. (1973) en Boyer, P. D. (ed). The enzymes, 3a edit. Vol. 8 Academic Press, New York, pp. 335-351.
- Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C., Shokat, K. (1997). Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94: 3565-3570.
- Shokat, K. M. (1995). Tyrosine kinases: modular signaling enzymes with tunable specificities. Chem. Biol., 2: 509-514.
- Szilágyi, A, Vas, M. (1998). Anion activation of 3-phosphoglycerate kinase requires domain closure. Biochemistry 37: 8551-8563.
- Szilágyi, A., Ghosh, M., Garman, E., Vas, M. (2001). A 1.8 Å resolution structure of pig muscle 3-phosphoglycerate kinase with bond MgADP and 3-phosphoglycerate in open conformation: new insight into the role of the nucleotide in domain closure. J. Mol. Biol., 306: 499-511.
- Tanswell, P., Westhead, E. W., Williams, R. J. (1976). Nuclear-magnetic-resonance study of the active-site structure of yeast phosphoglycerate kinase. Eur. J. Biochem., 63: 249-262.
- Taylor, S. J., Shalloway, D. (1993). The cell cycle and c-Src. Cur. Opin. Genet., 3: 26-34.
- Ulrich, S. M., Buzko, O., Shah, K., Shokat, K. (2000). Towards the engineering of an orthogonal protein kinase/nucleotide triphosphate pair. Tetrahedron, 56: 9495-9502.
- Wassenberg, D., Wuhrer, M., Beaucamp, N., Schurig, H., Wozny, M., Reusch, D., Fabry, S., Jaenicke, R. (2001). Local variability of the phosphoglycerate kinase- triosephosphate isomerase fusion protein from *Thermotoga maritima* MSB 8. Biol. Chem., 382: 693-697.
- Watson, H. C., Littlechild, J. A. (1990). Isoenzymes of phosphoglycerate kinase: evolutionary conservation of the structure of this glycolytic enzyme. Biochem. Soc. Trans., 18: 187-190.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Yoshida, A., Watanabe, S., Chen, S. H., Giblett, E. R., Malcolm, L. A. (1972). Human phosphoglycerate kinase II. Structure of a variant enzyme. *J. Biol. Chem.*, 24: 446-449.
- Yu, H., Rosen, M. K., Shin, T. B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J. S., Schreiber, S. L. (1992). Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science*, 258: 1665-1668.