



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

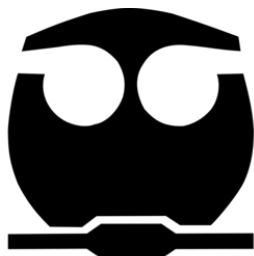
**DETERMINACIÓN DE LOS ENSAMBLES
CUATERNARIOS DE UNA PROTEÍNA TIPO
*MORPHEEIN***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

BRENDA BENÍTEZ FUENTES



CIUDAD DE MÉXICO

2024



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
VOCAL: Profesor: CESAR LUIS CUEVAS VELAZQUEZ
SECRETARIO: Profesor: NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG
1er. SUPLENTE: Profesor: EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ
2° SUPLENTE: Profesor: GENARO JIMÉNEZ REYES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 7 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS DEL INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG

Nuria S.P

SUSTENTANTE:

BRENDA BENÍTEZ FUENTES

B.F.

Agradecimientos

Dedicado principalmente a la mujer más fuerte que conozco, mi madre Leticia. Gracias por levantarte cada mañana y esperarme cada noche, gracias por todo lo que haces por mí. Te amo inmensamente.

A mis hermanos, Susana y Daniel, por su apoyo y amor incondicional. A mi sobrino Mateo, por llenarme de felicidad con su llegada.

A mis padrinos Raymundo y Virginia y a mi tía Verónica, por apoyarme desde la preparatoria, y alentarme siempre, son mi segundo hogar. De corazón gracias por todo.

Gracias a todo el equipo del laboratorio BQ7, especialmente a la Dra. Nuria y a la Dra. Abril, por enseñarme, apoyarme y ayudarme. Son unas grandes investigadoras y sin duda unas grandes personas. También gracias a mi compañero y gran amigo Juan Pablo quien ha sido un apoyo incondicional en muchos sentidos, te quiero mucho.

Gracias a todos mis amigos que siempre me han alentado a seguir desde que entré a la facultad. Por ustedes me llevo los mejores recuerdos de todos esos años, y aunque cada uno tome su camino siempre los llevaré en el corazón.

En general gracias a todas las personas que confiaron y creyeron en mí, y que lo siguen haciendo.

Al financiamiento otorgado en el proyecto DGAPA-PAPIIT IN215122 “Entendiendo los cambios conformacionales en EFL1 y su impacto en el Síndrome de Shwachman-Diamond” para la realización de este trabajo.

Al LANEM- IQ (Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas) por facilitar el uso del equipo de difracción circular.

Índice de contenido

1.	<i>Introducción</i>	1
1.1.	Las proteínas.....	1
1.1.1.	Estructura de las proteínas	1
1.1.2.	Proteínas oligoméricas	7
1.2.	Regulación enzimática	12
1.2.1.	Alosterismo	12
1.2.2.	Modelo de Monod-Wyman-Changeux.....	13
1.2.3.	Modelo de Koshland-Nemethy-Filmer.....	15
1.3.	Morpheesins.....	16
1.3.1.	Porfobilinógeno sintasa: prototipo de <i>morpheein</i>	18
1.4.	HMG-CoA reductasas.....	20
1.5.	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	23
1.5.1.	Complejo <i>Burkholderia cenocepacia</i> (BCC).....	23
2.	<i>Antecedentes</i>	25
3.	<i>Hipótesis</i>	27
4.	<i>Objetivos</i>	27
4.1	Objetivo general	27
4.2	Objetivos particulares	27
5	<i>Metodología</i>	28
5.1	Reactivos químicos y materiales	28
5.1.1	Disoluciones y amortiguadores de pH	28
5.1.2	Medios de cultivo	30
5.2	Expresión recombinante de la proteína BcHMGR.....	30
5.3	Purificación de la proteína recombinante BcHMGR	31
5.4	Electroforesis de proteína en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	32
5.5	Cuantificación de proteína por absorbencia a 280 nm	34
5.6	Electroforesis de proteína en condiciones nativas (<i>Blue-native</i>)	35
5.6.1	Electroforesis nativa con geles de acrilamida de gradiente 4-16%.....	35
5.6.2	Electroforesis nativa en geles de acrilamida al 10%	37
5.7	Cromatografía de exclusión molecular (SEC).....	38

5.8	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	40
6	<i>Resultados y discusión</i>	42
6.1	Expresión y purificación de la proteína recombinante BcHMGR.....	42
6.2	Electroforesis de proteína en condición nativa (Blue-native, BN-PAGE)	43
6.3	Cromatografía de exclusión molecular.....	46
6.4	Dicroísmo circular (CD)	58
7	<i>Conclusiones</i>	68
8	<i>Perspectivas</i>	68
9	<i>Referencias bibliográficas</i>	69

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de los aminoácidos.	2
Figura 2. Formación del enlace peptídico.....	3
Figura 3. Orientación de los residuos dentro de una estructura de tipo hélice α ... 4	4
Figura 4. Orientación de los residuos dentro de una estructura de tipo lámina β ... 5	5
Figura 5. Niveles de estructura que presentan las proteínas.	7
Figura 6. Oligomerización de la Acetil-coA Carboxilasa (ACC) de humano.....	10
Figura 7. Oligomerización de la Trifosfato de citidina sintetasa (CTPS1) de E. coli.	11
Figura 8. Modelo Monod-Wyman-Changeux (MWC) o concertado de la regulación alósterica enzimática.	14
Figura 9. Modelo de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF) o secuencial de la regulación alósterica enzimática.	16
Figura 10. Representación de un equilibrio de proteínas dinámicas tipo morpheein.	18
Figura 11. Representación del equilibrio estructural de la PBGS de plantas.....	19
Figura 12. Estructuras de las HMGR clase I y II.	21
Figura 13. Estructura de la HMGR-CoA reductas de B. cenocepacia.	26
Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE de la purificación de la proteína recombinante BcHMGR.....	42
Figura 15. Electroforesis Blue-native de la BcHMGR a diferente fuerza iónica....	45
Figura 16. Calibración de las columnas utilizadas en las cromatografías de filtración en gel.	48
Figura 17. Perfiles de exclusión molecular de la proteína BcHMGR en un amortiguador con alta fuerza iónica a diferentes pH.	50
Figura 18. Perfiles de exclusión molecular de la proteína BcHMGR en un amortiguador con baja fuerza iónica a diferentes pH.	52
Figura 19. Valores de radio hidrodinámico (R_h) de los ensamblajes diméricos de la BcHMGR.	54

Figura 20. Abundancia relativa del dímero globular respecto del oligómero de alto peso en función del pH y la concentración de proteína a alta fuerza iónica (300 mM NaCl).	56
Figura 21. Abundancia relativa del dímero elongado respecto del hexámero en función del pH y la concentración de proteína a baja fuerza iónica (50 mM NaCl).	57
Figura 22. Espectros de dicroísmo circular representativos de estructuras secundarias en proteínas.	58
Figura 23. Dicroísmo circular y curvas de desnaturalización térmica de la proteína BcHMGR en 300 mM NaF.	60
Figura 24. Dicroísmo circular y curvas de desnaturalización térmica de la proteína BcHMGR en 20 mM NaF.	61
Figura 25. Comparación de los espectros de dicroísmo circular de la proteína BcHMGR en alta y baja sal.	62
Figura 26. Función de distribución de pares (P(r)) para diferentes formas de partícula en solución.	65
Figura 27. Cromatografías de exclusión molecular acoplado a dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SEC-SAXS) de la BcHMGR.	66
Figura 28. Equilibrio tipo morpheein planteado para la BcHMGR.	67

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de soluciones y amortiguadores usados en este trabajo....	28
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo usados en este trabajo.....	30
Tabla 3. Composición del gel separador al 10% y del gel concentrador para electroforesis SDS-PAGE.....	33
Tabla 4. Preparación de muestras para las electroforesis nativas usando diferentes cantidades de proteína BcHMGR.....	36
Tabla 5 Preparación de muestras para las electroforesis nativa en presencia de sustratos y cofactor de la proteína BcHMGR.	36
Tabla 6. Preparación de amortiguador de ánodo para electroforesis nativa.....	37
Tabla 7. Preparación de amortiguador de cátodo para electroforesis nativa.....	37
Tabla 8. Composición del gel separador al 10% y del gel concentrador para electroforesis no desnaturalizante casera.	37
Tabla 9. Características de la columna Yarra® SEC-2000.	38
Tabla 10. Características de la columna Superdex® 200 Increase 3.2/300.	39
Tabla 11. Calibración de la columna Yarra® SEC-2000.	47
Tabla 12. Calibración de la columna Superdex® 200 Increase 3.2/300.	47
Tabla 13. Especies oligoméricas de la BcHMGR encontradas por medio de cromatografías de exclusión molecular a 300 mM NaCl.	49
Tabla 14. Especies oligoméricas de la BcHMGR encontradas por medio de cromatografías de exclusión molecular a 50 mM NaCl.	51
Tabla 15. Valores de radio hidrodinámico (R_h) de las especies diméricas de la proteína BcHMGR.	53
Tabla 16. Valores de radio hidrodinámico (R_h) de la especie hexamérica de la proteína BcHMGR.....	54
Tabla 17. Temperaturas medias de desnaturalización de la proteína BcHMGR a diferente fuerza iónica y diferentes valores de pH.....	61

Abreviaturas

ACC	Acetil CoA carboxilasa
FASN	Ácido graso sintasa
CTPS1	Trifosfato de citidina sintetasa
MWC	Modelo de Monod-Wyman-Chageux
KNF	Modelo de Koshland-Nemethy-Filmer
GlcN6P	Glucosamina 6-fosfato
GlcNA6P	N-acetilglucosamina 6-fosfato
GlcNol6P	Glucitolamina 6-fosfato
PBGS	Porfobilinógeno sintasa
ALA	5-aminolevulinato
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
CoA	Coenzima A
Bcc	Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>
FQ	Fibrosis Quística
CGD	Enfermedad granulomatosa crónica
BcHMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
PDB	Protein Data Bank
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín 5-trifosfato
BME	β -mercaptoetanol
DTT	1,4-ditiotreitol
LB	Medio Luria-Bertani

OD _{600nm}	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TEV	Proteasa del virus de grabado del tabaco
CV	Volumen de columna
TEMED	Tetrametilendiamina
PSA	Persulfato de amonio
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
V _T	Volumen total disponible para la fase móvil de la columna
V ₀	Volumen muerto
V _e	Volumen de elución
T _e	Tiempo de elución
R _h	Radio hidrodinámico
MW	Peso molecular
K _{av}	Relación entre el volumen de elución y el volumen total
BN-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo azul
CD	Dicroísmo circular
UV	Ultravioleta
T _m	Temperatura media de desnaturalización
SAXS	Dispersión de rayos X de ángulo reducido
D _{max}	Dimensión máxima
R _g	Radio de giro

Resumen

La regulación alostérica es una de las múltiples maneras por la cual puede ser modulada la actividad enzimática de una proteína favoreciendo la formación de una estructura en estado activo o inactivo, dependiendo del ambiente celular en el que se encuentre. Las *morpheins* son un tipo de proteínas dinámicas que adoptan diferentes estados oligoméricos a partir de una misma secuencia primaria, sin embargo, estos diferentes oligómeros no están en equilibrio ya que se disocian a un ensamble de menor multiplicidad seguido de un cambio conformacional para finalmente reasociarse en una estructura cuaternaria diferente. Dichas transiciones entre los ensamblajes oligoméricos son modulados alostéricamente por cambios en el ambiente en el que se encuentren o por la interacción con ligandos.

La bacteria Gram negativa, *Burkholderia cenocepacia* es particularmente peligrosa para los pacientes con fibrosis quística ya que puede causar severas complicaciones que generalmente son fatales. Éste patógeno oportunista expresa la proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (BcHMGR) que se ha descrito como una proteína tipo *morpheein*. La actividad enzimática de esta proteína está implicada en la biosíntesis de colesterol y otros isoprenoides usando NAD^+ como aceptor de hidruros al oxidar mevalonato. Mediante el uso de cromatografía de exclusión molecular y electroforesis nativa se identificaron diferentes oligómeros que adopta BcHMGR, y que corresponden a un monómero, dos dímeros de diferente conformación (globular y elongado), un hexámero y un oligómero de alto peso molecular (alrededor de 14 subunidades). Además, se identificó que el entorno químico juega un papel importante en la formación de estos ensamblajes, tal que a alta fuerza iónica se favorece el dímero globular y el oligómero de alto peso molecular, mientras que en condiciones de baja fuerza iónica se favorece el dímero elongado y el hexámero. Por medio de espectroscopia de dicroísmo circular se determinó que existe un cambio en el contenido de estructura secundaria entre los ensamblajes cuaternarios dímero globular-oligómero de alto peso molecular en comparación con el dímero elongado-hexámero, siendo los primeros más estables con valores de temperatura de desnaturalización más altas.

1. Introducción

1.1. Las proteínas

1.1.1. Estructura de las proteínas

Las proteínas se pueden describir como macromoléculas complejas que participan en múltiples procesos vitales entre los que se cuentan: conformación de la estructura celular, catálisis de reacciones enzimáticas, función hormonal, regulación de la expresión génica, homeostasis y transporte molecular. Sin importar la diversidad de funciones, todas las proteínas consisten en una cadena de veinte aminoácidos, por lo que se habla de estos como los componentes estructurales básicos de las proteínas [1].

La estructura canónica de un aminoácido consta de un centro de carbono denominado carbono α al cual se unen cuatro sustituyentes: un átomo hidrógeno, un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (-NH₂) y un grupo variable R conocido como "cadena lateral", único para cada aminoácido (**Figura 1A**) [2, 3]. Una excepción de esto es la prolina ya que su cadena lateral se une al nitrógeno del grupo amino formando así una amina secundaria o anillo pirrolidínico (**Figura 1B**) [2]. Son estas cadenas laterales las que brindan las propiedades fisicoquímicas a cada aminoácido y en consecuencia a cada proteína.

En general, los grupos -COOH y -NH₂ de todos los aminoácidos sufren equilibrios de protonación o deprotonación, pudiéndose encontrar en tres formas distintas: catión, zwitterión y anión (**Figura 1C**). Sin embargo, ciertos aminoácidos presentan grupos ionizables en su cadena lateral, por lo que esta protonación o deprotonación también se puede suscitar en dichos aminoácidos, otorgándole características ácidas o básicas.

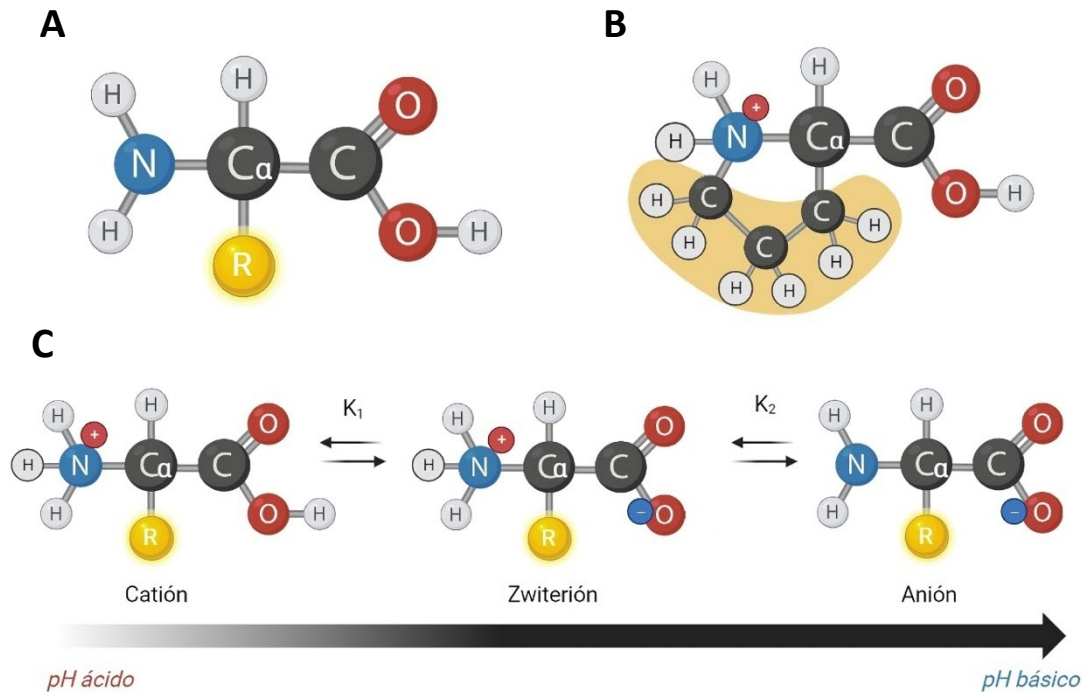


Figura 1. Estructura de los aminoácidos. (A) Estructura canónica de los aminoácidos. (B) Estructura del aminoácido prolina, delimitado en color amarillo la cadena lateral que forma el anillo pirrolidínico al unirse al grupo $-NH_2$. (C) Equilibrio ácido-base que presentan los aminoácidos dependiendo del pH. Figurada elaborada en BioRender.

Los 20 aminoácidos naturales, con su código de tres y una letra, son: alanina (Ala, A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (Iso, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptófano (Trp, W), tirosina (Tyr, Y) y valina (Val, V). La forma en la que estos aminoácidos se unen entre sí es mediante la formación de enlaces peptídicos, en donde el grupo $-COOH$ de un aminoácido se une con el grupo $-NH_2$ del siguiente aminoácido por medio de una reacción de condensación [3] (Figura 2). De este modo se crea una cadena lineal de aminoácido unidos, denominados residuos una vez que están incorporados a la cadena polipeptídica, esto para distinguir entre la forma libre y la forma unida [1]. Por convención, la secuencia lineal de residuos

resultantes se lee del dominio $-NH_2$ al dominio $-COOH$, dando como resultado la estructura primaria de una proteína.

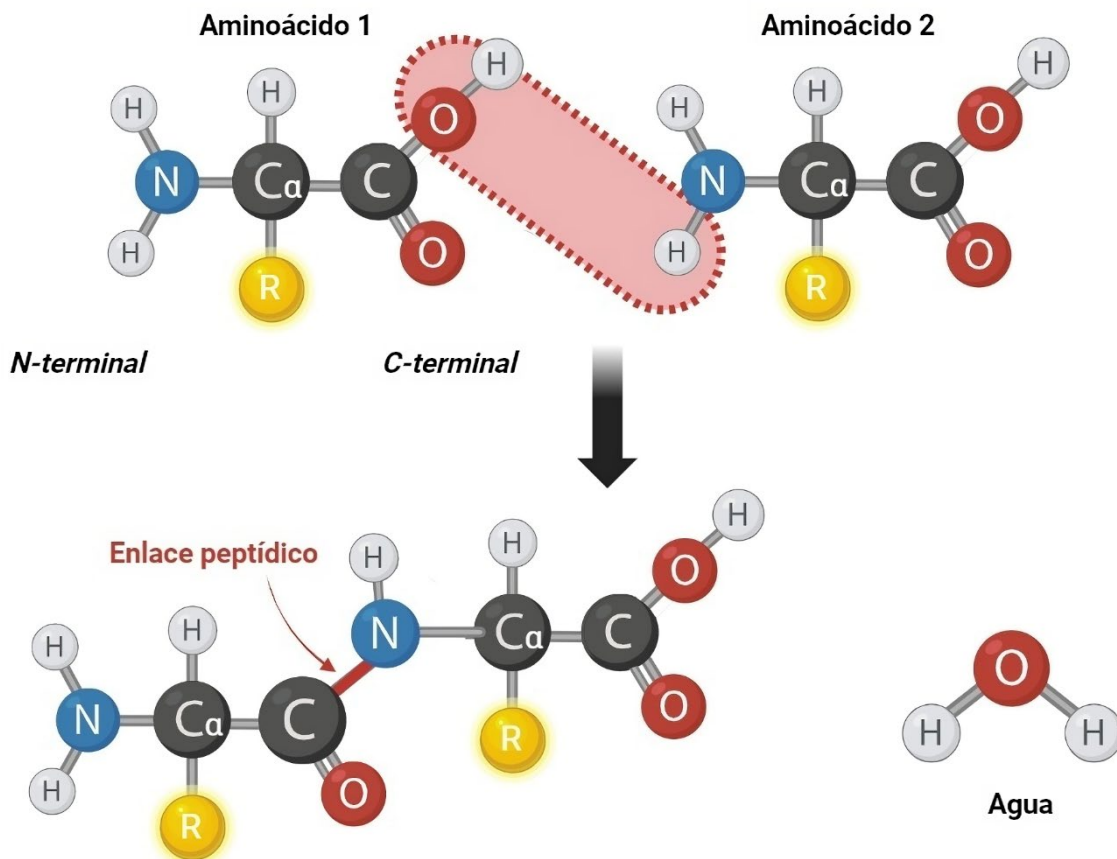


Figura 2. Formación del enlace peptídico. Enlace entre el grupo $-COOH$ de un aminoácido con el grupo $-NH_2$ del siguiente aminoácido. Figura elaborada en BioRender.

Este esqueleto peptídico puede enrollarse sobre su mismo eje longitudinal, formando una estructura helicoidal hacia la derecha, denominada como hélice α . Dicha hélice mantiene su estructura mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno del dominio $-COOH$ de un residuo y el átomo de hidrógeno del dominio $-NH_2$ de otro residuo situado a cuatro aminoácidos de distancia en la cadena, con las cadenas laterales apuntando hacia el exterior de la hélice (Figura 3). Formando parte de este tipo de hélices se pueden encontrar cualquiera de los aminoácidos excepto a la prolina dado que, como fue mencionado anteriormente, este aminoácido es cíclico por lo que no tiene libertad

de giro como los demás residuos, causando que en la mayoría de los casos este aminoácido interrumpa la conformación de hélices α [4]. También se tiene registrado que el residuo de glicina desempeña un papel en el inicio y la propagación de la hélice α cualquier otro residuo diferente a la glicina que se encuentre en el dominio -COOH puede terminar una hélice α al desviarse hacia regiones izquierdas del helicoide [5-7]. Aminoácidos cargados como lisina y ácido glutámico pueden desestabilizar la estructura helicoidal, aportando a la finalización de estas estructuras [4].

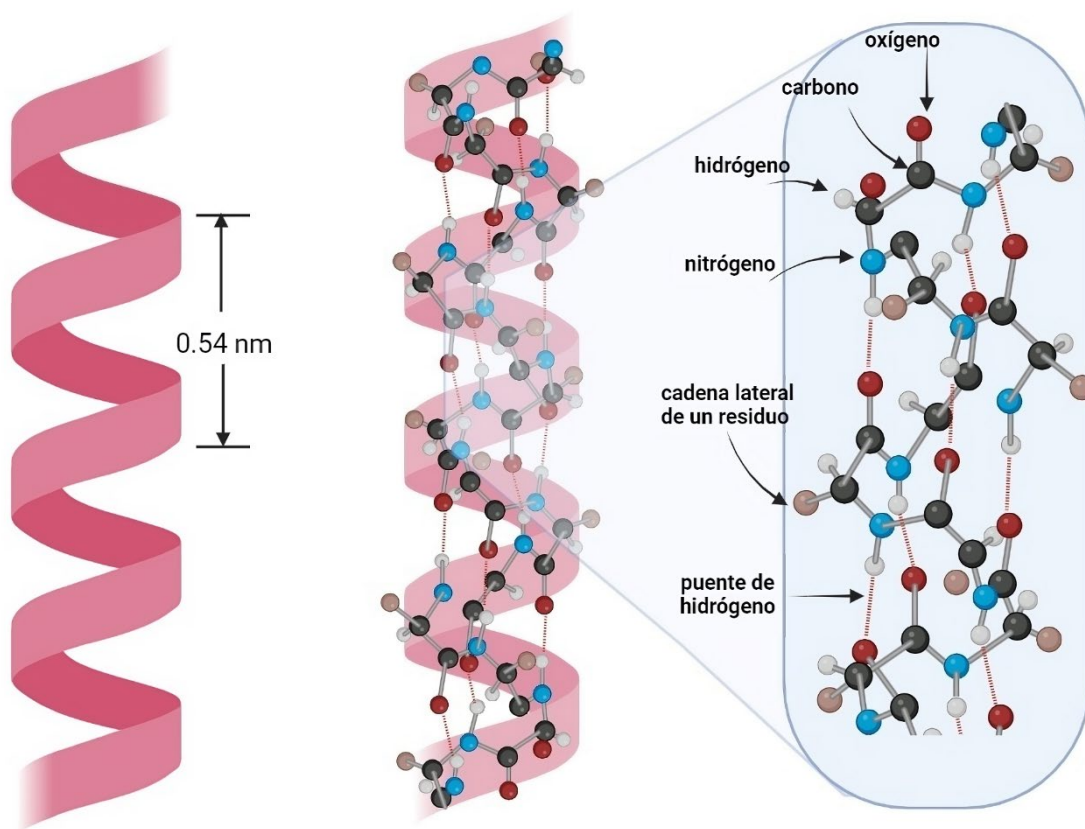


Figura 3. Orientación de los residuos dentro de una estructura de tipo hélice α . Las cadenas laterales de cada residuo se sitúan hacia afuera del helicoide. Figura elaborada en BioRender.

Otra conformación que puede adoptar la cadena polipeptídica se denomina hebra β , y ésta se da cuando la cadena principal se estira al máximo que le permiten los enlaces peptídicos, alternando las cadenas laterales hacia la izquierda y derecha de la cadena principal (**Figura 4**) [4]. Este tipo de hebras se pueden presentar en

varias regiones de la cadena polipeptídica, interaccionando entre sí mediante la formación de puentes de hidrógeno intracatenarios, dando lugar a estructuras laminares conocidas como laminas u hojas β . Cuando todas las hebras que componen una hoja β tienen el mismo sentido se le dice que es paralela, por el lado contrario, si tienen sentidos opuestos se le llama antiparalela [4]. Para poder cambiar el sentido de la cadena polipeptídica en las hojas β hay regiones cortas (aproximadamente de 3 a 4 residuos) conocidas como vueltas o giros β que ocasionan una reorientación de 180 grados en la cadena principal (Figura 4). Estudios de preferencia conformacional basadas en aminoácidos mostraron que algunos de los residuos que favorecen la formación de hojas β son serina, valina, isoleucina, y en menor medida treonina, mientras que en las vueltas β son la asparagina, glicina y prolina [4].

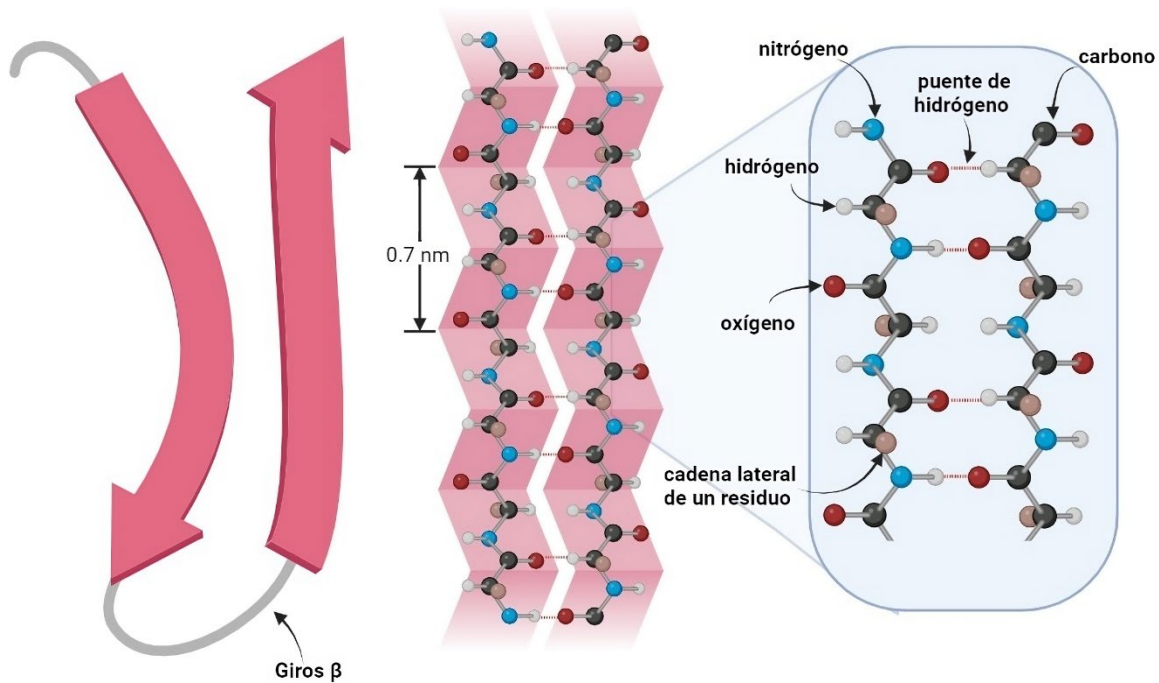


Figura 4. Orientación de los residuos dentro de una estructura de tipo lámina β . Las cadenas laterales de cada residuo se sitúan hacia la izquierda y derecha de la estructura. En este esquema se ejemplifica una estructura tipo lámina β antiparalela y la presencia de un giro β . Figura elaborada en BioRender.

Las hélices α , hebras y hojas β se conocen como estructuras secundarias. Puede presentarse una combinación de ambos tipos de estructura secundaria en una misma proteína o bien existen proteínas que son ricas en únicamente alguna de estas dos estructuras. Al acomodo espacial debido a la interacción de distintas regiones con hélices α y hojas β se clasifica como estructura terciaria dentro de la cual también se presentan regiones desestructuradas [8, 9]. Dentro de las interacciones que estabilizan la estructura terciaria de una proteína podemos encontrar enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos, fuerzas electrostáticas por la ionización de las cadenas laterales, interacciones de tipo hidrofóbico entre cadenas laterales apolares, fuerzas de van der Waals y también enlaces covalentes como puentes disulfuro entre dos residuos de cisteína (cistina) [4, 9]. Como resultado de estas interacciones la estructura terciaria de una proteína se pueden distinguir dos tipos de proteínas: globulares y fibrosas. Las proteínas globulares están en tal conformación que adoptan en una forma compacta, donde las regiones centrales tienen un carácter más hidrofóbico que las regiones que se encuentran expuestas al solvente [4, 10]. Por otro lado, las proteínas de tipo fibroso tienen estructuras longitudinales entre las que encontramos proteínas involucradas en brindar soporte, por ejemplo, proteínas de la matriz extracelular [4, 11].

Finalmente, existe un último nivel de estructuración llamado estructura cuaternaria la cual está dada por la interacción de más de una cadena polipeptídica; puede ser la misma proteína o de una diferente lo cual resulta en complejos macromoleculares generalmente de multiplicidad definida. A este tipo de estructura también se le conoce como oligómero [4]. Lo anteriormente descrito constituye los niveles de estructuración establecidos en las proteínas (**Figura 5**). Sin embargo, no todas las proteínas adoptan una estructura cuaternaria para formar oligómeros. Se estima que el 35% de las proteínas celulares son de naturaleza oligomérica, siendo la mayoría tetrámeros [12].

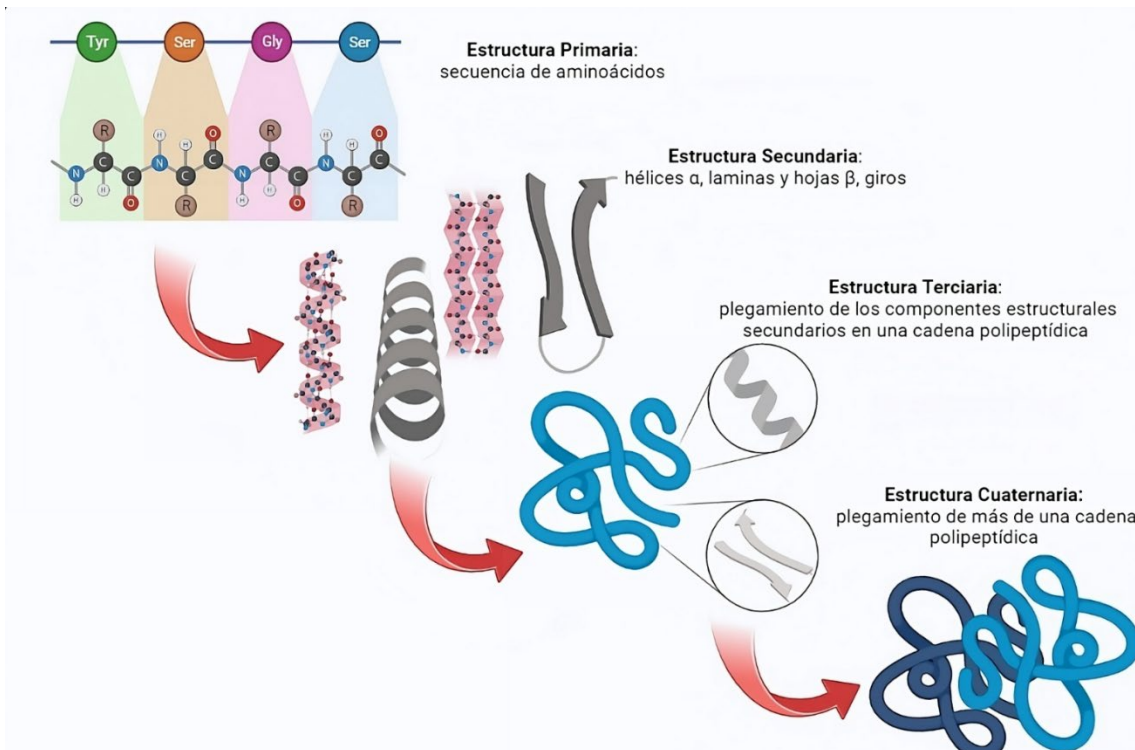


Figura 5. Niveles de estructura que presentan las proteínas. Figura elaborada en BioRender

1.1.2. Proteínas oligoméricas

Una forma de clasificar a las proteínas oligoméricas es haciendo una distinción por el tipo de subunidades que las componen: son hetero-oligómeros aquellos donde las subunidades son diferentes entre sí, y homo-oligómeros cuando las subunidades son de la misma identidad [13]. Un ejemplo de hetero-oligómero son los microtúbulos, proteínas del citoesqueleto encargadas del soporte estructural y de la segregación de los cromosomas en la división celular, los cuales están compuestos por dos subunidades diferentes de tubulina (tubulina α y β) [13, 14]. A la unidad mínima del oligómero (sea un monómero u otra multiplicidad) se les denomina “protómeros” los cuales se asocian entre sí hasta un número finito de subunidades idénticas [15]. Por ejemplo, la proteína Vpu es una fosfoproteína de membrana integral del VIH-1, que estructuralmente contiene un dominio transmembranal cerca del extremo $-\text{NH}_2$ y un dominio citoplasmático, la cual

puede oligomerizar ensamblando cinco subunidades idénticas de Vpu para finalmente formar estructuras pentaméricas semejantes a poros membranales por las cuales pueden pasar cationes selectivos [15, 16].

La formación de complejos macromoleculares depende de la asociación entre las subunidades, en donde la fuerza de la interacción establecida puede diferir y afectarse en respuesta a estímulos como el pH, fuerza iónica o temperatura. Por otro lado, hay proteínas que sólo oligomerizan mediante su unión con ligandos (e.g., otras biomoléculas, moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas) o por una modificación postraduccional. Un ejemplo de oligomerización dependiente de cambios en el entorno químico es el caso de la proteína chaperona Hsp31 de *Escherichia coli*, la cual oligomeriza a temperaturas arriba de 60°C, aumentando significativamente su actividad de chaperona [17].

La formación de complejos oligoméricos es común en proteínas con actividad enzimáticas como una forma de regulación funcional [18]. La especificidad de las enzimas resulta de la complementariedad del sustrato a un sitio específico de la proteína denominado como sitio activo, lugar donde se lleva a cabo la reacción catalítica [19]. Sin embargo, este sitio puede verse modificado cambiando su accesibilidad y/o especificidad por efecto de la oligomerización [20, 21]. Se tiene evidencia de que alteraciones en residuos de aminoácidos específicos pueden interrumpir la oligomerización de subunidades proteicas y aunque el origen del mecanismo de oligomerización aún no se comprende en su totalidad se piensa que a lo largo de la evolución hubo cambios en residuos de aminoácidos dentro de las proteínas los cuales ocasionaron este mecanismo [22]. Uno de los ejemplos más estudiados sobre el autoensamblaje de proteínas son las enzimas no citoesqueléticas formadoras de filamentos, siendo la Acetil-coA Carboxilasa (ACC, *Acetyl-CoA carboxylase*) una de las primeras enzimas identificadas en esta categoría [23, 24]. La ACC está presente en los mamíferos en dos isoformas, ACC1 (localizada en el citosol) y ACC2 (localizada en la membrana externa de las mitocondrias), compartiendo 75% de identidad en su secuencia de aminoácidos y la distribución estructural de sus dominios [25]. El monómero contiene tres

dominios catalíticos: un dominio de biotina carboxilasa (BC), un dominio carboxil transferasa (CT) y un dominio carboxilo de proteína portadora de biotina (BCCP) el cual une al dominio BC con el dominio CT (**Figura 6A**) [25]. Esta enzima cataliza la carboxilación de acetil-CoA para producir malonil-CoA, que a su vez es utilizado por la ácido graso sintasa (FASN, *fatty acid synthase*) para producir ácidos grasos saturados de cadena larga [25]. La presencia de citrato en el medio induce la polimerización de los protómeros, creando estructuras filamentosas catalíticamente activas con dimensiones de 70 - 100 Å de ancho y de hasta 5000 Å de largo (**Figura 6C**) [26]. Por el lado contrario, en un medio sin citrato la estructura filamentosa se desensambla, dando lugar nuevamente al protómero tetrámero catalíticamente inactivo (**Figura 6B**) [26].

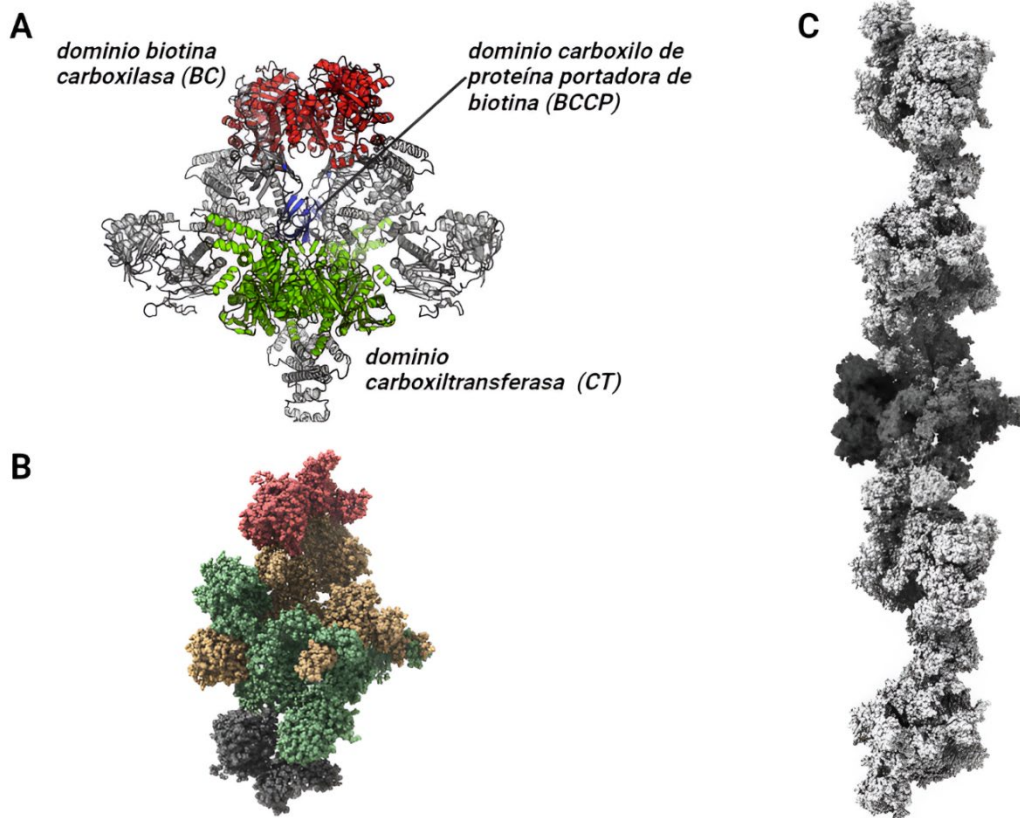


Figura 6. Oligomerización de la acetil-coA carboxilasa (ACC) de humano. (A) Dominio de biotina carboxilasa (BC) en color rojo, dominio carboxiltransferasa (CT) en color verde y un dominio carboxilo de proteína portadora de biotina (BCCP) en color azul, los cuales conforman la estructura de la acetil-coA carboxilasa (PDB 6G2D). (B) Heterotetrámero de la ACC, cada subunidad se denota de un color diferente. (C) Filamento activo de la ACC en respuesta a la presencia de citrato [27].

Otro mecanismo de oligomerización enzimática muy bien caracterizado es el caso de la trifosfato de citidina sintetasa (CTPS1, *cytidine triphosphate synthase 1*) [24]. Esta enzima cataliza la conversión de trifosfato de uridina en trifosfato de citidina (CTP, *cytidine triphosphate*), un paso esencial en la regulación de la proliferación celular y en la biosíntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. Esta enzima presenta una estructura homotetramérica de alta actividad en donde cada monómero está formado por un dominio amoniaco-ligasa (AL, *ammonia ligase*) y otro dominio glutamina amidotransferasa (GAT, *glutamine amidotransferase*) (Figura 7A) [24]. A

su vez, cada tetrámero (**Figura 7B**) se apila interactuando entre ellos por medio de los dominios GAT de cada uno dando lugar a estructuras filamentosas de baja actividad (**Figura 7C**); las cuales pueden desensamblarse en respuesta al aumento en la concentración de sustrato regresando a los protómeros catalíticamente activos [28]. Estos filamentos de CTPS1 han sido descritos en los ortólogos de bacterias, levaduras, mosca e incluso humanos, y dado que el mecanismo catalítico y la oligomerización es igual en todas las especies se cree la función también está conservada universalmente [28].

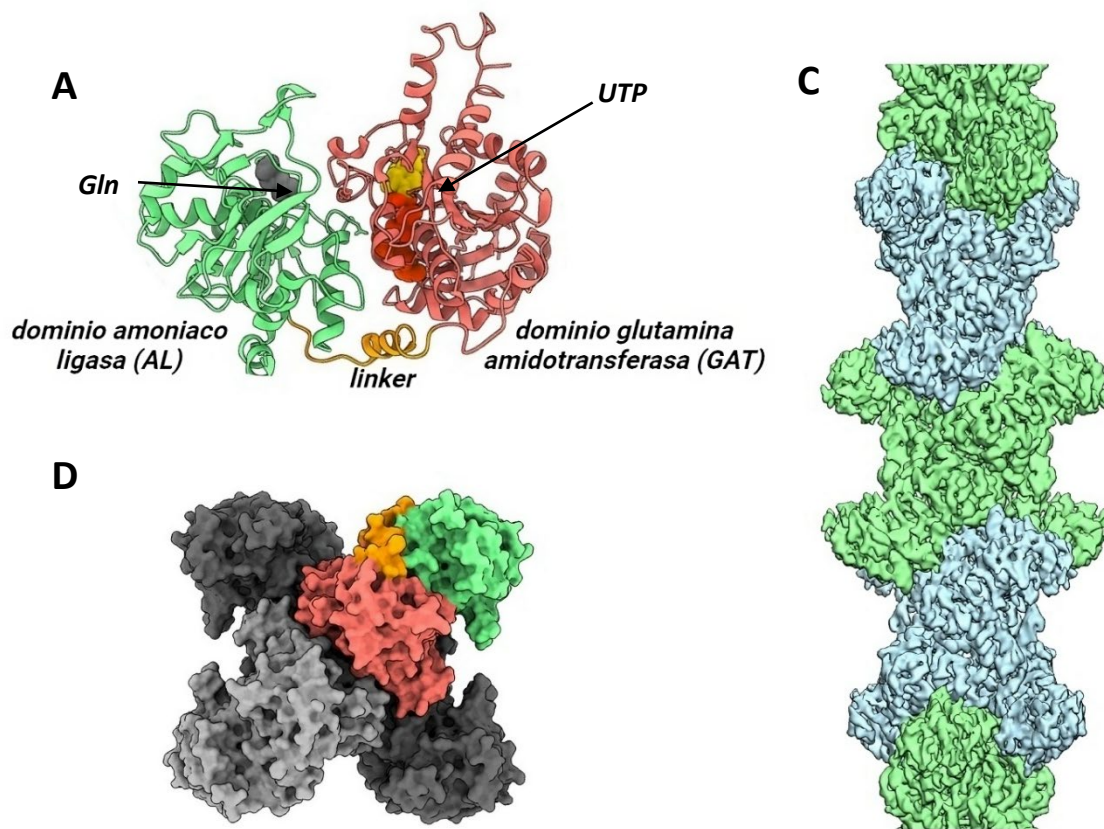


Figura 7. Oligomerización de la trifosfato de citidina sintetasa (CTPS1) de *E. coli*. (A) Estructura monomérica de la CTP mostrando su dominio AL en color verde y el dominio GAT en color rojo (PDB 6PK4). La esfera gris representa una molécula de glutamina mientras que la esfera dorada representa una molécula de UTP. (B) Ensamble homotetramérico resaltado en color a una subunidad monomérica. (C) Filamento constituido por tetrámeros de CTPS1, los tetrámeros se resaltan en color verde y azul [28, 29].

Estos son solo dos ejemplos de las múltiples enzimas que por medio de cambios en el entorno químico o adición de ligandos pueden ensamblar/desensamblar estructuras cuaternarias de orden superior con diferente actividad enzimática, adquiriendo un control adicional para su regulación.

1.2. Regulación enzimática

1.2.1. Alostерismo

La regulación en la actividad de una enzima resulta ser crucial para su buen funcionamiento dentro del organismo. Dicha regulación puede ser positiva (efecto cooperativo) aumentando la catálisis, pero también puede ser negativa haciendo que disminuya o incluso se inhiba completamente la actividad enzimática (efecto antagónico) [30]. Las enzimas cuentan con diferentes procesos para regular su actividad, anteriormente se describió el cambio en la estructura cuaternaria como forma de regulación, otros ejemplos son la formación de enlaces covalentes mediante modificaciones postraduccionales como las fosforilaciones, el cambio de la concentración de enzimas mediante la regulación de la transcripción de sus genes o la activación de la actividad por un proceso de proteólisis, entre otros procesos más [31].

Entre los mecanismos de regulación enzimática sobresale el alosterismo. El término “alostería” se puede definir como el proceso por el cual las proteínas transmiten el efecto de unión de un ligando o efector a un sitio distal al sitio catalítico mediante cambios conformacionales, permitiendo así la modulación de la actividad catalítica [31, 32]. Estos cambios se dan tanto a nivel atómico en escalas de tiempo de picosegundos, como en reordenamientos conformacionales en escala de milisegundos [33].

Actualmente se encuentran descritos diferentes sistemas alostéricos en donde las proteínas involucradas son generalmente homooligoméricas tal que poseen múltiples sitios de unión a ligandos distintos al sitio activo denominados sitios

alostéricos [15]. Los efectos alostéricos que pueden presentar estas proteínas se dividen generalmente en dos tipos: si el desencadenante efector es el sustrato de la misma enzima entonces este efecto es de tipo homotrópico, mientras que si es una molécula diferente entonces nos referimos a un efecto de tipo heterotrópico [15]. Los efectos heterotrópicos pueden ser de tipo antagónico o cooperativo, mientras que los efectos homotrópicos únicamente son de tipo cooperativo [15, 30]. Para el estudio de las enzimas alostéricas se han propuesto dos modelos: 1) el modelo de transición concertada de Monod-Wyman-Changeux (MWC), en el cual se asume que la enzima pre-existe en un equilibrio donde hay una mezcla de oligómeros de alta y baja afinidad y en donde los ligandos desplazan el equilibrio a favor de un estado u otro. Durante la transición, estos cambios conformacionales ocurren de manera concertada y simétrica en todas las subunidades y 2) el modelo de interacción secuencial de Koshland-Némethy-Filmer (KNF), en donde se asumen cambios secuenciales en las afinidades de los sitios vacantes conforme estos son ocupados.

1.2.2. Modelo de Monod-Wyman-Changeux

En 1965 Jacques-Lucien Monod, biólogo y bioquímico francés, junto con Jean-Pierre Changeux, neurocientífico francés y Jeffries Wyman, biólogo molecular y biofísico estadounidense, describieron el primer modelo que explica la regulación alostérica enzimática, nombrado como “modelo MWC” por las siglas de sus autores, o “modelo concertado”. En el cual se asume que la enzima pre-existe en un estado de equilibrio donde hay una mezcla de oligómeros de alta (estado R) y baja afinidad (estado T) y en donde los ligandos desplazan el equilibrio a favor de un estado u otro. Durante la transición, estos cambios conformacionales ocurren de manera concertada y simétrica en todas las subunidades [15]. Este paradigma es aplicable para complejos oligoméricos conformados por subunidades de la misma proteína. Sin embargo, en este modelo concertado se establece que todas las subunidades que componen un oligómero experimentan cambios conjuntos resultado de la unión del ligando en alguna de las subunidades [34]. De este modo es necesario tener una simetría dentro del oligómero, es decir, un oligómero está en el estado de alta afinidad sólo si todas sus subunidades se encuentran en ese

estado, mientras que, un oligómero está en el estado baja afinidad sólo si todas sus subunidades se encuentran en ese estado (**Figura 8**) [30, 35]

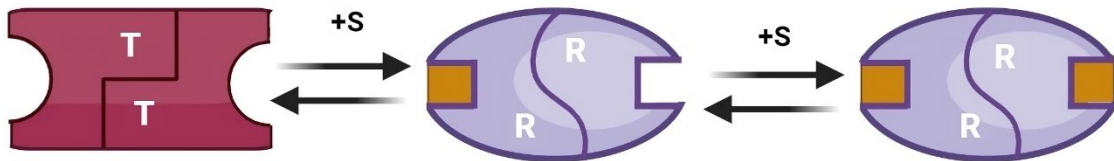


Figura 8. Modelo Monod-Wyman-Changeux (MWC) o concertado de la regulación alósterica enzimática. La unión del ligando ocasiona que todas las subunidades que conforman el oligómero cambien del estado T al estado R por medio de un cambio conformacional, sin cabida a proteínas con subunidades en diferentes estados. Figura elaborada en BioRender

La importancia que tuvo la postulación del modelo MWC radica en que fue la primera teoría que podía explicar las propiedades de proteínas oligoméricas reguladas por medio de cambios conformacionales en su estructura [35]. Un ejemplo que resalta la importancia de este modelo fue entender la transición que sufre la hemoglobina: proteína formada por dos subunidades alfa y dos subunidades beta capaz de unir y transportar el oxígeno a todo el organismo. Esta macromolécula inicialmente se encuentra como desoxihemoglobina, estructura que corresponde al estado T. La presencia de puentes salinos a cierta distancia del grupo hemo ocasionan que el átomo de hierro se asocie con la cadena lateral de una histidina proximal, posicionándola fuera del plano en el que se orienta el resto del grupo hemo. En esta conformación la desoxihemoglobina tiene baja afinidad por el oxígeno [36]. Cuando ocurre la oxigenación de la desoxihemoglobina, el átomo de hierro se introduce en el plano del grupo hemo para poder formar un enlace con la molécula de oxígeno, arrastrando a su vez a la histidina proximal con la que está asociado, produciendo un cambio conformacional de mayor escala que afecta a toda la proteína. Este cambio conformacional genera que la hemoglobina se encuentre ahora en un estado R,

donde es mucho más afín a la unión de moléculas de oxígeno [37]. La unión de oxígeno a la hemoglobina constituye en un ejemplo de alosterismo homotrópico.

Un ejemplo más de activación alostérica que a primera vista podría ser explicado por el modelo MWC es el caso de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa), la cual cataliza la desaminación e isomerización de glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) produciendo fructosa 6-fosfato y amonio. Esta enzima homohexamérica tiene activación alostérica de tipo homotrópica por su sustrato, la glucosamina-6-fosfato (GlcN6P), y activación heterotrópica por la N-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P) la cual resulta en el aumento de la afinidad por la GlcN6P. Sin embargo, bajas cantidades de su inhibidor competitivo glucitolamina-6-fosfato (GlcNol6P) ocasionan también una activación de la enzima de tipo heterotrópica, por lo que se propuso un modelo denominado "activación paradójica" [38]. Lo anterior se explicó por la existencia de un sitio alostérico inusual, distinto al sitio activo, en el cual se puede unir una molécula de sustrato imitando así la activación homotrópica pero con un origen heterotrópico.

1.2.3. Modelo de Koshland-Nemethy-Filmer

En 1966 Daniel E. Koshland, George Nemethy y David L. Filmer propusieron un segundo modelo de regulación alostérica llamado "modelo KNF" o "modelo secuencial". Este difiere del modelo MWC principalmente por establecer que la simetría no se conserva dentro de una proteína oligomérica dado que no todas las subunidades pueden estar en el mismo estado. La unión de un ligando a una de las subunidades ejerce un cambio conformacional de estado T a R, logrando que las subunidades adyacentes puedan ser más receptivas a este ligando sin necesariamente haber alcanzado el estado R en su totalidad, presentando así un estado "intermedio" (**Figura 9**) [34, 39].

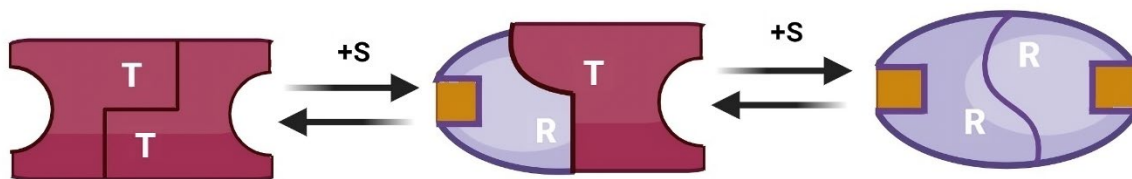


Figura 9. Modelo de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF) o secuencial de la regulación alósterica enzimática.

La unión del ligando a una subunidad de una proteína oligomérica ocasiona el cambio de estado T a R únicamente de esta subunidad, dando lugar a un estado intermedio con mayor afinidad sin necesidad de llegar al estado R.

Una proteína con regulación alostérica regida por el modelo KNF es el caso de la chaperona GroEL constituida por 14 subunidades idénticas que se ensamblan como dos anillos heptaméricos apilados uno sobre otro [40]. Su transición conformacional está inducida por ATP donde a concentraciones altas de ATP el doble anillo homooligomérico cambia de manera secuencial de estado TT (ambos anillos en estado T) a un estado TR (un anillo en estado T y el otro en estado R) para finalmente llegar a una conformación RR (ambos anillos en estado R) [41].

1.3. Morpheesins

Tanto en el modelo alostérico de MWC como KNF, una de las características fundamentales es que la multiplicidad estructural se conserva independientemente de sí el oligómero se encuentra en estado T o R [42]. Sin embargo, existen proteínas homooligoméricas que rompen este paradigma e incluso contradicen la pauta establecida de que una secuencia de aminoácidos dicta una única estructura secundaria, terciaria y finalmente cuaternaria. Este tipo de proteínas llevan por nombre “*morpheesins*” como resultado de la unión de la palabra en inglés *protein* y el verbo *to morph* que significa cambiar de forma [42]. La principal característica de las proteínas tipo *morpheesins* es que pueden formar múltiples ensamblajes cuaternarios en donde la estequiometría del ensamble final es dependiente de la conformación de la subunidad protomérica, todo esto a partir de

la misma estructura primaria. En contraste con los mecanismos de oligomerización previamente descritos, el mecanismo que presenta una proteína tipo *morpheein* se caracteriza porque los ensamblajes oligoméricos no están en equilibrio entre sí directamente, sino que hay un paso intermedio en donde el oligómero debe desensamblarse a un nivel de multiplicidad menor para posteriormente sufrir un cambio conformacional que permita la formación de un oligómero de estequiometría distinta (**Figura 10**) [42]. Los cambios conformacionales que ocurren en estas transiciones no implican la desnaturalización y el replegamiento *de novo* de la cadena polipeptídica, sino únicamente son arreglos de los elementos estructurales que se reflejan en una alteración de la estructura secundaria y/o terciaria del protómero, y por ende en la formación de la estructura cuaternaria [43]. Las transiciones entre los estados oligoméricos alternativos que presentan estas proteínas son de tipo reversible y ocurren en respuesta al entorno químico en el que se encuentre la proteína [43]. Además, cada ensamblaje resultante también es funcionalmente distinto, ya que, aunque catalizan la misma reacción química, difieren en sus propiedades catalíticas [42, 43].

De esta forma, el modelo de las estructuras de tipo *morpheein* proporciona un nuevo enfoque para comprender la regulación alostérica y los moduladores que participan en ella [43, 44].

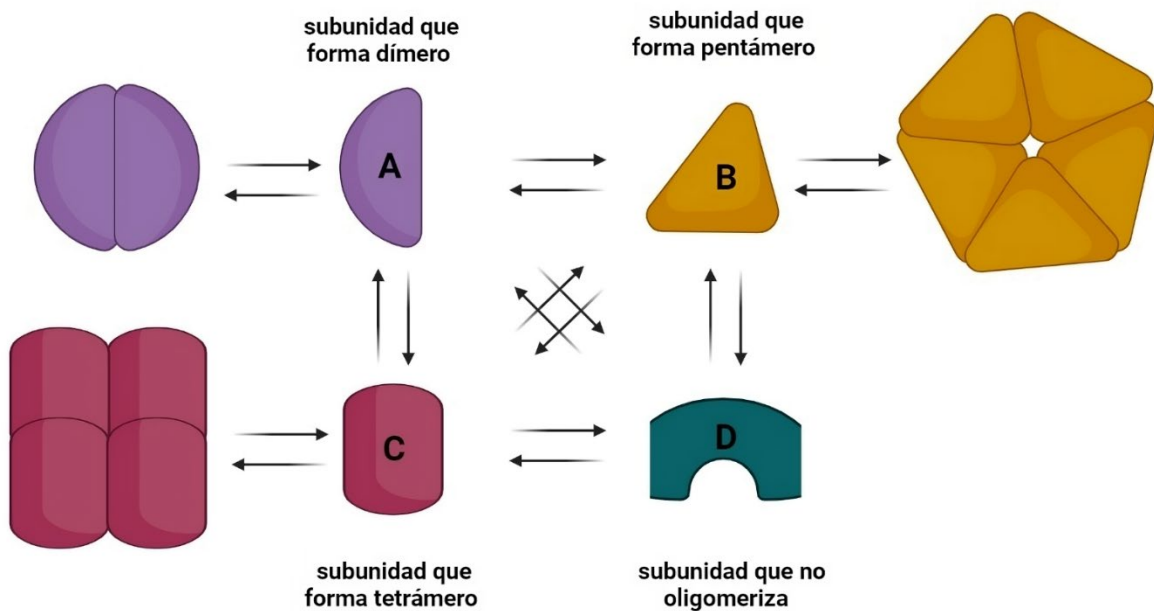


Figura 10. Representación de un equilibrio de proteínas dinámicas tipo morpheein. En este esquema una estructura monomérica dicta estequiometrías alternativas con un paso intermedio de disociación y re-asociación de las unidades fundamentales. Imagen elaborada en BioRender.

1.3.1. Porfobilinógeno sintasa: prototipo de morpheein

Hasta el momento la proteína tipo morpheein mejor caracterizada es la porfobilinógeno sintasa (PBGS, *porphobilinogen synthase*) [45]. La PBGS participa en la biosíntesis de pigmentos de tetrapirrol como lo son la clorofila, grupo hemo, vitamina B12, ficobilina y cofactor F430, catalizando la condensación asimétrica y ciclación de dos moléculas de 5-aminolevulinato (ALA, *5-aminolevulinic acid*) para dar como productos monopirrol porfobilinógeno y dos moléculas de agua. Esta enzima está altamente conservada, especialmente en organismos que realizan respiración, fotosíntesis y metanogénesis, utilizando como cofactor a iones metálicos como Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ , dependiendo de la variación filogenética [46].

El modelo descrito para la PBGS establece que esta enzima puede estar en cuatro conformaciones cuaternarias diferentes: un hexámero, dos dímeros y un octámero (Figura 11). Inicialmente el oligómero hexamérico se encuentra en un estado de baja actividad (estado T), que posteriormente se desensambla a su unidad

estructural, la cual es un dímero “separado”, denominado así por la posición abierta en la que se encuentran los extremos $-NH_2$ de cada monómero [42]. Una vez que el dímero separado se encuentra libre, éste cambia de conformación tal que los extremos $-NH_2$ se acomodan en una posición cerrada, dando lugar a un dímero “abrazador”. El dímero abrazador es estabilizado por la unión de iones Mg^{2+} las cuales fungen como activadores alostéricos del complejo proteico, permitiendo que se puedan ensamblar cuatro dímeros y formar un octámero de alta actividad en estado R [42, 47].

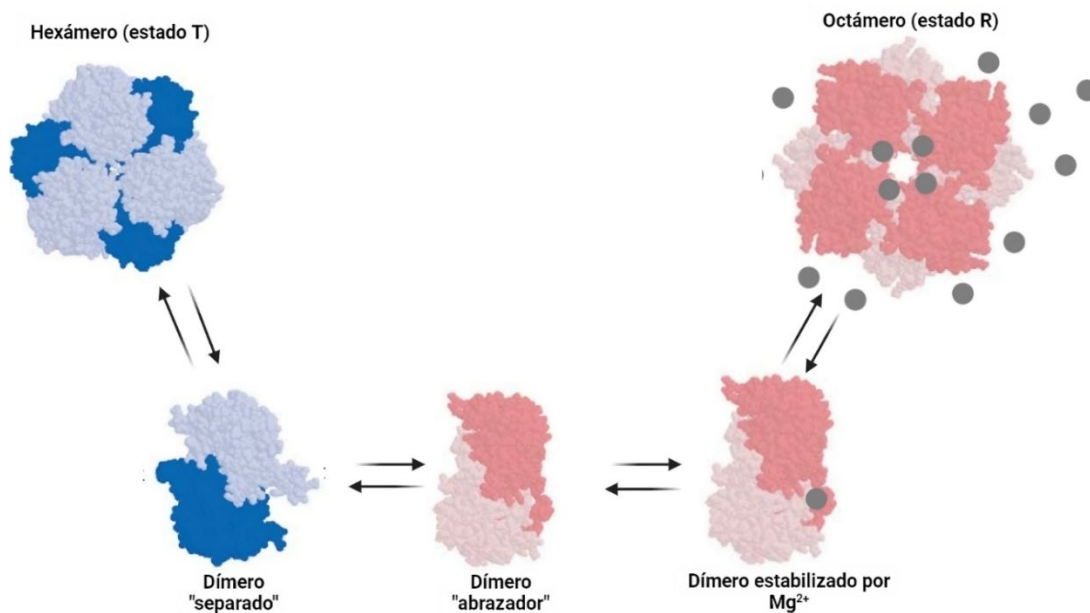


Figura 11. Representación del equilibrio estructural de la PBGS de plantas. Las unidades fundamentales son el dímero separado (azul) que puede oligomerizar dando una estructura hexamérica de baja actividad (estado T), y el dímero abrazador (rosa), el cual es estabilizado por iones magnesio para oligomerizar a un octámero de alta actividad (estado R). Imagen adaptada de [42].

Además de tener una regulación alostérica por los iones magnesio, el cual tiene sitios de unión en el octámero, pero no en el hexámero [48], el equilibrio entre sus ensamblajes oligoméricos puede ser modificado variando el pH, demostrando que a

pH neutro el equilibrio se modifica de modo que la especie predominante es el ensamble octamérico, mientras que a pH alcalinos se favorece la formación del ensamble hexámero [49].

En humanos el gen codificante para la enzima PBGS es el *gen ALAD*, del cual se han identificado mutaciones que resultan en una PBGS carente de actividad enzimática, provocando un trastorno autosómico recesivo denominado como Deficiencia de ácido-aminolevulínico deshidratasa o “porfiria ALAD” [46, 49]. Este tipo de porfiria es una enfermedad rara y el cuadro clínico suele ser variado, pero generalmente incluyen ampollas, cicatrices, hinchazón y picazón en la piel, dolor abdominal, entumecimiento u hormigueo, vómitos, estreñimiento, y problemas neurológicos. Un estudio de ocho variantes relacionadas a este trastorno demostró que estas mutaciones desplazan el equilibrio conformacional de la PBGS hacia el ensamble hexamérico, y dependiendo la variante que se presente es el porcentaje de la conformación hexamérica: F12L sólo genera hexámeros, mientras que G133R produce 48% de este oligómero [49].

1.4. HMG-CoA reductasas

La 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa o HMGR) es la enzima limitante en la biosíntesis de colesterol dentro de la célula, siendo un compuesto importante para mantener la fluidez de las membranas, además de ser precursor de hormonas esteroideas [50, 51]. Esta enzima está codificada por el *gen hmgr* ubicado en el cromosoma cinco en humanos; no obstante, por medio de secuenciación se ha podido identificar homólogos en los tres dominios de la vida. Un análisis filogenético con las secuencias de HMGR encontradas en los diversos organismos demostró que existen dos tipos de HMG-CoA reductasas: las enzimas clase I que están presentes en arqueas y en el retículo endoplásmico en eucariotas, y las enzimas de clase II que están presentes en procariontes y se localizan en el citoplasma [50, 52]

El análisis estructural de ambos tipos de HMG-CoA reductasas reveló diferencias entre estas. Las HMGR de clase I presentan un dominio N-terminal hidrofóbico

poco conservado que sirve como anclaje a la membrana y con función reguladora, y un dominio C-terminal catalítico altamente conservado que se subdivide en un dominio grande (L), un dominio pequeño (S) y finalmente un asa desestructurada que conecta ambos dominios (**Figura 12A**) [53, 54]. Esta región contiene los residuos críticos para la unión de HMG-CoA [55]. Las HMGR de clase II comparten la misma estructura central del dominio C-terminal catalítico que las de clase I, sin embargo, carecen del asa y del dominio N-terminal de anclaje a membrana (**Figura 12B**) [55]. Otra discrepancia entre ambas clases es la preferencia de su cofactor; todas las enzimas de clase I utilizan exclusivamente NADPH, mientras que las enzimas de clase II tienen una especificidad más variada ya que algunas usan NADH, otras NADPH y un tercer grupo que puede utilizar tanto NADH como NADPH [56].

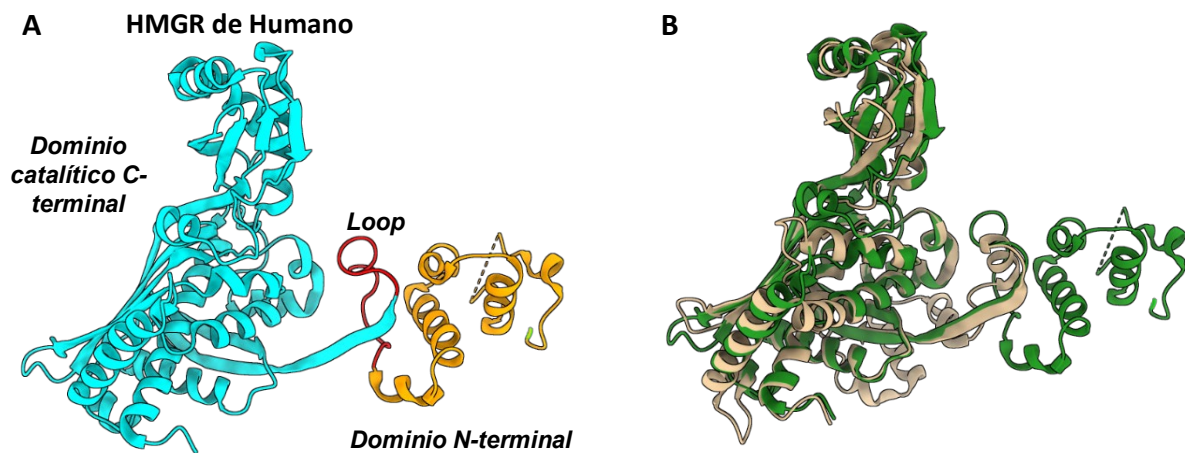
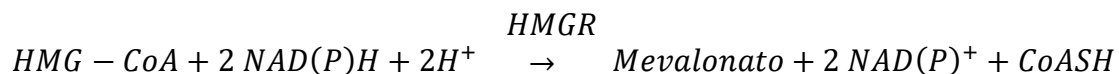
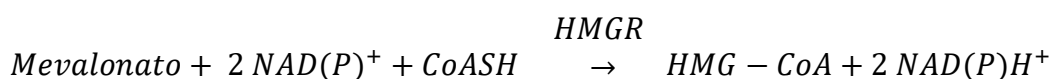


Figura 12. Estructuras de las HMGR clase I y II. (A) Estructura monomérica de la HMGR de humano (PDB 1DQ8) resaltando en color cian el dominio C-terminal, en color naranja el dominio N-terminal y en rojo el asa que une ambos dominios. (B) Superposición de las estructuras monoméricas HMGR de humano en color verde con la HMGR clase II de Pseudomonas mevalonii en color café (PDB 4I6A) la cual carece del asa y del dominio N-terminal.

La reacción enzimática que catalizan las HMGR de clase I es la síntesis de mevalonato dependiente de NAD(P)H a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), siendo una reacción de reducción [54]:



Por otro lado, las enzimas HMGR de clase II catalizan la reacción contraria, oxidando al mevalonato y utilizando a NAD(P)⁺ como aceptor de hidruros [54]:



Las HMGR son enzimas altamente reguladas [57] usando mecanismos como el aumento en la transcripción, traducción y estabilidad de la proteína [50] por disminución de las concentraciones de los productos en la ruta metabólica del mevalonato, y viceversa [51, 57, 58]. La regulación de una proteína también se logra mediante modificaciones en su actividad enzimática, la cual se puede disminuir al fosforilar ciertos residuos; un ejemplo es la HMGR de roedor que se fosforila en el residuo S871 inhibiendo su actividad catalítica alrededor de un 80% [57, 59].

Existe un interés particular en las HMG-CoA reductasas debido a la importancia que representa la vía metabólica en la que participan, y su presencia en microorganismos patógenos hace que esta enzima sea considerada como una diana terapéutica relevante para el diseño de compuestos antifúngicos y antibacterianos al tener un papel importante en la supervivencia de estos organismos [54, 60].

1.5. *Burkholderia cenocepacia*

1.5.1. Complejo *Burkholderia cepacia* (BCC)

El género *Burkholderia* fue descrito por primera vez en el año 1992, formando parte de las betaproteobacterias. En años posteriores, con el uso de la secuenciación de genomas y análisis de secuencias finalmente se estableció que la colección *Burkholderia sensu lato* está conformado por seis géneros: *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Mycetohabitans* y *Trinickia*. Dentro del género *Burkholderia* existen 32 especies distribuidas en tres complejos: *Burkholderia* fitopatógenas, *Burkholderia pseudomallei* (Bps) y *Burkholderia cepacia* (Bcc), siendo estas dos últimas de relevancia clínica por ser patógenos humanos [61, 62, 63].

El complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) está compuesto por al menos 20 especies diferentes de bacilos gram-negativos aerobios [52]. Mediante el análisis de pruebas fenotípicas y genotípicas se ha demostrado que este grupo está conformado por especies genómicas denominadas “genomovares”, el cual es un término aplicable a cepas que comparten características fenotípicas similares pero que genotípicamente son diferentes [64]. Los genomovares identificados en el Bcc son: *Burkholderia cepacia* (genomovar I), *Burkholderia multivorans* (genomovar II), *Burkholderia cenocepacia* (genomovar III), *Burkholderia stabilis* (genomovar IV), *Burkholderia vietnamiensis* (genomovar V), *Burkholderia dolosa* (genomovar VI), *Burkholderia ambifaria* (genomovar VII), *Burkholderia anthina* (genomovar VIII), y *Burkholderia pyrrocinia* (genomovar IX) [52]. Todas las especies pertenecientes a este complejo tienen una amplia distribución ambiental al ser bacterias ubicuas en la naturaleza, pudiéndose aislar de suelos, agua, rizosfera y semillas. Además de poder colonizar ambientes hospitalarios provocando infecciones nosocomiales, por lo que terminan siendo de importancia dentro del sector salud al ser causantes de infecciones en personas inmunocomprometidas [64]. Dentro de los pacientes inmunocomprometidos que se ven afectados por estos patógenos oportunistas se encuentran personas con Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD, *chronic granulomatous disease*), pero principalmente son pacientes con Fibrosis Quística (FQ) [52, 64]. Aunque cualquier patógeno del grupo Bcc puede infectar a pacientes

con deficiencias inmunológicas, se tiene reportado que de los nueve genomovares que conforman este complejo, *Burkholderia cenocepacia* es el genomovar más virulento al causar del 85% al 97% de las infecciones en pacientes con FQ [65]. Además de presentar una tasa de mortalidad cinco veces mayor, comparado con el resto de los patógenos que conforman el grupo [52]. Las personas que sufren FQ suelen contraer muchas infecciones bacterianas pulmonares a lo largo de su vida debido a la vulnerabilidad inmunológica que presentan, ocasionándoles inflamación y disminución progresiva de la función pulmonar [66]. Sin embargo, cuando esta infección es ocasionada por *B. cenocepacia* la disminución de la función pulmonar es muy acelerada [52] y escala rápidamente hasta conducir al “síndrome de cepacia” el cual se caracteriza por neumonía necrotizante con fiebre y septicemia, situación clínica que termina siendo fatal [66].

Burkholderia cenocepacia está considerada entre los patógenos más difíciles de tratar clínicamente debido a que tienen una alta resistencia a diversos antibióticos [67]. Algunos de los principales mecanismos que le confieren resistencia a antibióticos son: pared celular con permeabilidad reducida, bombas de eflujo más activas que en otros microorganismos, mutaciones en genes que codifican a dianas moleculares de los antibióticos, e incluso la inactivación del mismo fármaco [66]. Aunado a la resistencia a fármacos, *B. cenocepacia* cuenta con diversos factores de virulencia que le ayudan a la proliferación y a la supervivencia intracelular [64]. Posee estructuras como flagelos, pili y adhesinas que le permiten interaccionar con el epitelio pulmonar, y su internalización a células de este tejido por medio de lipasas y del sistema de secreción tipo IV, promoviendo así su replicación intracelular. Asimismo, *B. cenocepacia* puede retardar la acidificación del fagolisosoma provocando que los macrófagos no puedan erradicarla [66]. Debido a todas estas razones, los tratamientos farmacológicos existentes para combatir las infecciones ocasionadas por esta bacteria son, en la mayoría de los casos de bajo éxito, por lo que es vital la caracterización de blancos terapéuticos que ayuden al desarrollo de nuevas herramientas para combatir este patógeno [67].

2. Antecedentes

Burkholderia cenocepacia expresa la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (BcHMGR) de clase II, de la cual no se tiene mucha información hasta el momento. Un estudio publicado recientemente reporta que, a diferencia de otras HMGR, la de este patógeno presenta un equilibrio complejo entre diferentes estructuras cuaternarias no aditivas clasificándola como una proteína tipo *morpheein*. Los ensamblajes sugeridos para esta HMGR son un hexámero, un nonámero y un oligómero de mayor multiplicidad. Éste último es favorecido al aumentar el pH del medio y la concentración de la proteína [68]. Hasta el momento sólo se ha determinado mediante difracción de rayos X la estructura del monómero (PDB 6P7K) (**Figura 13A**) con un dímero y un hexámero modelados por simetría, en donde el hexámero está formado por un trímero de dímeros (**Figura 13B**) [68]. En la estructura monomérica se observa que la BcHMGR es estructuralmente similar a las unidades monoméricas de otras HMGR de clase II conservando el sitio de unión a coenzima A en el dominio grande. Inesperadamente se encontró ADP unido al dominio pequeño, superponiéndose al sitio de unión de la fracción ADP del NAD(H). Esta unión de ADP en BcHMGR es posible que haya ocurrido durante el proceso de expresión dado que esta molécula nunca fue añadida en el proceso de cristalización [68]. El monómero por sí solo no tiene la capacidad de formar el sitio activo debido a la orientación de algunos residuos importantes en el sitio de unión a HMG-CoA/mevalonato y NAD(P)H, los cuales cambian de conformación al multimerizar, sugiriendo que la estructura obligada de la HMGR es el dímero.

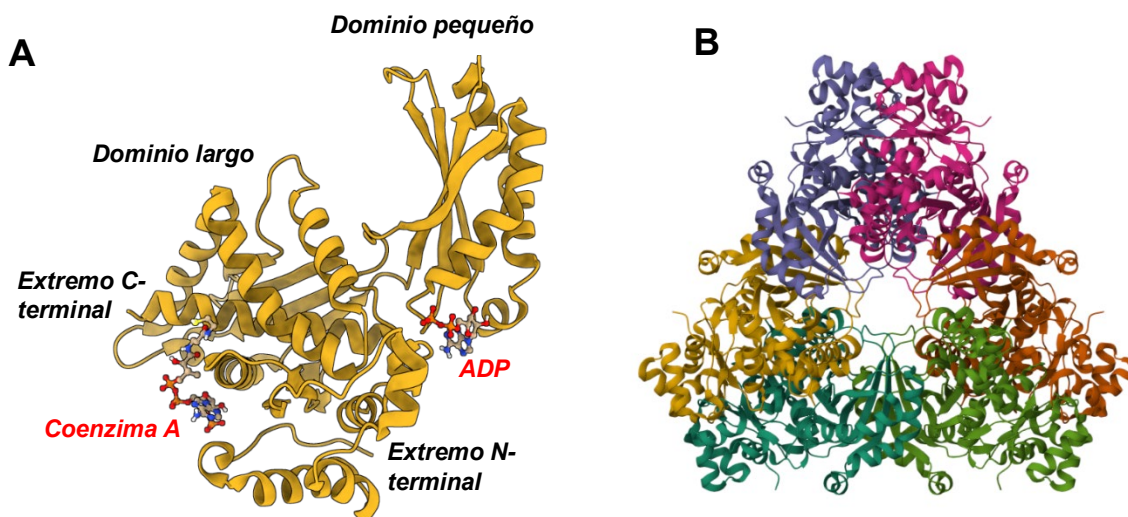


Figura 13. Estructura de la HMGR-CoA reductasa de *B. cenocepacia*. (A) Estructura monomérica obtenida mediante difracción de rayos X con resolución de 1.72 Å donde se muestran los dominios y sitios de unión a ADP y Coenzima A. (B) Modelo estructural del hexámero de la BcHMGR denotado con un color diferente cada monómero (PDB 6P7K).

Todos estos datos son un indicio del proceso conformacional que sufre la enzima BcHMGR como forma de regulación. Desafortunadamente, todavía no se ha podido concluir la multiplicidad de los ensamblajes y las condiciones que los promueven, siendo esto indispensable para caracterizar correctamente su actividad y cómo se regula a través de su naturaleza tipo *morpheein*. Debido a la importancia biológica que tiene la vía de biosíntesis en la que participa, se cree que BcHMGR puede ser un buen candidato como diana terapéutica, por lo que la caracterización de la proteína daría lugar a herramientas para el diseño de nuevos fármacos contra este patógeno de gran relevancia dentro del sector clínico. Debido a esto, el propósito e interés principal de este trabajo fue la identificación de los ensamblajes cuaternarios que adopta la BcHMGR en respuesta a cambios en el pH, fuerza iónica, y presencia de sustratos.

3. Hipótesis

Dado que la estructura mínima obligada de la BcHMGR parece ser un dímero entonces el uso de técnicas espectroscópicas, hidrodinámicas y electroforéticas permitirán identificar los ensamblajes que adopta esta proteína, los cuales se espera sean múltiplos de dos (dímero) y cuyas poblaciones se favorecerán ante diferentes condiciones como lo son cambios en el pH y/o fuerza iónica.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar los diferentes ensamblajes cuaternarios que adopta BcHMGR en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, específicamente cambios en el pH, fuerza iónica, concentración de proteína y presencia de sustratos.

4.2 Objetivos particulares

- Expresar y purificar la proteína recombinante BcHMGR en *Escherichia coli* mediante técnicas convencionales de cromatografía.
- Identificar la multiplicidad oligomérica que adopta BcHMGR a diferentes concentraciones de proteína, mediante electroforesis nativa en condiciones de alta y baja fuerza iónica.
- Identificar cambios en la multiplicidad oligomérica de BcHMGR en presencia de sus sustratos (ácido mevalónico, NAD⁺, ATP, y CoA) mediante electroforesis no desnaturizante en condiciones de alta y baja fuerza iónica.
- Identificar cambios en la multiplicidad de BcHMGR a diferentes concentraciones de proteína en condiciones de alta y baja fuerza iónica mediante cromatografía de exclusión molecular.

- Identificar cambios en la multiplicidad de BcHMGR a diferentes pH en condiciones de alta y baja fuerza iónica mediante cromatografía de exclusión molecular.
- Identificar cambios en el contenido de estructura secundaria de BcHMGR en condiciones de alta y baja fuerza iónica a distintos valores de pH por medio de espectroscopía de dicroísmo circular.
- Determinar cambios en la temperatura de desnaturalización de BcHMGR en condiciones de alta y baja sal a distintos valores de pH.

5 Metodología

5.1 Reactivos químicos y materiales

Los reactivos químicos usados se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos), BD (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lanes, NJ, EUA). El antibiótico ampicilina se adquirió de ForMedium®. Las unidades para concentración de proteína fueron adquiridas de Milipore® y la membrana de diálisis de Spectrum Laboratories (San Francisco, CA, USA).

5.1.1 Disoluciones y amortiguadores de pH

La composición de las soluciones y amortiguadores de pH utilizados en este trabajo se encuentran enlistados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de soluciones y amortiguadores usados en este trabajo.

Disolución	Composición
Purificación de la proteína recombinante	
Amortiguador de lisis	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 50 mM pH 7.0, NaCl 300 mM, imidazol 40 mM, β-mercaptoetanol (BME) 5mM, glicerol 5%
Amortiguador de elución	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 5° mM pH 7.0, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, β-mercaptoetanol (BME) 5mM, glicerol 5%
Amortiguador de diálisis-digestión	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 50 mM pH 7.0, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol (BME) 5mM,

	glicerol 5%
Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	
Para gel concentrador 1X	Tris-HCl 0.5 pH 6.8
Para gel separador 1X	Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
Amortiguador de corrida 10X	Tris-base 3%, glicina 14,4%, SDS 1%
Amortiguador de muestra 4X	Tris-HCl 200 mM pH 8.0, β -mercaptoetanol (BME) 400 mM, glicerol 40%, SDS 8%, azul de bromofenol 0.4%.
Solución fijadora	Etanol 40%, ácido acético 10%
Solución teñidora	Azul de Coomassie G-250 0.025%, ácido acético 10%, metanol 40%,
Electroforesis nativa (BN-PAGE)	
Amortiguador de corrida 20X	Bis-Tris 1M, Tricina 1M pH 6.8
Amortiguador aditivo 20X	Bis-Tris 1 M, Tricina 1M pH 6.8, Azul de Coomassie G-250 8%
Amortiguador de muestra 4X	Bis-Tris 200 mM pH 7.2, HCl 24 N, NaCl 200 mM, glycerol 40%, ponceau S 0.004%
Amortiguador sin sal	$\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 50 mM pH 7.0, imidazol 40 mM, β -mercaptoetanol (BME) 5 mM, glicerol 5%
NAD ⁺ 10X	NAD ⁺ 40 mM
CoA 10X	CoA 60 mM
Ácido mevalónico 10X	Ácido R-mevalónico 60 mM
Amortiguador cátodo casero 1X	Tricina 50mM, Bis-Tris 15 mM, Azul de coomassie 0.02%
Amortiguador ánodo casero 1X	Bis-Tris 50mM
Amortiguador de muestra casero 1X	Ácido aminocaproico 750 mM, Bis-Tris 50 mM (o Imidazol 25 mM) pH 7.0, Azul de coomassie G-250 5%, glicerol 5%
Solución Acrilamida/Bisacrilamida casera 1X	Acrilamida 48.5%, Bisacrilamida 1.5%
Amortiguador casero 3X	Ácido aminocaproico 1.5 M, Bis-Tris 150 mM, pH 7.0
Solución fijadora	Etanol 40%, ácido acético 10%
Cromatografías de exclusión molecular	
Amortiguador SEC A-1	Bis-Tris 50 mM pH 6.0, NaCl 300 mM, BME 5 mM, glicerol 5%
Amortiguador SEC A-2	Bis-Tris 50 mM pH 6.5, NaCl 300 mM, BME 5 mM, glicerol 5%
Amortiguador SEC A-3	$\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 50 mM pH 7.0, NaCl 300 mM, BME 5 mM, glicerol 5%
Amortiguador SEC A-4	$\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, BME 5 mM, glicerol 5%
Amortiguador SEC B-1	$\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 50 mM pH 7.0, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%
Amortiguador SEC B-2	$\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%

Amortiguador SEC B-3	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 50 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, DTT1 mM, glicerol 5%
Amortiguador SEC B-4	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 50 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, DTT1 mM, glicerol 5%
Dicroísmo circular	
Amortiguador CD A-1	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 6.5, NaF 300 mM
Amortiguador CD A-2	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 7.0, NaF 300 mM
Amortiguador CD A-3	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 7.5, NaF 300 mM
Amortiguador CD A-4	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 8.0, NaF 300 mM
Amortiguador CD A-5	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 8.5, NaF 300 mM
Amortiguador CD B-1	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 6.5, NaF 20 mM
Amortiguador CD B-2	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 7.0, NaF 20 mM
Amortiguador CD B-3	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 7.5, NaF 20 mM
Amortiguador CD B-4	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 8.0, NaF 20 mM
Amortiguador CD B-5	HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ 20 mM pH 8.5, NaF 20 mM

5.1.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo se adquirieron de ForMedium®. Las composiciones de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se encuentran enlistados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo usados en este trabajo.

Medio de cultivo	Composición
Medio LB	Triptona 1% (m/v), extracto de levadura 0.5% (m/v), NaCl 1% (m/v)
Medio auto-inducción	Medio comercial auto-inducción LB (Formedium), glicerol 1% (v/v)

5.2 Expresión recombinante de la proteína BcHMGR

Células de *Escherichia coli* C41 previamente transformadas con el plásmido pQLink-His-TEV-BcHMGR se inocularon en 20 mL de medio de cultivo LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, y se crecieron a 37°C con agitación durante toda la noche. Al siguiente día se inoculó 1 L de medio de autoinducción con el volumen necesario de este inóculo para comenzar con una densidad óptica a 600 nm (OD_{600nm}) de 0.1 unidades de absorbancia (UA) y se dejó en incubación a 25°C, con agitación durante 24 horas. La suspensión celular resultante se

centrifugó a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante y la fracción celular se guardó a -20°C hasta su posterior purificación.

El funcionamiento de este método de expresión se basa en la producción automática de la proteína recombinante, sin necesidad de adicionar un inductor como lo es el IPTG (isopropil- β -D-1-ihiooglactopiranosido). Esto es gracias a que el medio de autoinducción está conformado por una mezcla de sustratos de carbono como lo son glucosa, glicerol y lactosa, en donde se utiliza preferencialmente a la glucosa como sustrato y después el glicerol. Cuando se agotan estos dos, la lactosa puede ser metabolizada y convertirse en alolactosa, el cual es el inductor natural del operon lac [69, 70].

5.3 Purificación de la proteína recombinante BcHMGR

El paquete celular se resuspendió en amortiguador de lisis (**Tabla 1**) en una proporción de 15 mL de amortiguador por gramo de paquete celular húmedo, suplementado con BME (β -mercaptoetanol) 10 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0.5 mM y Benzamidina 1 mM, como inhibidores de proteasas. La lisis celular se realizó mediante sonicación a 4°C, durante 5 min totales con intervalos de 10 s en ON, 40 s en OFF y potencia de 6 W. Una vez finalizada la sonicación, el lisado se centrifugó a 9660 rfc por 50 minutos para retirar los escombros celulares de los cuales se tomó una pequeña muestra con un palillo y se resuspendió en 30 μ L de amortiguador de lisis (**Tabla 1**) para la electroforesis SDS-PAGE. Del sobrenadante obtenido o fracción soluble se tomó una muestra de 30 μ L para la electroforesis SDS-PAGE y el resto se purificó mediante cromatografía de afinidad a iones Cobalto (II) (HisPur™, Thermo Fisher) usando 5 mL de resina equilibrada con amortiguador de lisis. La resina equilibrada se vertió en un vaso de precipitado junto con el sobrenadante de la lisis celular, ambos se incubaron con agitación baja durante 50 minutos a 4°C. Posteriormente se empacó la columna con la mezcla resina-sobrenadante, y se recuperó la fracción que no fue retenida por la resina (se tomaron 30 μ L para electroforesis SDS-PAGE), después se hizo un lavado de 3 CV con el amortiguador de lisis, esto con el objetivo de retirar la proteína no unida a la columna y finalmente la proteína

BcHMGR se eluyó con 3 CV de amortiguador de elución (se tomaron 30 μ L para electroforesis SDS-PAGE). A esta fracción eluída de la primera columna de afinidad se le agregó 4 mg de proteasa TEV y se colocó en una membrana de diálisis con un tamaño de corte de 10 kDa, la cual se dejó en dializando contra 1 L de amortiguador diálisis–digestión (**Tabla 1**) a 4°C durante toda la noche. Al siguiente día se centrifugó la muestra a 9660 rfc, 4°C por 20 minutos para retirar agregados formados durante la diálisis, recuperando únicamente la fracción soluble de la cual se tomaron 30 μ L para correr la electroforesis SDS-PAGE. Se equilibró nuevamente la resina de afinidad a iones cobalto (II) con 3 CV de amortiguador de lisis y la fracción soluble después de la diálisis-digestión se incubó con la resina durante 50 minutos, en agitación baja y manteniendo la muestra en hielo. Terminado el tiempo de incubación se empacó la mezcla de resina-fracción soluble en una la columna y se recuperó la fracción que no fue retenida por la resina, la cual correspondió a la proteína BcHMGR pura (se tomaron 30 μ L para electroforesis SDS-PAGE). Después se hizo un lavado de 3 CV con el amortiguador de lisis, y finalmente se eluyó la proteasa TEV unida a la resina con 3 CV de amortiguador de elución (**Tabla 1**).

5.4 Electroforesis de proteína en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para monitorear el proceso de purificación se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% en dónde la composición y las cantidades para preparar el gel separador y el gel concentrador se presenta en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Composición del gel separador al 10% y del gel concentrador para electroforesis SDS-PAGE.

	Componente	Volumen (μL)
GEL SEPARADOR	Agua destilada	2447
	Tris 1.5 M pH 8.8	1250
	SDS 10%	50
	acrilamida/bisacrilamida 40%	1250
	TEMED	10
	PSA 10%	50
GEL CONCENTRADOR	Agua destilada	1267
	Tris 0.5 M pH 6.8	500
	SDS 10%	20
	acrilamida/bisacrilamida 40%	203
	TEMED	5
	PSA 10%	25

Cantidades para preparar un gel en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN (BioRad).

Se mezclaron en orden los componentes del gel separador, se homogeneizaron y se vertieron en el dispositivo (Mini-PROTEAN Cell, BioRad) previamente armado hasta llenar un 70% de la capacidad de los vidrios. Rápidamente se colocaron 100 μL de isopropanol en la superficie con la finalidad de evitar que el gel separador polimerice irregularmente ocasionando una migración errónea de las muestras. Al finalizar la polimerización, se retiró el isopropanol haciendo lavados con agua destilada. Una vez listo el gel separador se preparó la mezcla para el gel concentrador e inmediatamente se vertió hasta llenar completamente la capacidad de los vidrios y cuidadosamente se colocó el peine el cual formó los pozos en dónde se colocaron las muestras.

La preparación de las muestras se llevó a cabo añadiendo 10 μL de amortiguador de muestra 4X (Tabla 1) a los 30 μL de cada muestra que se tomó durante el proceso de purificación, se homogeneizaron bien cada una de ellas y se colocaron

en agua caliente (90°C) durante 5 minutos con la finalidad de desnaturalizar completamente las proteínas.

Se montó el dispositivo de la electroforesis con el amortiguador de corrida 10X (**Tabla 1**) y se colocaron 10 µL de cada una de las muestras, la corrida se realizó con un potencial eléctrico fijo de 120 V, durante 90 minutos aproximadamente. Al finalizar, se fijó el gel en la solución fijadora (**Tabla 1**) por 15 minutos, después se retiró dicha solución y se añadió la solución teñidora (**Tabla 1**) y se tiñó el gel durante 5-10 minutos. Finalmente, se destiñó el gel con agua destilada y metanol por toda una noche.

5.5 Cuantificación de proteína por absorbencia a 280 nm

La determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo mediante absorción en el UV a 280 nm utilizando un espectrofotómetro (Eppendorf® BioPhotometer plus). En este proceso, el amortiguador de lisis se empleó como blanco para la medición a 280 nm, y la concentración se determinó a través de la ecuación de Lambert-Beer (**Ecuación 1**):

$$A = l \cdot \epsilon \cdot C \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

A: La cantidad de luz absorbida

C: La concentración de la muestra (M)

E: Coeficiente de extinción molar teórico (M⁻¹ cm⁻¹)

l: La longitud del paso de luz que recorre por la muestra (cm)

Los valores de los coeficientes de extinción molar a 280 nm se obtuvieron a partir de la secuencia primaria de la proteína utilizando la **Ecuación 2**:

$$\epsilon_{280nm} = nW \cdot \epsilon_{280nm}^W + nY \cdot \epsilon_{280nm}^Y + nC \cdot \epsilon_{280nm}^{CC} \quad (\text{Ecuación 2})$$

A 280 nm las principales contribuciones de absorbencia provienen de los residuos de triptófano (W), tirosina (Y) y del dipéptido cistina (CC) cuyos coeficientes de extinción molar son $5,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $1,490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente. Otro de los residuos que se considera como contribución de absorbencia es la fenilalanina (F), sin embargo, este residuo presenta un máximo de absorbencia a 260 nm. Para la BcHMGR se obtiene un coeficiente de extinción molar de $24,410 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm.

5.6 Electroforesis de proteína en condiciones nativas (*Azul-nativa*)

5.6.1 Electroforesis nativa con geles de acrilamida de gradiente 4-16%

Para conocer si la BcHMGR presentaba múltiples ensamblajes cuaternarios se llevó a cabo una electroforesis en condiciones nativas tipo *Azul-nativa* utilizando el estuche comercial NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System con geles de gradiente del 4 al 16% (BN1004BOX, Thermo Fisher). Para estas electroforesis se probaron diferentes cantidades de proteína sola (5 - 50 μg) y presencia de sustratos/cofactor (mevalonato, NAD^+ , coenzima A a concentraciones de saturación), ambos en condiciones de alta fuerza iónica (NaCl 300 mM) y baja fuerza iónica (NaCl 100 mM). Para realizar la electroforesis con NaCl 300 mM, se ocupó la proteína BcHMGR tal cual se guardó al término de la purificación dado que el amortiguador ya tenía esta concentración de sal. Por otro lado, para realizar las electroforesis en NaCl 100 mM la muestra se diluyó en un amortiguador sin sal (**Tabla 1**) hasta llegar a una concentración de NaCl 100 mM. La preparación de las muestras se realizó de acuerdo con las instrucciones del manual del estuche comercial para un volumen final de 10 μL (**Tabla 4** y **Tabla 5**) a 4°C .

Tabla 4. Preparación de muestras para las electroforesis nativas usando diferentes cantidades de proteína BcHMGR.

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador de carga 4X (BN2003, Thermo Fisher)	2.5
BcHMGR*	x
Agua desionizada	c.b.p 10 μL

* volumen necesario de proteína para que la cantidad final en los 10 μL fuera de 5-50 μg

Tabla 5. Preparación de muestras para las electroforesis nativas en presencia de sustratos y cofactor de la proteína BcHMGR.

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador de carga 4X (BN2003, Thermo Fisher)	2.5
BcHMGR*	x
Sustrato** NAD ⁺ 10X CoA 10X Ácido mevalónico 10X	1
Agua desionizada	c.b.p 10 μL

* volumen necesario de proteína para que la cantidad final en los 10 μL fuera de 20 μg

**los sustratos se usaron individualmente, por lo que se preparó una muestra por sustrato

El marcador molecular utilizado fue Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis, el cual es una mezcla de proteínas liofilizadas que contiene: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (250 kDa), lactato deshidrogenasa (140 kDa) y albúmina (66 kDa). A este marcador no se le agregó amortiguador de carga, únicamente se inyectaron 4 μL. Posteriormente se prepararon los amortiguadores de ánodo (BN2001, Thermo Fisher) y cátodo (BN2002, Thermo Fisher) conforme el manual (**Tabla 6** y **Tabla 7**), se montó la cámara de electroforesis y se inyectaron las muestras. La corrida se realizó con un potencial eléctrico fijo de 50 V, durante 16 horas a una temperatura de 4°C.

Tabla 6. Preparación de amortiguador de ánodo para electroforesis nativa.

Componente	Volumen (mL)
Amortiguador de corrida 20X (BN2001, Thermo Fisher)	50
Agua desionizada	950

Tabla 7. Preparación de amortiguador de cátodo para electroforesis nativa.

Componente	Volumen (mL)
Amortiguador de corrida 20X (BN2001, Thermo Fisher)	10
Amortiguador aditivo 20X (BN2002, Thermo Fisher)	10
Agua desionizada	180

5.6.2 Electroforesis nativa en geles de acrilamida al 10%

Las electroforesis nativas en geles de acrilamida-bis acrilamida al 10% se realizaron por medio de un método “casero” y no de estuche comercial de acuerdo con la composición descrita en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Composición del gel separador al 10% y del gel concentrador para electroforesis nativa casera.

	Componente	Volumen (µL)
GEL SEPARADOR 10%	Solución Acrilamida/Bisacrilamida casera	1750
	Amortiguador casero 3X	2900
	Agua desionizada	4100
	TEMED	5
	PSA 10%	87.5
GEL CONCENTRAD OR 4%	Solución Acrilamida/Bisacrilamida casera	250
	Amortiguador casero 3X	1000
	Agua desionizada	1750
	TEMED	4.5
	PSA 10%	16

Cantidades para preparar un gel en una cámara Mini-PROTEAN (BioRAD).

La preparación de las muestras para esta electroforesis casera en condiciones nativa se hizo del mismo modo que la preparación de las muestras para la electroforesis de estuche comercial, únicamente sustituyendo el amortiguador de muestra 4X del estuche comercial por el amortiguador de muestra casero. El marcador molecular usado fue el mismo de Amersham mencionado en la sección anterior. Las condiciones en las que se llevó a cabo la electroforesis casera fueron 150-200 V por 3.5 horas a 4°C. Al finalizar ambas electroforesis, los geles se fijaron en solución fijadora (**Tabla 1**) por 10 minutos, y se destiñeron durante toda la noche en agua destilada con metanol.

5.7 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Las cromatografías de exclusión molecular en condiciones de alta fuerza iónica (NaCl 300 mM) se llevaron a cabo en un HPLC Waters 2695 con detector PDA 2998, usando una columna Yarra SEC-2000 (Phenomenex) la cual tiene las características enlistadas en la **Tabla 9**. Por otro lado, las cromatografías de exclusión en condiciones de baja fuerza iónica (NaCl 50 mM) se llevaron a cabo en un FPLC con una columna Superdex[®] 200 Increase 3.2/300 con las características enlistadas en la **Tabla 10**.

Tabla 9. Características de la columna Yarra[®] SEC-2000.

Característica	
Matriz	Silica
L x D.I	300 x 7.8 mm
Volumen	14 mL
Tamaño de partícula	3 µm
Rango de separación	1-300 kDa
pH	2.5-7.5
Presión máxima	3000 psi

Temperatura máxima de trabajo	50 °C
Flujo máximo de trabajo	1.5 mL/min

Tabla 10. Características de la columna Superdex® 200 Increase 3.2/300.

Característica	
Matriz	Agarosa y dextrano
Volumen	2.4 mL
L x D.I.	30 cm x 3.2 mm
Tamaño de partícula	8.6 µm
Rango de separación	10-600 kDa
pH	3-12
Presión máxima	735 psi
Temperatura máxima de trabajo	40 °C
Flujo máximo de trabajo	0.150 mL/min

La calibración de la columna Yarra® SEC-2000 se realizó inyectando 50 µL de proteínas estándares y proteínas que contábamos en el laboratorio a un flujo de 0.5 mL/min. Se utilizó al triptófano para conocer el volumen total de cama (V_T) y a la subunidad ribosomal 60S para marcar el volumen muerto (V_0). Para la calibración de la columna Superdex® 200 se inyectó 50 µL de cada proteína a un flujo de 0.04 mL/min, en este caso se usó imidazol para marcar el V_T y a la tiroglobulina para marcar el V_0 .

Para ambas columnas de exclusión molecular se expresó la curva de calibración como el logaritmo natural del peso molecular ($\ln MW$) y del radio hidrodinámico (R_h) de las proteínas estándar en función de K_{av} . El término K_{av} indica la relación entre el volumen de elución de una molécula determinada y el volumen total disponible de la columna, teniendo valores entre 0 y 1. Para hacer la conversión del volumen de elución (V_e) de cada muestra a K_{av} se utilizó la **Ecuación 3**:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0}$$

(Ecuación 3)

Para preparar las muestras de BcHMGR inicialmente se descongeló la proteína que se encontraba guardada a -40°C , se centrifugó a 9660 rfc a 4°C por 25 minutos. Terminado el tiempo se traspasó la proteína a un tubo eppendorf nuevo sin levantar los agregados que quedaron en el fondo para finalmente cuantificar a 280 nm. Las inyecciones de BcHMGR se realizaron a 2 mg/mL y 6 mg/mL, y a diferentes valores de pH: pH 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5 utilizando los amortiguadores SEC A1-4 (**Tabla 1**) para las cromatografías en alta fuerza iónica, y a pH 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5 utilizando los amortiguadores SEC B1-4 (**Tabla 1**) para las cromatografías de baja fuerza iónica. El volumen inyectado para las cromatografías en alta sal fue de 50 μL y se corrieron a un flujo de 0.5 mL/min, mientras que para las cromatografías en baja sal igual se inyectaron 50 μL pero el flujo en este caso fue de 0.04 mL/min. En ambas condiciones de fuerza iónica y en todos los valores de pH se realizó solo una réplica técnica.

Los perfiles cromatográficos que el programa Empower[®] 3 arrojó se encontraban en términos de tiempo de elución (min) y unidades de absorbencia (UA), sin embargo, para una mejor visualización los perfiles se convirtieron a volumen de elución (mL) y absorbencia normalizada. Para normalizar cada punto de absorbencia se aplicó la **Ecuación 4**:

$$1 - \left(\frac{Abs_{max} - UA}{Abs_{max} - Abs_{min}} \right)$$

(Ecuación 4)

en donde:

Abs_{max} = Valor de absorbencia máxima de todo el cromatograma a 25°C

Abs_{min} = Valor de absorbencia mínima de todo el cromatograma a 25°C

UA = valor de la absorbencia respecto al tiempo

5.8 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

El análisis de la estructura secundaria de la proteína se llevó a cabo mediante espectroscopía de dicroísmo circular a pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5 con NaF 20 mM

utilizando los amortiguadores CD A1-5 (**Tabla 1**) y 300 mM NaF utilizando los amortiguadores CD B1-5 (**Tabla 1**). La muestra de proteína BcHMGR fue diluida en la solución amortiguadora correspondiente y se ajustó a una concentración final de 2.5 μM . Los espectros de CD se adquirieron en un espectropolarímetro JASCO J-1500 a una temperatura de 25°C en la región de UV lejano (190–260 nm) con una celda de cuarzo de paso óptico de 1 mm. Inicialmente se realizó una lectura solo con amortiguador y sin proteína como blanco, y después se realizaron dos lecturas de proteína BcHMGR con tres acumulaciones cada una a una velocidad de barrido de 20 nm/min y un tiempo de integración de 16 s. También se evaluó la variación de la señal de dicroísmo circular en función de la temperatura para evaluar la estabilidad térmica de la proteína. Esto se llevó a cabo midiendo la elipticidad a 222 nm. El proceso de calentamiento se realizó a una velocidad de 1°C/min con un tiempo de integración de 16 s en un rango de temperatura de 25 - 65°C. Los datos se analizaron mediante una distribución de Boltzmann para determinar la temperatura media de desnaturalización o T_m . Los resultados se expresaron en unidades de elipticidad molar media de residuos (Θ) de acuerdo con la **Ecuación 5**:

$$\theta \cdot 10^{-3} (\text{grados} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{\theta_{obs} \cdot 10^3}{L \cdot C \cdot N} \quad (\text{Ecuación 5})$$

En donde:

θ_{obs} : Es el valor de la elipticidad observada en miligrados

L : Es el paso óptico de la luz en la celda en mm

C : Es la concentración de la proteína en μM

N : Es el numero de residuos de la proteína

6 Resultados y discusión

6.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante BcHMGR

Células de *Escherichia coli* C41 fueron transformadas con el plásmido pQlinkH-His-TEV-BcHMGR, y posteriormente fue inducida la expresión de la proteína mediante autoinducción. Una vez expresada la proteína ésta se purificó mediante cromatografía de afinidad a iones Co(II) y se realizó una electroforesis desnaturizante para evaluar la pureza de la proteína obtenida. Como se presenta en la **Figura 14**, la proteína BcHMGR se expresó satisfactoriamente de forma recombinante quedando casi en su totalidad en la fracción soluble. El remanente que quedó en el pellet celular se debe probablemente a que la eficiencia del lisado no fue del 100%, sin embargo, este remanente es despreciable dado que se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 100 mg de proteína por litro de cultivo. Los resultados del gel SDS-PAGE demostraron que el sistema y el método de expresión utilizado nos permitió obtener rendimientos altos de proteína recombinante, y que con el método de purificación aplicado se obtuvo la BcHMGR (45 kDa) en gran cantidad y con una elevada pureza.

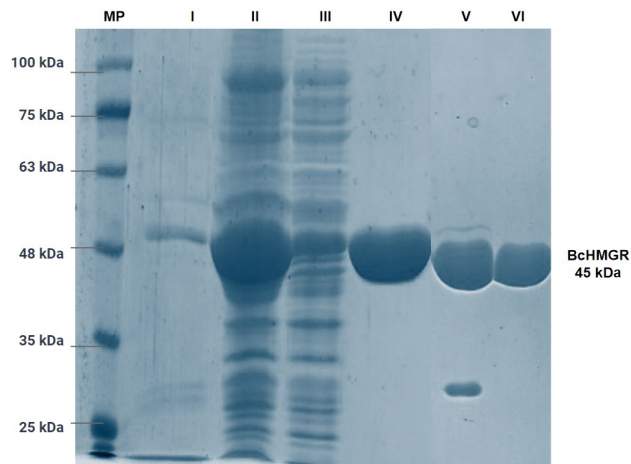


Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE de la purificación de la proteína recombinante BcHMGR. MP) Marcador de peso molecular. I) Fracción insoluble. II) Fracción soluble. III) Fracción no retenida en la primera columna de afinidad a iones cobalto. IV) Elución de la primera columna de afinidad a iones cobalto. V) Muestra después de la diálisis-digestión con la proteasa TEV. VI) Fracción no retenida en la segunda columna de afinidad a iones cobalto y que corresponde a la proteína pura.

6.2 Electroforesis de proteína en condición nativa (Blue-native, BN-PAGE)

La electroforesis Blue-native PAGE es un método muy utilizado para el aislamiento y análisis de complejos proteicos. A diferencia de la electroforesis SDS-PAGE tradicional que separa las proteínas por su relación carga/masa, en BN-PAGE los complejos se separan por su peso molecular y conformación [71]. El Azul de Coomassie usado en el amortiguador del cátodo les confiere a las proteínas una carga negativa, pero sin desnaturalizarlas como ocurre con el SDS. Así se preserva la conformación nativa de la proteína y permite analizar interacciones proteicas, identificar la composición de subunidades en complejos proteicos, así como el estudio de asociaciones comparativas de proteínas en diferentes condiciones, entre otros.

Se realizaron electroforesis de proteína en condiciones nativa tipo *Blue-native* en geles de poliacrilamida con gradiente 4-16% con diferentes cantidades de proteína (5 - 50 μ g) en condiciones de alta y baja fuerza iónica (NaCl a 300 mM y 100 mM). Como se observa en la **Figura 15 A y C** se resolvieron cuatro bandas, una banda de peso molecular pequeño por debajo del marcador de peso de 66 kDa la cual probablemente corresponde a la unidad monomérica (45 kDa), seguido de una banda alrededor de los 100 kDa que podría representar a un ensamble dimérico (90 kDa), una banda por arriba de los 250 kDa el cual probablemente corresponde al hexámero (270 kDa) y que se ve más prominente en las condiciones de 100 mM NaCl (**Figura 15C**) y, por último, una banda de mayor peso molecular cercana a 600 kDa que correspondió a un ensamble de multiplicidad mayor (posiblemente alrededor de 14 subunidades, de acuerdo a su migración respecto al marcador de peso molecular) que es más notorio en la condición de NaCl 300 mM (**Figura 15A**). De estos resultados se observa que la cantidad de proteína no parece alterar el equilibrio entre los ensamblajes oligoméricos que presenta la BcHMGR. Sin embargo, la fuerza iónica alta pareciera favorecer la formación del oligómero de alta multiplicidad, mientras que una fuerza iónica menor favoreció la forma

hexámerica. Se realizó otro gel nativo con un gradiente 4-16% de poliacrilamida cargando una cantidad fija de BcHMGR (20 µg) en alta y baja fuerza iónica y en presencia de altas concentraciones de los sustratos mevalonato y coenzima-A, y el cofactor NAD⁺ de la enzima. Como se observa en la **Figura 15-B y D**, los ensambles oligoméricos que se observaron corresponden de igual manera a monómero, dímero, hexámero y un ensamble de alto peso molecular, para los cuales la presencia de los sustratos y el cofactor no modificaron la proporción o naturaleza de las especies oligoméricas presentes. Dado que la BcHMGR puede adoptar múltiples ensambles, era posible que presentara ensambles con diferente conformación, pero del mismo peso molecular, lo cual no podía visualizarse en el gel de gradiente 4-16% debido a que bandas muy cercanas pueden no resolverse en bandas bien definidas observándose como una sola banda. Debido a esto se realizaron geles de poliacrilamida al 10% con el objeto de observar si había ensambles de distinta conformación, pero mismo peso molecular. Estos geles se realizaron también con 20 µg de BcHMGR en alta y baja fuerza iónica, añadiendo los sustratos y cofactores. Como se puede ver en la **Figura 15-B y D**, en el gel de poliacrilamida 4-16% se resuelve solo una banda alrededor de los 100 kDa mientras que en el gel de poliacrilamida al 10% se separan dos bandas que parecieran corresponder a dos dímeros distintos, uno de peso molecular aparente mayor que el otro. Este hecho se pudiera explicar si se considera que las moléculas de proteína que están en una conformación globular se retienen menos al no tener un impedimento para migrar por los poros de la matriz, de modo que pueden observarse como proteínas de peso molecular aparente menor a proteínas del mismo peso, pero cuya conformación sea elongada.

En este caso observamos que en el ensamble correspondiente al dímero de BcHMGR se resuelve en dos bandas lo cual sugiere que existen dos conformaciones diméricas de la BcHMGR, en donde uno de ellos es globular y el otro presenta una conformación menos compacta. Ambos dímeros estuvieron presentes sin importar la ausencia o presencia de cada uno de los sustratos y el cofactor, o la condición de fuerza iónica.

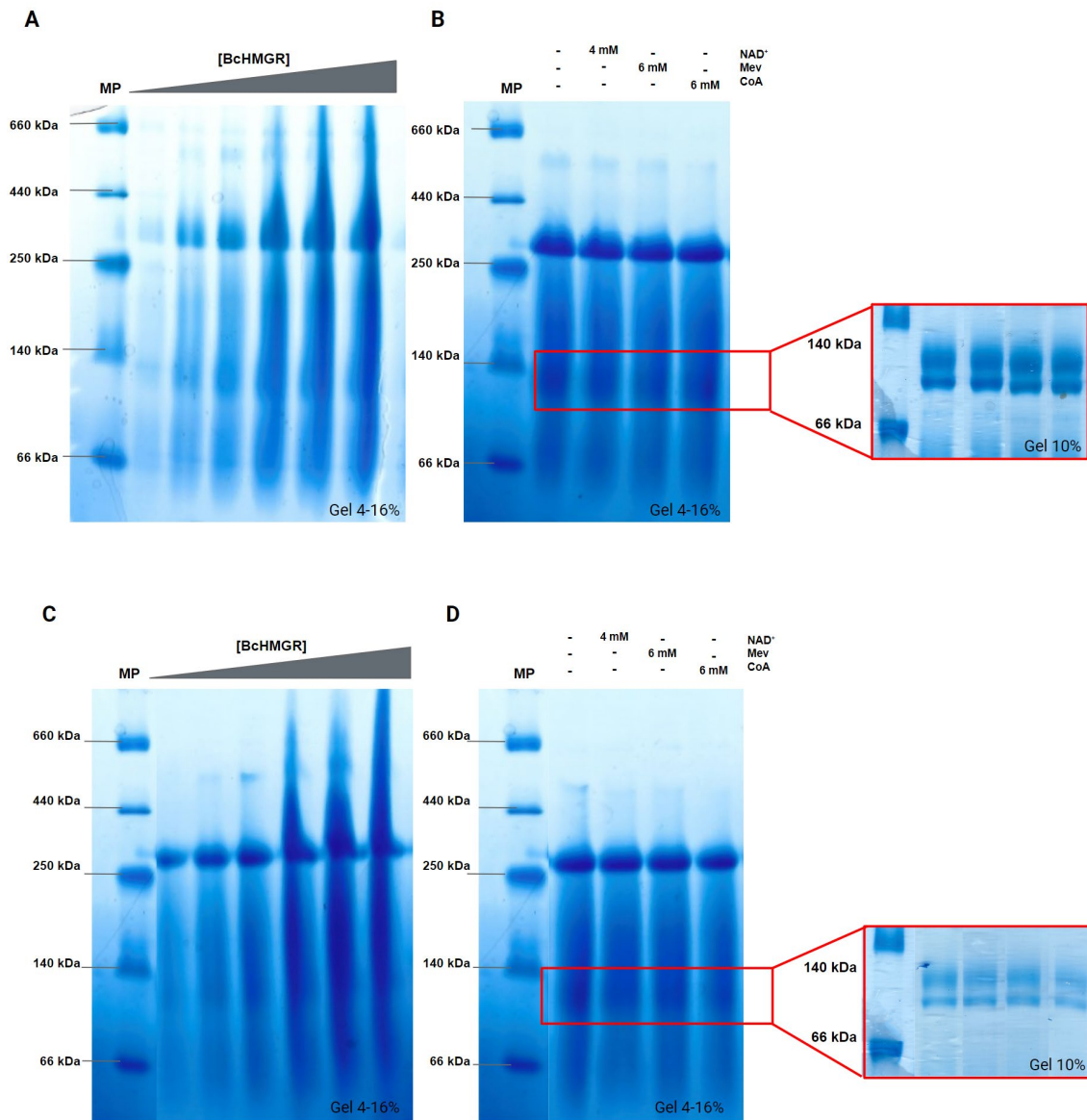


Figura 15. Electroforesis Blue-native de la BcHMGR a diferente fuerza iónica.
 (A) Diferentes cantidades de proteína BcHMGR: 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g, 30 μ g, 40 μ g y 50 μ g de proteína a NaCl 300 mM. (B) Presencia de sustratos con 20 μ g de proteína BcHMGR con un acercamiento en la resolución de dos dímeros a NaCl 300 mM. (C) Diferentes cantidades de proteína BcHMGR: 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g, 30 μ g, 40 μ g y 50 μ g de proteína a NaCl 100 mM. (D) Presencia de sustratos con 20 μ g de proteína BcHMGR con un acercamiento en la resolución de dos dímeros a NaCl 100 mM. MP corresponde al marcador de peso molecular a la izquierda de cada gel

6.3 Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular o de filtración en gel es una técnica muy usada para separar moléculas de diferente tamaño y forma que se encuentran en solución [70]. Esto es posible debido a la diferente migración de las moléculas a través de una matriz con cierto tamaño de poro, en dónde las moléculas de un peso o dimensiones mayores que el rango de separación de la columna no tienen cabida dentro de los poros de la matriz y fluyen a través del volumen intersticial eluyendo primero en el volumen muerto de la columna (V_0). Moléculas de un peso o dimensiones menores que el rango de separación de la columna son capaces de entrar entre los poros de la matriz, lo que ocasiona su retención, eluyendo al final en el volumen total disponible para la fase móvil de la columna (V_T). Por otro lado, moléculas con peso y dimensiones que se encuentran dentro del rango de separación de la columna son eluidas a un cierto volumen de elución (V_e) el cual abarca entre V_0 y V_T [72, 73].

Las curvas de calibración para las columnas de exclusión molecular se realizan empleando proteínas globulares, lo cual es un problema si la proteína en estudio no tiene una conformación globular ya que podría eluir en un volumen de elución que no corresponde a su dimensión, dándonos una masa molecular aparente que no está aproximada correctamente [73]. Para considerar esto, también se puede presentar la curva de calibración de una columna de exclusión molecular en términos del radio hidrodinámico (R_h) en lugar del peso molecular de las proteínas utilizadas durante la calibración. El radio hidrodinámico, también conocido como radio de Stokes, es un parámetro utilizado para reflejar las dimensiones de las proteínas, por lo que, moléculas con radio hidrodinámico más grande se alejan de una dimensión globular teniendo tamaños más alargados [74].

Se realizaron cromatografías de exclusión molecular de la BcHMGR en diferentes condiciones de fuerza iónica y pH con finalidad de identificar los ensamblajes oligoméricos presentes bajo cada condición, y mediante una extrapolación en la curva de calibración conocer su masa molecular y por ende su multiplicidad. Dado que los resultados de la electroforesis Blue-native sugieren la presencia de dos

dímeros de conformación distinta, las correspondientes señales en el cromatograma de exclusión molecular también se analizaron con la curva de calibración de R_h en función de K_{av} . Se utilizaron dos columnas de exclusión molecular dado el intervalo de pesos moleculares que pueden resolver. Los valores de peso molecular, volumen de elución, K_{av} y R_h para cada proteína usada en la curva de calibración de la columna Yarra SEC se encuentran registrados en la **Tabla 11**, mientras que los datos de la columna Superdex se encuentran en la **Tabla 12**.

Tabla 11. Calibración de la columna Yarra® SEC-2000.

Proteína	Peso molecular (Da)	ln (Peso molecular)	Tiempo de elución (min)	Volumen de elución (min)	K_{av}	R_h (nm)
Subunidad ribosomal 60S	4,200,000	15.25	4.13	2.06	0	-
Tiroglobulina	669,000	13.41	4.87	2.44	0.12	8.6
Aldolasa	158,000	11.97	6.01	3.01	0.31	4.8
Alcohol deshidrogenasa	150,000	11.92	6.07	3.04	0.32	4.6
EspK-C	27,191	10.21	6.99	3.45	0.47	ND
Lisozima	14,307	9.57	7.52	3.76	0.55	1.9
Triptófano	204	5.32	10.28	5.14	1	-

Los valores de R_h de las proteínas estándar fueron recabados de [70],[72]. ND – no determinado.

Tabla 12. Calibración de la columna Superdex® 200 Increase 3.2/300.

Proteína	Peso molecular (Da)	ln (Peso molecular)	Tiempo de elución (minutos)	Volumen de elución, (minutos)	K_{av}	R_h (nm)
Hemocianina	7,800,000	15.87	24.75	0.99	0	-
Tiroglobulina	669,000	13.41	27.05	1.08	0.06	8.6
β -Amilasa	200,000	12.21	33.85	1.35	0.23	5.4
Albúmina	66,000	11.097	39.07	1.56	0.36	3.5
Citocromo C	12400	9.425	47.87	1.92	0.58	1.7
Imidazol	68	4.220	64.65	2.59	1	-

Los valores de R_h de las proteínas estándar fueron recabados de [70].

Las curvas de calibración correspondientes a cada columna se presentan en la **Figura 16** en donde se puede observar que se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) aceptable.

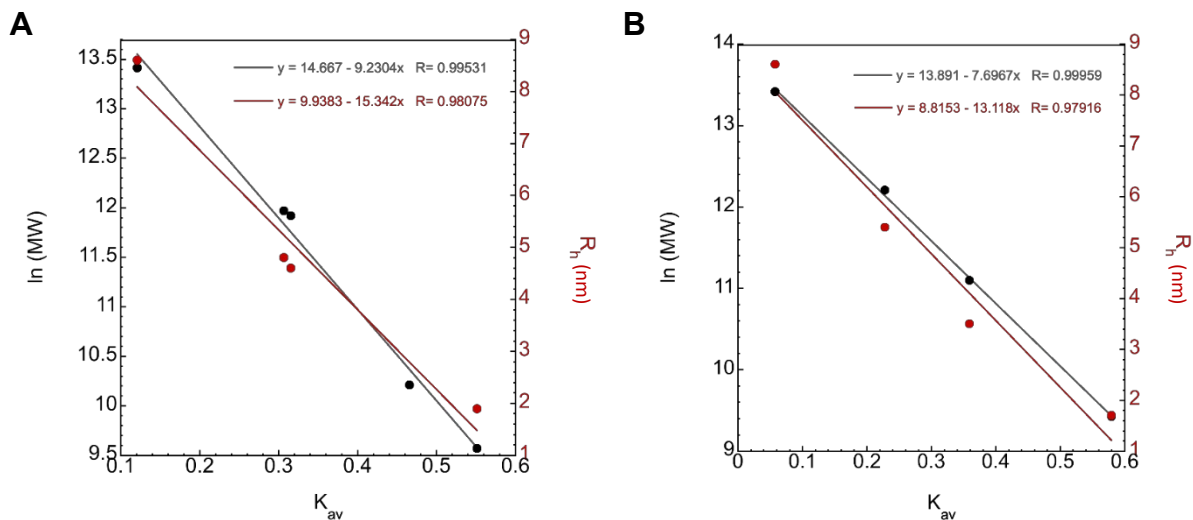


Figura 16. Calibración de las columnas utilizadas en las cromatografías de filtración en gel usadas en este trabajo. (A) Columna Yarra SEC-2000. (B) Columna Superdex 200 Increase 3.2/300. La línea sólida representa el ajuste a una regresión lineal.

Una vez calibradas las columnas de exclusión molecular se procedió a realizar las cromatografías en condiciones de alta fuerza iónica (NaCl 300 mM) en un intervalo de pH de 6.0 a 7.5 y baja fuerza iónica (NaCl 50 mM) en un intervalo de pH de 7.0 a 8.5. Con el tiempo de elución (T_e) y volumen de elución (V_e) obtenido de cada pico se calculó el K_{av} y se hizo la extrapolación en la curva de calibración para conocer la masa molecular (MW), la cual se dividió entre la masa molecular del monómero (45 kDa) y así se obtuvo la multiplicidad de cada ensamble (**Tabla 13**) (**Tabla 14**).

En condiciones de alta fuerza iónica se observó la presencia de tres picos para las dos concentraciones de BcHMGR evaluadas (**Figura 17A-B**). La primera señal eluyó en el volumen muerto de la columna, lo que sugiere la presencia de una especie con masa molecular mayor a 300 kDa. Esto concuerda con los resultados de la electroforesis en condiciones nativas en donde se observó un ensamble de

alta multiplicidad con una masa cercana a 600 kDa (**Figura 15A**) al cual me referiré como el “oligómero de alto peso molecular”. El segundo pico presentó una masa molecular alrededor de los 80-100 kDa, lo cual concuerda con una masa cercana a un ensamble dimérico. La última señal observada nos refería una molécula de tamaño muy pequeño, lo cual se atribuyó al imidazol presente en el amortiguador en el que se guardó la BcHMGR al término de su purificación (amortiguador de lisis). El imidazol es una molécula orgánica pequeña con estructura aromática heterocíclica la cual funge como grupo funcional de la histidina, por lo que este anillo aromático presenta absorbencia en longitud de onda de 280 nm [75, 76]. Estas tres señales se encontraron en todos los perfiles cromatográficos obtenidos en condiciones de alta fuerza iónica, sin embargo, la intensidad del pico correspondiente al oligómero mayor cambiaba respecto a la concentración de proteína y al pH del amortiguador de corrida. Usando una concentración de 2 mg/mL de proteína BcHMGR (**Figura 17A**) a pH 7.0 y 7.5 la intensidad del pico que corresponde al oligómero mayor disminuyó drásticamente en comparación a los picos obtenidos a pH 6.0 y 6.5. Sin embargo, a una concentración de 6 mg/mL de proteína (**Figura 17B**) esta disminución en la intensidad del pico del oligómero mayor no ocurrió dado que los picos se mantuvieron similares sin importar la variación del pH.

Tabla 13. Especies oligoméricas de la BcHMGR encontradas por medio de cromatografías de exclusión molecular a NaCl 300 mM.

pH	BcHMGR [mg/mL]	T _e (min)	V _e (mL)	K _{av}	ln MW	MW (kDa)	Multiplicidad
6	2	6.23	3.14	0.35	11.53	101.7	2.3
	6	6.17	3.08	0.32	11.70	120.8	2.7
6.5	2	6.30	3.15	0.35	11.51	99.4	2.2
	6	6.15	3.07	0.33	11.74	124.9	2.8
7	2	6.29	3.15	0.35	11.51	99.7	2.2
	6	6.13	3.07	0.33	11.76	128.1	2.8
7.5	2	6.42	3.21	0.37	11.30	80.6	1.8
	6	6.43	3.22	0.37	11.29	79.8	1.8

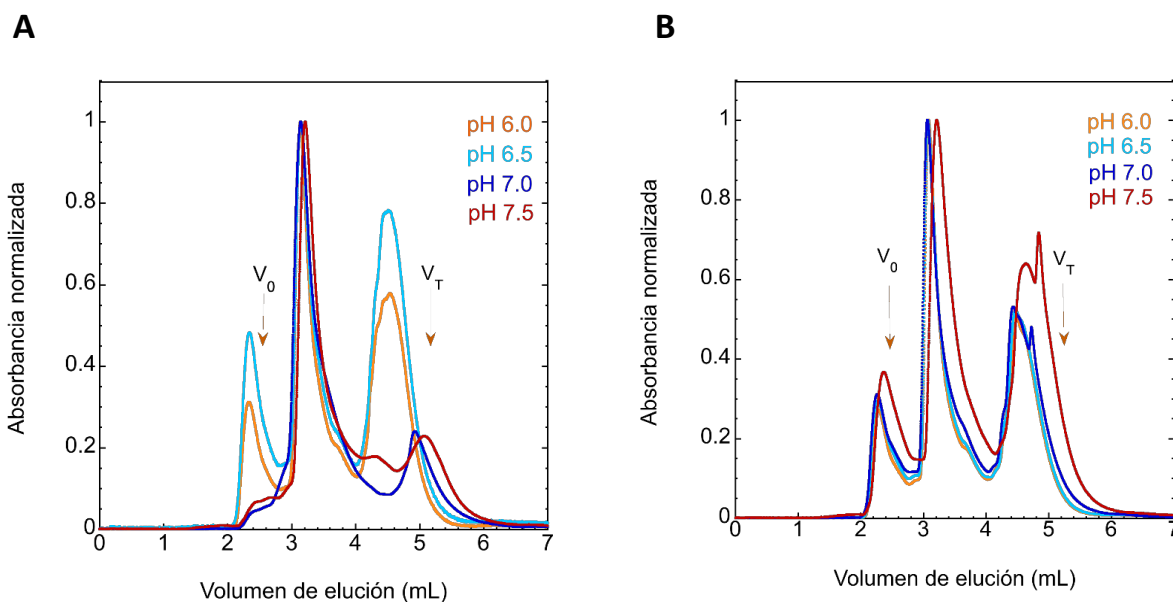


Figura 17. Perfiles de exclusión molecular de la proteína BcHMGR en un amortiguador con alta fuerza iónica a diferentes pH. (A) 2 mg/mL. (B) 6 mg/mL. V_0 - volumen muerto. V_T - volumen total de cama. Columna Yarra SEC-2000.

En los perfiles cromatográficos obtenidos en condiciones de baja fuerza iónica a 2 y 6 mg/mL de BcHMGR (**Figura 18A-B**) se observó la presencia de dos señales. La primera eluyó a un volumen tal que la extrapolación en la curva de calibración indicó un ensamble cercano a 370-380 kDa, lo que sugiere un ensamble de ocho subunidades. Mientras que el segundo pico que eluyó presentó una masa molecular alrededor de los 130 kDa lo cual correspondió a una multiplicidad de tres. Recordando los resultados de las electroforesis en condiciones nativas (**Figura 15C**), se observó una banda por arriba del marcador de peso molecular de 250 kDa, correspondiente a un ensamble de tipo hexamérico. Sin embargo, en los perfiles obtenidos en baja sal el ensamble presente refiere una multiplicidad de ocho, esta discrepancia puede deberse a alguna interacción del ensamble proteico con la resina de la columna que la haya retenido o quizás a que el ensamble hexamérico presente una conformación elongada, tal que eluyó como un ensamble de masa molecular aparente mayor. Esto mismo sucedió con el segundo pico que presentó una multiplicidad trimérica, y dado que existen dos dímeros siendo uno de ellos de aparente mayor peso molecular según las

electroforesis nativas, se consideró que este “trímero” en realidad es el dímero en una conformación alargada, por ello eluyó con una masa molecular aparente mayor que la del dímero globular. Estos resultados también sugieren que es a partir de este dímero elongado de donde se origina el hexámero.

Tabla 14. Especies oligoméricas de la BcHMGR encontradas por medio de cromatografías de exclusión molecular a NaCl 50 mM.

pH	BcHMGR [mg/mL]	T _e (min)	V _e (mL)	K _{av}	ln MW	MW (kDa)	Multiplicidad
7.0	2	30.11	1.20	0.13	12.86	383.6	8.5
		35.66	1.43	0.27	11.79	131.6	2.9
	6	30.23	1.21	0.14	12.84	375.0	8.3
		35.70	1.42	0.27	11.78	130.8	2.9
7.5	2	30.27	1.21	0.14	12.83	372.0	8.2
		35.88	1.44	0.28	11.74	126.0	2.8
	6	30.25	1.21	0.14	12.83	373.5	8.3
		35.72	1.43	0.28	11.78	130.0	2.9
8.0	2	30.17	1.21	0.14	12.85	379.7	8.4
		35.70	1.43	0.27	11.78	130.5	2.9
	6	30.27	1.21	0.14	12.83	372.0	8.2
		35.76	1.43	0.28	11.77	128.9	2.9
8.5	2	30.16	1.21	0.14	12.85	379.7	8.4
		35.75	1.43	0.28	11.77	129.4	2.9
	6	30.29	1.21	0.14	12.83	370.4	8.2
		35.80	1.43	0.28	11.76	128.1	2.8

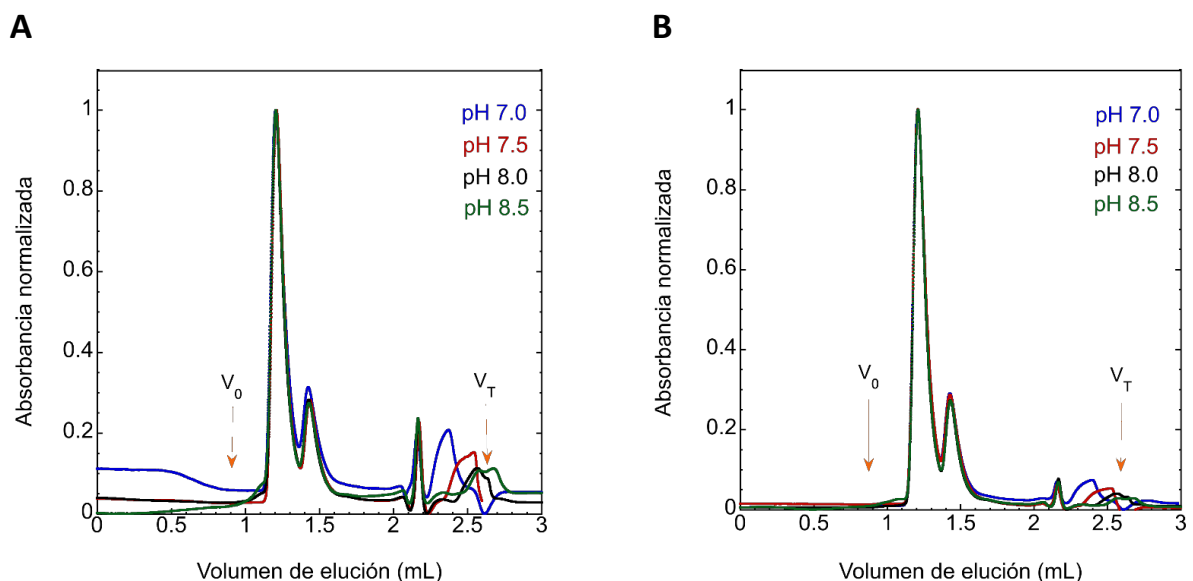


Figura 18. Perfiles de exclusión molecular de la proteína BcHMGR en un amortiguador con baja fuerza iónica a diferentes pH. (A) 2 mg/mL. (B) 6 mg/mL. V_0 - volumen muerto. V_T -volumen total de cama. Columna Superdex 200 Increase.

En comparación con los perfiles cromatográficos en condiciones de alta fuerza iónica (**Figura 17**), las intensidades de los picos correspondientes al hexámero y las de los picos correspondientes al dímero elongado en baja fuerza iónica no cambiaron respecto a la variación de pH o la concentración de proteína BcHMGR (**Figura 18**).

Los volúmenes de elución de los picos que correspondían al ensamblaje dimérico de la BcHMGR a baja fuerza iónica se extrapolaron en la curva de calibración en términos de radio hidrodinámico. Esto se realizó para ambas concentraciones a los diferentes valores de pH y en las dos condiciones de fuerza iónica (**Tabla 15**), obteniéndose que a NaCl 300 mM el dímero presente tiene un valor de R_h promedio de 4.5 nm para la concentración de 2 mg/mL y de 4.7 nm para la concentración de 6 mg/mL (**Figura 19**). Por otro lado, a NaCl 50 mM los valores de R_h promedio fueron de 5.2 nm para ambas concentraciones de proteína (**Figura 19**). Estos valores indicaron que en condiciones de alta fuerza iónica el dímero presente tiene una conformación más compacta, mientras que en baja fuerza

iónica se favorece un dímero elongado, sustentando nuevamente la presencia de los dos dímeros observados en la electroforesis nativa.

Con estos valores de R_h se puede establecer la presencia de dos dímeros con diferente conformación, a NaCl 300 mM se favorece el dímero globular mientras que a NaCl 50 mM se presenta el dímero elongado.

Tabla 15. Valores de radio hidrodinámico (R_h) de las especies diméricas de la proteína BcHMGR.

Condición	BcHMGR [mg/mL]	pH	R_h (nm)	R_h promedio (nm)
NaCl 300 mM	2	6.0	4.58	4.5 ± 0.2
		6.5	4.54	
		7.0	4.55	
		7.5	4.21	
	6	6.0	4.85	4.7 ± 0.3
		6.5	4.90	
		7.0	4.94	
		7.5	4.20	
NaCl 50 mM	2	7.0	5.23	5.2 ± 0.04
		7.5	5.16	
		8.0	5.22	
		8.5	5.18	
	6	7.0	5.22	5.2 ± 0.02
		7.5	5.21	
		8.0	5.19	
		8.5	5.18	

Esta misma extrapolación en términos de radio hidrodinámico se realizó para los picos que sugerían una multiplicidad hexamérica en condiciones de baja fuerza iónica obteniéndose un R_h de 7 nm (Tabla 16). Se puede observar que el valor de R_h se mantiene constante respecto a la variación en pH y concentración de proteína. Como era de esperarse este ensamble es de mayor dimensión que los ensambles diméricos mostrados anteriormente. Este análisis de valores de radio hidrodinámico no se realizó para los picos que eluyeron en el volumen muerto de

la columna Yarra SEC-2000 en las cromatografías, dado que en esta señal pueden coexistir una multitud de especies con diferentes pesos moleculares.

Tabla 16. Valores de radio hidrodinámico (R_h) de la especie hexamérica de la proteína BcHMGR

Condición	BcHMGR [mg/mL]	pH	R_h (nm)
NaCl 50mM	2	7.0	7.05
		7.5	7.00
		8.0	7.04
		8.5	7.04
	6	6.0	7.01
		6.5	7.01
		7.0	7.00
		7.5	6.99

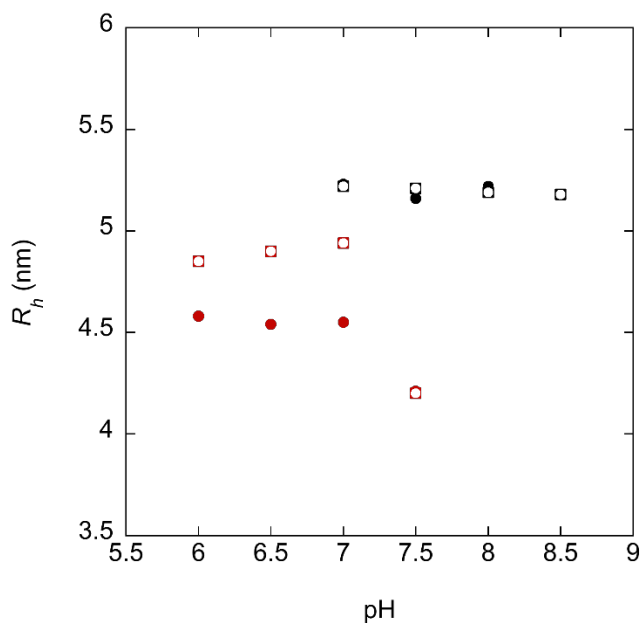


Figura 19. Valores de radio hidrodinámico (R_h) de los ensamblajes diméricos de la BcHMGR. Alta (rojo) y baja fuerza iónica (negro). Círculos sólidos – 2 mg/mL. Círculos vacíos – 6 mg/mL.

Para indagar en los cambios de la abundancia relativa de los ensamblajes respecto al pH y a la concentración de proteína en la condición de NaCl 300 mM se calculó la relación de la absorbancia máxima del pico correspondiente al dímero globular ($Abs_{d.g}$) respecto a la absorbancia máxima del pico correspondiente al oligómero de alto peso (Abs_o). La misma relación se obtuvo, pero considerando el área bajo la curva (ABC) de cada uno de estos picos. Para la condición de NaCl 50 mM se hizo el mismo análisis, pero para las señales correspondientes al dímero elongado ($Abs_{d.e}$) y al hexámero (Abs_h).

Para la condición de NaCl 300 mM (**Figura 20**) se puede observar que a una concentración de 2 mg/mL de BcHMGR y pH 6.0 - 6.5 tanto el dímero globular como el oligómero mayor se encuentran en una proporción que no cambia. Sin embargo, a pH 7 hay un aumento abrupto en la relación dímero globular/oligómero mayor lo cual indica que a este pH el ensamblaje que se favorece es el dimérico. De igual forma esto sucede a pH 7.5 en donde el cociente de esta relación también tiene un valor más alto que a pH 6.0 y 6.5, pero menos que a pH 7.0, lo que sugiere que el ensamblaje favorecido sigue siendo el dímero, pero en menor proporción respecto al oligómero de alto peso molecular. Por otro lado, a una concentración de 6 mg/mL la relación dímero globular/oligómero mayor parece mantenerse constante sin importar la variación en el pH.

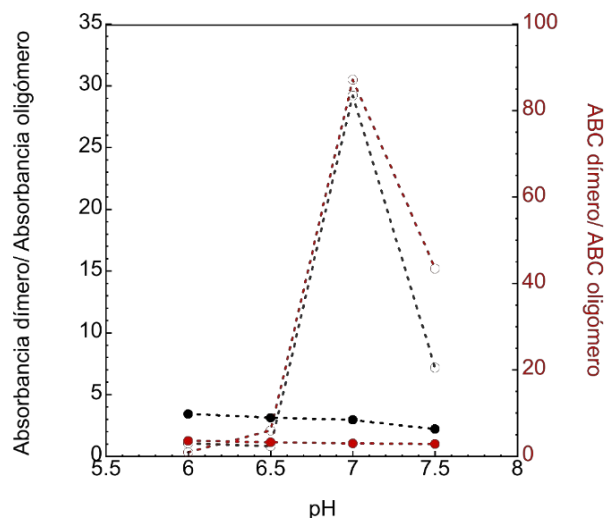


Figura 20. Abundancia relativa del dímero globular respecto del oligómero de alto peso en función del pH y la concentración de proteína a alta fuerza iónica (NaCl 300 mM). Círculos rellenos – 6 mg/mL. Círculos vacíos – 2 mg/mL.

Es probable que el cociente de la relación dímero/oligómero a pH 7.0 y 7.5 tengan un error de experimental asociado, dado que el pico correspondiente al dímero no está bien definido ni resuelto a línea base, además de que la intensidad de la señal es muy baja (**Figura 17**). En caso de ser así, esto denotaría que el pH no tiene ningún efecto sobre la formación de los ensamblajes y que en promedio en esta condición de alta fuerza iónica hay una proporción de tres veces más dímero globular respecto al oligómero de alto peso mayor. Debido a que no se realizaron repeticiones de las inyecciones en cada condición no se puede saber si el cromatograma obtenido a esos valores de pH realmente es anómalo o erróneo. Realizar estos ensayos con un número mayor de repeticiones es parte de las perspectivas de este proyecto. A NaCl 50 mM (**Figura 21**) la relación de dímero elongado/hexámero se mantuvieron prácticamente constantes con valores alrededor de 0.3, sin importar el valor de pH o la concentración de proteína. Es decir, hay cuatro veces más hexámero que dímero elongado.

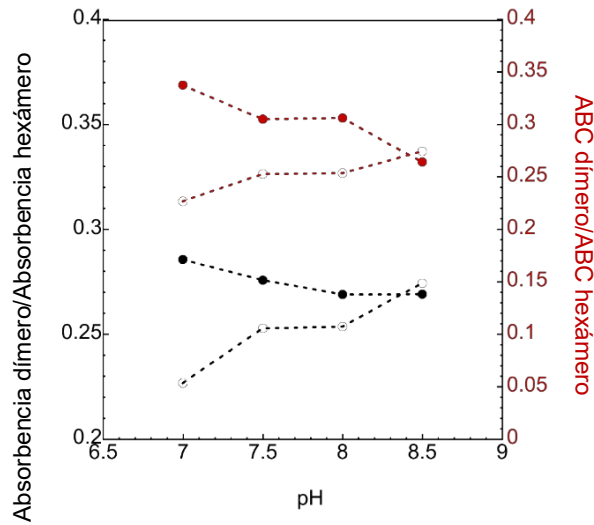


Figura 21. Abundancia relativa del dímero elongado respecto del hexámero en función del pH y la concentración de proteína a baja fuerza iónica (NaCl 50 mM). Círculos rellenos – 6 mg/mL. Círculos vacíos – 2 mg/mL.

De los resultados de electroforesis nativas, se identificó que el equilibrio dinámico de la BcHMGR engloba dos dímeros de diferente dimensión cada uno, un hexámero y un oligómero de alto peso molecular, y esto mismo se sustenta con los resultados obtenidos en las cromatografías de exclusión molecular en donde la multiplicidad obtenida de cada pico resuelto apunta a los mismos ensamblajes observados en los geles nativos. Sin embargo, las cromatografías de exclusión molecular nos aportaron aún más información sobre la forma en la que estas estructuras pueden presentarse, y es que es evidente que la fuerza iónica juega un papel importante en la formación de estos ensamblajes. Tal que el dímero globular está en equilibrio con el oligómero de alto peso molecular y se ve favorecido a fuerza iónica alta (NaCl 300 mM), mientras que el dímero elongado está en equilibrio con el hexámero a una baja fuerza iónica (NaCl 50 mM). Por otro lado, el pH y la concentración de proteína probablemente no juegan un papel crucial en la formación de estos ensamblajes, aunque como se mencionó anteriormente los datos obtenidos a pH 7 - 7.5 y NaCl 300 mM deben repetirse.

6.4 Dicroísmo circular (CD)

La espectroscopía de dicroísmo circular se puede definir como la absorción diferencial de luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha por moléculas quirales como los aminoácidos que conforman las proteínas [77]. Los espectros obtenidos en el UV cercano (250-350 nm) proveen información de la estructura terciaria de una proteína, y aquellos en el UV lejano (180-250 nm) evidencian el contenido de estructura secundaria [78]. Proteínas con estructuras tipo hélice α presentan dos mínimos característicos a 208 y 222 nm, mientras que las proteínas ricas en estructuras tipo láminas β presentan solo un mínimo de absorción a 215 nm (**Figura 22**). Por tanto, la espectroscopía de dicroísmo circular es una técnica muy usada para la determinación de la estructura secundaria y terciaria de proteínas, seguir su desnaturalización térmica o química, o para estudiar las interacciones macromolécula-ligando y macromolécula-macromolécula. Una ventaja de este método es que permite monitorear alteraciones estructurales relacionadas con cambios en las condiciones ambientales, como el pH, la temperatura y la fuerza iónica [79].

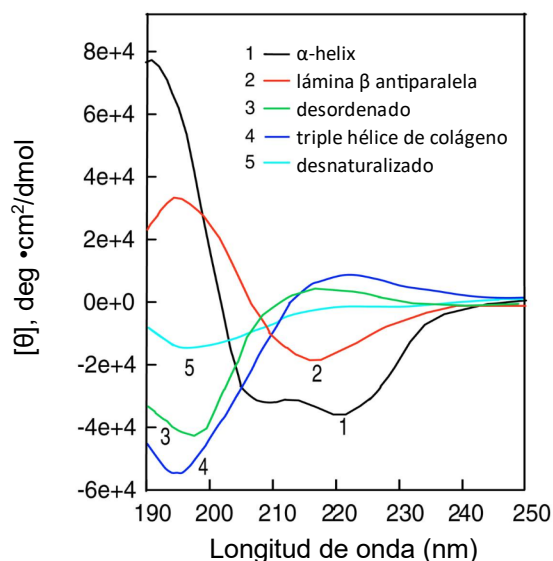


Figura 22. Espectros de dicroísmo circular representativos de estructuras secundarias en proteínas. Imagen adaptada de [77].

Se llevaron a cabo ensayos de dicroísmo circular y curvas de desnaturalización térmica a diferentes pH (6.5-8.5) en dos condiciones de fuerza iónica (NaF a 20 y 300 mM), utilizando como sal NaF en lugar de NaCl debido a que la adición de los iones cloruro absorben fuertemente en el UV-lejano, sin embargo, los iones fluoruro no lo hacen, por lo que son una buena alternativa cuando se requiere usar sal en el amortiguador [80]. Esto se hizo con finalidad de evaluar el contenido de estructura secundaria de los ensamblajes presentes en cada condición y observar si esto tiene alguna consecuencia en su temperatura media de desnaturalización (T_m).

En condiciones de alta fuerza iónica se obtuvo un espectro característico de una proteína rica en hélices α , con sus mínimos de absorbancia cercanos a -7 unidades de elipticidad molar, el cual se mantuvo sin importar la variación del pH (**Figura 23A**). Las curvas de desnaturalización térmica en alta fuerza iónica y distintos valores de pH entre 6.5-8.5 mostraron temperatura media de desnaturalización (T_m) con valores de 49-52°C (**Figura 23B**). De estas curvas podemos observar que la transición del estado nativo al desnaturalizado toma un intervalo 10°C, lo cual sugiere que probablemente la desnaturalización de la BcHMGR corresponde a un modelo $N \leftrightarrow U$ sin intermediarios y que la ruptura de los ensamblajes cuaternarios y la desnaturalización de las estructuras terciaria y secundaria ocurre de manera concertada. Otra observación respecto a las curvas de desnaturalización es que pareciera haber dos grupos de curvas de desnaturalización, el primero a pH 8.5 y 8.0 con una T_m de 49°C, y el segundo pH 7.5, 7.0 y 6.5 con una T_m de 51-52°C (**Tabla 17**).

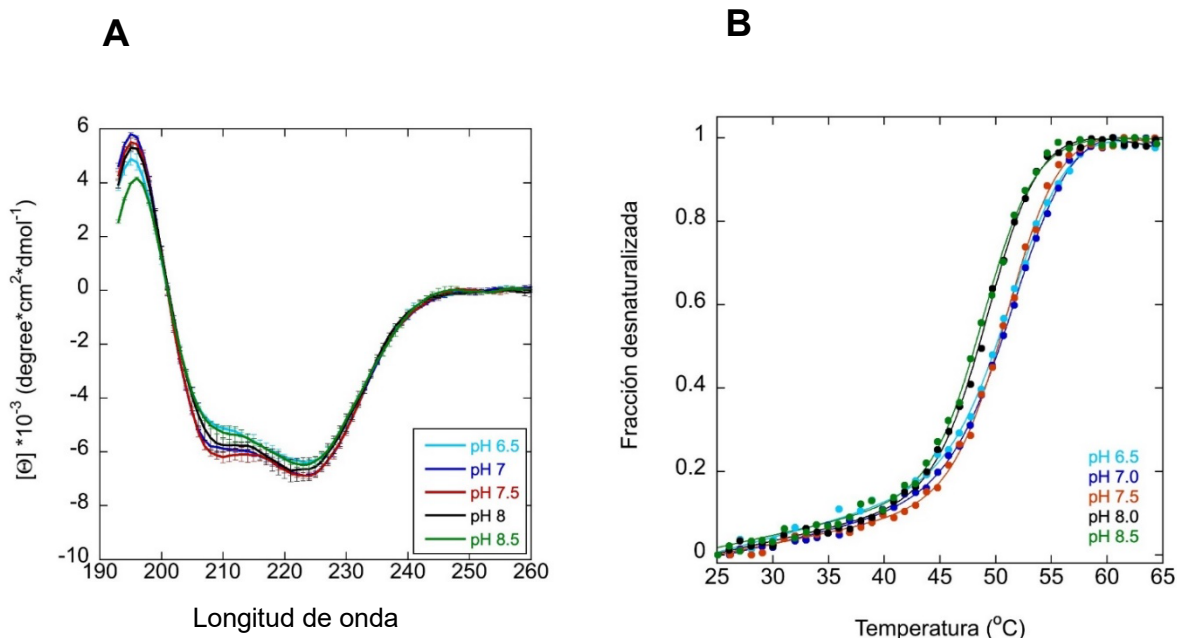


Figura 23. Dicroísmo circular y curvas de desnaturalización térmica de la proteína BcHMGR en NaF 300 mM. (A) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano a diferentes valores de pH. Las barras corresponden a la desviación estándar de dos réplicas independientes. (B) Curvas de desnaturalización térmica a distintos valores de pH. La línea sólida corresponde al ajuste a un modelo de una transición y dos estados $N \leftrightarrow U$.

Para la condición de baja fuerza iónica (NaF 20 mM) de igual forma se obtuvo un espectro característico de una proteína rica en hélices α . Sin embargo, la forma de los espectros difiere a los espectros en alta fuerza iónica, y la intensidad de la señal a 222 nm presentan valores cercanos a -9 unidades de elipticidad molar (Figura 24A). Las curvas de desnaturalización térmica a baja fuerza iónica y distintos valores de pH presentaron una temperatura media de desnaturalización (T_m) con valores entre 42-46 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 24B). La transición del estado nativo al desnaturalizado también abarcó aproximadamente 10 $^{\circ}\text{C}$, lo cual sugiere de igual manera que en estas condiciones la desnaturalización de la BcHMGR se ajusta adecuadamente a un modelo $N \leftrightarrow U$ sin intermediarios. Así como sucedió en la condición de alta sal, las curvas de desnaturalización en baja sal también parecen

diferenciarse en dos grupos, uno a pH 8.5 y 8.0 con una T_m de 42 y 43°C, y el segundo pH 7.5, 7.0 y 6.5 con una T_m de 44-46°C (Tabla 18).

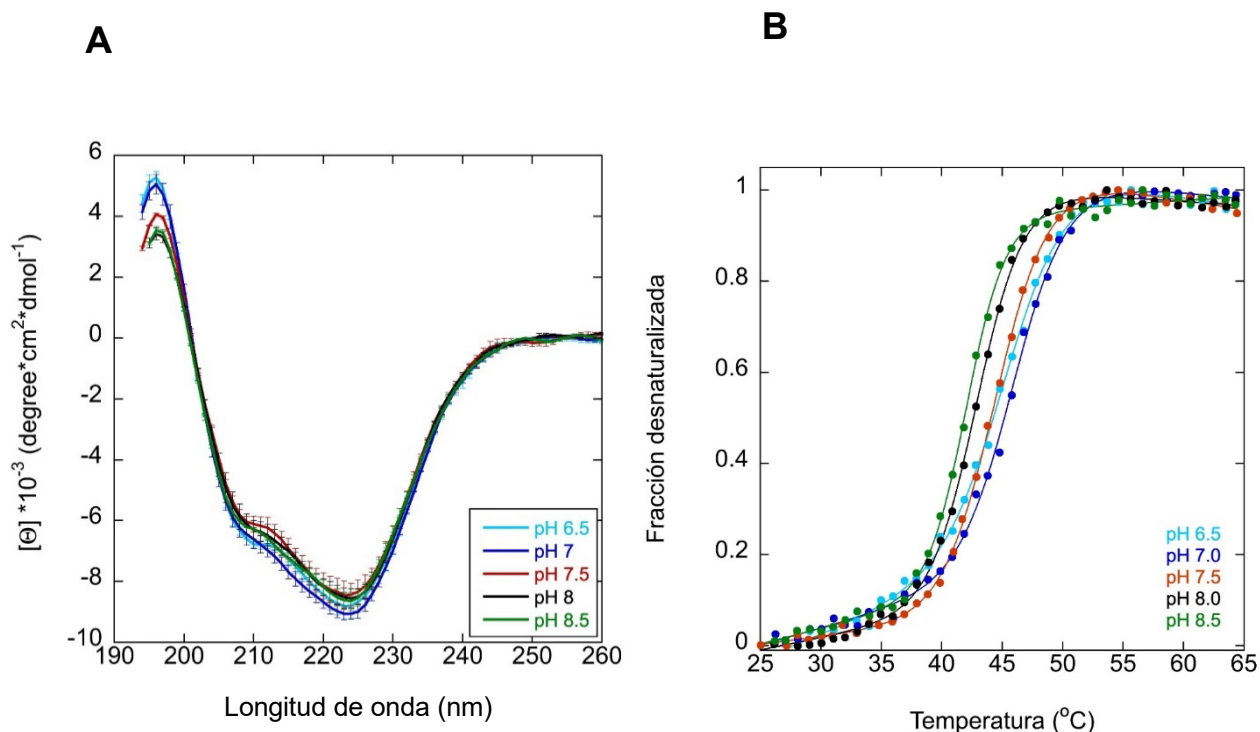


Figura 24. Dicroísmo circular y curvas de desnaturalización térmica de la proteína BcHMGR en NaF 20 mM. (A) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano a diferentes valores de pH. Las barras corresponden a la desviación estándar de dos réplicas independientes. (B) Curvas de desnaturalización térmica a distintos valores de pH. La línea sólida corresponde al ajuste de un modelo con una transición y dos estados $N \leftrightarrow U$.

Tabla 17. Temperaturas medias de desnaturalización de la proteína BcHMGR a diferente fuerza iónica y diferentes valores de pH.

Condición	pH	T_m (°C)
NaF 20 mM	6.5	45.7 \pm 0.20
	7.0	46.1 \pm 0.20
	7.5	44.6 \pm 0.08
	8.0	43.0 \pm 0.02
	8.5	42.1 \pm 0.10
NaF 300 mM	6.5	52.1 \pm 0.20
	7.0	52.4 \pm 0.19
	7.5	51.4 \pm 0.23

	8.0	49.7±0.21
	8.5	49.1±0.14

Como ya se mencionó anteriormente, aunque los espectros de dicroísmo circular tanto en baja como en alta y baja fuerza iónica hacen referencia a que la BcHMGR en ambas condiciones tiene estructuras secundarias de tipo hélice α , los espectros obtenidos en dichas condiciones difieren entre sí, esto se puede visualizar mejor en la **Figura 25**.

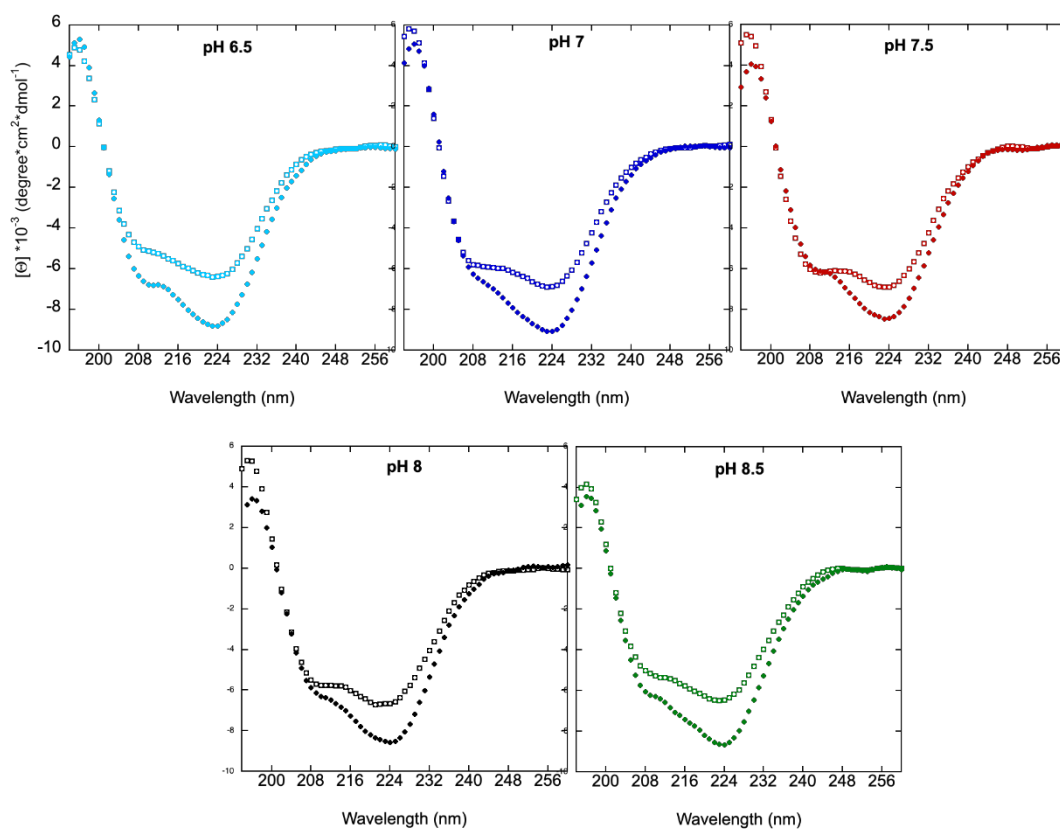


Figura 25. Comparación de los espectros de dicroísmo circular de la proteína BcHMGR en alta y baja sal a diferentes pH. Círculos sólidos – NaF 20 mM. Círculos vacíos – NaF 300 mM.

Esta diferencia entre los espectros de dicroísmo en ambas condiciones de fuerza iónica es un reflejo de las diferentes especies cuaternarias que se encuentran en cada condición. Recordando los resultados de las cromatografías de exclusión molecular, en alta fuerza iónica los ensambles cuaternarios que presenta la BcHMGR corresponden a un dímero globular y oligómero de alto peso molecular, mientras que en baja fuerza iónica se encuentra un dímero elongado y un hexámero. Lo que sugiere que el cambio conformacional de la especie dimérica mediado por un cambio en el contenido de estructura secundaria facilita la formación de cada uno de los ensambles cuaternarios de mayor multiplicidad. A su vez, esto mismo se refleja en la temperatura media de desnaturalización. En la condición de NaF 300 mM los ensambles presentan una T_m con valores de temperatura mayores que en baja sal, lo que sugiere que la estabilidad de los ensambles favorecidos en alta fuerza iónica es mayor que la de los ensambles presentes en baja fuerza iónica.

Con todos los resultados expuestos anteriormente es claro que la BcHMGR presenta diferentes estructuras las cuales corresponden a un monómero, un dímero globular, un dímero elongado, un hexámero y un oligómero constituido posiblemente por 14 subunidades. De este último ensamble aún no se tiene certeza de la multiplicidad debido al límite de resolución de la columna de cromatografía de exclusión molecular. Sin embargo, la multiplicidad de 14 subunidades se sugiere a partir de los resultados de electroforesis nativa. Esto último se encuentra en concordancia con experimentos de cromatografía de exclusión molecular acoplada a dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SEC-SAXS) realizados por el grupo de investigación en el sincrotrón DESY en Hamburgo, Alemania, en donde los perfiles cromatográficos señalan un oligómero de aproximadamente 16 subunidades (**Figura 27**).

Los datos obtenidos mediante SEC-SAXS también confirmaron la presencia de un hexámero en condiciones de baja sal y de dos estructuras diméricas de diferente conformación dada las diferencias en sus valores de $D_{m\acute{a}x}$ y R_g , uno que se presenta en condiciones de alta fuerza iónica y el otro en baja fuerza iónica.

La función de distribución de pares $P(r)$ que proporcionan los datos de SAXS, contiene información sobre la forma y dimensión máxima de una macromolécula en solución [81]. Como se puede ver en la **Figura 26**, dependiendo de la forma de la proteína en solución, la función $P(r)$ tiene un perfil característico. En el caso de ensamblados encontrados para la BcHMGR, el perfil de la función $P(r)$ sugiere que todos, incluyendo el oligómero de alto peso molecular, son globulares. Otro dato que aporta la función $P(r)$ en SAXS es la dimensión máxima de partícula (D_{\max}) y radio de giro (R_g), los cuales nos dan información sobre el tamaño de la macromolécula. El valor de D_{\max} es el punto final de la función $P(r)$ en el eje de las abscisas (**Figura 26**), en el caso de los ensamblados oligoméricos identificados para la BcHMGR se puede observar que la especie dimérica encontrada en condiciones de baja fuerza iónica tiene una dimensión más grande (D_{\max} de 11.50 nm, R_g de 3.6 nm) que la especie dimérica encontrada en condiciones de alta fuerza iónica (D_{\max} de 10 nm, R_g de 3.2 nm) (**Figura 27**). Esto sustenta lo observado en los geles nativos en los cuales se resuelven dos bandas haciendo alusión a dos dímeros de diferente conformación (**Figura 15**) y a su vez también respalda lo obtenido en las cromatografías de exclusión molecular donde se observan dos dímeros con diferente valor de R_h (**Figura 19**).

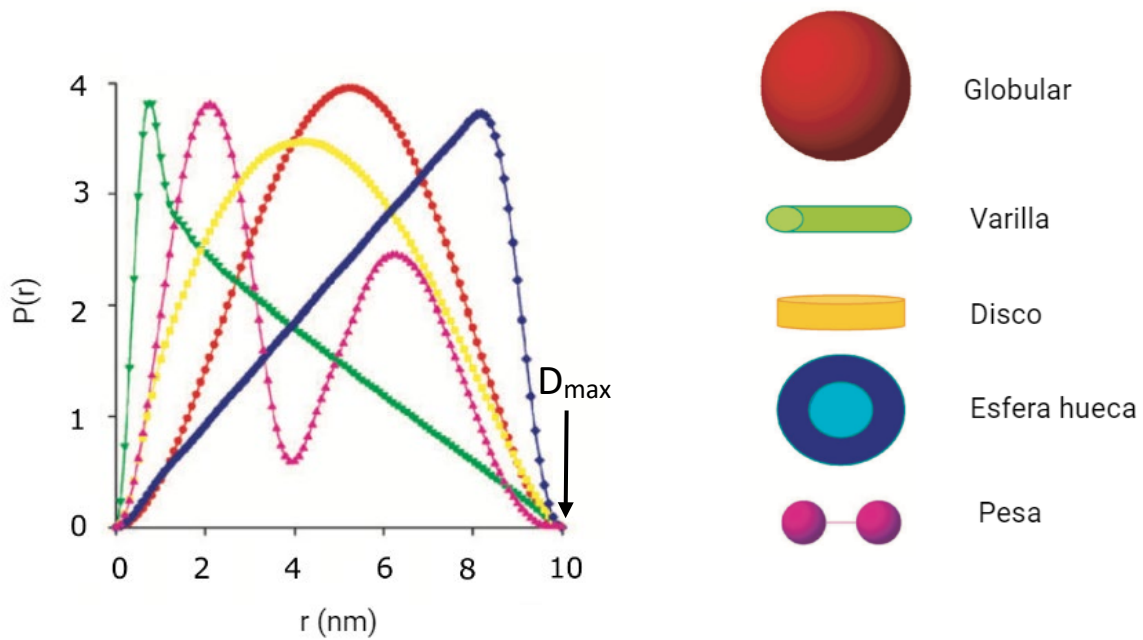


Figura 26. Función de distribución de pares ($P(r)$) para diferentes formas de partícula en solución. Imagen adaptada de [82].

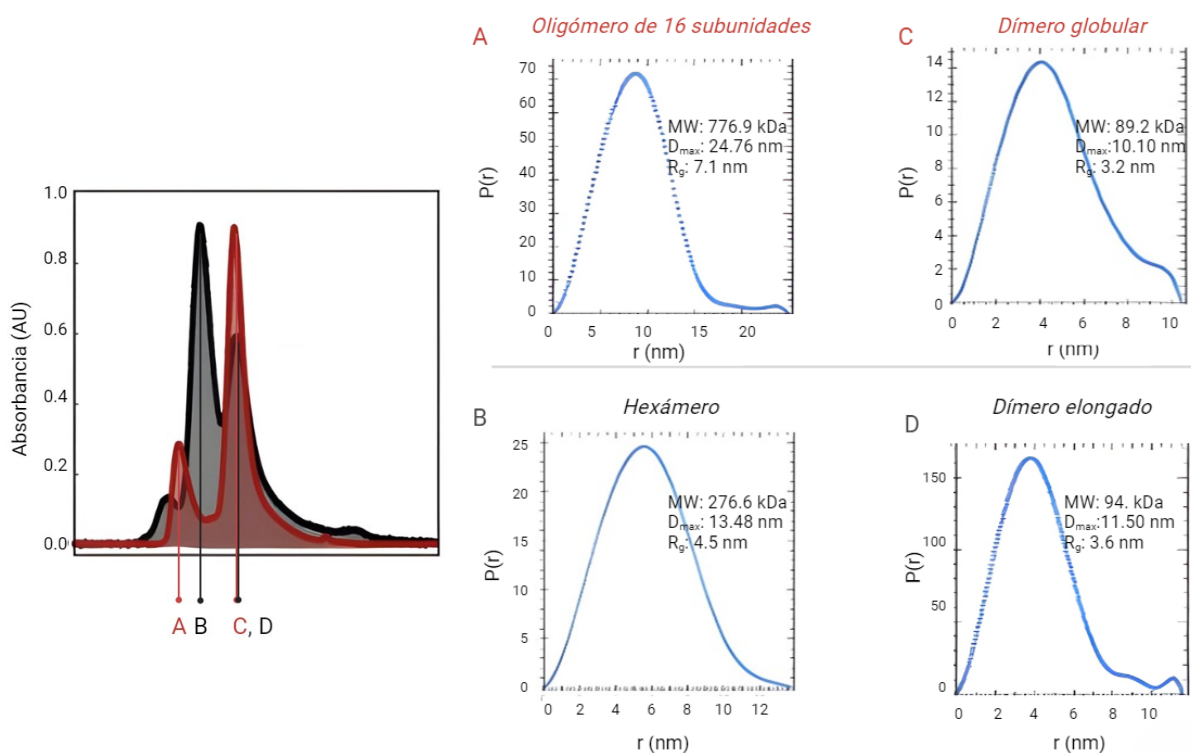


Figura 27. Cromatografías de exclusión molecular acoplado a dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SEC-SAXS) de la BcHMGR. A la derecha se muestra el perfil cromatográfico en condición de alta fuerza iónica (color rojo), y en condición de baja fuerza iónica (color gris). A la izquierda se muestran los gráficos de la función de distribución de pares $P(r)$, masa molecular (MW), Radio de giro (R_g) y dimensión máxima (D_{max}) de cada señal resuelta en el cromatograma.

Dado este panorama podemos inferir que el equilibrio entre estructuras cuaternarias de la BcHMGR puede favorecerse hacia la formación de ciertos ensamblajes al modificar la fuerza iónica del entorno químico. A NaCl 300 mM se favorece la formación del dímero globular y del oligómero de alto peso molecular (14-16 subunidades), mientras que a NaCl 50 mM se favorece la formación del dímero elongado y el hexámero. Dado que los dos dímeros coexisten según lo obtenido en las electroforesis nativas, hemos planteado que estos están en equilibrio entre sí, y de ellos derivan los ensamblajes de tipo hexamérico y el oligómero de alto peso molecular (**Figura 28**) Más aún, los resultados de espectroscopía de dicroísmo circular sugieren que el equilibrio conformacional

entre los dos dímeros esta mediado por un cambio en el contenido de estructura secundaria que repercute en su estabilidad de plegamiento.

Finalmente, dado que la estructura monomérica de BcHMGR no se ha observado en solución y sólo se ha descrito en la unidad asimétrica del cristal de la proteína, podemos suponer que este monómero es el que obtuvimos en la electroforesis nativa. El cuál correspondería a la unidad mínima del dímero elongado, debido a que con este dímero se modeló la estructura del hexámero. Sin embargo, se desconoce si el dímero compacto es capaz de disociarse a monómeros, y de ser así, sí el cambio conformacional ocurriría a este nivel estructural además de entre los dímeros (**Figura 28**).

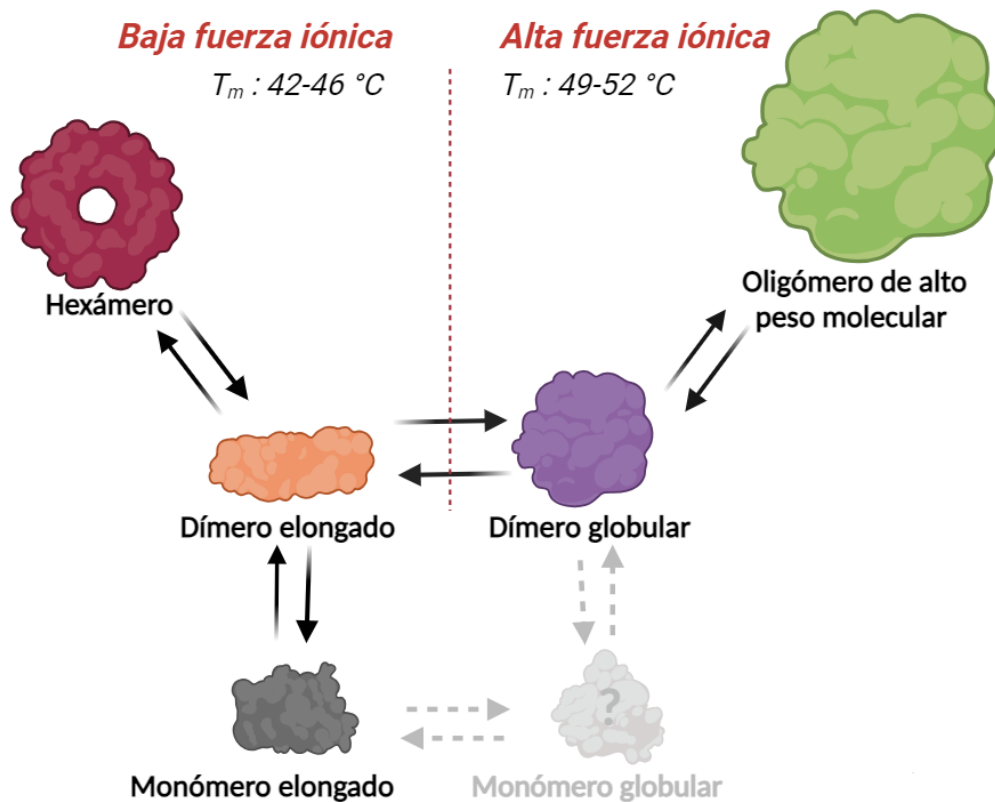


Figura 28. Equilibrio tipo morpheein planteado para la BcHMGR. Se plantea un equilibrio dinámico entre dos especies diméricas (globular y elongada) en donde a partir de la especie elongada se forma una especie hexámerica a una condición de baja fuerza iónica; por otro lado, a partir de la especie globular se forma un oligómero de alto peso molecular en condiciones de alta fuerza iónica. En color gris se muestra el equilibrio de la o las especies monoméricas implicadas, del cual no tenemos la información suficiente.

7 Conclusiones

- La proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa de *Burkholderia cenocepacia* (BcHMGR) se encuentra en un equilibrio estructural dinámico conformado por un monómero, un dímero globular, un dímero elongado, un hexámero y un oligómero conformado posiblemente por 14-16 subunidades.
- A baja fuerza iónica se favorece la formación de un dímero elongado y un hexámero los cuales presentan una T_m de 42-46°C.
- A alta fuerza iónica se favorece la formación de un dímero globular y un oligómero de alto peso molecular los cuales presentan una T_m de 49-52°C, siendo los ensambles con mayor estabilidad.
- El equilibrio dinámico estructural planteado para la BcHMGR muestra un equilibrio directo entre el dímero globular y el dímero elongado, los cuales, por medio de cambios estructurales dan pie a la formación del oligómero de alto peso molecular y al hexámero.

8 Perspectivas

- Realizar réplicas técnicas de los ensayos de exclusión molecular en NaCl 50 y 300 mM en un rango de pH de 6.0-8.5 para obtener un peso molecular y radio hidrodinámico promedio y la desviación estándar de cada medición.
- Realizar cromatografías de exclusión molecular a un pH fijo, variando la fuerza iónica en un intervalo de NaCl 20 - 500 mM con la finalidad de observar el cambio en el valor de radio hidrodinámico del ensamble dimérico, hasta que llegue a una concentración de baja y alta fuerza iónica en donde el R_h se mantenga constante, con la finalidad de encontrar condiciones en las cuales la especie dimérica predominante será la globular o la elongada.

9 Referencias bibliográficas

1. Sasiela, C., *Proteins: Structure and Function By David Whitford (University of London). John Wiley and Sons, Ltd., Chichester. 2005. x + 528 pp. 19.5 × 24 cm. \$65.00 (paper). ISBN 0-471-49894-7.* Journal of Natural Products, 2006. **69**(7): p. 1117-1117.
2. Herrera, F.E. and S.J. Sferco, *Estructura Conformacional de Pequeños Péptidos Conteniendo Prolina Usando Cálculos Cuánticos y de Dinámica Molecular.* Anales AFA, 2004. **16**: p. 236-241.
3. Ahern, K., I. Rajagopal, and T. Tan, *Biochemistry Free For All.* Vol. Version 1.3. 2018, Oregon Oregon State University. 3648.
4. Victoria, L.G., *Estructura y propiedades e las proteínas 2020.*
5. Ramakrishnan, C. and N. Srinivasan, *Glycyl residues in proteins and peptides: An analysis.* Curr. Sci., 1990. **59**: p. 851-861.
6. Gunasekaran, K., et al., *Stereochemical punctuation marks in protein structures: glycine and proline containing helix stop signals* Edited by J. Thornton. Journal of Molecular Biology, 1998. **275**(5): p. 917-932.
7. Lakshmi, B., et al., *Ramachandran analysis of conserved glycyl residues in homologous proteins of known structure.* Protein Science, 2014. **23**(6): p. 843-850.
8. Liu, X.R., M.M. Zhang, and M.L. Gross, *Mass Spectrometry-based protein footprinting for higher-order structure analysis: Fundamentals and applications.* Chemical Reviews, 2020. **120**: p. 4355-4454.
9. Schachman, H.K., *Considerations on the Tertiary Structure of Proteins.* Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1963. **28**: p. 409–430.
10. Bajaj, M. and T. Blundell, *Evolution and the tertiary structure of proteins in Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1984. p. 453-492.
11. Dror, Y., et al., *Nanofibers made of globular proteins.* Biomacromolecules, 2008. **9**(10): p. 2749-2754.
12. Ali, M.H. and B. Imperiali, *Protein oligomerization: How and why.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005. **13**(17): p. 5013-5020.
13. Santoyo, A.H., *Determinantes estructurales de la oligomerización en proteínas,* in *Boletín de la Sociedad Química de México* 2016. p. 29-31.
14. Salceda, R. and J. Silvestre, *El citoesqueleto: un componente fundamental en la arquitectura y en la fisiología celular.* . Rev.Educ. Bioquímica 2016. **35**: p. 102-114.
15. Monod, J., J. Wyman, and J.P. Changeux, *On the nature of allosteric transitions: A plausible model.* Journal of Molecular Biology, 1965. **12**(1): p. 88-118.
16. Khan, N. and J.D. Geiger, *Role of Viral Protein U (Vpu) in HIV-1 Infection and Pathogenesis.* Viruses, 2021. **13**(8).
17. Nava Ramírez, T. and W. Hansberg, *Características comunes de las chaperonas pequeñas y dimericas.* TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2020. **23**.

18. Ferreira, L.M.R., Li, A. M., Serafim, T. L., Sobral, M. C., Alpoim, M. C., & Urbano, A. M., *Intermediary metabolism: An intricate network at the crossroads of cell fate and function*. Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease, 2020. **1866**.
19. Robinson, P.K., *Enzymes: principles and biotechnological applications*. Essays Biochem, 2015. **59**: p. 1-41.
20. Hun Opfer, L., *El virus influenza* Acta Pediatrica Costarricense 2009. **21**: p. 5-7.
21. Brinda, K.V., A. Surolia, and S. Vishveshwara, *Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins*. Biochemical Journal, 2005. **391**(1): p. 1-15.
22. Simonet, J.C., et al., *Freedom of assembly: metabolic enzymes come together*. Molecular Biology of the Cell, 2020. **31**(12): p. 1201-1205.
23. Park, C.K., *Structures, Functions, and Mechanisms of Filament Forming Enzymes: A Renaissance of Enzyme Filamentation*. Department of Molecular and Cellular Biology. University of Arizona, Tucson
24. Liu, G.N.A.J.-L., *Metabolic regulation via enzyme filamentation*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2016. **51**: p. 282-293.
25. Wang, Y., et al., *Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 836058.
26. Meredith, M.J. and M.D. Lane, *Acetyl-CoA carboxylase. Evidence for polymeric filament to protomer transition in the intact avian liver cell*. Journal of Biological Chemistry, 1978. **253**(10): p. 3381-3383.
27. Hunkeler, M., et al., *Structural basis for regulation of human acetyl-CoA carboxylase*. Nature, 2018. **558**(7710): p. 470-474.
28. Lynch, E.M., et al., *Human CTP synthase filament structure reveals the active enzyme conformation*. Nature Structural & Molecular Biology, 2017. **24**(6): p. 507-514.
29. Hansen, J.M., et al., *Cryo-EM structures of CTP synthase filaments reveal mechanism of pH-sensitive assembly during budding yeast starvation*. eLife, 2021. **10**: p. e73368.
30. Laskowski, R.A., F. Gerick, and J.M. Thornton, *The structural basis of allosteric regulation in proteins*. FEBS Letters, 2009. **583**(11): p. 1692-1698.
31. Traut, T., *Properties and evolution of allosteric enzymes* in *Allosteric Regulatory Enzymes*. 2008, Springer New York, NY: New York, NY.
32. Motlagh, H., Wrabl, J., Li, J. et al, *The ensemble nature of allostery*. Nature 508, 331–339, 2014.
33. Kern, D. and E.R.P. Zuiderweg, *The role of dynamics in allosteric regulation*. Current Opinion in Structural Biology, 2003. **13**: p. 748-757.
34. Freiburger, L., Miletti, T., Zhu, S. et al., *Substrate-dependent switching of the allosteric binding mechanism of a dimeric enzyme*. Nat Chem Biol 10, 2014.
35. Alleva, K., et al., *La Teoría MWC (Monod, WyMan y Changeux): El sistema alostérico*. ÁGORA, 2012. **31**(2): p. 225-250.
36. Fraenza, C.C., *Determinación experimental del tiempo de evolución de procesos de cambios conformacionales en Hemoglobina humana mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear*, in *Matemática, Astronomía y*

Física 2010, Facultad de Matemática Astronomía y Física Universidad Nacional de Córdoba Córdoba, Arentina p. 103.

37. Franco Vera, L., *LA HEMOGLOBINA: UNA MOLÉCULA PRODIGIOSA*. Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat (Esp), 2010. **104**: p. 213-232.
38. Marcos-Viquez, J., et al., *Substrate binding in the allosteric site mimics homotropic cooperativity in the SIS-fold glucosamine-6-phosphate deaminases*. Protein Sci, 2023. **32**(6): p. e4651.
39. Changeux, J.P. and S. Edelstein, *Conformational selection or induced fit? 50 Years of debate resolved*. F1000 Biology Reports, 2011. **3**.
40. Xu, Z., Horwich, A. & Sigler, P, *he crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP)7 chaperonin complex*. Nature 1997. **388**: p. 741–750.
41. Horovitz A, W.K., *Allosteric regulation of chaperonins*. Current Opinion in Structural Biology, 2005. **15**(6): p. 646-651.
42. Jaffe, E.K., *Morpheins - A new structural paradigm for allosteric regulation*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(9): p. 490-497.
43. Lawrence, S.H. and E.K. Jaffe, *Expanding the concepts in protein structure-function relationships and enzyme kinetics: Teaching using morpheins*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2008. **36**: p. 274-283.
44. Vimal, A. and A. Kumar, *The morphein model of allosterism: a remedial step for targeting virulent L-asparaginase*. Drug Discovery Today, 2017. **22**: p. 814-822.
45. Jaffe, E.K. and S.H. Lawrence, *The morphein model of allostery: Evaluating proteins as potential morpheins*. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.j.), 2012. **796**: p. 217-217.
46. Jaffe, E.K., *Porphobilinogen synthase: An equilibrium of different assemblies in human health*. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2020. **169**: p. 85-104.
47. Lawrence, S.H., et al., *Shape Shifting Leads to Small-Molecule Allosteric Drug Discovery*. Chemistry and Biology, 2008. **15**(6): p. 586-596.
48. Breinig, S., et al., *Control of tetrapyrrole biosynthesis by alternate quaternary forms of porphobilinogen synthase*. Nature Structural Biology, 2003. **10**(9): p. 757-763.
49. Jaffe, E.K. and L. Stith, *ALAD porphyria is a conformational disease*. American Journal of Human Genetics, 2007. **80**(2): p. 329-337.
50. Friesen, J.A. and V.W. Rodwell, *The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases*. Genome Biology, 2004. **5**(11): p. 1-7.
51. Espenshade, P.J., *Cholesterol Synthesis and Regulation*. Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition 2013: p. 516-520.
52. Sfeir, M.M., *Burkholderia cepacia complex infections: More complex than the bacterium name suggest*. Journal of Infection, 2018. **77**: p. 166-170.
53. Regad L, M.J., Nuel G & Camproux A, *Mining protein loops using a structural alphabet and statistical exceptionalty*. BMC Bioinformatics, 2010. **11**: p. 75.
54. Hedl, M., et al., *Class II 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductases?* Journal of Bacteriology, 2004. **186**: p. 1927-1932.

55. Vögeli, B., et al., *Crystal structure of archaeal HMG-CoA reductase: insights into structural changes of the C-terminal helix of the class-I enzyme*. FEBS Letters, 2019. **593**(5): p. 543-553.
56. Miller, B.R. and Y. Kung, *Structural Features and Domain Movements Controlling Substrate Binding and Cofactor Specificity in Class II HMG-CoA Reductase*. Biochemistry, 2018. **57**(5): p. 654-662.
57. Istvan, E.S., et al., *Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis*. The EMBO Journal, 2000. **19**(5): p. 819-830.
58. Burg, J.S. and P.J. Espenshade, *Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast*. Prog Lipid Res, 2011. **50**(4): p. 403-10.
59. Sato R, G.J.B.M., *Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1993. **90**: p. 9262-9265.
60. Andrade-Pavón, D., et al., *The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductases from fungi: A proposal as a therapeutic target and as a study model*. Revista Iberoamericana de Micología, 2014. **31**: p. 81-85.
61. Estrada de los Santos, P., *Taxonomía del género Burkholderia sensu lato*. Alianzas y Tendencias BUAP, 2019. **4**(14): p. 11-29.
62. Meza-Radilla, G., et al., *Misidentification of Burkholderia pseudomallei and Other Burkholderia Species from Pediatric Infections in Mexico*. Open Forum Infectious Diseases, 2019. **6**(2).
63. Mullins, A.J. and E. Mahenthiralingam, *The Hidden Genomic Diversity, Specialized Metabolite Capacity, and Revised Taxonomy of Burkholderia Sensu Lato*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 726847.
64. Rojas-Rojas, F.U., et al., *The controversial Burkholderia cepacia complex, a group of plant growth promoting species and plant, animals and human pathogens*. Revista Argentina de Microbiología, 2019. **51**(1).
65. Drevinek, P. and E. Mahenthiralingam, *Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis: Epidemiology and molecular mechanisms of virulence*. Clinical Microbiology and Infection, 2010. **16**: p. 821-830.
66. Scoffone, V.C., et al., *Vaccines to Overcome Antibiotic Resistance: The Challenge of Burkholderia cenocepacia*. Trends in Microbiology, 2020. **28**: p. 315-326.
67. Lauman, P. and J.J. Dennis, *Advances in phage therapy: Targeting the Burkholderia cepacia complex*. Viruses, 2021. **13**.
68. Peacock, R.B., et al., *Structural and Functional Characterization of Dynamic Oligomerization in Burkholderia cenocepacia HMG-CoA Reductase*. Biochemistry, 2019. **58**(38): p. 3960-3970.
69. Li, Z., et al., *Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **91**(4): p. 1203-13.
70. Tahara, N., et al., *Boosting Auto-Induction of Recombinant Proteins in Escherichia coli with Glucose and Lactose Additives*. Protein Pept Lett, 2021. **28**(10): p. 1180-1190.

71. Srinivas, P.R., *Introduction to Protein Electrophoresis*. Methods Mol Biol, 2019. **1855**: p. 23-29.
72. Irvine, G.B., *Determination of Molecular Size by Size-Exclusion Chromatography (Gel Filtration)*. Current Protocols in Cell Biology, 2000. **6**(1): p. 5.5.1-5.5.16.
73. La Verde, V., P. Dominici, and A. Astegno, *Determination of Hydrodynamic Radius of Proteins by Size Exclusion Chromatography*. Bio Protoc, 2017. **7**(8): p. e2230.
74. Parmar, A.S. and M. Muschol, *Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: effects of chaotropic versus kosmotropic ions*. Biophys J, 2009. **97**(2): p. 590-8.
75. *How does imidazole affect my quantitation of protein?* ; Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=6a331f4d-8716-4adf-992c-298fddd0be&lang=en>.
76. Medvidović-Kosanović, M., et al., *Electrochemical and UV/VIS Study of L-Histidine and Its Complexes with Cobalt and Nickel*. Croatica Chemica Acta, 2018. **91**(4)
77. Greenfield, N.J., *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2876-90.
78. Miles, A.J., R.W. Janes, and B.A. Wallace, *Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review*. Chem Soc Rev, 2021. **50**(15): p. 8400-8413.
79. Martin, S.R. and M.J. Schilstra, *Circular dichroism and its application to the study of biomolecules*. Methods Cell Biol, 2008. **84**: p. 263-93.
80. Jasco. (2021, 22 julio). *Circular Dichroism Tips & Tricks for Biological Samples JASCO*. JASCO Inc. <https://jascoinc.com/learning-center/best-practices/circular-dichroism-tips-tricks/>
81. Hammel, M., et al., *X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution*. Quarterly Reviews of Biophysics, 2007. **40**(3): p. 191-285.
82. Dmitri, I.S. and H.J.K. Michel, *Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution*. Reports on Progress in Physics, 2003. **66**(10): p. 1735