BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Universidad de Alicante

Análisis estructural de la adaptación a medios de elevada fuerza iónica de la glucosa deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*

Julia Mª Esclapez Espliego

Tesis de Doctorado

Facultad de Ciencias

Directores: Dra. Dª. María José Bonete Pérez
Dr. D. Juan Ferrer Casanova
Dra. Dª. Carmen Pire Galiana

2004

UNIVERSIDAD DE ALICANTE

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS ADAPTACIONES A MEDIOS DE ELEVADA FUERZA IÓNICA DE LA GLUCOSA DESHIDROGENASA DE *Haloferax mediterranei*

Julia Mª Esclapez Espliego

Alicante, 2004

ÍNDICE

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1.- FILOGENIA 2
1.2.- FAMILIA *Halobacteriaceae* 6
1.2.1.- Características generales 6
1.2.2.- Adaptaciones halofílicas 8
1.3.- *Haloferax mediterranei* 11
1.4.- GLUCOSA DESHIDROGENASA 14
1.5.- GLUCOSA DESHIDROGENASA DE *Hfx. mediterranei* 15
1.6.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA ENZIMA GlcDH 22
1.7.- MECANISMOS CATALÍTICOS DE ENZIMAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA MDR 27
1.8.- OBJETIVOS 31

2.- MATERIALES Y MÉTODOS 32
2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO 33
2.1.1.- Cepas utilizadas 33
2.1.2.- Plásmidos utilizados 34
2.1.3.- Oligonucleótidos diseñados 34
2.2.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS 35
2.2.1.- Medios de cultivo, crecimiento y conservación de cepas bacterianas 35
2.2.2.- Transformación bacteriana 36
2.3.- MANIPULACIÓN DEL DNA 36
2.3.1.- Preparación de DNA plasmídico de *E. coli* 36
2.3.2.- Restricción, modificación y ligación del DNA 36
2.3.3.- Electroforesis convencional y purificación de fragmentos de DNA 37
2.3.4.- Amplificación de fragmentos de DNA 37
2.3.5.- Secuenciación del DNA 38
2.3.6.- Reacción de mutagénesis dirigida 38
2.4.- EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS 41
2.4.1.- Crecimiento e inducción de la expresión 41
2.4.2.- Aislamiento de fracciones celulares 41

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.4.3.- Solubilización de los cuerpos de inclusión 44
2.4.4.- Renaturalización de la GlcDH recombinante 44
2.5.- METODOLOGÍA DE PROTEÍNAS 44
2.5.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida 44
2.5.2.- Medida de actividad Glucosa Deshidrogenasa 45
2.5.3.- Cuantificación de proteínas 45
2.5.4.- Purificación de la GlcDH recombinante 45
2.5.5.- Diálisis y concentración 46
2.5.7.- Análisis de especificidad de sustratos 47
2.5.8.- Determinación de parámetros cinéticos 47
2.5.9.- Estudios de la concentración de los iones hidrógeno (pH) en la enzima 47
2.5.10.- Efecto de la concentración de EDTA 48
2.5.11.- Efecto de la temperatura sobre la estabilidad y actividad enzimática 48
2.5.12.- Efecto de la concentración de sal sobre la actividad enzimática 49
2.5.13.- Efecto de la concentración de sal sobre la estabilidad enzimática 49
2.6.- CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS 49
2.6.1.- Introducción a la determinación de estructuras de proteínas mediante difracción de rayos X 49
2.6.2.- Ensayos preliminares de cristalización de GlcDH de *Hfx. mediterranei* 53
2.6.3.- Optimización de la cristalización de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* 54
2.6.4.- Cristalización del mutante GlcDH D38C 54
2.6.5.- Cristalización del triple mutante GlcDH D172K D216K D344K 55
2.6.6.- Manipulación de cristales 56
2.6.7.- Resolución y estudios estructurales 57

3.- EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA GlcDH DE *Hfx. mediterranei* 59
3.1.- INTRODUCCIÓN 60
3.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 64
3.2.1.- Clonaje de GlcDH de *Hfx. mediterranei* en los vectores de expresión 64

3.2.2.- Expresión y localización de la GlcDH recombinante 65
3.2.3.- Solubilización de los cuerpos de inclusión y renaturalización de la GlcDH recombinante 67
3.2.3.1.- Solubilización de los cuerpos de inclusión 67
3.2.3.2.- Renaturalización de la GlcDH recombinante 67
3.2.4.- Purificación de la GlcDH recombinante 74
3.2.5.- Caracterización de la GlcDH recombinante 76
3.2.5.1.- Determinación de la masa molecular 77
3.2.5.2.- Especificidad de sustratos 78
3.2.5.3.- Determinación de parámetros cinéticos 79
3.2.5.4.- Estudios de la concentración de los iones de hidrógeno en la enzima 82

4.- ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LOS MUTANTES GlcDH D38A Y GlcDH D38C 86
4.1.- INTRODUCCIÓN 87
4.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 89
4.2.1- Clonaje del gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* en el vector pGEM11-Zf(+) 89
4.2.2.- Mutagénesis dirigida 89
4.2.3.- Clonaje de los genes mutados en el vector pET3a 91
4.2.4.- Expresión y renaturalización de las proteínas mutadas 92
4.2.5.- Purificación de las proteínas GlcDH D38A y GlcDH D38C 94
4.2.6.- Caracterización de la proteína GlcDH D38C 95
4.2.6.1.- Determinación de los parámetros cinéticos 95
4.2.6.2.- Efecto de la concentración de EDTA 97
4.2.6.3.- Efecto de la temperatura sobre la estabilidad y actividad de la enzima 99

5.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA GlcDH SILVESTRE Y GlcDH D38C 104
5.1.- INTRODUCCIÓN 105
5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 106
5.2.1.- Cristalización y estudios preliminares de la GlcDH silvestre 106

5.2.2.- Cristalización y estudios preliminares de la GlcDH D38C 109
5.2.3.- Obtención de datos 112
5.2.4.- Determinación y refinamiento de la estructura del complejo binario GlcDH D38C-$NADP^+$ 114
5.2.5.- Análisis de la estructura del complejo binario GlcDH D38C con $NADP^+$ y zinc 116
5.2.5.1.- Estructura secundaria, terciaria y cuaternaria 116
5.2.5.2.- Análisis de la estructura cuaternaria 120
5.2.5.3.- Análisis de la superficie accesible al solvente 122
5.2.6.- Identificación de contraiones y determinación preliminar de estructuras de moléculas de agua y de sus interacciones con la superficie de la proteína 125
5.2.7.- Comparación del complejo binario GlcDH D38C en presencia de $NADP^+$ y zinc con el complejo GlcDH silvestre con NADPH y zinc 127
5.2.8.- Análisis de las estructuras de GlcDH D38C obtenidas en presencia de diferentes combinaciones de sustratos y productos 132
5.2.8.1.- Análisis del complejo binario GlcDH D38C en presencia de NADPH y zinc 133
5.2.8.2.- Análisis del complejo binario GlcDH D38C-NADPH en ausencia de zinc 134
5.2.8.3.- Análisis del complejo ternario no productivo GlcDH D38C con $NADP^+$ y gluconolactona 135
5.2.8.4.- Comparaciones entre los complejos ternarios no productivos de la GlcDH D38C 142

6.- ESTUDIO DE LA HALOADAPTACIÓN DE GlcDH POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA 147
6.1.- INTRODUCCIÓN 148
6.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 151
6.2.1.- Construcción del triple mutante GlcDH D172K D216K D344K 151
6.2.2.- Expresión, renaturalización y purificación del triple mutante 153
6.2.3.- Caracterización de la proteína GlcDH D172K D216K D344K 157
6.2.3.1.- Determinación de los parámetros cinéticos 157

6.2.3.2.- Efecto de la concentración de sal sobre la actividad enzimática 159
6.2.3.3.- Efecto de la concentración de sal sobre la estabilidad enzimática 161
6.2.4.- Cristalización en presencia de K^+ de GlcDH silvestre y triple mutante 164
6.2.5.- Estudios estructurales del triple mutante 166

7.- CONCLUSIONES 170

8.- BIBLIOGRAFÍA 173

9.- APÉNDICE I: Descripción de marcadores genéticos 189

10.- APÉNDICE II: Mapas de los plásmidos utilizados 192

11.- APÉNDICE III: Abreviaturas 199

12.- APÉNDICE IV: Índice de figuras 202

13.- APÉNDICE V: Índice de tablas 209

INTRODUCCIÓN

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1.1.- FILOGENIA

Hasta el año 1977 todos los organismos vivos se clasificaban dentro de dos grupos: eucariotas (células con núcleo) y procariotas (células sin núcleo). En dicha fecha, Woese y Fox, basándose en la comparación de fragmentos de RNA ribosómico (rRNA) 16S o 18S generados por tratamiento con ribonucleasa, propusieron que los procariotas no constituían un grupo homogéneo, sino que hay dos linajes claramente diferenciados, los cuales recibieron el nombre de eubacterias y arqueobacterias. Cada uno de estos dos grupos poseía tanta entidad como el grupo de los eucariotas.

Las diferencias entre eubacterias, arqueobacterias y eucariotas son más profundas que las asociadas con el nivel taxonómico Reino. Debido a ello, en 1990 Woese y col. propusieron un nuevo taxón de mayor rango, al cual denominaron Dominio. El nombre de cada Dominio fue elegido teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: mantener la continuidad con los nombres existentes, sugerir las características básicas del grupo, y evitar cualquier connotación que señale una relación entre bacterias y archaeas. Considerando todo ello, los tres Dominios propuestos por Woese y col. fueron: *Bacteria, Eukarya* y *Archaea* (Figura 1), que sustituyeron a eubacterias, eucariotas y arqueobacterias, respectivamente. Esta nomenclatura se sigue manteniendo actualmente.

La existencia de los tres Dominios es clara, pero existe una gran controversia sobre la relación que hay entre ellos (Forterre , 1997; Gupta, 1998; Cavalier-Smith, 2002). Por comparación de secuencias de RNA ribosómico, el Dominio *Archaea* parece estar más estrechamente relacionado con *Eukarya* que con *Bacteria* (Woese y col.; 1990, Woese, 2002). Pero hay datos que contradicen esta aparente relación entre *Archaea* y *Eukarya*, como son las secuencias de algunas proteínas de arqueas muy similares a las homólogas de bacterias, sobre todo a bacterias gram-positivas (Gupta, 1998; Karlin y col., 2002).

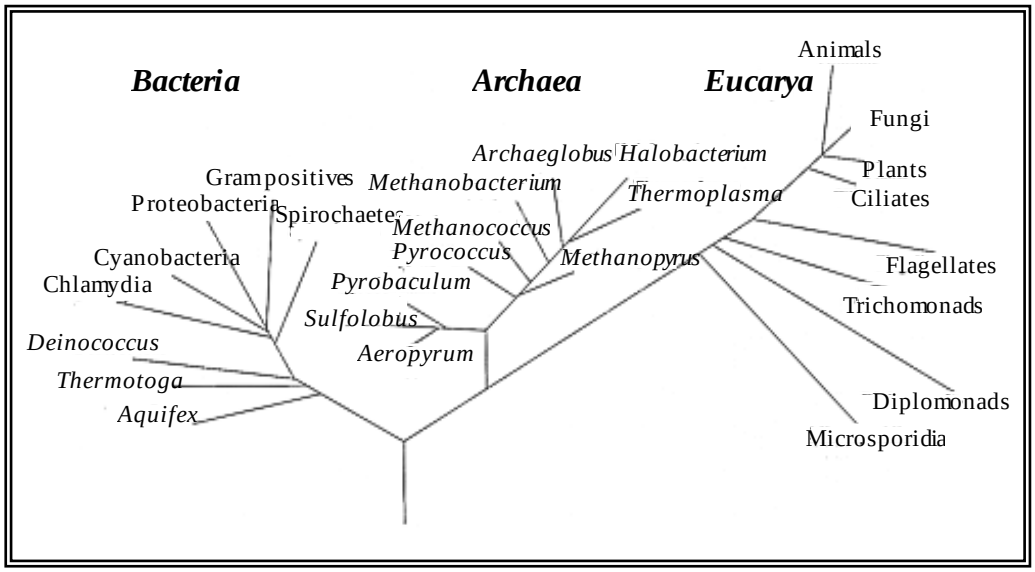

Figura 1: Representación esquemática del árbol filogenético universal de Woese y col., 1990, tomado de Lecompte y col., 2002.

Dominio Archaea

El Dominio *Archaea* está formado por un grupo heterogéneo de microorganismos capaces de habitar ambientes extremos. Entre sus características distintivas destacan las siguientes (Bullock, 2000):

- poseen membranas lipídicas que contienen cadenas laterales isoprenoide con enlaces éter, en contraste con los hidrocarburos con enlaces éster de todos los demás sistemas biológicos,
- carecen en todos los casos del ácido murámico (peptidoglicano) como constituyente de la pared celular,
- presentan una morfología típica que no se ha encontrado en ninguno de los microorganismos que componen el Dominio *Bacteria*, como por ejemplo las formas poligonales que tienen algunas arqueas halófilas o los cocos extremadamente irregulares que presentan algunos hipertermófilos,
- no catabolizan la glucosa mediante glicolisis, sino que emplean una vía metabólica de oxidación simple,
- y su maquinaria fundamental de transcripción es muy similar a la que poseen los organismos pertenecientes al Dominio *Eukarya*.

En base a sus propiedades metabólicas y ecológicas, Woese y Fox en 1977 diferenciaron los tres primeros fenotipos de arqueas: metanógenos (microorganismos estrictamente anaerobios y productores de metano), halófilos (microorganismos capaces de vivir en lugares con concentraciones salinas saturantes) y termoacidófilos (microorganismos aerobios que viven en ambientes ácidos y con altas temperaturas). Pero muchos más fenotipos fueron descubiertos en las siguientes décadas, como por ejemplo metanógenos hipertermófilos o psicrófilos, metanógenos alcalófilos y/o halófilos, e hipertermófilos anaeróbicos, alcalófilos y neutrófilos. Finalmente, el estudio basado en la amplificación mediante PCR del rRNA 16S ha puesto de manifiesto la existencia de arqueas mesofílicas en diferentes ambientes (mares y suelos) cuyo fenotipo es todavía desconocido (Forterre y col., 2002).

De acuerdo con las comparaciones de rRNA 16S el Dominio *Archaea* se divide principalmente en dos phyla (Woese y col., 1990):

- Phylum *Crenarchaeota*: comprende a los microorganismos que han sido denominados hipertermófilos y termoacidófilos. Algunos géneros son *Sulfolobus, Desulfurococcus, Pyrodictium, Thermoproteus* y *Thermofilum*. Actualmente, también se incluyen en este phylum varios grupos de microorganismos mesofílicos, y probablemente, psicrófilos que han sido detectados mediante PCR en diversos ambientes, aunque todavía no han sido cultivados (Forterre y col., 2002).
- Phylum *Euryarchaeota*: abarca un amplio rango ecológico, comprendiendo microorganismos hipertermófilos (géneros *Pyrococcus* y *Thermococcus*), metanógenos (género *Methanosarcina*), halófilos (géneros *Haloferax, Halobacterium* y *Halococcus*) e incluso metanógenos termofílicos (géneros *Methanococcus, Methanothermus* y *Methanobacterium*) (Brown y col., 1997)

Mediante la amplificación por PCR de secuencias de RNA ribosómico 16S procedentes de organismos no aislados, se han detectado nuevas especies de arqueas que no se encuadran dentro de los dos phyla propuestos, y que parecen estar más cercanas al Dominio *Eukarya*. Estas secuencias se clasifican provisionalmente en otro phylum dentro del Dominio *Archaea* denominado *Korarchaeota* (Barns y col., 1996) (Figura 2).

Figura 2: Filogenia del Dominio *Archaea* basado en secuencias de RNA ribosómico 16S de especies cultivadas y no cultivadas. Los triángulos grises incluyen secuencias de especies cultivadas y sin cultivar mientras que los triángulos blancos sólo incluyen secuencias de especies no cultivadas (Forterre y col., 2002).

Recientemente, Huber y col. (2002) han propuesto un nuevo phylum, denominado Nanoarchaeota, dentro del Dominio *Archaea*. Dicho phylum está representado por la especie *Nanoarchaeum equitans*, un microorganismo simbionte hipertermófilo de tan solo 400 nm de diámetro que ha sido encontrado en chimeneas submarinas. El archaeon *N. equitans* crece pegado a la superficie de una arquea específica perteneciente al género *Ignicoccus*, y a pesar de varios intentos, no se ha podido obtener ningún cultivo puro del mismo. Por tanto, el contacto directo célula-célula con el huésped parece ser un requisito imprescindible para su crecimiento. Los estudios filogenéticos basados en secuencias de rRNA monocatenario que se han realizado sitúan a *N. equitans* en una rama aislada. Pero, para conocer su posición exacta tendremos que esperar hasta que se descubran más miembros de este grupo y se puedan realizar estudios filogenéticos más amplios.

BIBLIOTECA VIRTUAL

1.2.- FAMILIA *Halobacteriaceae*

La familia *Halobacteriaceae* es el único componente del orden *Halobacteriales*. Los microorganismos que constituyen esta familia muestran una estricta dependencia por altas concentraciones de sal para su crecimiento y estabilidad estructural, por ello son considerados como halófilos por excelencia.

Filogenéticamente, la familia *Halobacteriaceae* está clasificada dentro del phylum *Euryarchaeota*, y se encuentra muy relacionada con los microorganismos metanógenos pertenecientes a los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales* (Oren, 2002). En la actualidad dicha familia está dividida en 18 géneros (enero 2004), aunque en las bases de datos aparece un género más, denominado *Haloalcalophilium*, cuya descripción todavía está pendiente de publicación.

1.2.1.- Características generales

Los microorganismos pertenecientes a la familia *Halobacteriaceae* abundan en salinas y lagos hipersalinos, como por ejemplo en el Mar Muerto y Gran Lago Salado, ambientes bajo los que muy pocos seres vivos pueden crecer. Hasta hace tan solo tres años, se pensaba que únicamente las arqueas eran capaces de

habitar dichos ambientes. Sin embargo empleando técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH), se ha puesto de manifiesto que las bacterias constituyen una parte significativa de la microbiota del hábitat de las salinas. Por tanto, parece ser que al igual que las arqueas, las bacterias también pueden sobrevivir en ambientes extremos, como es el caso de *Salinibacter ruber* (Antón y col., 2000).

Una característica fundamental de los miembros de esta familia es que son halófilos obligados, necesitando en general concentraciones de NaCl mayores de 1,5 M para crecer. La concentración de NaCl media óptima de crecimiento se sitúa entre 2 y 4,5 M dependiendo de las especies, pudiendo crecer algunas de ellas incluso a concentraciones saturantes de sal. Además, toleran bastante bien temperaturas elevadas, ya que los ambientes que habitan, por la posición geográfica que ocupan y por tratarse de aguas estancadas, suelen ser lugares muy cálidos (con temperaturas que pueden llegar a más de 50 °C). Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa en torno a 40-45 °C, pudiendo llegar a crecer incluso a 60 °C como por ejemplo *Haloterrigena thermotolerans* (Montalvo-Rodríguez y col. 2000).

Las arqueas halófilas son básicamente heterótrofas aerobias. Estos microorganismos llevan a cabo la degradación de los compuestos carbonados mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y la cadena transportadora de electrones, en combinación con el ciclo del glioxilato y reacciones de la vía Embdem-Meyerhof y de la vía modifica de Entner-Doudoroff (Oren, 2002). Muchas de estas especies pueden crecer en medios inorgánicos con un solo compuesto orgánico como fuente de carbono, como por ejemplo *Haloferax mediterranei* que es capaz de crecer en medio mínimo en presencia de glucosa (Rodríguez Valera y col., 1980). Sobre el crecimiento de halófilos en presencia de ácidos grasos no existen datos actualmente, aunque los genes implicados en la β-oxidación se han encontrado en el genoma de *Halobacterium* NRC-1 (Ng y col., 2000).

Debido a las altas concentraciones de sal y a las usuales elevadas temperaturas de las salinas, la solubilidad del oxígeno es muy baja convirtiéndose en un factor limitante para el desarrollo de estos microorganismos. Con el fin de sobrevivir en estos medios microaerófilos, e incluso anaeróbicos, algunas especies de la familia *Halobacteriaceae* han desarrollado diversas estrategias. Por ejemplo,

Haloferax mediterranei, Halobacterium salinarum o Natronobacterium vacuolatum, forman vesículas de gas que les permiten flotar hasta la superficie donde la concentración de oxígeno es mayor (Pfeifer y col., 1997). Otras especies son capaces de utilizar aceptores de electrones alternativos en la respiración como el nitrato (Mancinelli y col., 1986; Hochstein y col., 1991), dimetilsulfóxido (DMSO) (Oren y col., 1990), fumarato (Oren 1991), tiosulfato o azufre (Tindall y col., 1986). E incluso, algunas especies como *Hbt. salinarum* pueden crecer anaeróbicamente por fermentación de algunos aminoácidos (L-arginina) (Hartmann y col., 1980). Este último microorganismo también puede comportarse como fotoheterótrofo, al obtener energía en forma de ATP mediante la fosforilación de ADP mediada por la proteína de membrana bacteriorrodopsina, que se activa por efecto de la luz (Stoeckenius y col., 1979). Por último, cabe destacar que aunque los halófilos son organismos quimioheterótrofos, se han descrito diversos casos de fijación de CO_2 que implican la carboxilación reductiva de propionato, la reacción de la enzima glicina sintasa o el intercambio de CO_2 con el grupo carboxílico del piruvato (Oren, 2002).

Los microorganismos halófilos extremos poseen, al igual que todos los organismos del Dominio *Archaea* y a semejanza de bacterias, un cromosoma circular con un tamaño de 2.000 a 3.000 kilobases (Kb). Una característica importante es la presencia de varios plásmidos, algunos de gran tamaño que reciben el nombre de megaplásmidos o minicromosomas (Ng y col., 1998). Dichos plásmidos poseen abundantes secuencias de inserción, las cuales son secuencias de DNA que contienen información únicamente para promover su propia inserción en otros lugares del genoma. En halófilos se han secuenciado varios de estos elementos, generalmente son secuencias ricas en pares de nucleótidos AT, y tienen un tamaño entre 0,5 y 2 Kb (Brügger y col., 2002). Por ejemplo, en el genoma de *Halobacterium* NRC-1 se han encontrado 82 secuencias de inserción, 24 en el cromosoma y 58 en los dos megaplásmidos (Ng y col., 2000). Como resultado de la existencia en el genoma de un número tan alto de secuencias de inserción, estos microorganismos presentan tasas de mutación espontánea muy elevadas, pudiendo llegar a alcanzar valores entre 10^{-2} – 10^{-4}. Además, se han identificado modificaciones en el genoma de *Hfx. mediterranei* dependientes de la concentración salina del medio de cultivo. A bajas concentraciones de sal (10%) se

modifican algunas secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción *Pst*I, pero cuando las células se crecen de nuevo en condiciones óptimas (25%) se vuelve a observar la secuencia original. Los patrones obtenidos cuando el DNA genómico se digiere con diferentes enzimas de restricción mostró que dichas modificaciones no son ni inserciones ni deleciones sino modificaciones puntuales en secuencias específicas (Juez y col., 1990; Mojica y col., 1993)

En cuanto a la organización del genoma, los halófilos poseen genes agrupados en operones que se transcriben en RNA mensajeros policistrónicos. El mecanismo básico de transcripción guarda gran similaridad con el de *Eukarya*, pero es más sencillo, ya que en este Dominio intervienen más factores (Bell y col., 1998). En cuanto a la regulación de la transcripción existen muy pocos ejemplos donde se estudie en profundidad. Uno de ellos es el estudio de la regulación de la proteína GvpA, que forma parte de la pared de las vesículas de gas que se forman en algunos microorganismos. Por último, en la replicación del DNA las proteínas que intervienen son generalmente homólogas a las de *Eukarya*, incluyendo las DNA polimerasas, aunque se ha descubierto un nuevo grupo en el Dominio *Archaea*. Esto parece indicar que, al igual que el mecanismo de transcripción, el proceso de replicación en *Archaea* es más parecido al de *Eukarya* que al de *Bacteria*, aunque tiene características únicas que no se dan en ninguno de los dos dominios (Cann y col., 1999).

1.2.2.- Adaptaciones halofílicas al medio

Los microorganismos que viven en medios con elevadas concentraciones de sal se encuentran sometidos a un importante estrés salino. Con el fin de hacer frente a este estrés, los halófilos han desarrollado dos estrategias distintas. Una de ellas consiste en la acumulación citoplasmática de solutos compatibles, compuestos orgánicos de bajo peso molecular como el glicerol, la ectoina o la sacarosa. Esta es la opción que utilizan la mayoría de las bacterias halófilas y halotolerantes, microorganismos halófilos pertenecientes al Dominio *Eukarya* y las arqueas metanógenas halofílicas.

Las arqueas halófilas de la familia *Halobacteriaceae*, un grupo de bacterias halofílicas anaeróbicas y la bacteria halófila *Salinibacter ruber*, han desarrollado otro tipo de estrategia, la cual consiste en la acumulación de sales inorgánicas en el citoplasma. Todas las proteínas y componentes celulares estructurales de estos microorganismos, están adaptados a la presencia de elevadas concentraciones de sal para asegurarse el funcionamiento de la maquinaria enzimática intracelular. El K^+ es el catión intracelular dominante, pudiendo alcanzar concentraciones próximas a 5 M, y el Cl^- es el anión intracelular más abundante. El Na^+ también está presente pero a concentraciones más bajas, alrededor de 1 M, a diferencia de lo que sucede en el medio extracelular, donde el Na^+ es el catión dominante y la concentración de K^+ es muy pequeña. Este gradiente entre el medio extra e intracelular se mantiene por la existencia de diferentes sistemas de transporte en la membrana citoplasmática (Madigan y col., 1999).

BIBLIOTECA VIRTUAL

En cuanto a las proteínas, la presencia de elevadas concentraciones de sal favorece la formación de interacciones hidrofóbicas, causando la agregación de éstas y otras macromoléculas. En las arqueas halófilas extremas la concentración intracelular de sal es muy elevada de modo que toda la maquinaria enzimática requiere una serie de adaptaciones especiales. Sin embargo, tales adaptaciones hacen que estos microorganismos muestren una estricta dependencia por la presencia elevadas concentraciones de sal con el fin de mantener su integridad estructural y viabilidad (Lanyi, 1974; Eisenberg, 1995; Ebel y col., 1999).

La mayoría de las enzimas de lo microorganismos halófilos extremos requieren entre 2 y 4 M de sal para alcanzar su máxima actividad, desnaturalizándose a concentraciones de sal inferiores a 1 M (Lanyi, 1974). En general, estas proteínas se caracterizan por presentar un aumento de residuos ácidos (Asp y Glu), un bajo contenido de residuos básicos (Lys y Arg), un incremento de los residuos apolares Gly, Ala y Val, y una disminución de los residuos alifáticos (Lanyi, 1974; Eisenberg y col., 1992; Madern y col, 2000; Mevarech y col., 2000).

Los estudios estructurales de la malato deshidrogenasa y de la ferredoxina de *Haloarcula marismortui,* y de la dihidrofolato reductasa de *Hfx. volcanii* (Dym y col., 1995; Frolow y col., 1996; Piepper y col., 1998) aportaron nueva información sobre las proteínas halofílicas. En ellos se describe como los grupos carboxilo de

los residuos ácidos organizan una red de moléculas de agua e iones K^+ hidratados en la superficie de las proteínas, y forman un elevada cantidad de puentes salinos internos con residuos básicos específicamente localizados que parecen ser determinantes en la estabilización tridimensional de la estructura de las proteínas halofílicas.

Un reciente estudio de la glutamato deshidrogenasa de *Halobacterium salinarum* mostró que la superficie de la proteína se encuentra decorada con un elevado número de residuos ácidos y que presenta una reducción significativa del carácter hidrofóbico expuesto en comparación con proteínas no halofílicas. Esta última diferencia no está causada por la pérdida de residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína, como se ha había propuesto anteriormente, sino por la reducción en el número de residuos de lisina expuestos. Un bajo contenido de lisinas conlleva el incremento de la carga total negativa de la superficie de la proteína, y también la disminución del carácter hidrofóbico de la superficie accesible al solvente (Britton y col., 1998).

Por último, Franzetti y col. (Franzetti y col., 2001) han demostrado que bajo condiciones hiposalinas las arqueas halofílicas pueden producir enzimas similares a chaperoninas que reparan las proteínas dañadas como resultado de la pérdida de sal.

1.3.- *Haloferax mediterranei*

El Archaeon halófilo extremo *Haloferax mediterranei* fue descrito por primera vez en 1983 por Rodríguez Valera y col. como *Halobacterium mediterranei*. Posteriormente, en 1986, Torreblanca y col. propusieron una nueva clasificación de este microorganismo junto con *Hbt. volcanii* y *Hbt. denitrificans*, pasando a formar parte del género *Haloferax.* Esta distinción se hizo basándose en un amplio estudio sobre los lípidos polares de la membrana celular y otras características morfológicas y fisiológicas. Actualmente, el género *Haloferax* está compuesto por cinco especies: las tres anteriormente citadas, *Hfx. gibbonsi* (Juez y col., 1986) y *Hfx. lucentensis,* descrita hasta hace un año como *Hfx. alicantei* (Gutierrez y col., 2002).

Haloferax mediterranei, al igual que las especies pertenecientes a su género, presenta una amplia variedad morfológica siendo el bacilo la forma predominante. Su tamaño se encuentra entre 0,5 y 2 μm, presenta una débil motilidad durante la fase exponencial de crecimiento, y posee abundantes vacuolas de gas. Tanto la concentración de sal óptima para su crecimiento como la concentración mínima de sal que requiere para crecer son menores que las correspondientes a otros miembros de su familia, excepto *Hfx. volcanii*, y requiere la presencia de Mg^{2+} en su crecimiento.

Este microorganismo es capaz de crecer en medio mínimo en presencia de glucosa como única fuente de carbono. Para ello emplea la vía modificada de Entner-Doudoroff (Tomilson y col., 1972; Danson y col., 1992; Bonete y col., 1996), en la cual la glucosa se oxida a gluconato y éste se deshidrata a 2-ceto-3-desoxigluconato, antes de la fosforilación para dar 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato. A continuación el metabolismo procede según la vía normal de Entner-Doudoroff, con el rendimiento de un ATP por glucosa metabolizada (Figura 3). Esta vía modificada se ha encontrado también en otras especies de halófilos extremos, como por ejemplo en *Halococcus saccharolyticus* o *Halorubrum saccharovorum* (Tomilson y col., 1976).

La organización de su genoma se determinó mediante el uso de electroforesis de campo pulsante (PFGE) y el análisis de patrones de restricción obtenidos con varias endonucleasas. Estas técnicas revelaron la presencia de un cromosoma circular de 2,9 Mpb, el cual es muy parecido al de *Hfx. volcanii*, y tres plásmidos de 490, 320 y 130 Kb (López-García y col., 1992).

Por último, cabe destacar dos propiedades que hacen de *Hfx. mediterranei* un microorganismo muy interesante desde el punto de vista biotecnológico. La primera consiste en la acumulación de cantidades considerables de polihidroxialcanoato (PHA), un copolímero de β-hidroxibutirato y β-hidroxivalerato, que se emplea para la producción de plásticos biodegradables, aunque todavía no se ha comercializado (Rodríguez Valera y col., 1992; Eichler, 2001). Y la segunda de ellas se basa en la producción de exopolisacáridos (Antón y col. 1988; Eichler, 2001) que pueden ser empleados como agentes gelatinizantes, emulsionantes, espesantes, etc., aunque su producción a gran escala todavía no se ha iniciado.

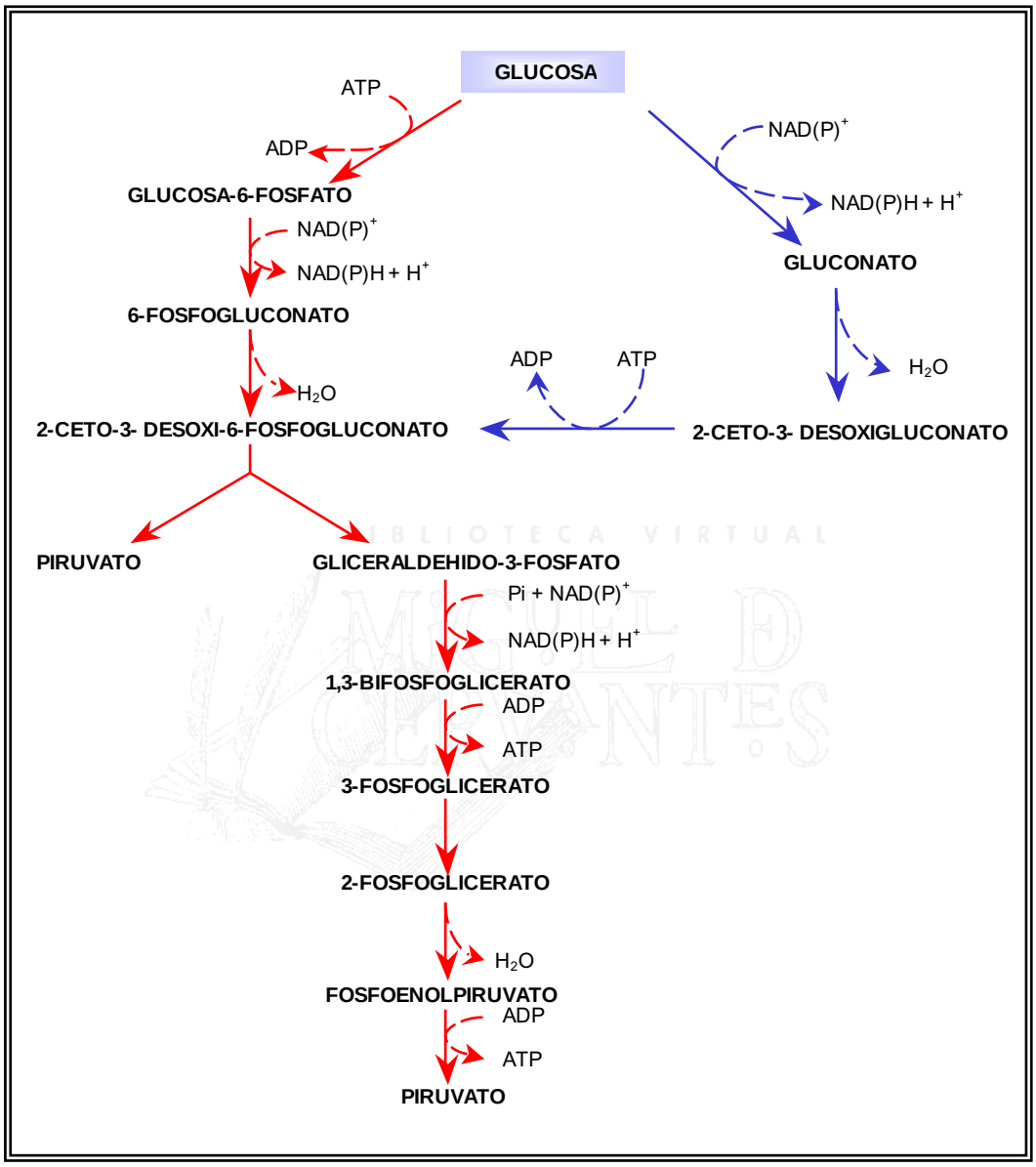

Figura 3: Vías del catabolismo de glucosa. La vía modificada de Entner-Doudoroff de halófilos se muestra en color azul, y la vía de Entner- Doudoroff se muestra en color rojo.

1.4.- GLUCOSA DESHIDROGENASA (GlcDH)

Hay dos tipos de glucosa deshidrogenasa: GlcDH quinona dependiente (GlcDH-Q, EC 1.1.99.17) y GlcDH $NAD(P)^+$ dependiente (GlcDH-N, EC 1.1.1.47).

La GlcDH quinona dependiente cataliza la oxidación de glucosa a gluconato en presencia de pirrolquinoleina quinona (PQQ) como cofactor en el periplasma. Además, estas enzimas transfieren electrones a la citocromo oxidasa por medio de ubiquinona en la cadena transportadora de electrones (Matsushita y col., 1993). Algunas GlcDH quinona dependientes se encuentran solubles en el perisplasma (Duine y col., 1979, Olsthoorn y col., 1998) mientras que otras están unidas a la cara externa de la membrana citoplasmática (Cleton-Jansen y col., 1990; James y col., 2003). En la actualidad, estas quinoproteínas son muy interesantes no sólo desde el punto de vista fisiológico sino también desde un punto de vista biotecnológico ya que pueden ser empleadas en tratamientos medioambientales o como biosensores (Yamada y col., 2003).

Comparaciones de secuencias entre la GlcDH quinona dependiente de *Acinetobacter calcoaceticus* y 23 proteínas homólogas han puesto de manifiesto que las enzimas PQQ dependientes se encuentran más ampliamente distribuidas de lo que inicialmente se suponía. En concreto, la presencia de una proteína PQQ dependiente en al menos un microorganismo perteneciente al Dominio *Archaea* abre la posibilidad de que el cofactor PQQ estuviera presente en el metabolismo de los procariotas desde el principio de la evolución en la tierra (Oubrie, 2003).

La presencia de la actividad glucosa deshidrogenasa $NAD(P)^+$ dependiente se ha descrito para varios miembros de la familia *Halobacteriaceae,* como por ejemplo en *Hbt. saccharovorum* (Tomlinson y col., 1976), *Hbt. salinarum* (Madan y col., 1996) y *Hfx. mediterranei* (Bonete y col., 1996). Asimismo, se ha identificado el gen que codifica esta proteína en el genoma de *Halobacterium* NRC-1 (Ng y col., 2000) a pesar de que este microorganismo es incapaz de metabolizar azúcares. En el caso de las arqueas termófilas, la actividad glucosa deshidrogenasa $NAD(P)^+$ dependiente se ha descrito en *Sulfolobus solfataricus* (Giardina y col., 1986), *Thermoplasma acidophilum* (Smith y col., 1989), *Thermoproteus tenax* (Siebers y col., 1997), y recientemente en *Sulfolobus tokodaii* (Ohshima y col., 2003).

En arqueas termófilas y halófilas, la GlcDH NAD(P)$^+$ dependiente está implicada en el catabolismo de carbohidratos. Concretamente, es la primera enzima de la vía modificada de Entner-Doudoroff catalizando la siguiente reacción:

D-Glucosa + NAD(P)$^+$ ⟶ D-Glucono-1,5-lactona + NAD(P)H + H$^+$

La GlcDH no se encuentra exclusivamente en el Dominio *Archaea*, sino que también aparece en levaduras, hígado de mamífero (hígado de caballo) y varias especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Clostridium* (Andreesen y col., 1969), *Alcaligenes, Achomobacter* (Kersters y col., 1968), *Gluconobacter* (Eguchi y col., 1992) y *Bacillus* (Makino y col., 1989).

A pesar de que todos estos microorganismos presentan actividad GlcDH, la enzima purificada a partir de cada uno de ellos varía en sus propiedades moleculares y catalíticas, como por ejemplo en su naturaleza oligomérica, la especificidad por el coenzima o la utilización de sustratos alternativos. Así, las GlcDH de las arqueas termófilas se encuentran en forma de homotetrámeros, mientras que las GlcDH de las arqueas halófilas forman homodímeros, o la GlcDH de *Hfx. mediterranei* presenta una clara preferencia por el coenzima NADP$^+$, mientras que la GlcDH de *S. tokodaii* alcanza su máxima actividad en presencia de NAD$^+$.

1.5.- GLUCOSA DESHIDROGENASA DE *Hfx. mediterranei*

- Propiedades bioquímicas

La GlcDH de *Hfx. mediterranei* se ha purificado empleando cromatografías de tamizado molecular y afinidad, en presencia de tampones con elevadas concentraciones de sal o glicerol para estabilizar su estructura. Esta proteína es una enzima dimérica con una masa molecular de 39 kDa por subunidad. Es catalíticamente activa tanto con NADP$^+$ como con NAD$^+$, aunque manifiesta una mayor afinidad por el NADP$^+$, la presencia de iones divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) actúan como activadores durante la reacción enzimática, y su actividad muestra una marcada dependencia de la concentración de NaCl o KCl, al igual que el resto de proteínas halofílicas (Bonete y col., 1996; Pire, 1998).

Además de estas propiedades, la inactivación de la GlcDH en presencia de agentes quelantes de metales indica que esta proteína contiene unidos iones metálicos que son esenciales para su actividad. Los primeros estudios sobre su contenido de metales pusieron de manifiesto la existencia de dos átomos de zinc por subunidad (Pire y col., 2000), sin embargo, a lo largo de este trabajo se comprobará que la GlcDH sólo contiene un átomo de zinc por subunidad.

Para determinar el mecanismo cinético de la GlcDH se han realizado estudios de velocidades iniciales e inhibición por producto, observándose que la reacción que cataliza esta enzima obedece a un mecanismo secuencial ordenado Bi-Bi. En la Figura 4 se describe el orden de entrada y salida de los sustratos y productos respectivamente (Pire y col., 2000).

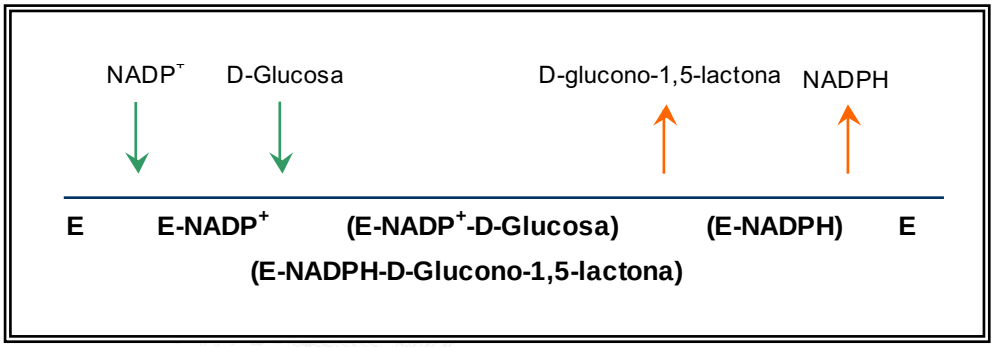

Figura 4: Descripción del mecanismo cinético de GlcDH de *Hfx. mediterranei.*

- Aislamiento del gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei*

El gen que codifica la GlcDH se ha identificado en una librería genómica de *Hfx. mediterranei* construida en fago lambda empleando una sonda de 191pb, la cual contiene la secuencia del extremo N-terminal de la proteína. Tras la realización del segundo screening, se obtuvieron varias placas con una fuerte señal de hibridación, aislándose el DNA de dos fagos positivos. Uno de ellos se secuenció con oligonucleótidos específicos, dando lugar a un marco abierto de lectura (ORF) de 1071pb que codifica una proteína de 357 aminoácidos, identificada por comparación en bases de datos como GlcDH (Pire y col., 2001).

- Análisis de la secuencia

La obtención de la secuencia del gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* ha permitido llevar a cabo diversas comparaciones con otras secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos. Tales comparaciones han revelado que la GlcDH de *Hfx. mediterranei* pertenece a la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media (MDR), la cual incluye sorbitol deshidrogenasas, xilitol deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasas (Pire y col., 2001).

El alineamiento de secuencias de aminoácidos se ha realizado entre la GlcDH de *Hfx. mediterranei* (hGlcDH), las GlcDHs termofílicas de *T. acidophilum* (tGlcDH) y *S. solfataricus* (sGlcDH), y dos proteínas pertenecientes a la superfamilia MDR, la lactato deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) y la sorbitol deshidrogenasa de hígado de oveja (SDH) (Figura 5). En él se observa que aunque el grado de identidad con la HLADH y SDH no es elevado (aproximadamente un 20 %) existen algunos residuos conservados que son clave para entender la relación que existe entre estas dos enzimas y la GlcDH de *Hfx. mediterranei* (Pire y col., 2001). Además, comparaciones de secuencias con otras glucosas deshidrogenasas bacterianas, incluida la GlcDH de *Bacillus megaterium,* no revelaron similaridades significativas con la GlcDH halofílica.

Al analizar la secuencia aminoacídica de la GlcDH halófila se observa una secuencia consenso, Gly-His-Glu-X(2)-Gly/Ala-X(2)-Ile/Val/Ser/Ala/Cys (correspondiente a los residuos 62-70) que representa un patrón característico de las enzimas pertenecientes a la superfamilia MDR (Prosite Database PDOC00058, Person y col., 1994). El residuo His63 presente en dicha secuencia es uno de los ligandos del átomo de zinc catalítico.

Comparaciones de secuencias aminoacídicas entre la GlcDH de *Hfx. mediterranei* y otras secuencias de GlcDHs pertenecientes a la familia MDR mostraron similaridad con la GlcDH de *T. acidophilum* y *S. solfataricus*, ambas termófilas y pertenecientes al Dominio *Archaea*. Las secuencia de aminoácidos de la GlcDH halofílica mostró un 39 % de similaridad y un 29 % de identidad con la GlcDH de *T. acidophilum*, y un 41 % y 30 % de similaridad e identidad, respectivamente, con la GlcDH de *S. solfataricus*.

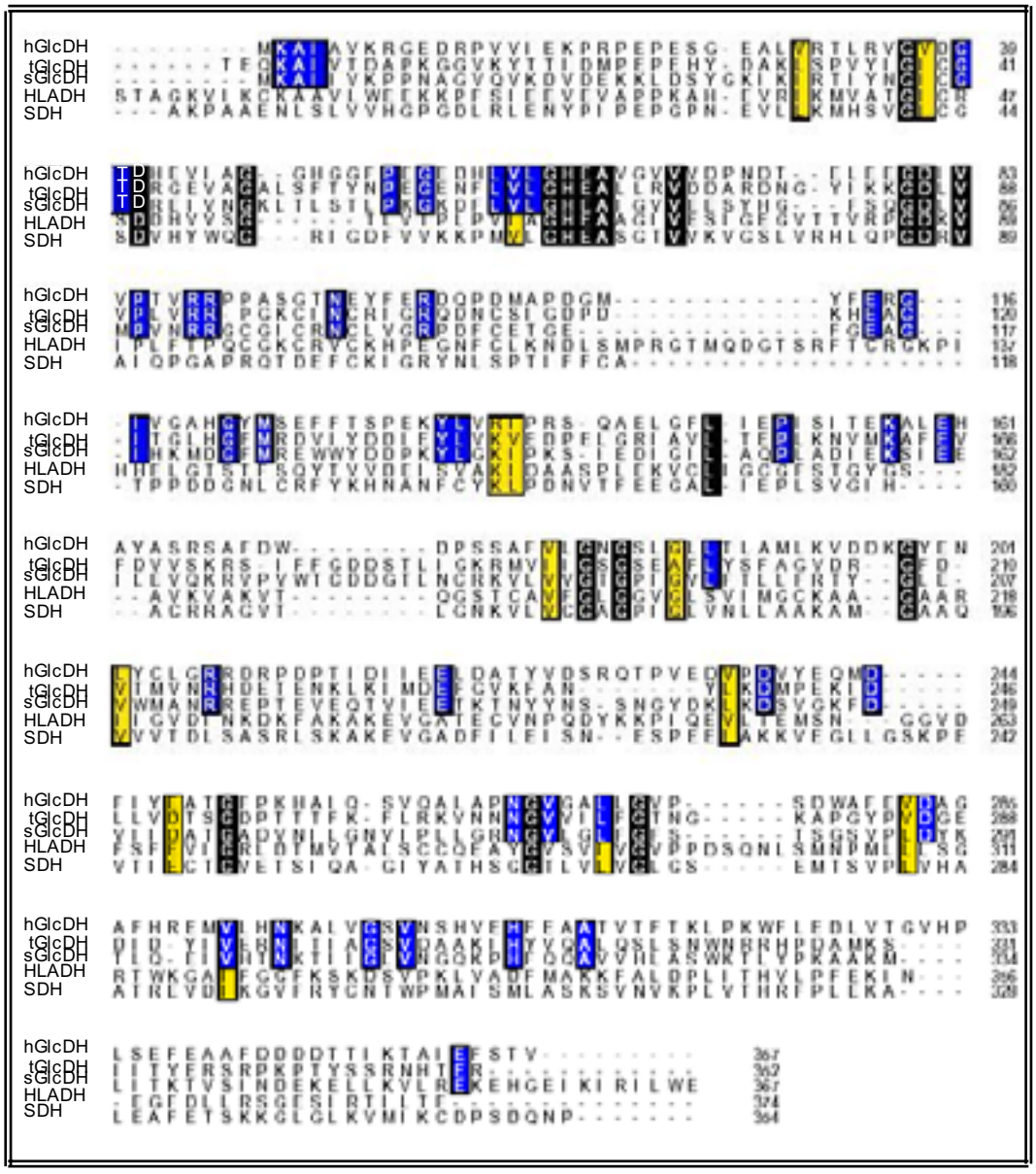

Figura 5: Alineamiento de secuencias de aminoácidos. La identidad de los aminoácidos entre las tres GlcDHs se muestra en color azul, entre las cinco proteínas en color negro, y los cambios de aminoácidos conservados se presentan en color amarillo.

En el análisis de la composición de aminoácidos para diferentes GlcDHs pertenecientes al Dominio Archaea (Tabla 1) se observa un aumento de los residuos ácidos sobre los básicos en la GlcDH de *Hfx. mediterranei.* Esta tendencia en las proteínas halófilas constituye una adaptación a medios con elevadas concentraciones salinas, como ya anticipó Lanyi en 1977. Concretamente, en la GlcDH halofílica los aminoácidos aspartato y glutamato representan el 69% de los residuos cargados, mientras que en la GlcDH de *T. acidophilum* y de *S. solfataricus* este porcentaje desciende hasta 54% y 50%, respectivamente. En total, la proteína halofílica contiene 64 residuos cargados negativamente (Asp y Glu), y 29 residuos cargados positivamente (asumiendo que His es un residuo neutro, y que Lys y Arg son residuos cargados positivamente) por subunidad, confiriéndole una carga total negativa de 35 por subunidad, a diferencia de la GlcDH de *T. acidophilum* en la que la carga total es -8.

El incremento de los residuos ácidos en la proteína halofílica con respecto a la GlcDH de *T. acidophilum* se debe, principalmente, a un incremento en el número de residuos de glutamato, acompañado por una reducción de residuos de lisina. Este aumento de residuos de glutamato coincide con el hecho de que este aminoácido posee la mayor capacidad para la unión de moléculas de agua, incluyendo al aspartato. Sin embargo, este aumento no es universal, puesto que existen estudios basados en el pK_a de Asp y Glu que afirman que el carácter acídico de las proteínas halófilas está causado por un incremento en el número de residuos de aspartato (Fukuchi y col., 2003).

Tabla 1: *Composición aminoacídica de GlcDH de Hfx. mediterranei, T. acidophilum y Sulfolobus solfataricus.*

Aminoácido	*Hfx. mediterranei*	*T. acidophilum*	*S. solfataricus*
Ala	30	19	13
Arg	17	21	15
Asn	7	17	16
Asp	29	31	21
Cys	1	4	7
Gln	6	4	9
Glu	35	22	27
Gly	30	31	36
His	12	8	7
Ile	16	26	31
Leu	27	23	34
Lys	12	24	32
Met	7	8	6
Phe	18	15	11
Pro	24	17	15
Ser	18	17	14
Thr	20	20	22
Trp	3	1	6
Tyr	10	14	11
Val	35	30	33
TOTAL	357	352	366

Otras diferencias en la composición de aminoácidos entre proteínas halofílicas y sus homólogas mesofílicas son el aumento de los residuos neutros polares serina y treonina, y el fuerte descenso de los residuos hidrofóbicos fenilalanina, isoleucina, valina y leucina (Lanyi, 1974). Sin embargo, la GlcDH de *Hfx. mediterranei* no presenta diferencias significativas en cuanto a la proporción de los residuos serina y treonina, y aunque el número de isoleucinas se ha reducido en un 50% aproximadamente, se ha observado un ligero aumento en el número de fenilalanina, leucina y valina. Por tanto, la GlcDH de *Hfx. mediterranei* no muestra ninguna de estas características cuando se compara con otras GlcDHs de arqueas no halófilas. Además, hay destacar el fuerte aumento en el contenido de residuos de Ala en la proteína halófila, aunque el significado de este hecho todavía se desconoce.

Por último, estudios sobre el modelo de la glutamato deshidrogenasa de *Hbt. salinarum* han revelado otra diferencia importante entre la composición aminoacídica de las proteínas halófilas y sus homólogas mesófilas. Esta diferencia consiste en una reducción en el número de lisinas presentes en las proteínas halófilas (Britton y col., 1998). Esta disminución se observó claramente en la GlcDH de *Hfx. mediterranei*, la cual contiene únicamente 12 residuos de lisina en comparación con los 24 y 32 que presentan la GlcDH de *T. acidophilum* y *S. solfataricus*, respectivamente.

Las observaciones contempladas en la GlcDH de *Hfx. mediterranei* (incremento de residuos ácidos, reducción del contenido de Lys y aumento de residuos de Ala) coinciden con el análisis del genoma de *Halobacterium* sp. NRC-1. Comparaciones del genoma de *Halobacterium sp* NRC-1 con el genoma de *Thermoplasma acidophilum* muestran que el porcentaje de residuos Lys aumenta en este último de un 2% a un 6%, el contenido de residuos ácidos desciende desde el 16% hasta el 12% y el de Ala del 13% al 7% respectivamente del total de la composición aminoacídica para cada genoma (Kennedy *et al.*, 2001; http://www.ebi.ac.uk/proteome). El incremento en el contenido de residuos de Ala en la GlcDH de *Hfx. mediterranei* comparado con la enzima de *T. acidophilum* no parece ser una característica general de halófilos, como se ha observado por comparación con diferentes proteínas de otros microorganismos, como por ejemplo

con la glutamato deshidrogenasa de *Hbt. salinarum* comparada con la glutamato deshidrogenasa de *Clostridium symbiosum* (Britton y col., 1998; Britton y col., 2004).

1.6.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA ENZIMA GLUCOSA DESHIDROGENASA

Hasta el momento, el número de estructuras resueltas de la enzima glucosa deshidrogenasa no es muy elevado, existiendo representantes tanto de la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) como de la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media (MDR).

La GlcDH de *Bacillus megaterium* IWG3 pertenece a la familia de las SDR, no requiriendo zinc para su actividad catalítica (Jörnvall y col., 1995). Su estructura (Yamamoto y col., 2001) ha puesto de manifiesto que la enzima consiste en cuatro subunidades idénticas, dispuestas con una simetría 222. El plegamiento de la cadena polipeptídica de esta glucosa deshidrogenasa (Figura 6) es muy similar al que presentan las enzimas que pertenecen a la familia SDR, aunque el sitio de unión del NAD^+ y las interacciones entre subunidades son diferentes. Desafortunadamente, el modo en el que se une la glucosa a la enzima todavía no ha sido determinado y por lo tanto no se ha podido establecer el mecanismo catalítico de la glucosa deshidrogenasa de *B. megaterium.* Sin embargo, en el análisis del centro activo de la proteína se han observado residuos conservados de tirosina (Tyr158) y lisina (Lys162), los cuales son característicos de las enzimas pertenecientes a la familia SDR. Se piensa que estos aminoácidos están implicados en una catálisis básica, estabilizando el ión alcóxido formado durante el ciclo catalítico de la enzima.

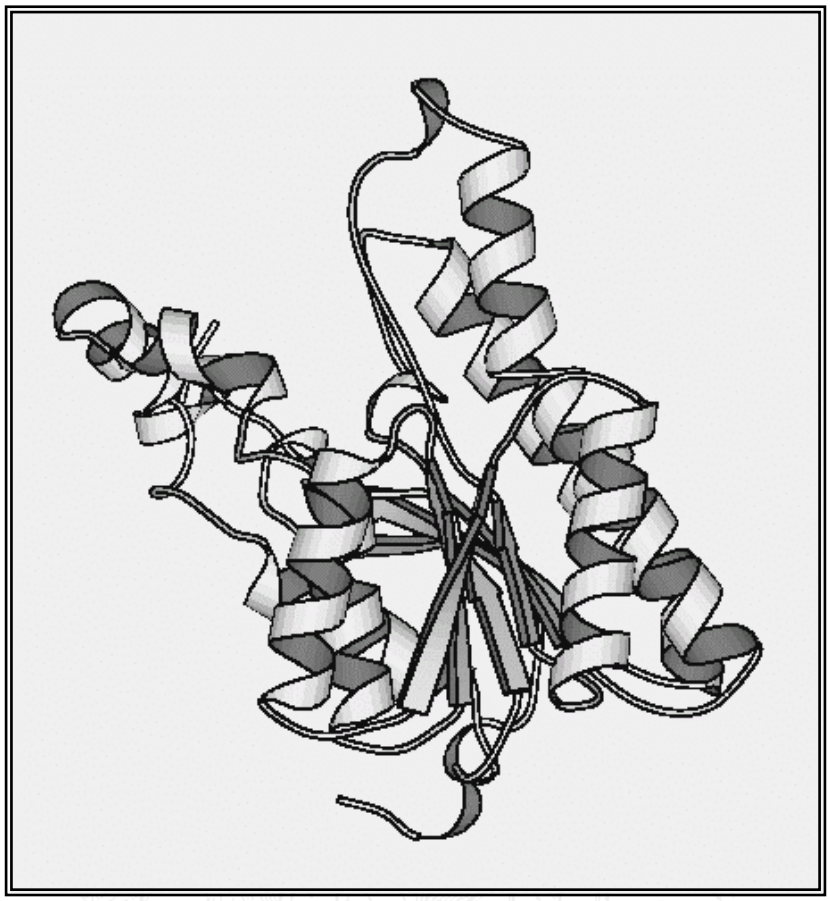

Figura 6: Estructura de la subunidad de la glucosa deshidrogenasa de *B. megaterium*.

La resolución de la estructura de la glucosa deshidrogenasa, de la arquea termófila, *T. acidophilum* (John y col., 1994) permitió establecer relaciones entre la estructura y la función de las enzimas pertenecientes a la familia MDR. En la estructura del monómero de esta enzima se observan claramente dos dominios separados por una hendidura, uno de ellos es el dominio de unión al nucleótido (residuos 187-300), y el otro es el dominio catalítico (residuos 1-186 y 301-352) (Figura 7). El dominio de unión al nucleótido comprende una hoja-β formada por seis hebras paralelas (βA - βF) (nomenclatura descrita en John y col., 1994), las cuales representan el núcleo del motivo característico $\beta\alpha\beta$ conocido también como plegamiento de Rossmann (Rossmann y col., 1974). Dicha hoja-β se encuentra flanqueada por cuatro hélices α (αB, αC, αE, αF), que varían en longitud cuando se comparan con hélices equivalentes de otras deshidrogenasas. Una hélice α central, de mayor longitud (residuos 154-174), conecta el dominio de unión al nucleótido

con la región N-terminal del dominio catalítico. De forma similar, una pequeña hélice α (residuos 308-321) enlaza también el dominio de unión al nucleótido con el final del extremo C-terminal del monómero. Dos hélices α y varios lazos, que forman parte del dominio catalítico, completan el patrón de plegamiento del monómero de la GlcDH de *T. acidophilum*.

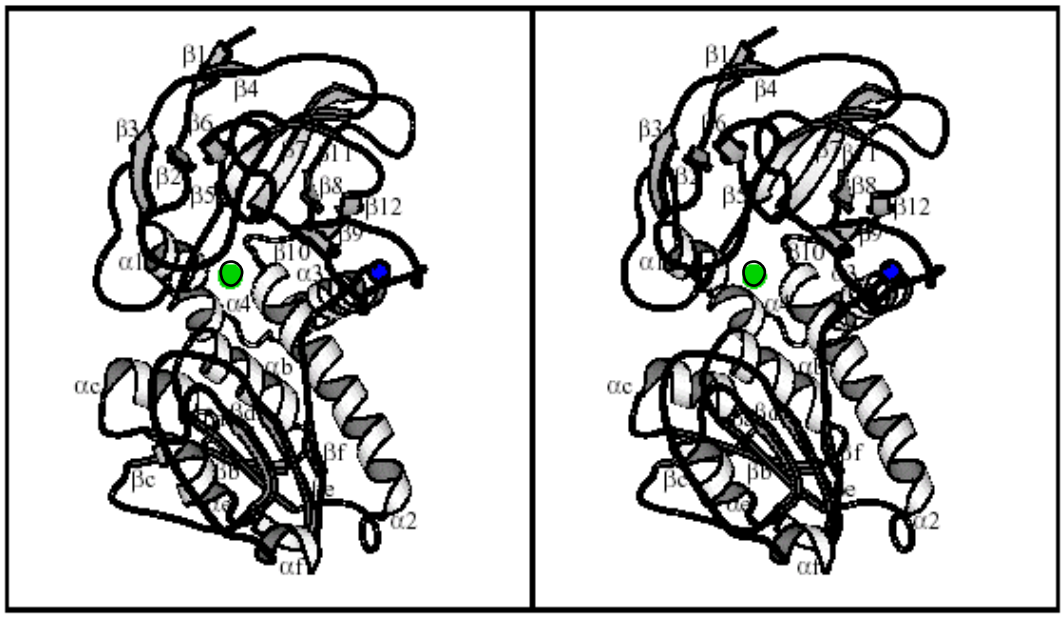

Figura 7: Visión en estéreo de la estructura del monómero de la GlcDH de *T. acidophilum*. El átomo de zinc catalítico se muestra en color verde y el átomo de zinc estructural en color azul.

La estructura de la GlcDH de *T. acidophilum* puso de manifiesto la presencia de dos átomos de zinc por subunidad, uno con función catalítica y otro estructural (Figura 7). El átomo de zinc catalítico se encuentra en la parte inferior de la hendidura que separa ambos dominios y parece estar coordinado por los residuos Cys40, His67 y Glu155. El átomo de zinc estructural se ha identificado en un lazo de la proteína situado en la boca de la hendidura. En la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo, el zinc estructural está coordinado por cuatro cisteínas. Sin embargo, en la GlcDH de *T. acidophilum* contiene solamente tres cisternas (Cys98, Cys101 y Cys109), siendo el cuarto ligando de la proteína un residuo de Asp (Asp115) (Figura 8).

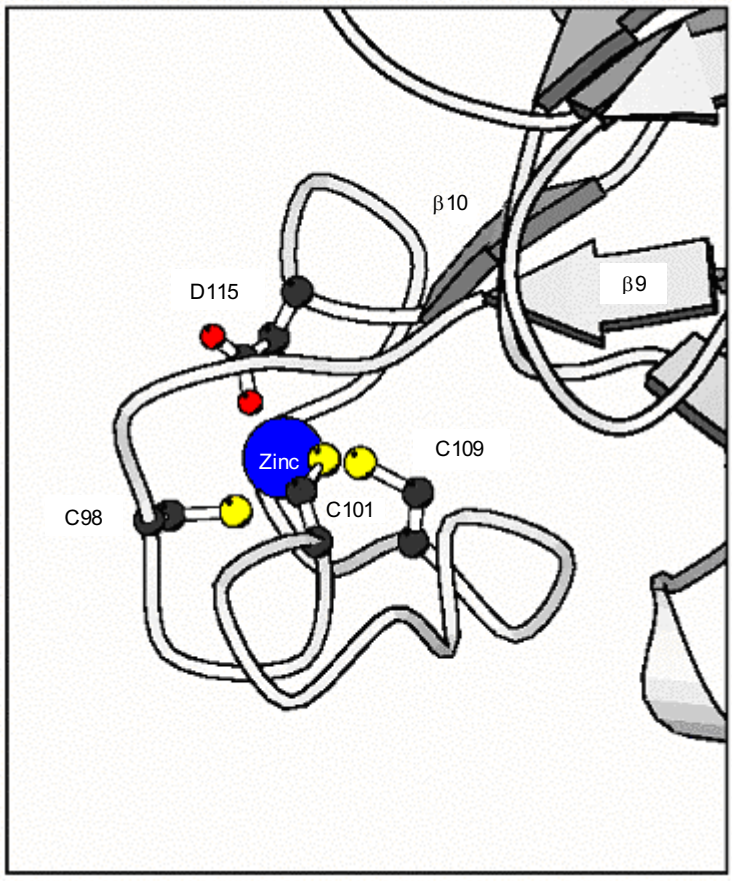

Figura 8: Representación esquemática del sitio de unión del zinc estructural en la GlcDH de *T. acidophilum*, mostrándose los residuos implicados en su coordinación.

Mediante comparaciones de secuencias dos a dos entre la GlcDH de *T. acidophilum* y la ADH de hígado de caballo, la ADH de levadura y la SDH, se ha determinado que el grado de identidad es de 19%, 20% y 21%, respectivamente. Comparaciones estructurales muestran una significativa similaridad en el patrón de plegamiento de dichas enzimas, y también en los residuos que forman el centro activo en cada una de ellas (John y col., 1994)

- Sitio de unión del zinc catalítico en la GlcDH de *T. acidophilum*

Los miembros de la familia MDR requieren un átomo de zinc con función catalítica para poseer actividad (Jornvall y col., 1987). Además, en algunos componentes de esta familia se ha identificado un átomo de zinc adicional, con

función estructural, que no parece ser esencial para la función de la enzima. En la HLADH los ligandos del zinc catalítico son dos residuos de cisteína (Cys46 y Cys174) y uno de histidina (His67), los cuales se encuentran altamente conservados. En la apoenzima, una molécula de agua completa la coordinación tetraédrica del átomo de zinc (Eklund y col., 1976). En la GlcDH de *T. acidophilum* un residuo de glutamato (Glu155) reemplaza al residuo Cys174 presente en HLADH. Los otros dos residuos (His67 y Cys46) se encuentran conservados en la proteína termófila (His67 y Cys40) (John y col., 1994) (Figura 9).

En la secuencia de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* el residuo Cys40 está sustituido por un residuo acídico (Asp38), los otros dos residuos, His67 y Glu155, se encuentran conservados (His63 y Glu150 en la GlcDH halofílica) (Pire y col., 2001)

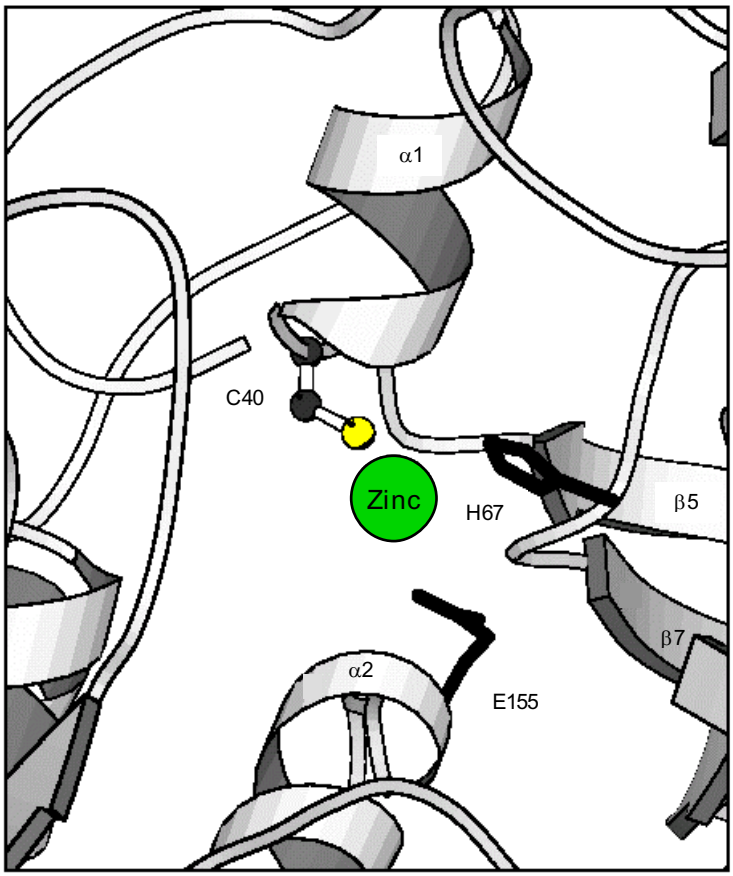

Figura 9: Representación esquemática del sitio de unión del zinc catalítico en la GlcDH de *T. acidophilum*, mostrándose los residuos implicados en su coordinación

- Sitio de unión del nucleótido en la GlcDH de *T. acidophilum*

La glucosa deshidrogenasa de *T. acidophilum* es una enzima que muestra especificidad dual para los coenzimas $NADP^+$ y NAD^+, aunque utiliza de manera preferente el $NADP^+$. Estudios previos sobre la forma de reconocimiento del coenzima NAD^+ o $NADP^+$ en enzimas que muestran el clásico plegamiento de Rossmann indican que la especificidad por el NAD viene dada por el motivo rico en glicinas GxGxxG/A, el cual se encuentra entre la primera hebra β y la siguiente hélice α y un residuo cargado negativamente al final de la segunda hebra β. En general , se piensa que la presencia de residuos cargados positivamente al final de esta segunda hebra β confiere especificidad para el $NADP^+$ (Baker y col., 1992).

El análisis de la secuencias de las GlcDHs de *T. acidophilum* y *Hfx. mediterranei* revela la presencia del motivo rico en glicinas (GxGxxA y GxGxxG, respectivamente) y de residuos cargados positivamente al final de la segunda hebra β. En la enzima halófila estos residuos son dos argininas consecutivas (Arg207 y Arg208), los cuales se encuentran reemplazados por Arg216 e His217 en la GlcDH de *T. acidophilum.* No obstante, todavía no se dispone de los detalles necesarios para establecer la forma exacta de reconocimiento del coenizma para esta familia de GlcDHs. Comparaciones estructurales entre la GlcDH de *T. acidophilum* y la HLADH sugieren que la Asn215 presente en la enzima termófila es estructuralmente equivalente al residuo Asp223 de HLADH, el cual forma interacciones con el anillo ribosa de la adenina en esta enzima (John y col., 1994). Este hecho sugiere que la asparagina (Asn215) podría estar implicada en la estabilización de la adenosina-2-fosfato junto con la His217.

1.7.- MECANISMOS CATALÍTICOS DE ENZIMAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA MDR

En base a los estudios espectroscópicos y estructurales de diversas alcohol deshidrogenasas (ADH) se han propuesto varios mecanismos catalíticos. La oxidación de los alcoholes requiere la eliminación de dos átomos de hidrógeno del sustrato. Este proceso de deshidrogenación se lleva a cabo mediante dos procesos acoplados, el primero de ellos consiste en la eliminación de un protón y el segundo en la transferencia de un ión hidruro.

Los dos principales mecanismos propuestos para la HLADH se diferencian específicamente en el modo de coordinación del átomo de zinc durante la catálisis.

Uno de los mecanismos postula el desplazamiento de una molécula de agua unida al zinc catalítico cuando se une el sustrato (alcohol), de modo que el zinc mantiene una coordinación tetraédrica durante la catálisis (Eklund y col., 1982). En el caso de la HLADH, el oxígeno del grupo hidroxilo del sustrato (alcohol) se une al átomo de zinc presente en el sitio activo. Seguidamente, se transfiere un protón hasta la His51, mediante enlaces de hidrógeno, a través de la Ser48 y el 2-hidroxilo del anillo de ribosa del NAD (Figura 10). La distancia entre el oxígeno del alcohol coordinado y la Ser48 es de 2.5 Å en el complejo formado por la enzima con el NAD y el pentafluorobencil alcohol, estableciendo probablemente un enlace de hidrógeno de baja barrera (LBHB) (Cleland, 2000). De este modo el alcóxido y la Ser48 comparten un protón en un LBHB, y la energía liberada es empleada para conducir el protón transferido a la His51 (Ehrig y col., 1991; Ramasw amy y col., 1999).

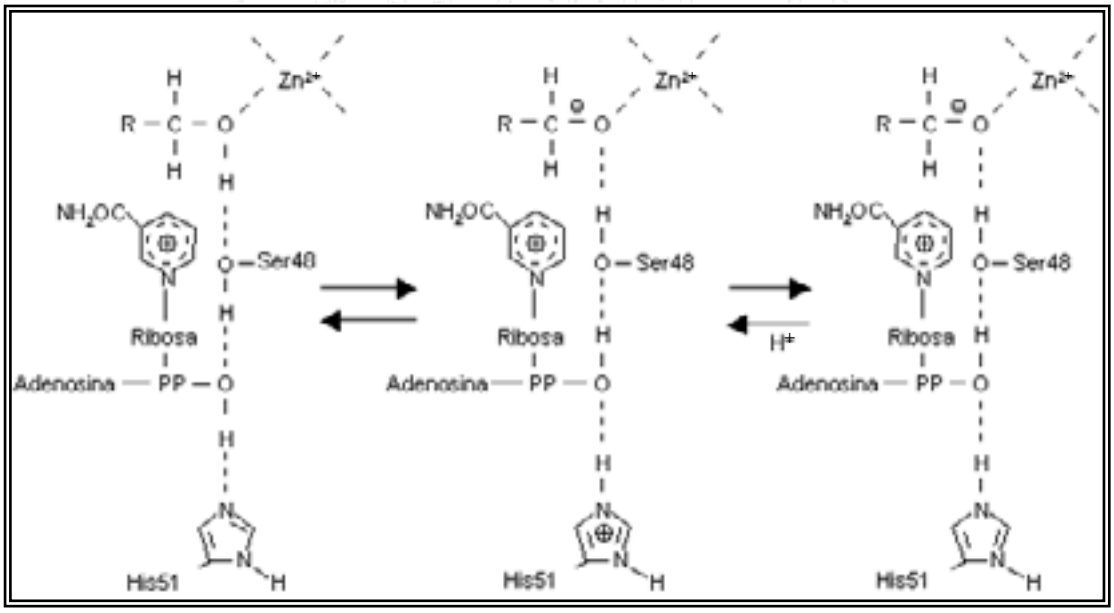

Figura 10: Esquema de la transferencia del protón en la HLADH (Ehrig y col., 1991).

Se ha propuesto que la GlcDH de *T. acidophilum* también actúa siguiendo el mecanismo descrito para la HLADH. Pero en la enzima termófila el residuo equivalente a His51 (presente en HLADH) es Gly45, hecho que podría impedir la transferencia del protón del modo descrito anteriormente. No obstante, el residuo Thr42 de la GlcDH de *T. acidophilum* es equivalente a la Ser48 de HLADH pudiendo llevarse a cabo la transferencia del protón directamente al disolvente desde la Thr42 (Edwards y col., 1996).

En el segundo mecanismo, se postula que la molécula de agua unida al zinc no se desplaza en presencia del sustrato, es decir, el átomo de zinc permanece pentacoordinado durante la catálisis (Makinen y col., 1983) (Figura 11).

Estas diferencias entre los dos mecanismos propuestos se deben a la carencia de estudios estructurales en presencia de diferentes combinaciones de productos y sustratos, los cuales podrían confirmar la coordinación que presenta el átomo de zinc catalítico durante la catálisis de estos sistemas enzimáticos (Kleifeld y col., 2003).

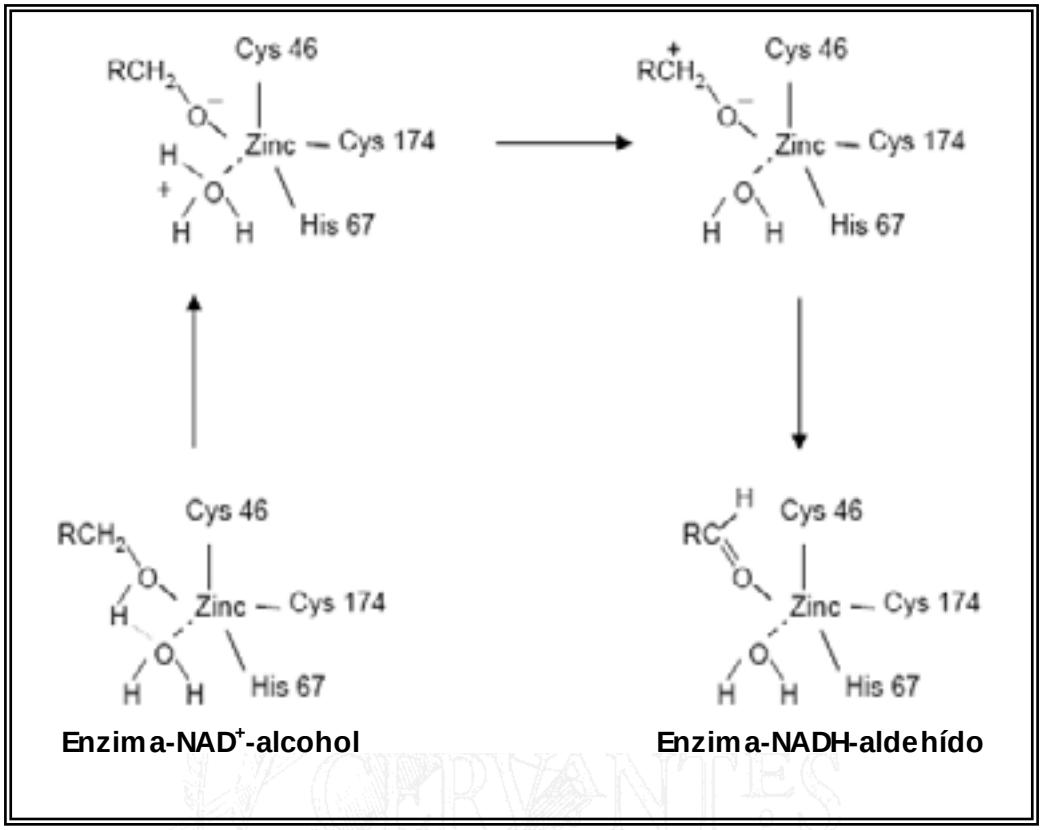

Figura 11: Esquema del centro de unión del átomo de zinc catalítico de la alcohol deshidrogenasa de hígado durante la conversión del complejo ternario enzima-NAD^+ -alcohol al complejo enzima-NADH-aldehído. La reducción del aldehído hasta el alcohol se puede llevar acabo mediante la reacción inversa a través de los mismos intermediarios (Makinen y col., 1983).

1.8.- OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo consiste en:

- Ampliar el conocimiento sobre las bases moleculares responsables de la adaptación halofílica de la glucosa deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei.*

Este propósito comprende los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un sistema de expresión heteróloga en *E. coli* para la glucosa deshidrogenasa de *Hfx. mediterranei* con el fin de obtener cantidades de proteína suficiente que permitan llevar a cabo estudios bioquímicos y estructurales.

2. Renaturalizar, purificar y caracterizar la proteína recombinante.

3. Llevar a cabo ensayos de cristalización de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* y sus complejos que faciliten los estudios estructurales de la enzima.

4. Analizar mediante mutagénesis dirigida y estudios bioquímicos los diferentes aminoácidos implicados en la unión del átomo de zinc catalítico en la GlcDH de *Hfx. mediterranei* y otras proteínas pertenecientes a la familia MDR.

5. Analizar mediante mutagénesis dirigida y estudios bioquímicos el papel de los residuos ácidos presentes en la superficie de las proteínas en la halotolerancia de la GlcDH de *Hfx. mediterranei*.

6. Cristalizar las proteínas mutadas construidas en los puntos (4) y (5) para ampliar nuestro conocimiento sobre las relaciones estructura/función de la GlcDH.

BIBLIOTECA VIRTUAL

MATERIALES Y MÉTODOS

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1.-Cepas utilizadas

Las cepas de *E. coli* empleadas en la realización de este trabajo se describen en la siguiente tabla:

Tabla 2: *Cepas de E. coli utilizadas.*

Cepa	Genotipo	Utilidad
E. coli NovaBlue (Novagen)	*end* A1, *hsd* R17 (r_{K12}^-, m_{K12}^-), *sup* E44, *thi*1, *rec* A1, *gyr* A96, *rel* A1, *lac* F' [*pro* A^+B^+, *lac* I^q ZΔM15:: Tn 10 (Tc^R)]	Clonaje
E. coli JM109 (Promega)	*end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*1, *hsd* R17 (r_k^-, m_k^-), *rel*A1, *sup*E44, Δ(*lac-pro*AB), [F', *tra*D36, *pro*A^+B^+, *lac*I^qZΔM15]	Clonaje
E. coli XL1-Blue (Stratagene)	*end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17, *rel*A1, *sup*E44, lac[F', *pro*AB, *lac*I^qZΔM15, Tn10(Tc)^r]	Clonaje y mutagénesis
E. coli BMH71-18 *mut*S (Promega)	*thi*, *sup*E, Δ (*lac-pro*AB), [*mut*S:Tn10], [F', *pro*A^+B^+, *lac*I^qZ ΔM15]	Mutagénesis
E. coli BL21(DE3) (Novagen)	F^- *omp* T, *hsd* S_B (r_B^-, m_B^-), *gal, dcm,* (DE3)	Expresión

El significado de los marcadores genéticos se describe en el Apéndice I.

2.1.2.- Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en esta tesis se resumen en la Tabla 3 y sus mapas se muestran en el Apéndice II.

Tabla 3: *Plásmidos utilizados.*

Plásmido	Marcador	Utilidad
pCR®2.1 (Invitrogen)	Amp^r, Kan^r, *plac-lacZ'*	Vector de clonaje y para secuenciación
pGEM®11-Zf(+) (Promega)	Amp^r, *lac*Z	Vector de clonaje y mutagénesis
pET3a (Novagen)	Amp^r	Vector de expresión
pET14b (Novagen)	Amp^r	Vector de expresión

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.1.3.- Oligonucleótidos diseñados

Los oligonucleótidos diseñados para clonar el gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* y para introducir las mutaciones deseadas en dicho gen, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4: *Oligonucleótidos específicos diseñados.*

Nombre	Secuencia *	Utilidad
GlcForw (N-Terminal)	5' GCA TTG GTA AA**C** **ATA TG**A AAG C 3'	Amplificación, clonaje en pET3a y secuenciación
GlcRev (C-Terminal)	5' **GGA TTC** GTT CTT CAT ACA GTA C 3'	Amplificación, clonaje en pET3a y secuenciación
GlcDH D38A	5' CGG CGT C**GC A**GG GAC C 3'	Mutagénesis dirigida
GlcDH D38C	5' CGG CGT C**TG C**GG GAC C 3'	Mutagénesis dirigida
GlcDH D172K	5' GTT CGA CTG G**AA A**CC GTC GTC GGC 3'	Mutagénesis dirigida
GlcDH D216K	5' CGG ACC CGA CAA TC**A** **AA**A TCA TCG AG 3'	Mutagénesis dirigida
GlcDH D344KFor	5' CAT TCG ATG AC**A AG**G ACA CCA CTA TAA AAA CCG 3'	Mutagénesis dirigida
GlcDH D344KRev	5' CGG TTT TTA TAG TGG TGT C**CT T**GT CAT CGA ATG 3'	Mutagénesis dirigida

* En negrita se muestran las secuencias de restricción para las enzimas *Nde*I y *Bam*HI en GlcForw (oligonucleótido directo) y GlcRev (oligonucleótido reverso), respectivamente. En color rojo se muestran los codones mutados.

2.2.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

2.2.1.- Medios de cultivo, crecimiento y conservación de cepas bacterianas

E. coli fue crecida a 37 °C con agitación en medio rico Luria-Bertani (LB), o en placa utilizando el mismo medio con 1,5 % (p/v) de agar (DIFCO). En los casos en los que fue necesario se incluyó en los medios los antibióticos ampicilina o kanamicina (50 μg/ml). En las placas se añadió isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 0,5 mM para la inducción del promotor P*lac*, y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactósido (X-Gal) 0,01% (p/v) para seleccionar recombinantes por actividad β-galactosidasa. La composición de los medios se describe en los manuales de laboratorio (Sambrook y col., 1990; Sambrook y col., 2001).

El crecimiento de los cultivos se siguió midiendo la densidad óptica a 600nm en un espectrofotómetro Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech).

Las células de *E. coli* se conservaron durante largos períodos de tiempo a –80 ºC en medio de crecimiento que contiene glicerol 10% (p/v).

2.2.2.- Transformación bacteriana

Las transformaciones de células competentes de *E. coli* se llevaron a cabo mediante un choque térmico, siguiendo el método físico-químico descrito por Hanahan (Hanahan, 1983).

Tras la transformación, en todos los casos se incubaron las células a su temperatura de crecimiento el tiempo necesario para la expresión de los genes de resistencia al antibiótico.

2.3.- MANIPULACIÓN DEL DNA

2.3.1.- Preparación de DNA plasmídico de *E. coli*

El DNA plasmídico de *E. coli* se obtuvo empleando el kit CONCERT^{TM} Rapid Plasmid Miniprep System de Gibco BRL (Life Technologies), y su pureza se determinó espectrofotométricamente mediante la relación A_{260}/A_{280}.

2.3.2.- Restricción, modificación y ligación del DNA

La digestión del DNA (alrededor de 2μg) se realizó siguiendo las condiciones recomendadas por la casa suministradora de las enzimas de restricción (Fermentas, Promega).

Los vectores digeridos con una sola enzima de restricción se desfosforilaron empleando la enzima fosfatasa alcalina (Pharmacia Biotech) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante.

La ligación de fragmentos de DNA se llevó a cabo manteniendo una relación 1:2 (vector:inserto) y empleando la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4

(Boehringer Mannheim). Las reacciones se incubaron a 16 ºC durante 16 horas aproximadamente.

2.3.3.- Electroforesis convencional y purificación de fragmentos de DNA

La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó de forma rutinaria en geles de agarosa 1% (Pronadisa), en tampón TAE 1X con 0,5 μg/ml de bromuro de etidio.

Para purificar los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se empleó el kit GFX™ PCR suministrado por la casa comercial Amershan Pharmacia Biotech.

2.3.4.- Amplificación de fragmentos de DNA

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó mediante PCR empleando el termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems). En la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos (≈ 2 pmol/μl) y la enzima EcoTaq (Ecogen). Las condiciones de la reacción se muestran a continuación:

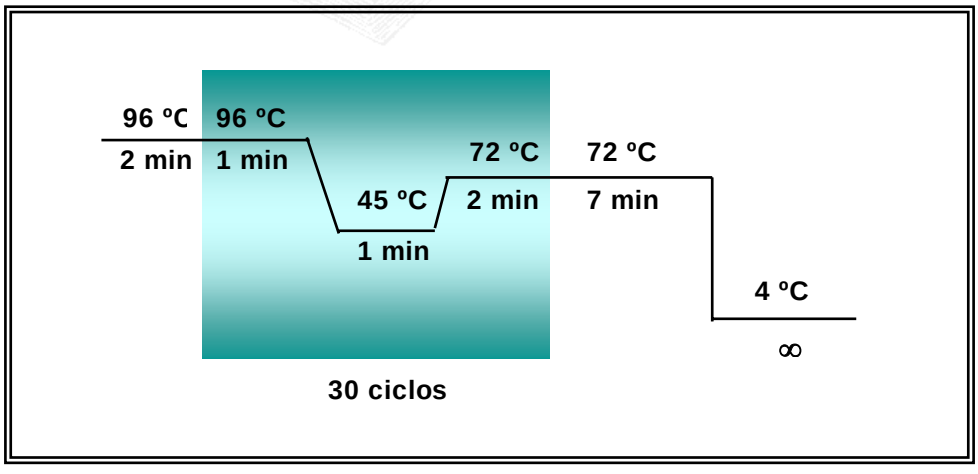

Figura 12: Programa de PCR de amplificación.

2.3.5.- Secuenciación del DNA

La secuenciación del DNA se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) según el método de terminadores didesoxi marcados (Sanger, 1977) con la utilización de oligonucleótidos específicos.

El equipo de PCR utilizado fue el mismo que el descrito en el apartado anterior, y las condiciones de reacción fueron las recomendadas por el fabricante para la utilidad de secuenciación automática. Las muestras obtenidas se purificaron con el kit Centri-Sep Column (Princeton Separations).

El programa para la adquisición de datos primarios empleado fue ABI Prism 310 Collection v 1.2.2 y el análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con el programa Sequencing Análisis v 3.0.

El posterior análisis y solapamiento de las secuencias así obtenidas se realizó con los programas BESTFIT y GAP del software "Wisconsin Genetics Computer Group" (GCG) (Devereux y col., 1984)

2.3.6.- Reacción de mutagénesis dirigida

Para la construcción de los diferentes mutantes de GlcDH de *Hfx. mediterranei* se utilizaron dos técnicas diferentes de mutagénesis dirigida.

En la primera de ellas, el gen que codifica la proteína halófila se clonó en el vector pGEM®-11Zf(+), y los ensayos de mutagénesis dirigida se llevaron a cabo empleando el kit GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (Promega). En este sistema se produce la unión simultánea de dos oligonucleótidos a la hebra del plásmido previamente desnaturalizado, uno de ellos introduce la mutación deseada en el gen que codifica la proteína objeto de estudio, y el otro introduce una mutación en el gen de la β-lactamasa, de modo que se incrementa la resistencia frente a antibióticos β-lactámicos. La introducción de las mutaciones deseadas se realizó mediante una adaptación del método propuesto por la casa comercial, la cual consistió en incrementar el tiempo (de 5 a 20 min.) y la temperatura (de temperatura ambiente (25 °C) a 37 °C) de desnaturalización del DNA en presencia de NaOH. En la Figura 13 se puede observar un esquema del proceso realizado.

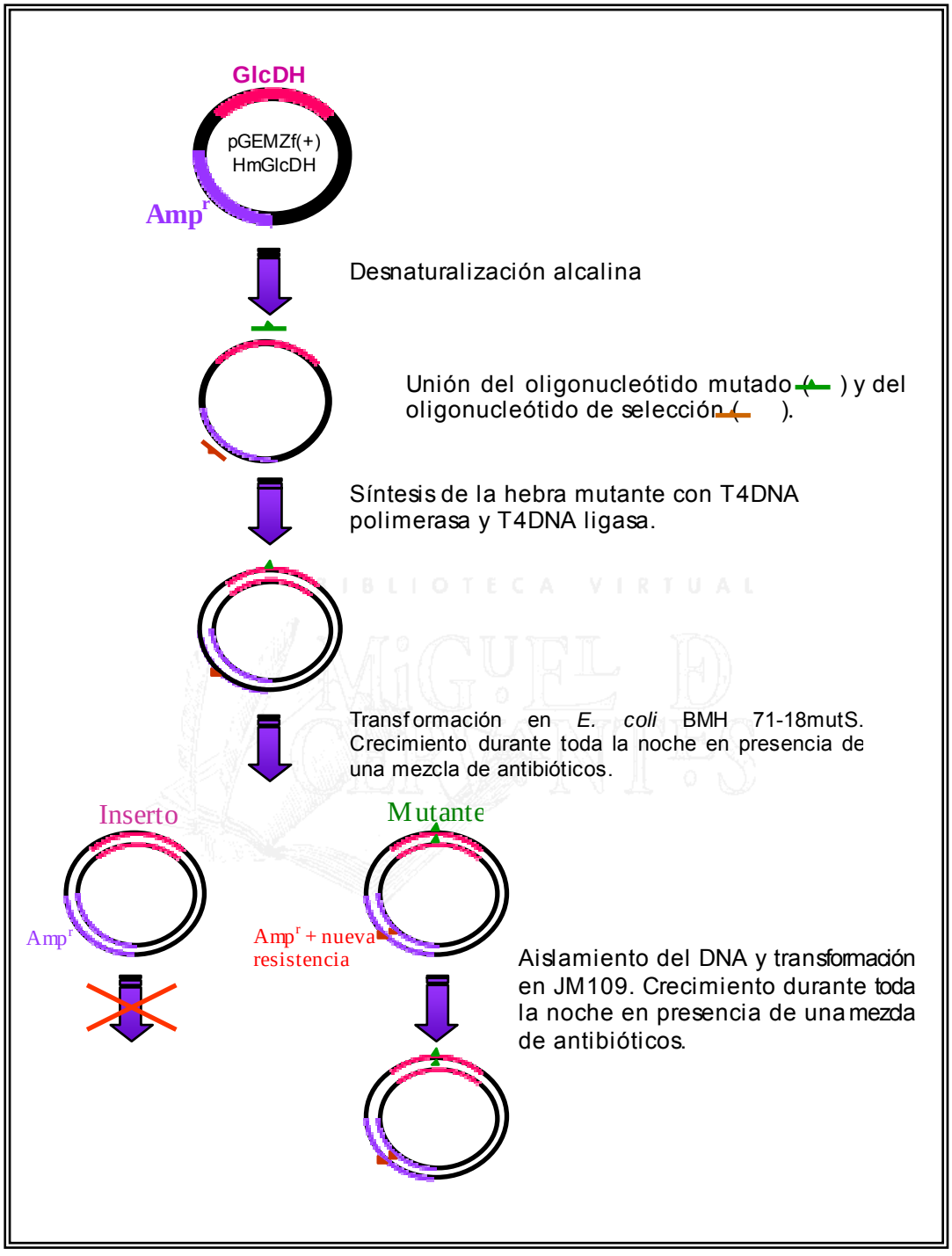

Figura 13: Descripción de la técnica de mutagénesis dirigida empleando el kit GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System.

En la segunda técnica empleada, las mutaciones se incorporaron mediante PCR empleando la DNA polimerasa *Pfu Turbo* (Stratagene), y posterior digestión con la endonucleasa *Dpn*I (Fermentas), la cual digiere específicamente DNA metilado o hemimetilado. Este método permite introducir mutaciones en DNA bicatenario, eliminándose el paso de desnaturalización del plásmido. En la Figura 14 se describe el método empleado.

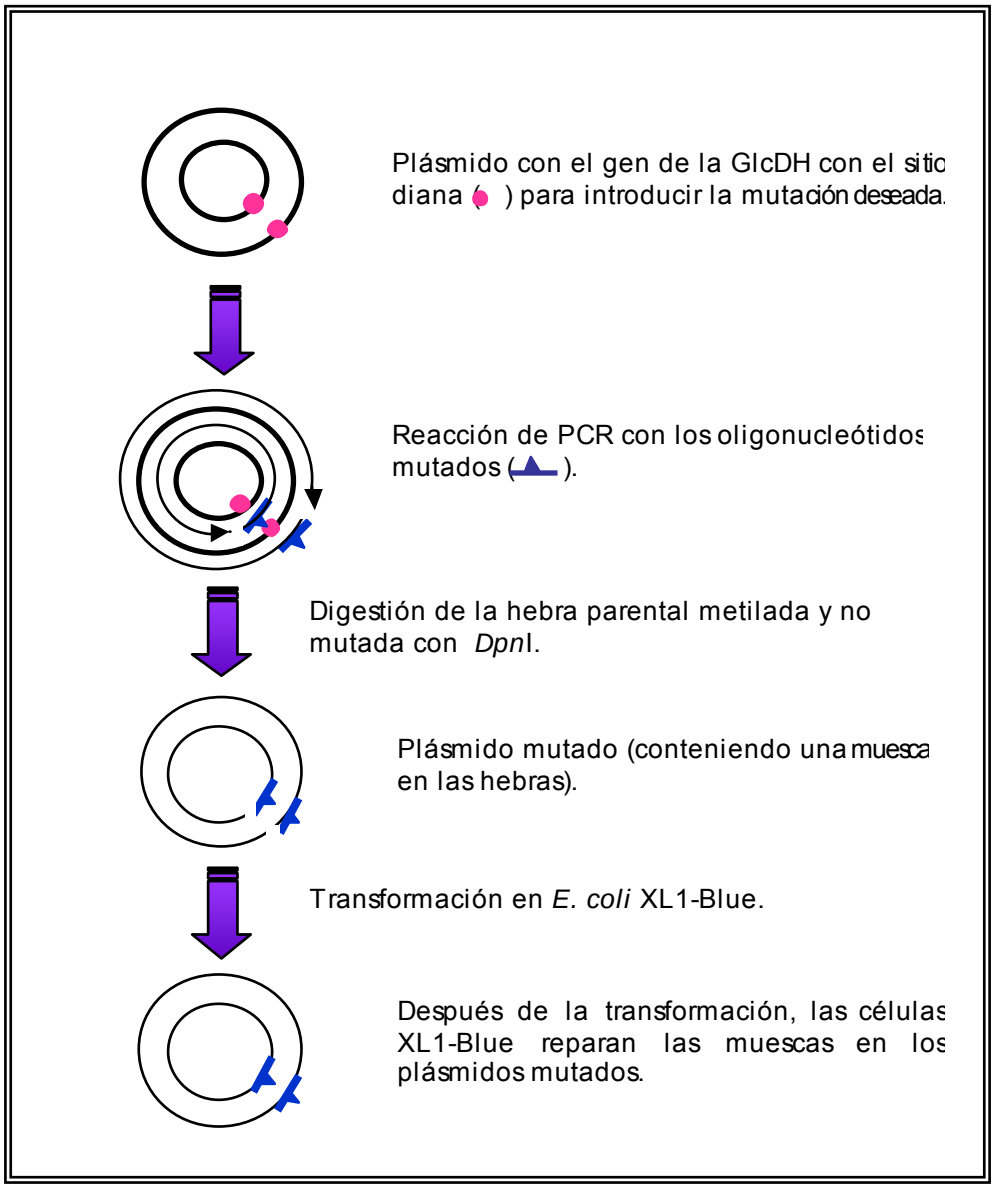

Figura 14: Descripción de la técnica de mutagénesis dirigida empleada para incorporar mutaciones en DNA bicatenario.

2.4.- EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

2.4.1.- Crecimiento e inducción de la expresión

Se creció una colonia de *E. coli* BL21(DE3) que contenía el plásmido pET3a-HmGlcDH o pET14b-HmGlcDH en medio líquido LB con ampicilina 50 μg/ml hasta una DO_{600} entre 0,5-1,0. Con este preinóculo se sembró 500 ml de LB con ampicilina (50 μg/ml), el cual se incubó a 37 °C con agitación hasta una DO_{600} entre 0,5 y 1,0. Una vez que se alcanzó la densidad óptica deseada, se llevó a cabo la inducción del cultivo durante 3 h a 37 °C mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,4 mM.

2.4.2.- Aislamiento de fracciones celulares

BIBLIOTECA VIRTUAL

Las distintas fracciones celulares que se analizaron, con el fin de comprobar si se ha sobreexpresado la glucosa deshidrogenasa y cual es su localización, fueron:

a) Fracción total celular

Para obtener la fracción total celular se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial Novagen, el cual consiste en:

- Transferir 1 ml de cultivo a un eppendorf y centrifugar a 10000xg durante 1 minuto.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado obtenido en 100 μl de PBS (Phosphate buffered saline).
- Añadir 100 μl de 2X Sample Buffer (80 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0,006 % azul de bromofenol, 15 %) y sonicar durante 15 segundos entre 8 y 10 veces con una amplitud de 16-18 microns.
- Incubar durante 5-10 min. a 80-85 °C y guardar a -20 °C hasta que se realice la SDS-PAGE.

b) Fracción del medio extracelular

Es poco probable que la proteína sobreexpresada se encuentre en el medio extracelular, pero en un primer ensayo es recomendable visualizar todas las fracciones. En este caso la fracción del medio extracelular se obtuvo del siguiente modo:

- Centrifugar el cultivo restante a 6500xg durante 15 min a 4 °C.
- Transferir el sobrenadante a un recipiente limpio y conservar el precipitado en hielo hasta el siguiente paso.
- Precipitar 1 ml de sobrenadante con 0,1 volumen de ácido tricloroacético 100 % (p/v). Resuspender las proteínas precipitadas en 100 µl de PBS y añadir 100 µl de 2X Sample Buffer. Incubar durante 5-10 min. a 80-85 °C y guardar a -20 °C hasta que se realice la SDS-PAGE

BIBLIOTECA VIRTUAL

c) Fracción periplasmática

La fracción periplasmática se obtuvo mediante un choque osmótico (Connaris y col., 1999) del siguiente modo:

- Resuspender el precipitado anterior en 20 mM Tris-HCl pH 8,0 con 20 % (p/v) sacarosa, hasta llegar a una DO_{600} entre 3 y 5.
- Incubar en hielo durante 10 min y centrifugar a 12000rpm durante 2 min a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 20 mM Tris-HCl pH 8,0.
- Incubar en hielo durante 10 min y centrifugar a 10000xg durante 10 min a 4 °C.
- Transferir el sobrenadante (fracción periplasmática) a un vaso de precipitados y conservar el precipitado obtenido en hielo hasta el siguiente paso.
- Precipitar 1 ml de sobrenadante con 0,1 volumen de ácido tricloroacético 100 % (p/v). Resuspender las proteínas precipitadas en 100 µl de PBS y añadir 100 µl de 2X Sample Buffer. Incubar durante 5-10 min. a 80-85 °C y guardar a -20 °C hasta que se realice la SDS-PAGE

d) Fracción citoplasmática

La obtención de las proteínas de la fracción citoplasmática soluble e insoluble se realizó mediante una adaptación del método descrito por Connaris y col. (1999). A continuación se describe el proceso desarrollado para obtener cada una de ellas:

- Fracción citoplasmática soluble:

- Resuspender el sedimento de células obtenido a partir del cultivo de 500 ml en 40 ml de 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 M NaCl y 1 mM EDTA (Tampón A).
- Añadir lisozima hasta una concentración final de 0,1 mg/ml y 0,1 volumen de Tritón X-100 al 1% (v/v). Incubar a 30 ºC durante 1 h.
- Incubar en hielo durante 15 min. y sonicar entre 8 y 10 veces durante 15 segundos con una amplitud de 16-18 microns.
- Centrifugar a 14000xg durante 10 min. a 4 ºC.
- Transferir el sobrenadante (fracción soluble citoplasmática) a un vaso de precipitados, y conservar el precipitado (fracción insoluble citoplasmática o cuerpos de inclusión) en hielo hasta el siguiente paso.
- Precipitar 1 ml de sobrenadante con 0,1 volumen de ácido tricloroacético 100 % (p/v). Resuspender las proteínas precipitadas en 100 µl de PBS y añadir 100 µl de 2X Sample Buffer. Incubar durante 5-10 min. a 80-85 ºC y guardar a -20 ºC hasta que se realice la SDS-PAGE.

- Fracción citoplasmática insoluble o cuerpos de inclusión

- Lavar dos veces el precipitado anterior con 4 ml de Tampón A centrifugando a 10000xg durante 5 min.
- Resuspender el precipitado en 40 ml de Tampón de Solubilización a 37 ºC.
- Preparar la muestra de SDS-PAGE a partir de 100 µl de los cuerpos de inclusión solubilizados en el paso anterior.

2.4.3.- Solubilización de los cuerpos de inclusión

La solubilización de los cuerpos de inclusión se llevó a cabo empleando varias combinaciones de tampones compuestos por (De Bernardez, 2001):

- agentes caotrópicos con un alto poder desnaturalizante o detergentes,
- agentes reductores que evitan la formación de puentes disulfuro,
- agentes quelantes de metales,
- inhibidores de proteasas.

2.4.4.- Renaturalización de la GlcDH recombinante

Para determinar las condiciones óptimas de renaturalización de la proteína recombinante se realizaron numerosos ensayos variando el tampón de solubilización de los cuerpos de inclusión, la composición y el pH del tampón de renaturalización, el factor de dilución, la temperatura y el modo de realizar la dilución.

El efecto de la concentración y el tipo de sal en el proceso de recuperación de la actividad enzimática se determinó empleando diversos tampones de renaturalización compuestos por concentraciones comprendidas entre 1 y 3 M de KCl o NaCl.

2.5.- METODOLOGÍA DE PROTEÍNAS

2.5.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de eletroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) discontinua, en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), descrito por Laemli en 1970.

La visualización directa de las proteínas se realizó mediante tinción con Azul Coomassie (Brillant Blu R, SIGMA) utilizando una adaptación del método propuesto por De Moreno y col. (De Moreno y col., 1995). Los geles se conservaron en papel de celofán “Gel Drying Film” (Promega), los cuales fueron previamente humedecidos en una disolución compuesta por 40 % metanol- 10 % ácido acético.

2.5.2.- Medida de actividad Glucosa Deshidrogenasa

La actividad de la GlcDH se midió espectrofotométricamente a 340 nm de acuerdo a la tasa de formación de NADPH (ε = 6,19 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}). Las medidas se realizaron a 40 °C en 20 mM Tris-HCl pH 8,8, con 2 M NaCl, 25 mM glucosa , 0,22 mM $NADP^+$, 25 mM $MgCl_2$, y un volumen de disolución de enzima que fue ajustado en cada ensayo, de modo que la velocidad de reducción del $NADP^+$ fuera lineal con respecto al tiempo ensayado (Bonete y col., 1996). Cada una de las medidas de actividad se realizó por triplicado.

La unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que es capaz de reducir 1 μmol de $NADP^+$ por minuto en las condiciones de ensayo descritas.

2.5.3.- Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante el método Bradford (Bradford, 1976), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón para realizar la correspondiente curva de calibrado.

2.5.4.- Purificación de la GlcDH recombinante

La purificación de la GlcDH recombinante se llevó a cabo mediante únicamente dos etapas, las cuales se describen a continuación:

- Precipitación en presencia de sulfato amónico:

El primer paso de la purificación consistió en una precipitación de las proteínas no halofílicas en presencia de sulfato amónico, quedando la glucosa deshidrogenasa (proteína halofílica) en solución.

Para ello, una vez renaturalizada la glucosa deshidrogenasa, se añadió sulfato amónico hasta alcanzar una concentración de 2,5 M. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 27000xg durante 30 minutos, obteniendo un precipitado que se corresponde con las proteínas no halofílicas y un sobrenadante en el que se encuentra la glucosa deshidrogenasa en solución.

- Cromatografía en DEAE-celulosa

Para realizar esta cromatografía en primer lugar se activó la matriz y se empaquetó la columna. Para ello se pesaron 7,5 g de DEAE-celulosa fast flow (Sigma), y se resuspendieron en 0,5 M HCl. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos, removiéndose aproximadamente cada 4–5 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 4000rpm durante 2 min y se eliminó el sobrenadante, lavándose con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro y eliminando las partículas más pequeñas con una pipeta Pasteur. A continuación se realizó el mismo proceso empleando 0.5 M NaOH. Una vez activada la matriz, se empaquetó una columna de 2,5 x 10cm (Sigma), equilibrándose con 50 mM tampón fosfato pH 6,6, 2,5 M $(NH_4)_2SO_4$ y 1 mM EDTA a temperatura ambiente.

El sobrenadante obtenido tras la precipitación en presencia de sulfato amónico se introdujo en la columna con la ayuda de una bomba peristáltica LKB Pump P-1 (Pharmacia Biotech) a una velocidad de flujo de 55 ml/h recogiendo fracciones de 10 ml. La proteína retenida, se lavó con dos volúmenes de columna con 50 mM tampón fosfato pH 6,6, 2,5 M $(NH_4)_2SO_4$ y 1 mM EDTA. La elución se llevó a cabo con 50 mM tampón fosfato pH 7,3 que contenía 2M NaCl y 1 mM EDTA , a una velocidad de flujo de 40 ml/h recogiéndose fracciones de 3ml.

Por último, se midió la absorbancia a 280 nm, la actividad glucosa deshidrogenasa y la concentración de proteína de cada una de las fracciones obtenidas, reuniéndose aquellas de mayor actividad específica.

2.5.5.- Diálisis y concentración

Las proteínas purificadas se dializaron frente a 50 mM tampón fosfato pH 7,3, 2M NaCl durante toda la noche a 4 ºC. Posteriormente, las muestras dializadas se concentraron hasta alcanzar entre 15 y 20 mg/ml mediante el uso de concentradores centrífugos Vivaspin (Viva Science) cuando éstas se utilizaron para llevar a cabo ensayos de cristalización.

2.5.6.- Determinación de la masa molecular

La determinación de la masa molecular de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante tamizado molecular en HiPrep^R 16-60 Sephacryl-S300 High Resolution utilizando un GradiFrac System (Pharmacia Biotech). La columna se equilibró con 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$ y 1 mM EDTA, y para su calibrado se utilizaron las siguientes proteínas: citocromo c, quimotripsinógeno A, albúmina, aldolasa y catalasa (Boehringer). La GlcDH recombinante se dializó frente al tampón de equilibrado y seguidamente se introdujeron aproximadamente 100μg de proteína en la columna.

2.5.7.- Análisis de especificidad de sustratos

La especificidad por sustratos alternativos se realizó en condiciones saturantes tanto de $NADP^+$ como de NAD^+, y empleando distintos azúcares a una concentración de 0,1 M (Pire y col., 2000).

2.5.8.- Determinación de parámetros cinéticos

Para la determinación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$, el estudio de las velocidades iniciales se efectuó con el sustrato de la enzima, glucosa, y con NADP. Los ensayos de velocidades iniciales se realizaron manteniendo un sustrato fijo a diferentes concentraciones y variando el otro en un intervalo de concentraciones no saturantes. En todos los ensayos se mantuvo una concentración fija de 25 mM Mg^{2+} y las medidas de actividad se llevaron a cabo incubando 3 minutos a 40 °C y disparando la reacción con NADP. Cada una de las medidas enzimáticas se realizó por triplicado. La determinación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo mediante el ajuste a las ecuaciones adecuadas empleando el programa SigmaPlot v 1.02.

2.5.9.- Estudios de la concentración de los iones hidrógeno (pH) en la enzima

Para observar el efecto del pH en los parámetros cinéticos de la GlcDH, se realizaron medidas de actividad a 40 °C empleando tampones con una escala de

pHs comprendida entre 7,5 y 10,5 a una concentración de 20 mM y 2 M NaCl. Se utilizó fosfato sódico para pH 7,5, Tris-HCl en el intervalo de pH 7,5 a 9,0 inclusive, y tampón glicina-NaOH de 9,0 a 10,5. La determinación de las actividades a cada pH se efectuó variando la concentración de uno de los sustratos y manteniendo fijo el otro a diferentes concentraciones.

En el tratamiento de datos se utilizó el programa HABELL de Cleland (1979) modificado a FORTRAN 77 en este Departamento por la Dra. María José Bonete para su uso en PC.

2.5.10.- Efecto de la concentración de EDTA

Una muestra de proteína se dializó frente a 50 mM tampón fosfato pH 7,4 conteniendo 2 M NaCl. A continuación, se realizaron diluciones con 50 mM tampón fosfato pH 7,4 y 50 mM tampón fosfato pH 7,4, 4 M NaCl para obtener la enzima en tres concentraciones de NaCl distintas (1, 2 y 3 M) y con la misma concentración de proteína (30 μg/ml). Cada una de las muestras se incubó durante 5 min. en presencia de concentraciones crecientes del agente quelante EDTA, mezclando 9 volúmenes de enzima con 1 volumen de EDTA. Transcurrido ese tiempo, se determinó la actividad enzimática a 40 ºC en ausencia de Mg^{2+}.

2.5.11.- Efecto de la temperatura sobre la estabilidad y actividad enzimática

Para realizar los ensayos de termoestabilidad se utilizaron muestras de proteína a tres concentraciones de NaCl distintas (entre 1 y 3 M), las cuales se incubaron a varias temperaturas: 55, 60, 65, 70 y 80 ºC. Las medidas de actividad enzimática se realizaron a diferentes intervalos de tiempo, tras incubar la enzima en hielo durante 1 min.

Con el fin de observar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, se realizaron medidas de actividad variando éste parámetro entre 24 ºC y 74 ºC. La temperatura del ensayo se monitorizó en cubeta con un termómetro digital tras 3 minutos de incubación.

2.5.12.- Efecto de la concentración de sal sobre la actividad enzimática

Para observar el efecto de la concentración de sal sobre la actividad enzimática del triple mutante, se realizaron medidas de actividad a 40 ºC empleando el tampón 20 mM Tris-HCl pH 8,8 conteniendo entre 0 y 4M de NaCl o KCl.

Para las medidas realizadas en presencia de KCl, se emplearon muestras de proteínas que habían sido dializadas previamente frente a 50 mM tampón fosfato pH 7,4, 2 M KCl y 1 mM EDTA.

2.5.13.- Efecto de la concentración de sal en la estabilidad enzimática

Los estudios de estabilidad enzimática se realizaron a temperatura ambiente (25 ºC) y a 40 ºC, empleando muestras de proteínas en presencia de tres concentraciones de KCl: 0,25, 0,5 y 2 M.

Las muestras de proteína en distintas concentraciones de sal se incubaron a las temperaturas anteriormente citadas, realizándose medidas de actividad a diversos intervalos de tiempo, las cuales se llevaron a cabo a 40 ºC tras incubar la enzima en hielo durante 1 min.

2.6.- CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

2.6.1.- Introducción a la determinación de estructuras de proteínas mediante difracción de rayos X

La cristalografía de rayos X es un área de investigación muy importante dentro del estudio de las proteínas, ya que nos proporciona información sobre las propiedades estructurales de éstas. Sin embargo, existen varios inconvenientes que hay que superar antes de poder determinar la estructura tridimensional de una macromolécula por difracción de rayos X.

Uno de los inconvenientes es que la proteína objeto de estudio tiene que ser cristalizada, y los cristales deben ser únicos y de buena calidad, entendiendo como cristal la repetición de la celda unidad de átomos o iones en tres dimensiones

(Figura 15). Asimismo, la celda unidad se define como la unidad de volumen más pequeña y simple que se repite en todo el cristal, caracterizada por los ángulos formados por sus tres caras y el tamaño de cada una de ellas (Gilbert, 1975).

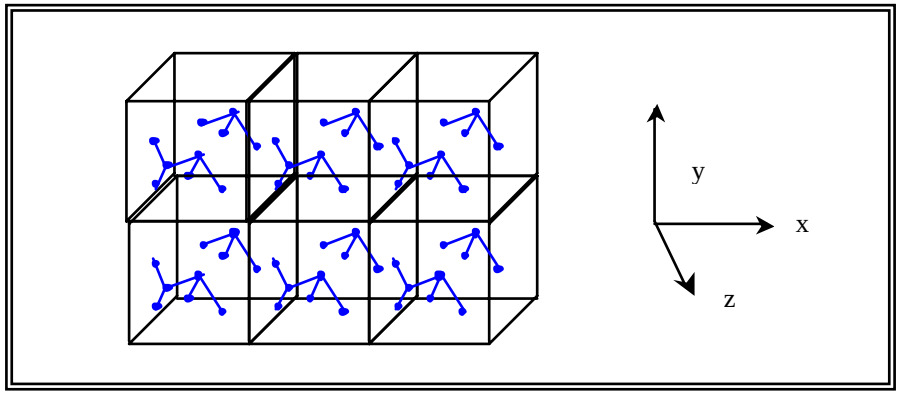

Figura 15: Seis celdas unidad en una estructura cristalina. Cada unidad contiene dos moléculas con distinta orientación.

La cristalización es básicamente un proceso de ensayo-error, en el cual las proteínas son lentamente precipitadas en su solución. La presencia de impurezas, el núcleo de cristalización y otros factores desconocidos, juegan un papel muy importante en este proceso. Los experimentos de cristalización se realizan a bajas temperaturas y en un sistema cerrado bajo condiciones controladas. El disolvente normalmente es una disolución acuosa tamponada con algún agente precipitante, pero a una concentración en la cual la precipitación no tiene lugar. Y como regla general, la proteína debe de estar lo más pura posible y concentrada, entre 5 y 20 mg/ml, en un tampón en el que sea soluble y estable (Rhodes, 2000).

Los métodos más empleados para la cristalización de proteínas son: “hanging drop”, “sitting drop” y diálisis (Figura 16). Los dos primeros se basan en la difusión de vapor entre la gota, formada por la mezcla de volúmenes iguales de disolvente y proteína, y el disolvente que se encuentra en el pocillo. De este modo, la concentración del agente precipitante y de la proteína aumentan de forma gradual, hasta que finalmente ésta precipita. En este punto, tiene lugar la formación de cristales. En el tercer método, la diálisis, la difusión ocurre a través de una membrana, donde las condiciones de las disoluciones que hay a cada lado de ella pueden ser fácilmente controladas y se pueden variar. La membrana permite la

difusión de la disolución a la vez que impide el paso de la proteína. Por tanto, la concentración del precipitante aumenta lentamente hasta que la proteína precipita formando cristales (Fisher, 1999).

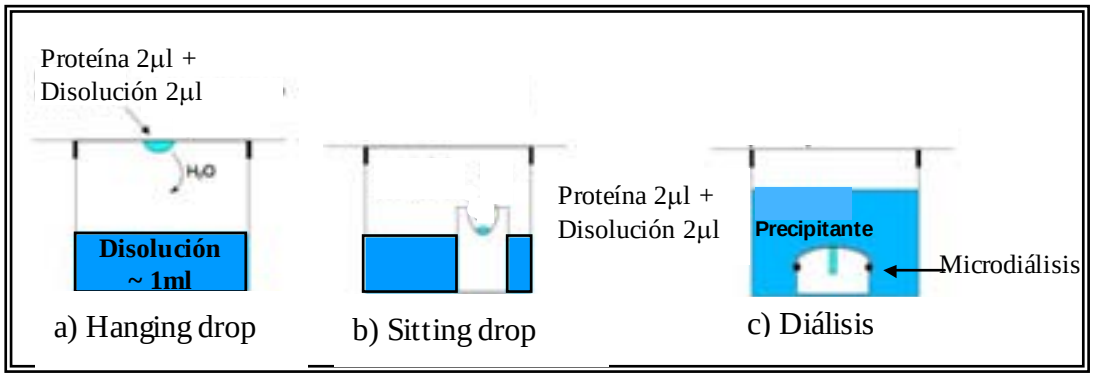

Figura 16: Esquema de los métodos más empleados en la cristalización de proteínas.

Una vez que se ha conseguido el cristal, se somete a difracción de rayos X, los cuales consisten en una radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra comprendida entre 10^{-7} y 10^{-11} m (100 Å – 0,1 Å). Se producen por el bombardeo de un metal (comúnmente cobre o molibdeno), con los electrones obtenidos a causa del calentamiento de un filamento y de la aceleración ejercida por un campo eléctrico. Estos electrones, con un alto nivel de energía, colisionan y desplazan a los electrones del orbital más interno del metal. Entonces, electrones de los orbitales más altos ocupan las posiciones disponibles en los orbitales más internos, produciéndose la liberación de energía en forma de fotones de rayos X, los cuales inciden sobre el cristal. La longitud de onda a la cual los rayos X son emitidos depende del material del metal, y su intensidad es proporcional a la velocidad a la cual el calor es dispersado por éste.

En la actualidad, existen tres tipos de fuentes de rayos X: los tubos de rayos X, los tubos con ánodo rotatorio, y los aceleradores de partículas. La fuente más potente de ellas es la última, la cual se emplea para la obtención de radiación sincrotrónica. No obstante, la fuente de tubos con ánodo rotatorio es la más empleada, ya que es 10 veces más potente que los tubos de rayos X y no requiere instalaciones tan especiales como los aceleradores de partículas (Rhodes, 2000).

Cuando un cristal se somete a difracción de rayos X, el resultado obtenido es un patrón de difracción, el cual consiste en millones de señales que constituyen el dato bruto. Cada una de las señales está determinada por tres parámetros que son necesarios para obtener el mapa de densidad electrónica. Dichos parámetros son la posición, la intensidad y la fase de las ondas que forman cada señal. Los dos primeros son relativamente fáciles de determinar, sin embargo la resolución de la fase constituye otro de los grandes inconvenientes de la cristalografía de rayos X. Con el fin de solventar este problema, frecuentemente se emplea la técnica de reemplazamiento isomorfo. Este método se basa en la incorporación de metales pesados en la proteína cristalizada sin modificar su estructura. Pero este objetivo no siempre se consigue, ya que en algunas ocasiones sí que existen modificaciones. En estos casos se recurre a otra técnica, en la cual los metales pesados se incorporan directamente en las proteínas recombinantes. Para ello se sustituye el aminoácido metionina por selenometionina, sin variar prácticamente la estructura de la proteína (Branden y col., 1999).

Además, a partir de los datos obtenidos tras la difracción de rayos X de los cristales de proteína, se pueden determinar varios parámetros estadísticos que indican si ésta ha sido adecuada o no. Dichos parámetros son (Blow , 2002):

- Difracciones únicas: difracciones necesarias para generar un grupo completo de difracciones mediante simetría.
- "Completeness": relación entre el número de difracciones únicas registradas y el número total de difracciones únicas teóricas
- Multiplicidad: relación entre el número total de difracciones registradas y el número total de difracciones registradas únicas
- B-factor: representa la disminución de la intensidad en la difracción debido al desorden del cristal. Incluye tanto el desorden estático del cristal como el desorden causado por vibraciones térmicas. La unidad de este factor es el Å, y cuando su valor es superior a 40 Å indica o bien la presencia de lazos móviles o bien que el modelo construido es erróneo.
- R_{merge}: diferencia entre los datos obtenidos experimentalmente y los calculados de forma hipotética. Cuando su valor está próximo a 0 indica que el modelo es correcto, y si es mayor de 0,59 indica que es erróneo.

- $I/\sigma I$: relación entre la intensidad de la difracción y el ruido de fondo. Su valor debe ser superior a 2.

El resultado de una buena cristalización y la determinación de la fase es una imagen tridimensional formada por nubes de electrones de la proteína que se conoce con el nombre de mapa de densidad electrónica. A partir de este mapa y con la secuencia de aminoácidos, se construye un modelo inicial de la estructura de la proteína, el cual da lugar a un modelo final tras ser sometido a una serie de refinamientos. Este último modelo de la estructura de la proteína consiste en las coordenadas cartesianas de cada uno de los átomos de la molécula excepto de los átomos de hidrógeno.

Una propiedad importante del modelo final es su resolución, es decir, la mínima distancia que puede ser definida. La unidad de éste parámetro es el Amstrong (Å), y cuanto menor sea su valor mayor será la resolución, es decir, el mapa de densidad electrónica será de mayor calidad.

2.6.2.- Ensayos preliminares de cristalización de GlcDH de *Hfx. mediterranei*

Los ensayos preliminares de cristalización de la GlcDH halófila se llevaron a cabo tanto con la enzima libre como con los complejos binarios GlcDH – NADP y GlcDH – NADPH, empleando todas las disoluciones que se encuentran en los kits Hampton Crystallization Screen I, Screen II y PEG Screen (Hampton Research). Todos los ensayos se realizaron a 290 K mediante la técnica de “hanging drop” o gota colgante (Figura 17). También se realizaron ensayos de cristalización con los complejos ternarios no productivos GlcDH – NADP – gluconolactona y GlcDH – NADPH – glucosa.

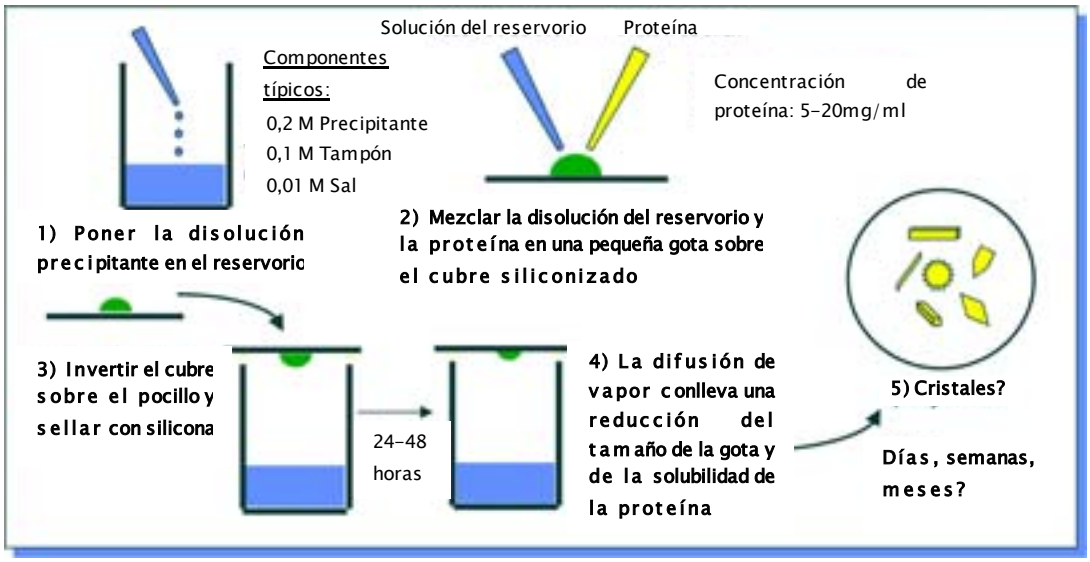

Figura 17: Descripción de la técnica de cristalización "hanging drop".

En algunos ensayos se añadió 1 mM $ZnCl_2$, no observándose diferencias en el comportamiento de la enzima en presencia y ausencia del metal, ya que la proteína une fuertemente el zinc e, incluso cuando no se adiciona el metal, es capaz de captar suficiente zinc para ocupar su centro activo. En este último caso, la proteína podría captar el zinc de las impurezas presentes en las disoluciones a la que está expuesta.

2.6.3.- Optimización de la cristalización de la GlcDH de *Hfx. mediterranei*

En base a los ensayos preliminares de cristalización, la GlcDH de *Hfx. mediterranei* se cristalizó mediante la técnica de "hanging drop" a 290 K empleando una disolución compuesta por 100 mM tampón HEPES pH 7,0 y citrato sódico en una concentración comprendida entre 1,4 y 1,6 M. Este ensayo se realizó con la GlcDH libre y con el complejo binario GlcDH-NADP.

2.6.4.- Cristalización del mutante GlcDH D38C

La proteína GlcDH D38C, purificada en presencia de NaCl, se cristalizó con citrato sódico como agente precipitante a 290 K mediante la técnica de "hanging drop" y utilizando las siguientes combinaciones de sustratos:

- Proteína + 1mM $ZnCl_2$
- Proteína + 1 mM $NADP^+$ + 1mM $ZnCl_2$
- Proteína + 1 mM $NADP^+$ + 10 mM gluconolactona + 1mM $ZnCl_2$

En presencia de NADPH, el mutante GlcDH D38C se cristalizó empleando una disolución compuesta por 100 mM tampón HEPES pH 7,0 y 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) entre un 62 y 72% como agente precipitante. Estos ensayos se llevaron a cabo mediante la técnica de "hanging drop" a 290 K con las siguientes combinaciones de proteína y sustratos:

- Proteína + 1 mM NADPH + 10mM Glucosa + 1mM $ZnCl_2$
- Proteína + 1 mM NADPH + 1mM $ZnCl_2$
- Proteína + 1 mM NADPH

Además, se crecieron cristales de GlcDH D38C, dializada frente a 50 mM tampón fosfato potásico pH 7,4 con 2 M KCl, en presencia de 1 mM $ZnCl_2$ y 1 mM NADP utilizando entre 1,4 y 1,6 M de citrato potásico como agente precipitante.

2.6.5.- Cristalización del triple mutante GlcDH D172K D216K D344K

Para analizar el efecto de las mutaciones sobre la estructura de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* se realizaron ensayos de cristalización con la proteína mutada. En dichos ensayos se utilizaron diferentes sales con el fin de estudiar la unión de contraiones. Previamente a la cristalización, la enzima GlcDH D172K D216K D344K purificada se dializó a 4 °C durante toda la noche frente a los siguiente tampones:

- 50 mM Tampón fosfato potásico pH 7,4, 1 M KF
- 50 mM Tampón fosfato potásico pH 7,4, 1 M KCl
- 50 mM Tampón fosfato potásico pH 7,4, 1 M KBr

Inmediatamente después, las muestras se concentraron hasta alcanzar aproximadamente 17 mg/ml. Este proceso se repitió con la GlcDH silvestre dializando frente a los mismos tampones pero conteniendo 2M de KF, KBr o KCl en lugar de 1 M.

La GlcDH silvestre y el triple mutante se cristalizaron empleando la técnica de "hanging drop" a 290 K, utilizando una disolución compuesta por 100 mM tampón HEPES pH 7,0 con citrato potásico en concentraciones comprendidas entre

1,4 y 1,8 M como agente precipitante. Estos ensayos se llevaron a cabo con el complejo binario proteína y NADP (1 mM) en presencia de $ZnCl_2$ (1 mM).

2.6.6.- Manipulación de cristales

Algunos de los cristales obtenidos se difractaron a temperatura ambiente, para ello se montaron en finos capilares de cuarzo (Figura 18) que minimizan la absorción y el ruido de fondo de los rayos X. Sin embargo, el bombardeo de los rayos X sobre el cristal a temperatura ambiente produce daños sobre el mismo, limitando frecuentemente los estudios estructurales a media resolución. Con el fin de solventar este problema se introdujo la técnica de criocristalografía, en la que el cristal se difracta a temperaturas de unos 100 K. En estas condiciones el cristal resiste períodos prolongados de irradiación, incluso cuando se usa el intenso rayo de sincrotón. Además la resolución se ve mejorada por la disminución del movimiento térmico. Pero la criodifracción requiere poner el cristal a la temperatura del experimento o más baja. Ello obliga a eliminar el solvente que recubre el cristal, pues si no se hace así se forman cristales de hielo en la superficie del mismo que hacen imposible la obtención de buenos patrones de difracción. Para eliminar el solvente se recurre al paso rápido de los cristales por soluciones crioprotectoras como el glicerol seguido inmediatamente de congelación en el chorro de nitrógeno gaseoso del difractómetro. Para llevar a cabo la difracción del cristal, éste se recoge mediante un dispositivo en lazo de hilo muy fino de nylon (Figura 19) montado sobre un terminal metálico, el cual está unido a un tapón especial con una pieza de material férrico que permite insertarlo o bien en el goniómetro del difractómetro o bien en unos viales especiales que se emplean para el transporte de los critales sumergidos en nitrógeno líquido (Figura 19).

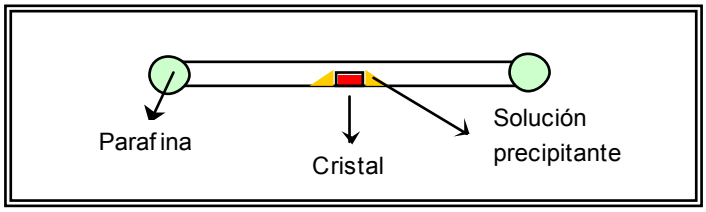

Figura 18: Montaje de cristales de proteína en capilares de cuarzo.

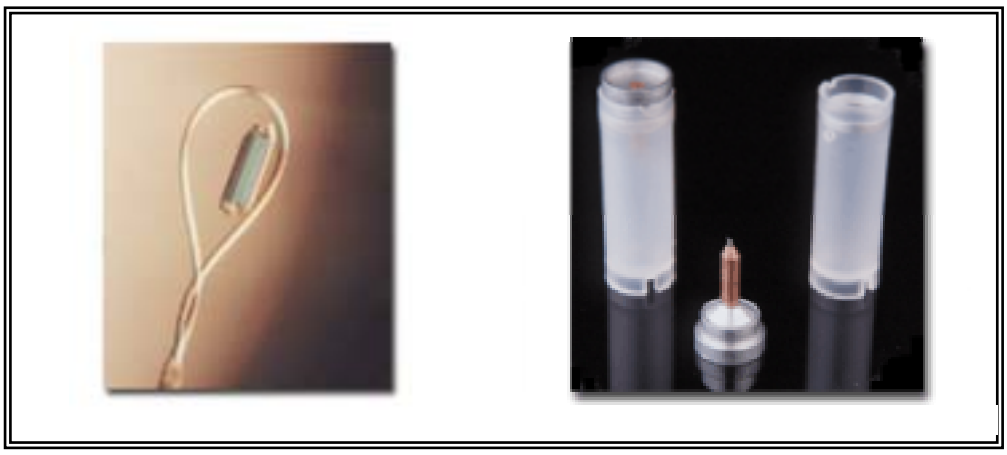

Figura 19: Imágenes de lazos de nylon empleados en la recolección de cristales.

2.6.7.- Resolución y estudios estructurales

La difracción de rayos X y el procesamiento de datos se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Profesor David Rice.

Los programas informáticos empleados en la resolución y análisis de estructuras de la GlcDH se muestran a continuación:

Tabla 5: *Programas empleados para resolver estructuras.*

Programa	Utilidad	Referencia
DENZO/ SCALEPACK	Procesamiento de los datos obtenidos a partir de la difracción de los cristales	Otwinowski y col., 1997
REFMAC5	Construcción del modelo de la proteína y refinamiento de su estructura	Murshudov y col., 1997
arpWarp	Construcción del mapa de densidad electrónica	Lamzin y col., 1997
LSQKAB	Superposición de estructuras	CCP4, 1994
ARP	Determinación de la presencia de moléculas de agua en la estructura	Lamzin y col.,1997
QUANTA	Interpretación de modelos de proteínas	Molecular Simulations Inc., San Diego, CA
TURBO-FRODO	Interpretación de modelos de proteínas	Roussel y col., 1991

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA GlcDH DE *Hfx. meditrranei*

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

3.1.-INTRODUCCIÓN

La expresión de proteínas se ha convertido en una herramienta fundamental para poder llevar a cabo estudios relacionados con la función y la estructura de las mismas. Este proceso se puede realizar de dos formas distintas, mediante expresión homóloga o heteróloga. En el primero de los casos el huésped utilizado para expresar la proteína deseada es el organismo parental, mientras que en la expresión heteróloga el huésped es otro organismo distinto.

En los sistemas de expresión homóloga se lleva a cabo la modificación postraduccional de las proteínas expresadas y su correcto plegamiento, procesos que nos permiten obtener la proteína deseada en su estado nativo. Sin embargo, este sistema no es el más empleado en la actualidad, puesto que existen diversas limitaciones entre las que cabe destacar la baja versatibilidad de vectores de expresión y el tiempo que se requiere para optimizar el proceso.

La expresión heteróloga es el método que más se ha aplicado en la producción de proteínas durante los últimos años. La mayoría de estos sistemas emplean como huésped la bacteria gram negativa *Escherichia coli* por diversas razones, entre las que destacan su rápido crecimiento, su amplia caracterización genética, la disponibilidad de un gran numero de cepas y de vectores de expresión, y la capacidad de producir proteínas a gran escala. Sin embargo, este tipo de expresión no permite la modificación postraduccional de las proteínas ni, en ocasiones, el plegamiento correcto de la misma dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión (Baneyx, 1999).

Empleando *E. coli* como huésped de expresión se han expresado proteínas en el medio extracelular, en el espacio periplasmático, y en el citoplasma, siendo éste último caso el más usual.

Las proteínas expresadas que son exportadas al espacio periplasmático se obtienen en forma soluble, aunque en algunas ocasiones pueden formar agregados y dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión. Al encontrarse en el periplasma, las proteínas están protegidas frente a la degradación por proteasas

citoplasmáticas, la formación de enlaces disulfuro se encuentra favorecida puesto que el ambiente es oxidante, y debido al bajo numero de proteínas que hay en el periplasma su purificación es más sencilla. Pero la traslocación de las proteínas recombinantes a través de la membrana citoplasmática es muchas veces delicada, y no es garantía suficiente para un adecuado plegamiento. Además algunas proteínas pueden cruzar la membrana externa y ser secretadas al medio extracelular, sobre todo cuando los tiempos de inducción son demasiado largos (Bass y col., 1997).

Las proteínas que se expresan en el citoplasma, caso más frecuente, se pueden encontrar en forma soluble, o formando agregados insolubles que se denominan cuerpos de inclusión. Cuando se consigue en forma soluble, la proteína puede ser activa o inactiva, requiriendo en este último caso un paso posterior de reactivación para obtener la proteína en su estado nativo. Y cuando se obtiene en forma de cuerpos de inclusión, y por lo tanto inactiva, es necesario llevar a cabo un primer paso de solubilización de la proteína, seguido de un paso de renaturalización *in vitro* para conseguir finalmente la proteína en su forma activa (Georgiou y col., 1999)

Los cuerpos de inclusión son agregados heterogéneos de elevada densidad, formados por diversas proteínas que poseen cierta estructura secundaria (Carrió y col., 2000). Además, como consecuencia de sus propiedades refráctiles se pueden observar fácilmente mediante microscopia electrónica. La formación de los cuerpos de inclusión es independiente del huésped empleado para expresar una proteína, ya que se han obtenido incluso cuando se expresa una proteína endógena (expresión homóloga). Tampoco hay una relación directa entre la formación de los cuerpos de inclusión y las características intrínsecas de la proteína, como por ejemplo del peso molecular y la hidrofobicidad. Sólo en el caso de que la proteína forme puentes disulfuro en su estructura, se ha visto cierta relación entre ambos parámetros (Lilie y col., 1998). El desequilibrio entre la cantidad de proteínas nacientes y su plegamiento debido a una alta expresión, parece ser la causa de la agregación de la proteína, y por tanto de la formación de los cuerpos de inclusión.

El obtener la proteína expresada en forma de cuerpos de inclusión posee diversas ventajas, entre las que cabe destacar:

- la obtención de la proteína expresada prácticamente pura, ya que puede llegar a constituir el 95% de los cuerpos de inclusión,
- el evitar la traslocación a través de membranas, lo cual puede provocar modificaciones en las proteínas,
- y la protección frente al ataque de proteasas periplasmáticas.

Sin embargo, también conlleva varios inconvenientes, como son:

- la ausencia de protección contra las proteasas citoplasmáticas, puesto que recientemente se ha observado que con el paso del tiempo los cuerpos de inclusión pueden ser atacados por estas proteínas (Carrió y col., 2000),
- y la formación de estructuras intermedias inactivas e irreversibles durante el proceso de renaturalización, resultando imposible obtener la proteína en su estado nativo, por ello este proceso debe ser cuidadosamente optimizado (De Bernardez, 2001).

La expresión de proteínas halofílicas en huéspedes mesofílicos, como por ejemplo *E. coli*, presenta el inconveniente de que la mayoría de las veces se obtienen en forma de cuerpos de inclusión, requiriendo un paso posterior de renaturalización de la proteína. Esto se debe a que dichas proteínas requieren la presencia de elevadas concentraciones de sal para ser activas, solubles y estables. Pero este problema, se ha solventado fácilmente mediante el empleo, durante el proceso de renaturalización *in vitro*, de disoluciones con elevadas concentraciones de sal. Otra de las soluciones posibles consistiría en llevar a cabo la expresión homóloga de dichas proteínas. No obstante este proceso también cuenta con diversas dificultades, puesto que habría que invertir largos períodos de tiempo en optimizar las técnicas de biología molecular necesarias. Posiblemente, esta sea la razón por la que solamente se ha expresado una proteína halófila de forma homóloga, la dihidrolipoamida deshidrogenasa de *Hfx. volcanii* (Jolley y col., 1996) que fue obtenida en su estado nativo en la fracción citoplasmática soluble. El número de proteínas halófilas expresadas heterólogamente en *E. coli* es mayor, hasta el momento se han sobreexpresado satisfactoriamente la dihidrofolato reductasa (Blecher y col., 1993), la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa

(Bischoff y col., 1996), la citrato sintasa, la dihidrolipoamida deshidrogenasa (Connaris y col., 1999), y la isocitrato deshidrogenasa (Camacho y col, 2002), todas ellas de *Hfx. volcanii*, y la malato deshidrogenasa de *Haloarcula marismortui* (Cedrin y col., 1993). La mayoría de estas proteínas se obtuvieron en forma de cuerpos de inclusión. Solamente la citrato sintasa y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa se obtuvieron en forma soluble, aunque en ambos se casos se requirió un posterior paso de reactivación para conseguir las proteínas en su estado nativo.

La glucosa deshidrogenasa de *Hfx. mediterranei* se ha expresado heterólogamente en *E. coli*. A continuación, se describe el método empleado para ello, así como la purificación y caracterización de la proteína.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

3.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1.- Clonaje de GlcDH de *Hfx. mediterranei* en los vectores de expresión

El gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* se amplificó mediante PCR (Figura 20) a partir de una construcción de fago lambda, empleando los oligonucleótidos específicos GlcForw y GlcRev que contienen los sitios de corte para *Nde*I y *Bam*HI.

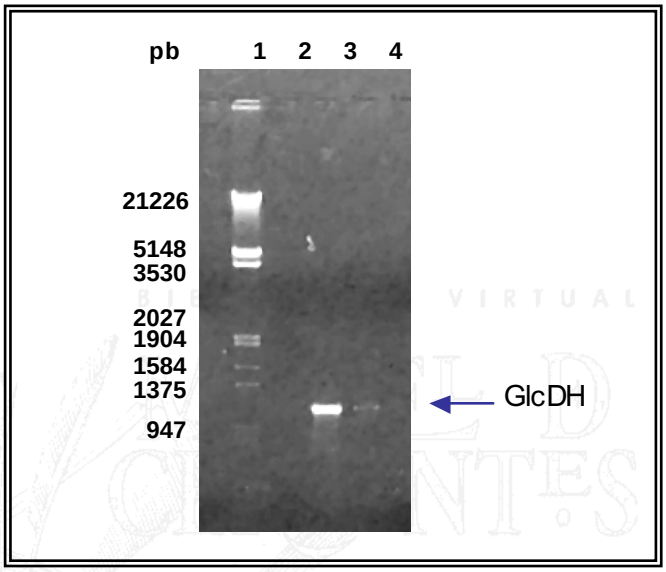

Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación por PCR.

Calle 1: Marcadores de tamaño. Marker III (Fermentas)
Calle 2: Control sin DNA
Calle 3: Producto de PCR correspondiente al gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* (5 μl)
Calle 4: Producto de PCR correspondiente al gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* (1 μl)

El fragmento de DNA obtenido se clonó en el vector pCR2.1, dando lugar a la construcción del plásmido pCR2.1-HmGlcDH.

Con el fin de insertar el gen de la GlcDH en los plásmidos pET3a y pET14b se digirieron, con las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI, tanto los vectores de expresión como el plásmido pCR2.1-HmGlcDH (Figura 21).

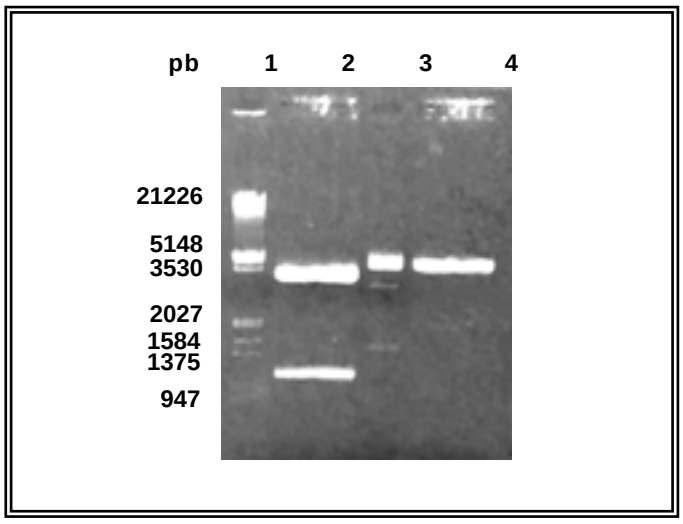

Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión con las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI

Calle 1: Marcadores de tamaño. Marker III (Fermentas)
Calle 2: Digestión del plásmido pCR2.1-HmGlcDH
Calle 3: pET 14b lineal
Calle 4: pET 3a lineal

Tras las reacciones de ligación y las transformaciones en *E. coli* NovaBlue, se obtuvieron clones positivos tanto con la construcción del plásmido pET3a-HmGlcDH como con la construcción pET14b-HmGlcDH.

3.2.2.- Expresión y localización de la GlcDH recombinante

Los plásmidos pET3a-HmGlcDH y pET14b-HmGlcDH, anteriormente construidos, se emplearon para transformar el huésped de expresión *E. coli* BL21(DE3). Después de la inducción del cultivo por adición de IPTG, se aislaron todas las fracciones celulares observándose que la proteína sobreexpresada se obtiene en forma de cuerpos de inclusión (Figura 22), independientemente del vector de expresión utilizado.

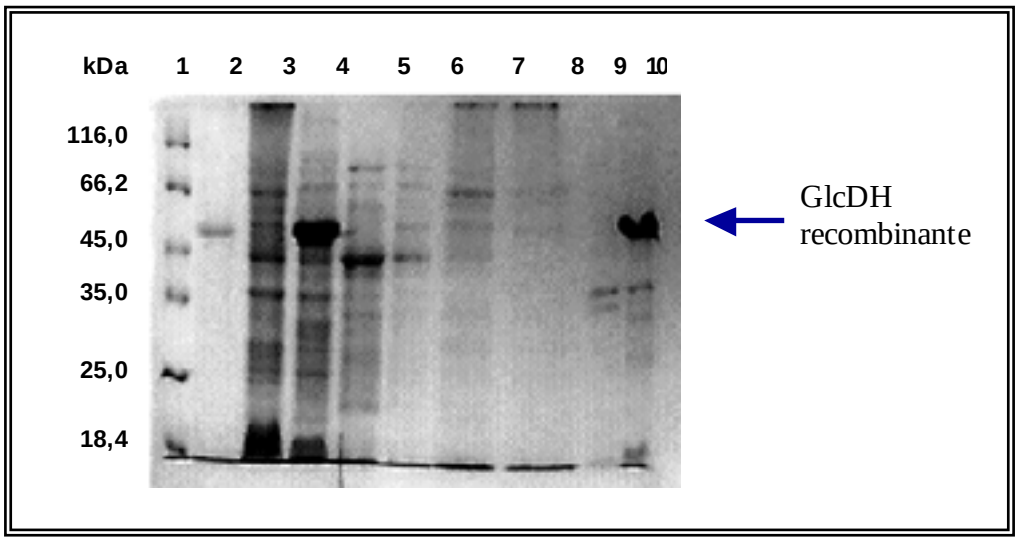

Figura 22: Localización de la GlcDH recombinante mediante SDS-PAGE.

Calle 1: Marcadores de peso molecular
Calle 2: GlcDH de *Hfx. mediterranei*
Calles 3 y 4: Proteínas celulares totales
Calles 5 y 6: Fracción periplásmica
Calles 7 y 8: Fracción citoplásmica soluble
Calles 9 y 10: Fracción citoplásmica insoluble o cuerpos de inclusión.
Calles 3, 5, 7 y 9 Fracciones celulares de *E. coli* BL21 (DE3) que contienen el plásmido pET3a
Calles 4, 6, 8 y 10 Fracciones celulares de *E. coli* BL21(DE3) que contienen el plásmido pET3a-HmGDH

En base al gel de electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE), la masa molecular de la GlcDH sobreexpresada sería aproximadamente 50 kDa por subunidad, cuando en realidad es 39,3 kDa por subunidad (Pire y col., 2001). Esta sobreestimación de la masa molecular mediante SDS-PAGE es típica de los cálculos realizados con proteínas halofílicas, debido a que el SDS es un detergente con cargas negativas que producen repulsiones electrostáticas con los abundantes residuos acídicos de estas proteínas. Esto hace que el SDS se una en menor cantidad y se produzca por tanto una disminución en la velocidad de migración de las proteínas, realizándose de esta forma una sobreestimación de la masa molecular. Normalmente, se sobreestima el valor en aproximadamente un 25 % (Mondstadt y col., 1990; Prüβ y col., 1993; Bonete y col., 1996).

Para mejorar la solubilidad de la proteína expresada se realizaron diversos ensayos que consistieron en reducir la temperatura de crecimiento e inducción de 37º C a 25 ºC, aumentar la concentración de NaCl en el medio de cultivo hasta un 5%, e incrementar el tiempo de inducción de 3 a 16 horas. Con estas modificaciones se pretendía favorecer el plegamiento correcto de la proteína al disminuir la velocidad de expresión de la misma y el crecimiento celular. Sin embargo, no se consiguieron los resultados esperados, obteniéndose en todos lo casos la proteína sobreexpresada en forma de cuerpos de inclusión, independientemente del vector de expresión empleado.

3.2.3.- Solubilización de los cuerpos de inclusión y renaturalización de la GlcDH recombinante

3.2.3.1.- Solubilización de los cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión, como se ha comentado anteriormente, tienen que ser solubilizados. Para ello se emplean agentes caotrópicos y detergentes.

En el caso de la glucosa deshidrogenasa, se consiguió solubilizar totalmente los cuerpos de inclusión a 37 ºC empleando las siguientes disoluciones:

- 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Urea, 50mM DTT y 2 mM EDTA
- 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 6 M Cloruro de guanidinio, 50 mM DTT y 2 mM EDTA
- 1% SDS

No obstante, todos los agentes solubilizantes empleados no tienen el mismo efecto sobre la proteína expresada. En consecuencia, una vez determinadas las condiciones de renaturalización de la misma, se comprobó con cual de ellos se obtienen los mejores resultados.

3.2.3.2.- Renaturalización de la GlcDH recombinante

La renaturalización de los cuerpos de inclusión solubilizados se inicia al eliminar del medio el agente solubilizante, esto se llevó a cabo mediante diálisis y dilución.

La diálisis conlleva la ventaja de que el agente solubilizante se elimina gradualmente, permitiendo una renaturalización lenta de las proteínas. Sin

embargo, a concentraciones intermedias de agente solubilizante algunas proteínas tienden a formar estructuras intermedias, irreversibles e inactivas, produciendo agregados estabilizados mediante interacciones hidrofóbicas. En estos casos es mejor realizar una dilución rápida, donde la concentración de agente solubilizante se reduce rápidamente evitando la aparición de agregados.

La formación de agregados durante el proceso de renaturalización depende de la concentración de proteína desnaturalizada y no, de la proteína nativa. En general, la concentración de proteína óptima para evitar la formación de agregados se encuentra entre 10 y 50 μg/ml. Las condiciones de renaturalización dependen de cada proteína, y deben de ser optimizadas en cada caso teniendo en cuenta ciertos parámetros externos como por ejemplo la temperatura, fuerza iónica, pH y tiempo de renaturalización (De Bernardez y col., 1999; De Bernardez, 2001).

En el caso de la glucosa deshidrogenasa recombinante, la renaturalización se realizó tanto por diálisis como por dilución, siguiéndose el proceso mediante medidas de actividad enzimática.

- Renaturalización mediante dilución:

Los primeros ensayos de renaturalización de la proteína sobreexpresada se realizaron con cuerpos de inclusión solubilizados en presencia de urea, y mediante dilución rápida (1:20) con distintas composiciones de tampones en los que la GlcDH de *Hfx. mediterranei* es activa y estable (Figura 23). En la gráfica se observa que la enzima no se consiguió renaturalizar en presencia de tampón fosfato con $(NH_4)_2SO_4$ (tampón empleado en el primer paso de la purificación de la GlcDH de *Hfx. mediterranei*). Cuando se sustituyó la sal por un soluto compatible como el glicerol tampoco se renaturalizó la enzima, a pesar de que una vez renaturalizada la GlcDH recombinante es estable en este tampón. Este hecho pone de manifiesto que las condiciones de renaturalización de la proteína son independientes de las condiciones de estabilidad de la misma. En presencia del tampón de actividad de la GlcDH tampoco se consiguió renaturalizar la proteína, debido a que su pH no es el adecuado. Sin embargo, cuando se utilizó un tampón con pH 7,4 y compuesto por Tris-HCl, glicerol, NaCl y $MgCl_2$ sí que se observó cierta renaturalización de la GlcDH. Aunque, la actividad recuperada fue muy baja comparada con la obtenida al

emplear el tampón Tris-HCl pH 7,4, 3 M KCl y 1mM EDTA. Estos ensayos nos permitieron determinar que el pH adecuado para la renaturalización de la GlcDH recombinante se encuentra alrededor de 7,4 y que se requiere una elevada concentración de sal para obtener resultados satisfactorios.

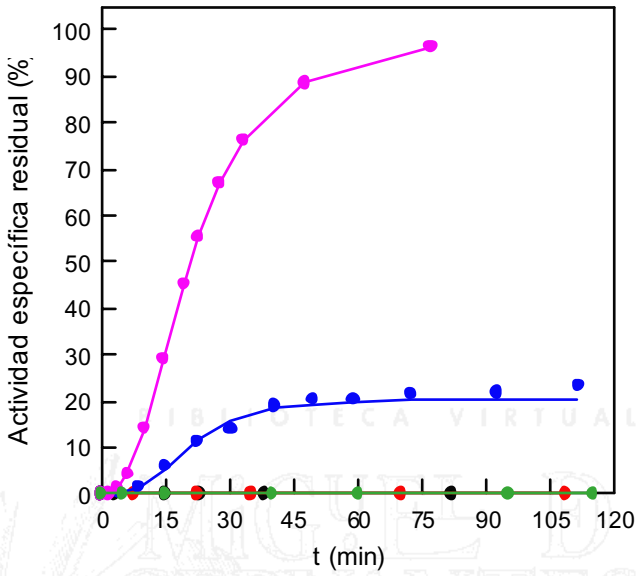

Figura 23: Renaturalización de la GlcDH recombinante obtenida a partir del vector de expresión pET3a, mediante dilución rápida (1:20) en tampones con diversas composiciones: (●) 50 mM Fosfato sódico pH 6,6, 2,5 M $(NH_4)_2SO_4$; (●) 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 20% Glicerol; (●) 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 2M NaCl; (●) 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 10mM $MgCl_2$, 20% Glicerol, 2M NaCl; (●) 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 3 M KCl, 1 mM EDTA.

Como se explicó anteriormente, el agente empleado en la solubilización de los cuerpos de inclusión puede influir en el proceso de recuperación de actividad de la proteína expresada. Por ello los cuerpos de inclusión fueron solubilizados en presencia de urea, cloruro de guanidinio y SDS, renaturalizándose posteriormente la enzima en el tampón con el que mejores resultados se habían obtenido hasta ahora. Este ensayo se realizó tanto con la enzima obtenida a partir del vector de expresión pET3a (Figura 24) como con la obtenida a partir del pET14b, y en ambos casos los resultados fueron iguales. Al solubilizar los cuerpos de inclusión con SDS la proteína recupera tan solo un 4% de actividad, en presencia de cloruro de guanidinio el porcentaje de actividad recuperada asciende hasta un 30%, pero es al

utilizar la urea como agente solubilizante cuando se obtienen los valores más altos de actividad, tomándose éstos como el 100%. De ahí que a partir ese momento se solubilizaran siempre los cuerpos de inclusión en presencia de urea 8 M.

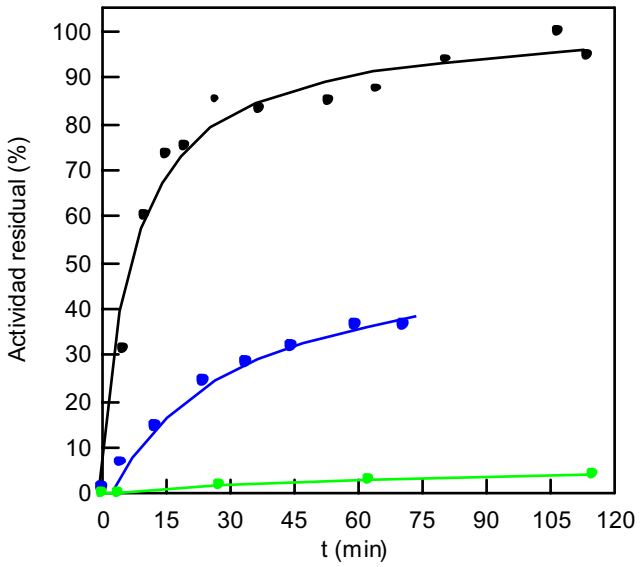

Figura 24: Efecto de los agentes solubilizantes en el proceso de renaturalización de la GlcDH obtenida a partir del vector pET3a en el tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 3 M KCl y 1 mM EDTA. Las disoluciones empleadas para solubilizar los cuerpos de inclusión fueron: (●) 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Urea, 50 mM DTT, 2 mM EDTA; (●) 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 6 M Cloruro de Guanidinio, 50 mM DTT, 2 mM EDTA ; (●) 1% SDS.

Ciertas proteínas halofílicas requieren la presencia de algún metal, bajas temperaturas o uno de sus sustratos para ser renaturalizadas (Connaris y col., 1999). Para observar si el proceso de recuperación de actividad de la GlcDH se ve afectado por la temperatura o la presencia de otros compuestos, se realizaron ensayos de renaturalización variando la temperatura y adicionando al tampón pequeñas cantidades de $NADP^+$, $ZnCl_2$ y $MgCl_2$.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6, observándose que independientemente de la temperatura los mejores resultados se consiguen en ausencia de cualquier aditivo en el tampón, probablemente debido a que su presencia interfiere en el plegamiento correcto de la proteína. La temperatura también influye en el proceso de renaturalización puesto que los valores de actividad obtenidos varían con la misma, alcanzándose los mejores resultados a

temperatura ambiente independientemente de la composición del tampón. A 37 ºC el plegamiento de la proteína es más rápido, pero puede que no sea totalmente correcto y por ello las actividades alcanzadas son menores que a 25 ºC. Sin embargo, a 4 ºC el plegamiento es más lento obteniendo actividades mayores que a 37 ºC, y aproximadamente iguales que a temperatura ambiente.

Tabla 6: *Actividad máxima obtenida en diferentes ensayos de renaturalización variando la temperatura y la composición del tampón.*

	Actividad (U/ml)		
Tampón / Temperatura	**4ºC**	**25 ºC**	**37 ºC**
20 mM Tris-HCl pH 7.4, 3 M KCl, 1 mM EDTA	1,93	1,96	1,10
20 mM Tris-HCl pH 7.4, 3 M KCl, 1 mM EDTA + 0,2 mM $NADP^+$	0,22	0,30	0,19
20 mM Tris-HCl pH 7.4, 3 M KCl, 1 mM EDTA + 48 µM $ZnCl_2$	1,50	---*	---*
20 mM Tris-HCl pH 7.4, 3 M KCl, 1 mM EDTA + 48 µM $ZnCl_2$ + 4 mM $MgCl_2$	1,21	1,59	---*

***** (---) Los ensayos bajo estas condiciones no se llevaron a cabo.

También se realizaron ensayos de renaturalización con tampones compuestos por Tris-HCl y una elevada concentración de NaCl o KCl, pero en ausencia del agente quelante EDTA. En estos ensayos la GlcDH se renaturalizó, alcanzando actividades máximas similares a las obtenidas en presencia de EDTA. Sin embargo, bajo estas condiciones la enzima no se mantiene estable, comenzando a perder actividad minutos después de haber alcanzado su actividad máxima. Este hecho es debido a que el EDTA protege a la enzima de las impurezas presentes en los cuerpos de inclusión.

Teniendo en cuenta estos resultados, los siguientes ensayos de renaturalización se llevaron a cabo empleando el tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,4 conteniendo 3M KCl y 1 mM EDTA, y a temperatura ambiente (25 ºC).

Al utilizar el vector pET14b, que incorpora una cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína expresada, también se consiguió renaturalizar la GlcDH. Cuando se comparó el proceso de renaturalización de las proteínas recombinantes obtenidas a partir de los vectores de expresión pET3a y pET14b (Figura 25), se observó que el comportamiento de ambas fue básicamente el mismo. Por tanto, la cola de histidinas incorporada en la proteína no afecta a su renaturalización.

Se llevaron a cabo ensayos con trombina para eliminar dicho fragmento de aminoácidos, con el fin de evitar posibles interferencias en futuros experimentos. Pero resultó imposible debido a que la proteasa actúa a bajas concentraciones de sal, y en esas condiciones la GlcDH sufre una desnaturalización irreversible. Como consecuencia de estos resultados decidimos seguir trabajando únicamente con la GlcDH obtenida a partir del vector pET3a.

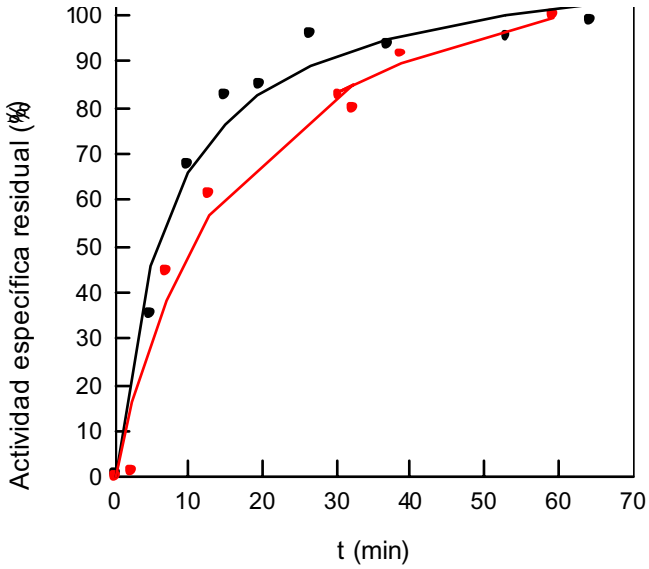

Figura 25: Renaturalización de la GlcDH recombinante obtenida a partir del vector de expresión pET3a (●) y pET14b (●).

Puesto que la concentración es un factor importante en la renaturalización de las proteínas sobreexpresadas, se estudió el efecto de la concentración de GlcDH en el proceso de recuperación de actividad enzimática. En la Figura 26 se observa que cuando la concentración de GlcDH es aproximadamente de 100 μg/ml únicamente se recupera un 60 % de actividad, alcanzándose el 100% cuando la

concentración se encuentra en torno a 50 μg/ml. Esto es debido a que la presencia de elevadas concentraciones de proteína desnaturalizada favorece la formación de plegamientos intermedios, inactivos e irreversibles durante el proceso de renaturalización.

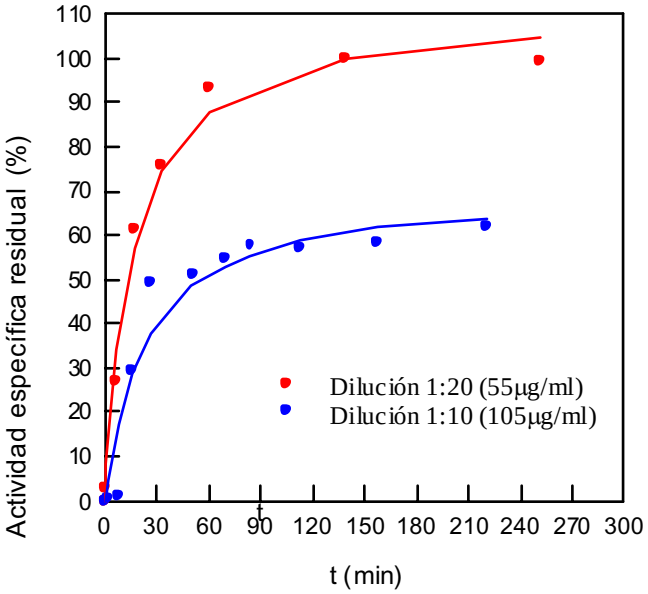

Figura 26: Efecto de la concentración de proteína en el proceso de renaturalización.

Por último, se estudió el efecto de la composición y concentración de las sales en el proceso de renaturalización de la proteína. Los resultados obtenidos (Figura 27) muestran que las mejores actividades enzimáticas se observaron, como era de esperar, en presencia de altas concentraciones de sal, obteniéndose los mejores resultados con 3 M NaCl. A bajas concentraciones de sal, la actividad recuperada fue menor, siendo imposible renaturalizar la proteína en presencia de 1 M KCl.

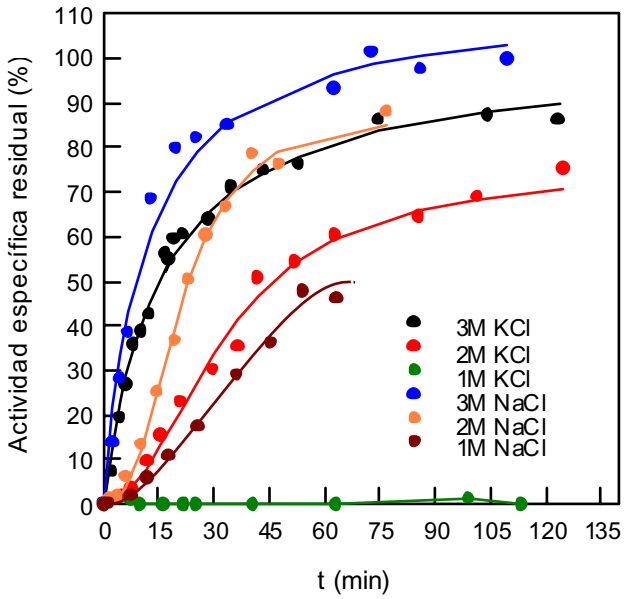

Figura 27: Efecto del tipo de sal y su concentración en el proceso de renaturalización de la GlcDH recombinante. El tampón de renaturalización empleado estaba compuesto por 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA y diferentes concentraciones de KCl y NaCl.

- Renaturalización mediante diálisis:

Los cuerpos de inclusión solubilizados en presencia de urea 8 M se dializaron frente a 20 mM Tris-HCl pH 7,4 conteniendo 3 M KCl y 1 mM EDTA. Una vez terminada la diálisis la GlcDH mostró actividad, pero ésta supuso solamente un 26% de la actividad alcanzada al renaturalizar la proteína mediante dilución rápida, desestimándose este proceso de renaturalización por obtenerse peores resultados.

3.2.4.- PURIFICACIÓN DE LA GlcDH RECOMBINANTE

Generalmente, la purificación de las proteínas recombinantes obtenidas en forma de cuerpos de inclusión es sencilla, rápida y eficiente. Además, en el caso de las proteínas halofílicas, las cuales requieren elevadas concentraciones de sal tanto para su actividad como para su estabilidad, el proceso de purificación resultó mucho más eficaz.

Las características de la GlcDH permitieron llevar a cabo una precipitación en presencia de 2,5 M $(NH_4)_2SO_4$ como primer paso en la purificación. Durante esta etapa la mayoría de proteínas de *E. coli* precipitaron, quedándose en disolución la GlcDH prácticamente pura. Aunque el precipitado de proteínas obtenido contiene una pequeña cantidad de GlcDH, este primer paso de purificación sigue siendo eficaz, puesto que la concentración de proteína que se pierde es despreciable comparada con la que permanece en disolución (Tabla 7). El siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía en DEAE-celulosa en presencia de $(NH_4)_2SO_4$. DEAE-celulosa es una resina intercambiadora de aniones, sin embargo, a causa de la elevada concentración de sales, tanto de la muestra como del tampón de equilibrado de la columna, las fuerzas electrostáticas responsables de la separación son parciales o nulas. En estas condiciones DEAE-celulosa presenta un comportamiento hidrofóbico, quedando la proteína halofílica adsorbida en la resina. Tras la elución en presencia de NaCl, se obtuvo la GlcDH recombinante pura y concentrada (Tabla 7).

Tabla 7: *Purificación de Glucosa Deshidrogenasa recombinante.*

Fracción enzimática		**Vol. (ml)**	**U_T**	**mg_T**	**Factor de purificación**	**Rendimiento (%)**
Renaturalización enzimática en 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2M NaCl, 1mM EDTA		500	2210	20,90	1,0	100,0
Precipitación $(NH_4)_2SO_4$	**Sobrenadante**	500	2180	18,65	1,1	98,6
	Precipitado	20	27	1,73	---	---
DEAE-celulosa		18	1666	8,87	1,8	75,4

La purificación se siguió mediante electroforesis en presencia de SDS. La cantidad de proteína aplicada en cada calle fue del orden de 10 μg. En la Figura 28 se muestran los distintos pasos de purificación, observándose en la última calle una única banda que se corresponde con la GlcDH recombinante pura.

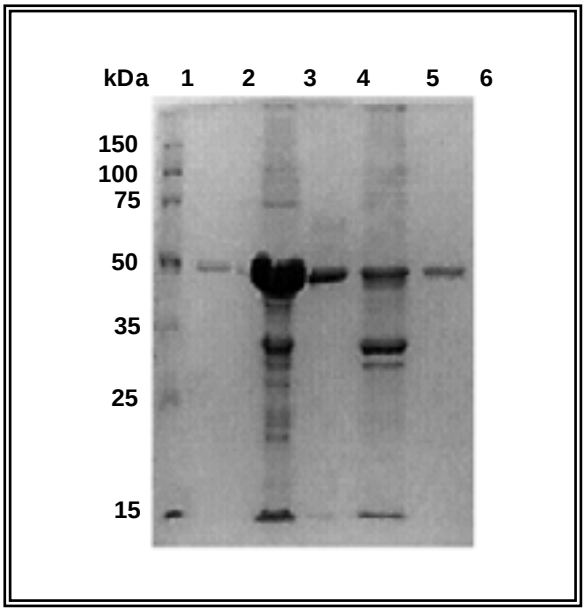

Figura 28: Purificación de glucosa deshidrogenasa recombinante

Calle 1: Marcadores de peso molecular (Fermentas)
Calle 2: GlcDH de *Hfx. mediterranei*
Calle 3: Cuerpos de inclusión solubilizados en presencia de urea 8M.
Calle 4: Precipitación con $(NH_4)_2SO_4$. Sobrenadante
Calle 5: Precipitación con $(NH_4)_2SO_4$. Precipitado
Calle 6: GlcDH recombinante purificada

Este método de purificación basado en las características halofílicas de la GlcDH es rápido y eficaz, teniendo la ventaja adicional de que se obtiene la proteína concentrada. Además, es la primera enzima recombinante con características halofílicas que se purifica en un solo paso cromatográfico, ya que todas las descritas hasta ahora requieren purificaciones más complejas.

3.2.5.- Caracterización de la GlcDH recombinante

Con el propósito de comprobar que la GlcDH recombinante mantiene las mismas características que la GlcDH de *Hfx. mediterranei*, se llevó a cabo su caracterización en base a su masa molecular, su especificidad a diferentes sustratos, y la determinación de sus parámetros cinéticos.

3.2.5.1.- Determinación de la masa molecular (Mr)

En la determinación de Mr mediante cromatografía en Sephacryl S-300, la actividad glucosa deshidrogenasa se detectó en un volumen de elución (V_e) de 76,5 ml, tanto en el caso de la proteína salvaje como de la proteína recombinante. El volumen muerto (V_o) fue 45 ml, y el volumen total (V_t) 130,5 ml, medidos con azul dextrano y cromato potásico, respectivamente. El volumen de elución obtenido para cada una de las proteínas patrón se muestran en la Tabla 8.

A partir de todos estos datos se calcularon los coeficientes de partición (K_{av}) según la expresión:

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)} \qquad \text{(Ec. 1)}$$

BIBLIOTECA VIRTUAL

Al representar log Mr vs K_{av} se obtiene la recta patrón que se muestra en la Figura 29. A partir del volumen de elución de las proteínas problema por interpolación en la recta patrón se estimó la masa molecular de cada enzima, obteniéndose un valor de Mr aproximado de 79 kDa para ambas proteínas, siendo coincidentes las masas moleculares relativas de la GlcDH nativa y recombinante.

Tabla 8: *Proteínas patrón empleadas para realizar la determinación de Mr de GlcDH.*

PROTEINA	Mr (Da)	V_e (ml)
Citocromo c	12500	94,1
Quimotripsinógeno A	25000	93,8
Albúmina	68000	72,3
Aldolasa	158000	70,5
Catalasa	240000	67,1

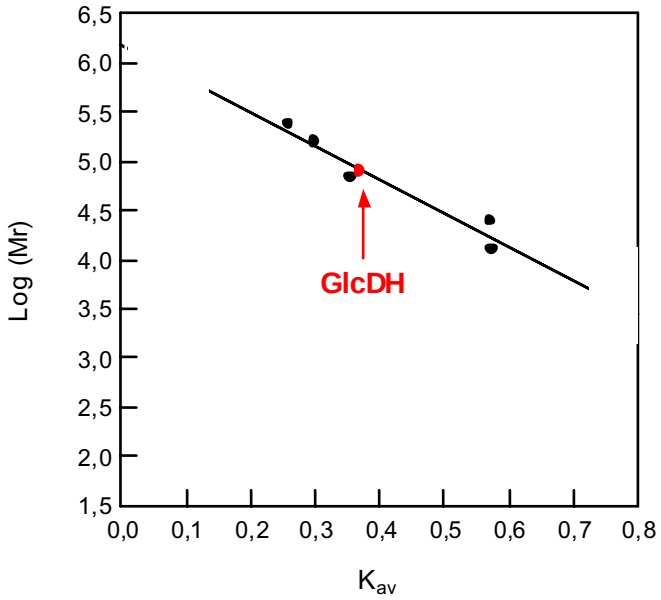

Figura 29: Determinación de Mr de GlcDH recombinante y salvaje a partir de tamizado molecular en Sephacryl S-300. (●) Proteínas patrón, (●) GlcDH recombinante y salvaje.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

3.2.5.2.- Especificidad de sustratos

En el análisis de la especificidad de sustratos de la GlcDH recombinante se obtuvieron resultados muy similares a los que se calcularon para la GlcDH salvaje (Tabla 9).

Al emplear $NADP^+$ como coenzima, los mejores resultados se obtienen en presencia de glucosa como sustrato (velocidad relativa: 100%). Sin embargo, al utilizar NAD^+, la actividad obtenida empleando xilosa es mayor que con glucosa. Concretamente, la velocidad relativa en presencia de xilosa es de un 67% mientras que con glucosa es de un 15%. La actividad con el resto de sustratos ensayados es menor que con glucosa y xilosa en todos los casos.

Estos resultados ponen de manifiesto que el proceso de renaturalización de la GlcDH recombinante no afecta a sus características funcionales, ya que éstas son prácticamente iguales a las que presenta la GlcDH salvaje.

Tabla 9: *Especificidad de sustratos y coenzimas de GlcDH salvaje y recombinante.*

	Velocidad relativa (%) GlcDH salvaje		Velocidad relativa (%) GlcDH recombinante	
Sustrato	**$NADP^+$**	**NAD^+**	**$NADP^+$**	**NAD^+**
D-Glucosa	100	26	100	15
D-Manosa	7	7	4	3
D-Galactosa	13	1	7	2
D-Xilosa	88	79	60	67
D-Glucosamina	6	5	5	7
D-Fructosa	3	1	5	1

Todos los sustratos se utilizaron a una concentración de 0,1 M, tomándose como 100 la velocidad de oxidación de D-glucosa en presencia de $NADP^+$. La concentración utilizada de NAD^+ y $NADP^+$ fue 5 veces el valor de sus K_m.

BIBLIOTECA VIRTUAL

3.2.5.3.- Determinación de parámetros cinéticos

Los estudios de velocidades iniciales se llevaron a cabo empleando glucosa como sustrato y $NADP^+$ como coenzima. En las Figuras 30 y 31 se muestran los resultados obtenidos, comprobándose que con todas las combinaciones de sustratos ensayadas las rectas obtenidas fueron intersectantes. Estos datos confirman que la GlcDH recombinante sigue un mecanismo secuencial.

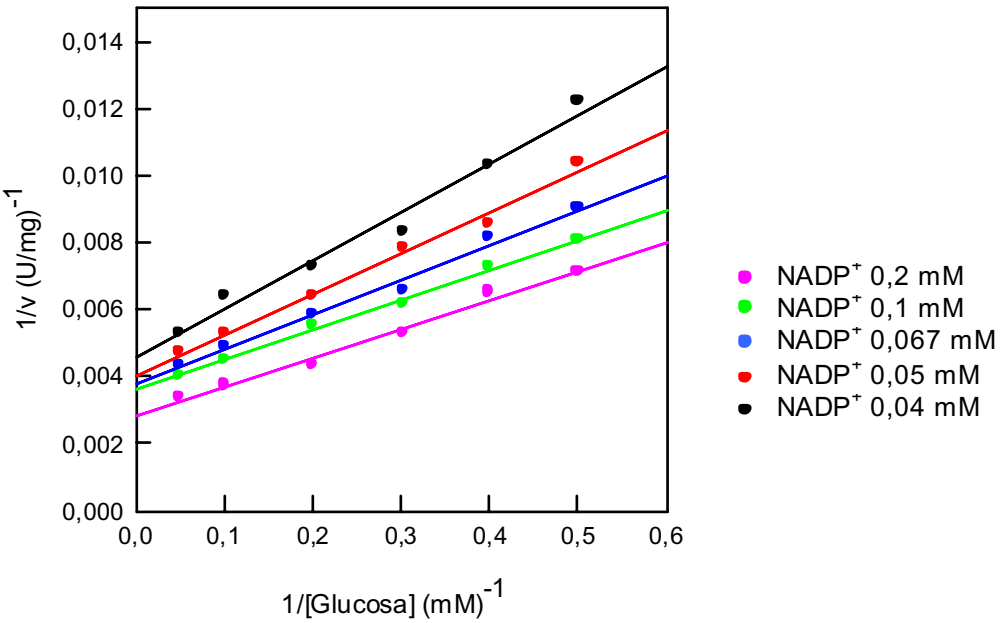

Figura 30: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de glucosa.

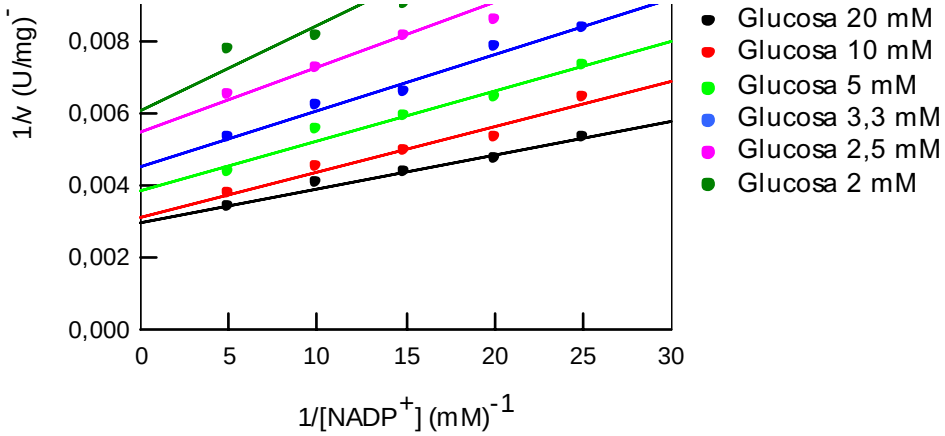

Figura 31: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de $NADP^+$.

Las constantes cinéticas se calcularon ajustando los datos obtenidos a la ecuación de velocidad inicial correspondiente a un mecanismo secuencial ordenado Bi-Bi:

$$v = \frac{VAB}{K_{ia} K_b + K_a B + K_b A + AB} \qquad \text{(Ec. 2)}$$

donde v es la velocidad inicial, V, K_a, K_b y K_{ia} son constantes, y A y B son las concentraciones de los sustratos.

En el caso de la GlcDH, A se corresponde con el coenzima $NADP^+$ y B con la glucosa (Pire y col., 2000), quedando la ecuación del siguiente modo (Ecuación 3):

$$v = \frac{V [NADP][Glucosa]}{K_{iNADP} K_{glucosa} + K_{NADP} [Glucosa] + K_{glucosa} [NADP] + [NADP][Glucosa]} \qquad \text{(Ec. 3)}$$

La K_{cat}, definida como el número de moles de sustrato transformados por minuto y mol de enzima bajo condiciones óptimas, se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$K_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E_T]} \qquad \text{(Ec. 4)}$$

donde $[E_T]$ es la concentración total de enzima.

Los valores obtenidos para las constantes cinéticas de la GlcDH recombinante se muestran en la Tabla 10, junto con los calculados con anterioridad para la GlcDH de *Hfx. mediterranei* (Pire, 1998; Pire y col., 2000). En ella se observa que los valores de K_{NADP} y de $K_{glucosa}$ para ambas proteínas son del mismo orden. Sin embargo, existen diferencias significativas entre los valores de $V_{máx}$, K_{cat} y $K_{cat}/K_{glucosa}$ de la GlcDH recombinante y salvaje. Estas diferencias podrían ser debidas a que el proceso de purificación de ambas enzimas es distinto, al igual que el tampón en el que se encuentra cada una de ellas. En cualquier caso, la GlcDH recombinante parece ser más eficaz catalíticamente que la GlcDH salvaje, demostrando que el proceso de renaturalización, a partir de los cuerpos de inclusión, de la enzima sobreexpresada es efectivo.

Tabla 10: *Constantes cinéticas calculadas a partir de velocidades iniciales.*

	K_{NADP} (mM)	$K_{glucosa}$ (mM)	$V_{máx}$ (U/mg)	K_{cat} x 10^{-3} (min^{-1})	K_{cat}/K_{gluc} x 10^{-3} (mM^{-1} min^{-1})
GlcDH salvaje	0,039 ± 0,010	4,7 ± 1,0	93 ± 7	7,0 ± 0,5	1,48 ± 0,28
GlcDH recombinante	0,035 ± 0,004	2,8 ± 0,3	397 ±15	31,1 ± 1,2	11,1 ± 1,6

3.2.5.4.- Estudios de la concentración de los iones hidrógeno en la enzima

El efecto de la concentración del ión hidrógeno sobre la enzima, así como otros efectores, puede dar una valiosa información en relación a la naturaleza de los grupos implicados en la unión de los sustratos. Asimismo, las constantes de ionización características de las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos de la proteína, hacen que estos estudios sirvan para identificar grupos específicos que desempeñan un papel importante en la catálisis (Tipton y Dixon, 1979).

En el caso de la GlcDH se realizaron estudios de pH con el objetivo de determinar los residuos aminoacídicos implicados en la catálisis y en la unión de los sustratos. Para ello las inversas de las velocidades iniciales se representaron frente a las inversas de las concentraciones de sustrato, obteniéndose mediante el ajuste a la Ecuación 3 los valores de $V_{máx}$, K_m y $V_{máx}/K_m$ para cada uno de los sustratos (Tabla 11).

Tabla 11: *Valores de $V_{máx}$, K_m y V/K para los sustratos glucosa y $NADP^+$.*

pH	$V_{máx}$	K_{NADP}	V/K_{NADP}	$K_{Glucosa}$	$V/K_{Glucosa}$
7,5	0,41	0,360	1,13	1,3	0,31
8,0	7,70	0,150	51,33	5,2	1,48
8,5	14,40	0,066	218,18	4,1	3,51
9,0	16,40	0,060	273,33	2,1	7,81
9,5	24,90	0,047	529,78	2,7	9,22
10,0	23,20	0,050	464,00	1,8	12,89
10,5	24,40	0,060	406,67	2,0	12,20

A continuación, se realizaron las representaciones de Dixon (Figuras 32, 33 y 34) ajustándose los datos, mediante el programa HABELL suministrado por Cleland (1979) y modificado a FORTRAN 77, a la siguiente ecuación:

$$\text{Log } y = \text{Log}\left(\frac{c}{1+(H/K_1)}\right) \qquad \text{(Ec. 5)}$$

donde "y" representa V ó V/K, H la concentración del ión hidrógeno, "c" es el valor de "y" pH-independiente en un estado óptimo de protonación, y K_1 es la constante de disociación de los grupos que participan en la catálisis y unión de sustratos.

Según Cleland (1982), en un mecanismo en el que la unión del sustrato sólo se produce en la forma correctamente ionizada de la enzima, el perfil de V será independiente del pH, y los valores de pK para los grupos catalíticos y de unión se obtendrán de las representaciones de V/K. En la Figura 32 se aprecia un clara dependencia de la velocidad máxima con el pH, indicando que para que la catálisis se produzca la enzima debe estar en su forma desprotonada.

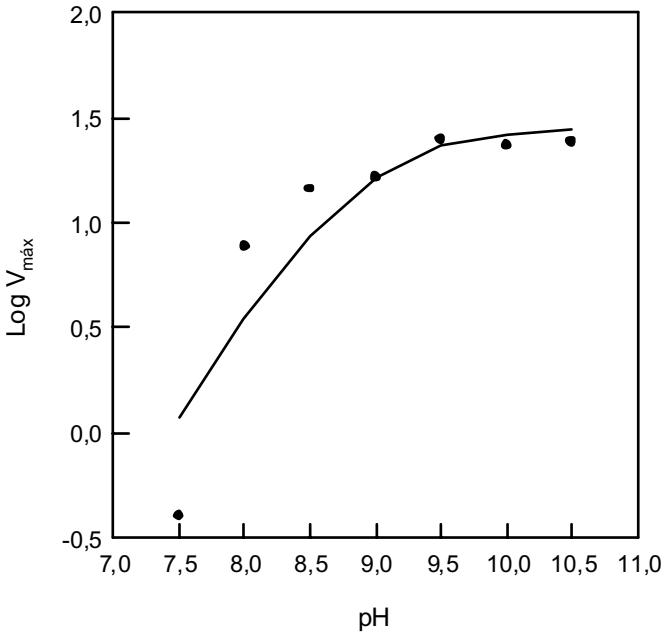

Figura 32: Dependencia del Log $V_{máx}$ con el pH.

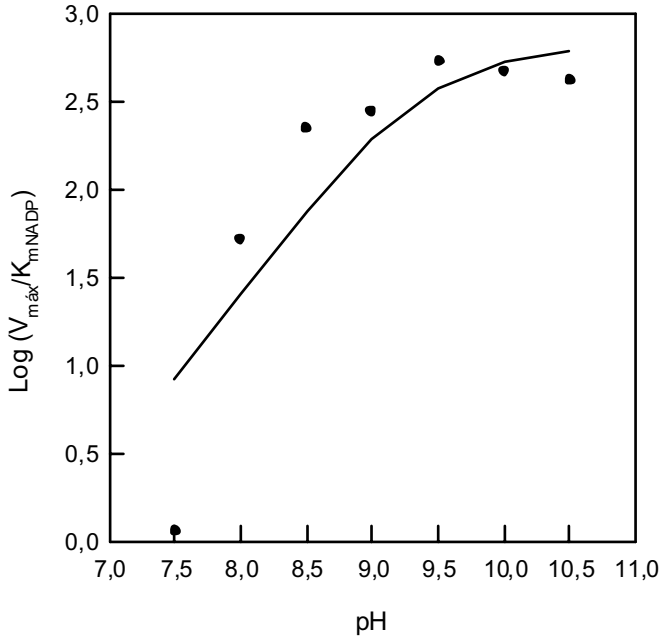

Figura 33: Dependencia del Log ($V_{máx}/K_m$) con el pH cuando el sustrato variable es el $NADP^+$ en condiciones estándar de medida.

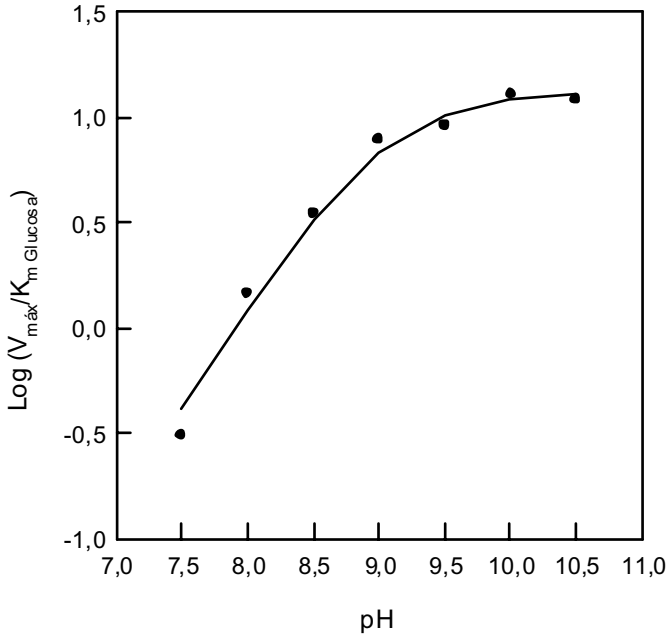

Figura 34: Dependencia del Log ($V_{máx}/K_m$) con el pH cuando el sustrato variable es la glucosa en condiciones estándar de medida.

Los perfiles de Log V/K (Figura 33 y 34) para el $NADP^+$ y la glucosa muestran que la unión de estos sustratos a la enzima es dependiente de un solo pK para la enzima libre y el complejo enzima-$NADP^+$ (Tabla 12).

Tabla 12: *Valores de pK de los parámetros cinéticos para la glucosa deshidrogenasa de Hfx. mediterranei.*

Parámetro	pK (1)	σ (1, 2)
Log $V_{máx}$	8,42 ± 0,47	0,93
Log $V/K_{glucosa}$	9,00 ± 0,08	0,18
Log V/K_{NADP}^+	8,81 ± 0,72	1,57

(1) Estos valores se han calculado mediante el uso del programa HABELL (Cleland, 1979)
(2) σ: suma de los cuadrados de los residuales dividido por los grados de libertad.

Los valores de pK obtenidos, entre 8,42 y 9,00, para la GlcDH podrían corresponderse con un grupo ε-amino de un residuo de lisina implicado en la unión de sustratos o en la catálisis enzimática. Sin embargo, cuando se analiza la estructura de esta enzima no se observa ningún residuo de este tipo cercano al centro catalítico de la GlcDH. Los valores de pKs de las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos pueden estar afectados por el ambiente en que se encuentran en la proteína, así como por la proximidad de otros grupos cargados. En la GlcDH, los valores de pK calculados podrían estar influidos por la presencia del átomo de zinc catalítico, no correspondiéndose con los valores de pK que tendrían los residuos implicados en la catálisis y en la unión de sustratos. Esto es lo que sucede con el doble mutante G293A, P295T de la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo, donde los valores de pK calculados, 9,3 y 8,4, se asignan a la molécula de agua unida al átomo de zinc en el complejo enzima-NAD^+ y al grupo hidroxilo del sustrato (alcohol) unido al átomo de zinc en el complejo ternario enzima-NAD^+-alcohol, respectivamente (Ramaswamy y col., 1999). Otra posibilidad consistiría en que los pK calculados se correspondieran con un residuo de His situado en un ambiente en el que su protonación estuviera favorecida.

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LOS MUTANTES GlcDH D38A Y GlcDH D38C

4.1.- INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la ingeniería de proteínas se ha convertido en una herramienta indispensable dentro del área de bioquímica y biología molecular. Gracias a ella se ha conseguido relacionar la información de una secuencia de DNA con la función y regulación de su producto, o mejorar y adaptar las propiedades de las enzimas a unas condiciones determinadas (Cerdán Villanueva y col., 1997). En la ingeniería de proteínas se emplean principalmente dos técnicas, la mutagénesis dirigida o la mutagénesis al azar. La primera de ellas se utiliza cuando se desea realizar una o varias mutaciones específicas, con el fin de observar como influyen esos cambios en la función de la proteína. Para llevar a cabo este tipo de experimentos es recomendable disponer de información sobre la estructura de las mismas, puesto que de este modo será más fácil entender las relaciones entre la estructura y la función de las proteínas. Cuando se desean resolver cuestiones más complejas o no se posee información estructural sobre las proteínas que se quieren modificar, se recurre a la mutagénesis al azar. En este caso se obtiene un gran número de mutantes, teniendo que establecer una serie de criterios para seleccionar aquellos que puedan proporcionar más información sobre las características de la proteína objeto de estudio.

Mediante análisis de secuencia se determinó que la GlcDH de *Hfx. mediterranei* pertenece a la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media (MDR). Esta familia incluye un gran número de deshidrogenasas dependientes de zinc, las cuales pueden unir uno o dos átomo de zinc por subunidad. Concretamente, la GlcDH halófila contiene un átomo de zinc por subunidad cuya función es catalítica.

En la estructura de HLADH, el zinc catalítico se encuentra coordinado por los residuos Cys46, His67 y Cys174 (Eklund, 1981). Los dos primeros residuos están conservados en la mayoría de los miembros de la familia MDR, mientras que la Cys174 está sustituida en algunas enzimas por un residuo de glutamato, como por ejemplo en la GlcDH de *T. acidophilum* (Glu155) (Figura 35) y la sorbitol deshidrogenasa de hígado de oveja (Glu174). En el caso de la GlcDH de *S. solfataricus* el residuo equivalente a Cys174 (en HLADH) es Gln151. En base a alineamientos de secuencias, en la GlcDH de *Hfx. mediterranei* los residuos implicados en la coordinación del átomo de zinc catalítico serían Asp38, His63 y

Glu150. Esta secuencia de residuos implicados en la unión del átomo de zinc no se había observado previamente en las proteínas pertenecientes a la familia MDR, de modo que el cambio de Cys por Asp en la posición 38 de la proteína halófila podría ser una adaptación en respuesta a la presencia de altas concentraciones salinas ya que hasta el momento en todas las proteínas de la familia el residuo de Cys permanece invariable.

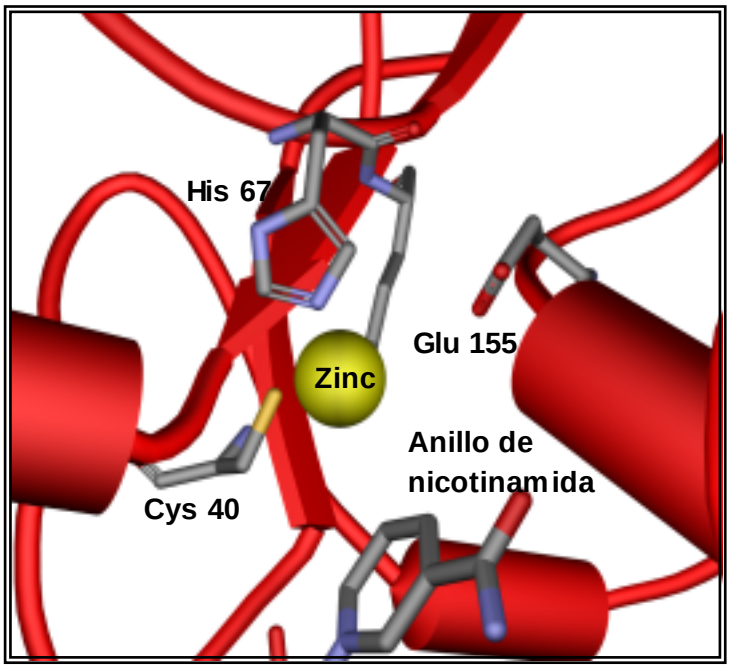

Figura 35: Centro de unión del zinc catalítico en la GlcDH de *T. acidophilum.*

En la HLADH, cuatro residuos de cisteína (Cys97, Cys100, Cys103 y Cys111) son los responsables de la unión del átomo de zinc estructural. La GlcDH de *T. acidophilum*, en la cual la presencia del zinc estructural se confirmó mediante estudios estructurales, presenta tres de estos residuos (Cys98, Cys101 y Cys109) mientras que el cuarto ligando es Asp115. Sin embargo, ninguno de estos residuos se encuentra conservado en la GlcDH de *Hfx. mediterranei*,

Con el fin de investigar el modo de unión del átomo de zinc catalítico en la GlcDH de *Hfx. mediterranei* se han construido dos mutantes. En uno de ellos el Asp38 se ha sustituido por Cys (aminoácido presente en el resto de proteínas de la familia MDR), y en el otro por Ala (residuo incapaz de ligar metales). A lo largo de este capítulo se describe la construcción de ambos mutantes así como la expresión de las proteínas mutadas y su análisis bioquímico.

4.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1.- Clonaje del gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* en el vector pGEM®11-Zf (+)

Para insertar el gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* en el plásmido pGEM11®-Zf11(+) se digirieron tanto el vector como el plásmido pCR2.1-HmGlcDH con la enzima de restricción *Bam*Hl (Figura 36).

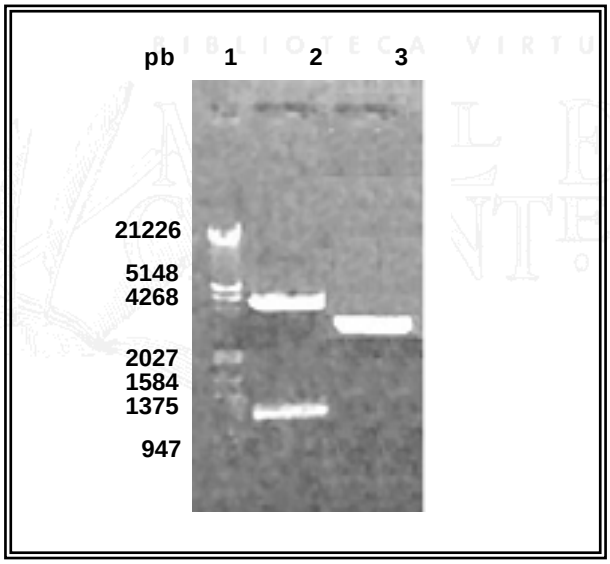

Figura 36: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión con *Bam*Hl.
Calle 1: Marcadores de tamaño. Marker III (Fermentas)
Calle 2: Digestión del plásmido pCR2.1-Hm GlcDH
Calle 3: Vector pGEM®11-Zf (+) linealizado

Después de llevar a cabo la reacción de ligación y la transformación en *E. coli* JM109, se obtuvieron clones positivos que contenían la construcción del plásmido pGEM-HmGlcDH.

4.2.2.- Mutagénesis dirigida

El plásmido pGEM-HmGlcDH se desnaturalizó mediante una adaptación del método alcalino propuesto por la casa comercial Promega (Figura 37). Dicha

adaptación consistió en aumentar el tiempo de incubación con NaOH de 5 a 20 min. y la temperatura de 25 a 37 ºC.

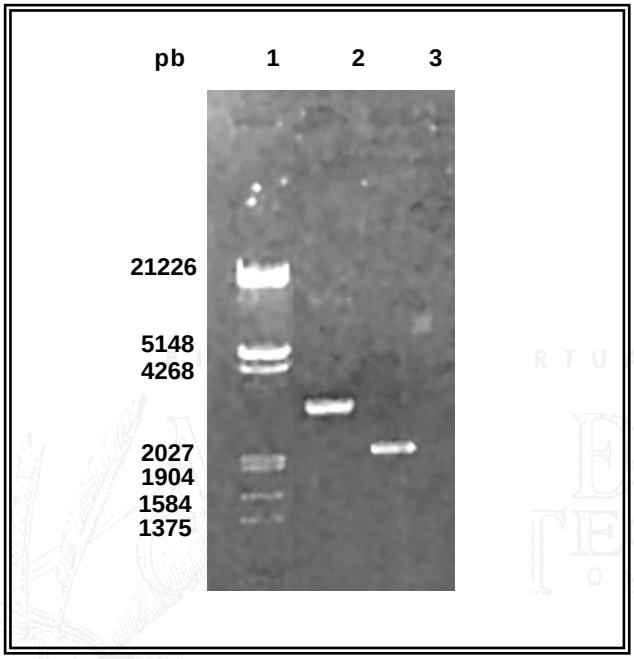

Figura 37: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA desnaturalizado.

Calle 1: Marcadores de tamaño. Marker III (Fermentas)
Calle 2: Plásmido no desnaturalizado (pGEM-HmGlcDH)
Calle 3: Plásmido desnaturalizado (pGEM-HmGlcDH)

Una vez desnaturalizado el DNA, se realizaron las reacciones de mutagénesis empleando los oligonucleótidos GlcDH D38A y GlcDH D38C y el kit GeneEditor™ *in vitro* Site-Directed Mutagénesis System. En una de las reacciones se sustituyó el codon GAC que codifica para el Asp38 por el codon TGC que codifica para Cys (aminoácido presente en las GlcDHs termófilas y otros miembros de la familia MDR), y en la otra se sustituyó por el codon GCA que codifica para Ala (aminoácido hidrofóbico). A continuación se llevó a cabo el proceso descrito en la Figura 13, consiguiendo un elevado número de transformantes para cada una de las reacciones.

El sistema utilizado produce aproximadamente un 60% de clones que han incorporado la mutación deseada. Debido a ello, se analizaron mediante secuenciación 10 clones de cada uno de los ensayos, obteniéndose un 60% de efectividad para la mutación D38A y un 40% para la mutación D38C.

4.2.3.- Clonaje de los genes mutados en el vector de expresión pET3a

Los plásmidos pGEM-HmGlcDH D38A y pGEM-HmGlcDH D38C construidos anteriormente, se digirieron con las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI, aislando el inserto de GlcDH con las mutaciones incorporadas para su posterior inclusión en el vector de expresión (Figura 38).

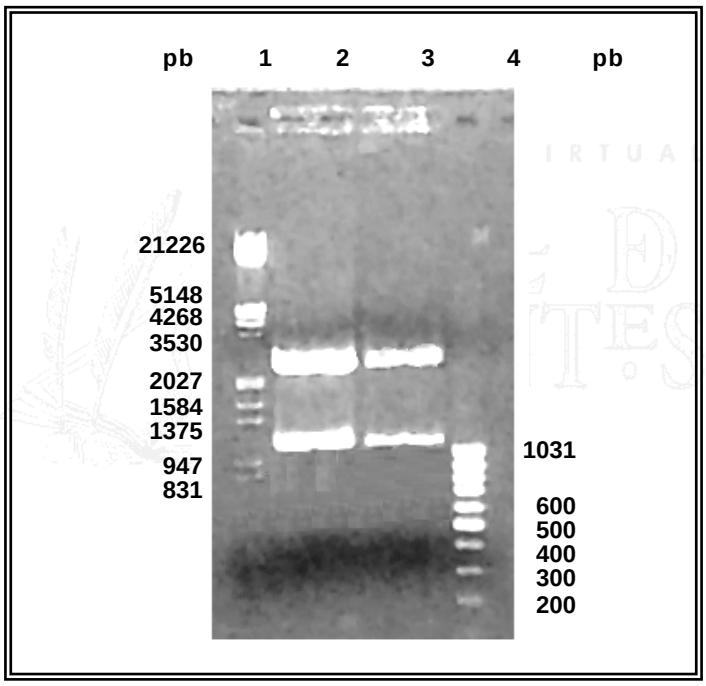

Figura 38: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones realizadas con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I.

Calle 1: Marcadores de tamaño. Marker III (Fermentas)
Calle 2: Digestión del plásmido pGEM-HmGlcDH D38A
Calle 3: Digestión del plásmido pGEM-HmGlcDH D38C
Calle 4: Marcadores de tamaño. Patrón 100pb (Fermentas)

Seguidamente, se realizó la reacción de ligación entre el vector de expresión pET3a, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, y los insertos GlcDH D38A y GlcDH D38C. Tras las transformaciones en *E. coli* JM109 se obtuvieron clones positivos tanto con la construcción del plásmido pET3a-HmGlcDH D38A como con la construcción pET3a-HmGlcDH D38C.

4.2.4.- Expresión y renaturalización de las proteínas mutadas

Los plásmidos pET3a-HmGlcDH D38A y pET3a-HmGlcDH D38C se utilizaron para transformar *E. coli* BL21(DE3). Después de realizar el ensayo de expresión, se aislaron las fracciones celulares solubles e insolubles, observando que tanto la proteína GlcDH D38A como la GlcDH D38C se encuentran en forma de cuerpos de inclusión (Figura 39 a y b), tal y como sucedió con la GlcDH silvestre.

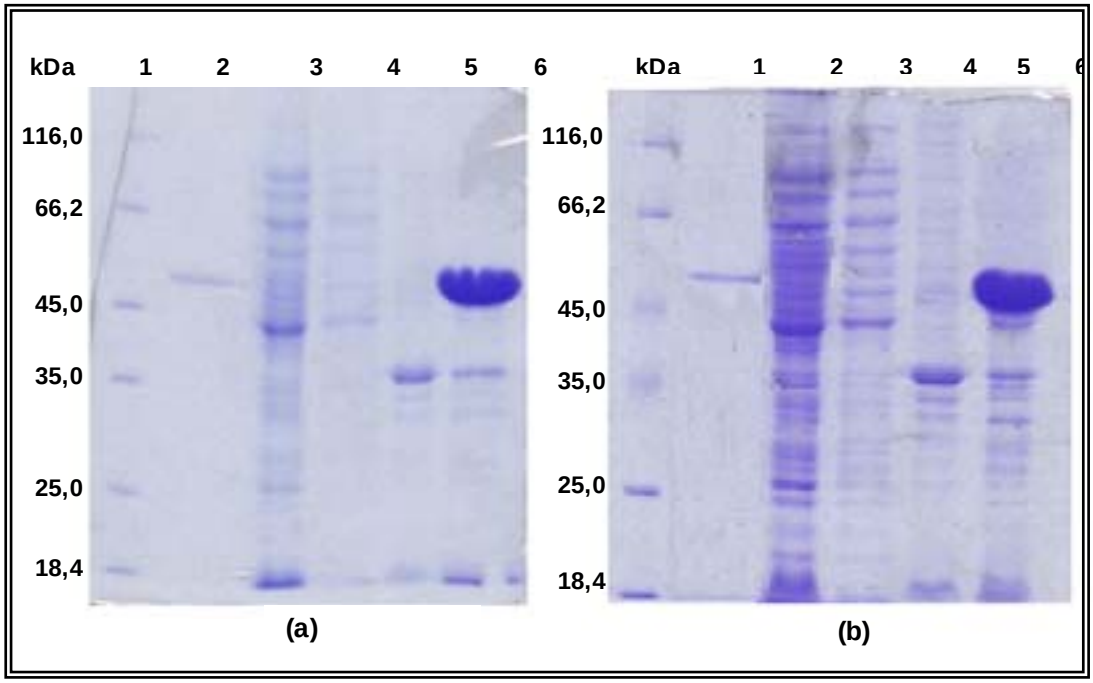

Figura 39: Localización de las proteínas sobreexpresadas GlcDH D38A (figura a) y GlcDH D38C (figura b) mediante SDS-PAGE.

Calle 1: Marcadores de peso molecular (Fermentas)
Calle 2: Hm-GlcDH
Calle 3: Fracción soluble pET3a
Calle 4: Fracción soluble pET3a-HmGlcDH D38A / pET3a-HmGlcDH D38C
Calle 5: Cuerpos de inclusión pET3
Calle 6: Cuerpos de inclusión pET3a-HmGlcDH D38A / pET3a-HmGlcDH D38C

En ambos casos, los cuerpos de inclusión se solubilizaron con tampón 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8M Urea, 50 mM DTT y 2 mM EDTA y la renaturalización de las enzimas se llevó a cabo mediante dilución rápida (1:20) en 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 2M NaCl y 1mM EDTA (Figura 40).

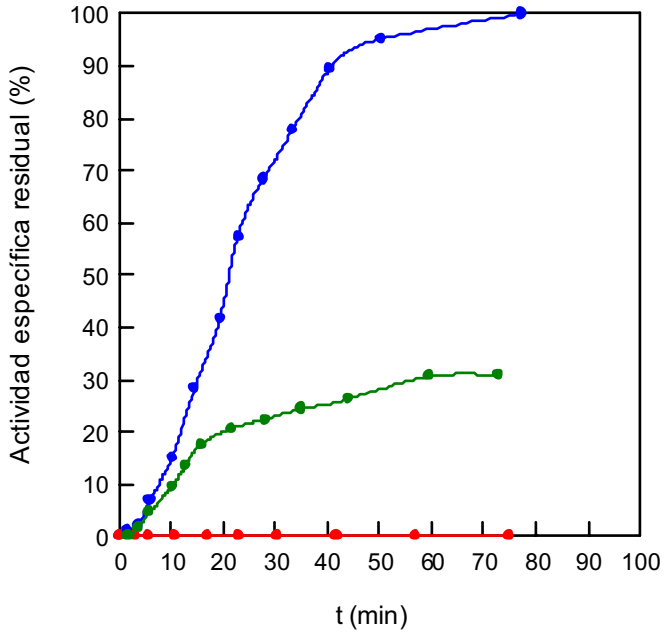

Figura 40: Comparación del proceso de renaturalización de las proteínas mutadas GlcDH D38A ( ) y GlcDH D38C ( ) con la GlcDH silvestre ( ).

En la gráfica se observa que ninguno de los mutantes alcanzó los niveles de actividad que presenta la GlcDH silvestre bajo las mismas condiciones de renaturalización. En el caso del mutante GlcDH D38A no se llegó a detectar actividad enzimática, mientras que la actividad recuperada por el mutante GlcDH D38C disminuyó más de un 60% con respecto a la actividad que presenta la GlcDH silvestre.

Al analizar los resultados obtenidos con el mutante GlcDH D38A se pensó que, probablemente, la proteína no presentaba actividad debido a que la unión con el átomo de zinc era tan lábil que éste podía ser reemplazado o eliminado fácilmente a la concentración de NaCl en la que se renaturalizó la proteína. Por ello, se realizaron nuevos ensayos de renaturalización empleando los siguientes tampones:

- 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 M NaCl y 10 μM $ZnCl_2$
- 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 % glicerol
- 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 %glicerol y 88 μM $ZnCl_2$

Pero en ninguno de los casos se recuperó actividad enzimática.

A partir de estos datos se deduce que el residuo Asp38 es imprescindible en la coordinación del zinc, puesto que su sustitución por un aminoácido apolar como la alanina produce una enzima totalmente inactiva e incapaz de unir dicho átomo. Estudios del centro de unión del zinc realizados con otras metaloproteínas muestran resultados similares, obteniéndose también proteínas inactivas al sustituir algún residuo implicado en la coordinación del zinc por alanina (Breksa y col., 2002)

4.2.5.- Purificación de las proteínas GlcDH D38A y GlcDH D38C

Tanto la proteína GlcDH D38A como la GlcDH D38C se purificaron a homogeneidad mediante una precipitación en presencia de sulfato amónico seguida de una cromatografía en DEAE-celulosa (Figura 41). La purificación de la GlcDH D38C se siguió mediante medidas de absorbancia a 280 nm y de actividad enzimática (Tabla 13), mientras que la purificación de la GlcDH D38A se siguió únicamente mediante absorbancia a 280 nm puesto que es inactiva.

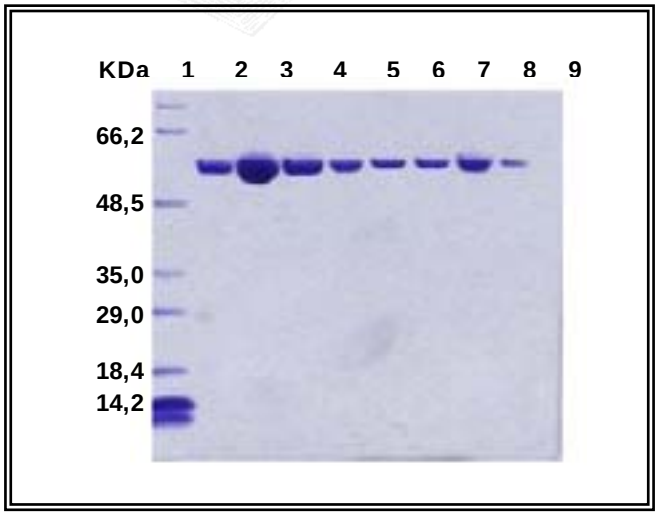

Figura 41: SDS-PAGE de diversas fracciones correspondientes a la purificación de las proteínas GlcDH D38C y GlcDH D38A.

Calle 1: Marcadores de peso molecular (Sigma)
Calle 2-5: Fracciones purificación GlcDH D38C
Calle 6-8: Fracciones purificación GlcDH D38A
Calle 9: GlcDH de *Hfx. mediterranei*

Tabla 13: *Purificación de la GlcDH D38C.*

Fracción enzimática		Vol. (ml)	U_T	mg_T	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Renaturalización enzimática en 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 M NaCl, 1 mM EDTA		740	949	26	1,00	100,0
Precipitación $(NH_4)_2SO_4$	**Sobrenadante**	740	783	21	1,03	83
	Precipitado	80	5	3,6	---	---
DEAE-celulosa		17	544	12	1,24	57

4.2.6.- Caracterización de la proteína GlcDH D38C

4.2.6.1.- Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos para la proteína GlcDH D38C se determinaron del mismo modo que para la GlcDH silvestre. En las Figuras 42 y 43 se muestran las representaciones de la doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de glucosa y $NADP^+$, respectivamente. Como se observa en ellas, se obtuvieron rectas intersectantes en ambos casos, confirmándose que la enzima GlcDH D38C sigue un mecanismo secuencial.

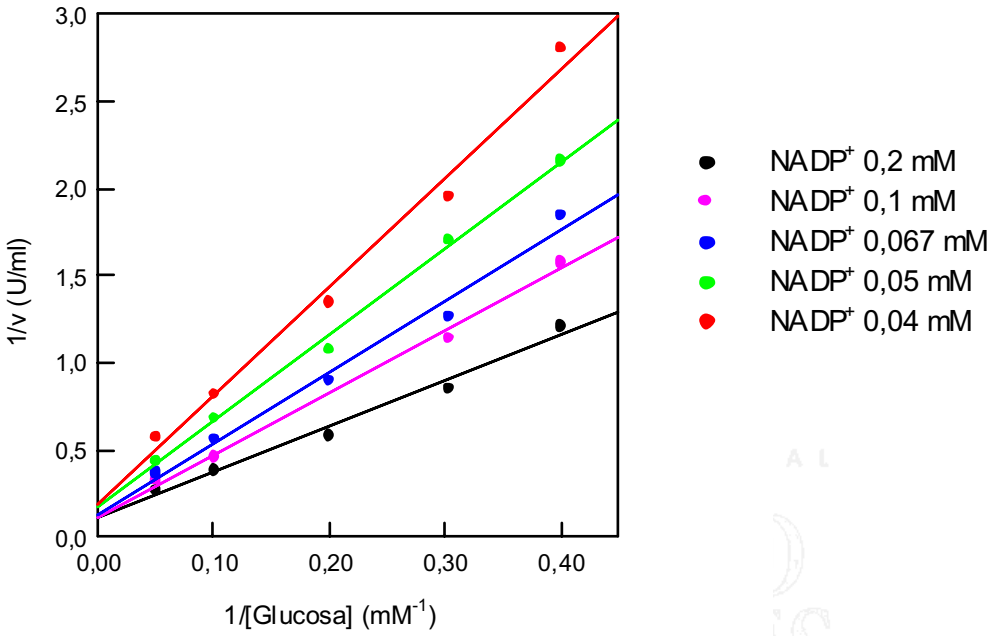

Figura 42: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de glucosa.

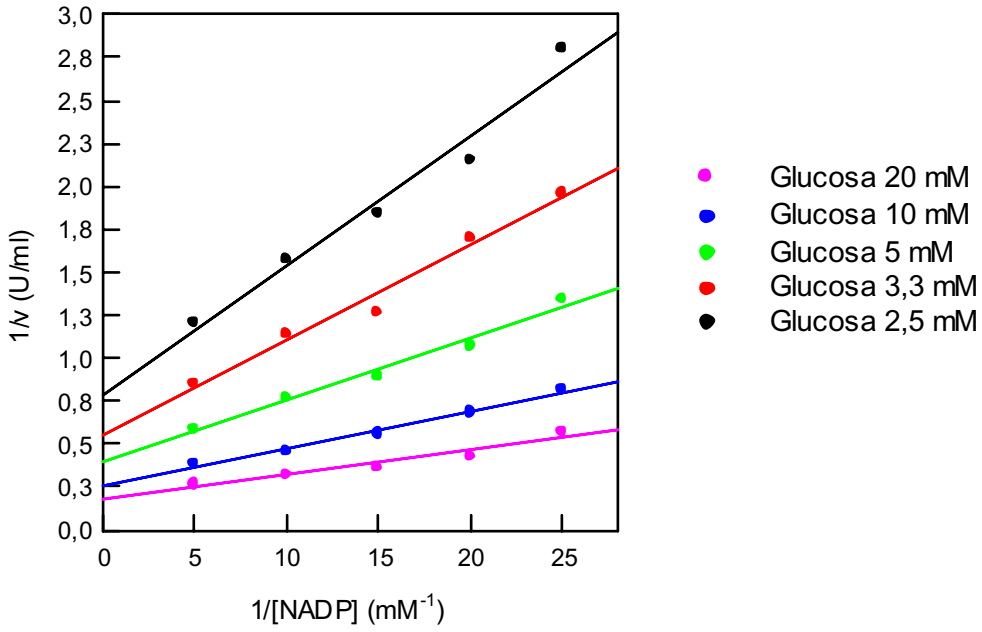

Figura 43: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de $NADP^+$.

Los valores de las constantes cinéticas $V_{máx}$ y K_m se obtuvieron mediante el ajuste de los datos a la ecuación de velocidad inicial correspondiente a un mecanismo secuencial ordenado BI-BI (Ecuación 3), y la K_{cat} se calculó aplicando la Ecuación 4.

En la Tabla 14 se muestran los parámetros cinéticos para la GlcDH silvestre y el mutante GlcDH D38C. Las diferencias entre los valores de K_{NADP} para ambas proteínas no son significativas, sin embargo la mutación ha provocado un incremento considerable del valor de $K_{glucosa}$ y una notable caída en el valor de $V_{máx}$. Además, como indican los parámetros K_{cat} y $K_{cat}/K_{glucosa}$ la eficiencia catalítica de la proteína mutada es menor que en la GlcDH silvestre, es decir, se ha reducido el número de procesos de reacción que cataliza cada sitio activo por unidad de tiempo.

Tabla 14: *Parámetros cinéticos de la proteína silvestre y mutante.*

	K_{NADP} (mM)	$K_{glucosa}$ (mM)	$V_{máx}$ (U/mg)	K_{cat} x 10^{-3} (min^{-1})	K_{cat}/K_{gluc} x 10^{-3} (mM^{-1} min^{-1})
GlcDH Silvestre	0,035±0,004	2,8±0,3	397±15	31,1±1,2	11,10±1,60
GlcDH D38C	0,044±0,010	12,4±2,3	83±9	6,5±0,7	0,52±0,14

Estos datos indican que la sustitución del Asp38 por Cys en la GlcDH no solo afecta a la coordinación del zinc catalítico sino también al centro activo de la proteína, disminuyendo la afinidad de ésta por la glucosa y su $V_{máx}$, y como consecuencia su eficiencia catalítica.

4.2.6.2.- Efecto de la concentración de EDTA

La GlcDH de *Hfx. mediterranei* pierde su átomo de zinc cuando se incuba a concentraciones superiores a 1 mM del agente quelante EDTA, resultando la enzima inactiva (Pire y col., 2000). Para observar el efecto de la sustitución del Asp38 por Cys sobre la fuerza con la que se une el átomo de zinc en la proteína GlcDH D38C, se realizaron ensayos en los que tanto la GlcDH silvestre como la proteína mutada, se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de

EDTA. Asimismo, dichos ensayos se llevaron a cabo con muestras de proteínas en concentraciones de NaCl comprendidas entre 1 y 3 M.

Los resultados obtenidos (Figura 44) muestran que la cantidad de EDTA necesaria para inactivar la enzima GlcDH D38C es mucho menor que para inactivar la GlcDH silvestre. Además, el comportamiento que presenta la proteína mutada es independiente de la concentración de sal, puesto que en las tres condiciones de NaCl ensayadas la enzima perdió aproximadamente un 80% de su actividad en presencia de EDTA 0,25 mM, resultando completamente inactiva a concentraciones superiores de 2mM. Sin embargo, en el caso de la GlcDH silvestre la cantidad de EDTA necesaria para secuestrar el átomo de zinc a 3 M de NaCl es mayor que a 1 M, por lo que el comportamiento de esta proteína si que es dependiente de la concentración de sal, aunque a concentraciones superiores a 4 mM del agente quelante la GlcDH es completamente inactiva independientemente de la concentración de NaCl. Por consiguiente, la sustitución del residuo Asp38 por Cys en la proteína ha producido una debilitación de la unión del átomo de zinc.

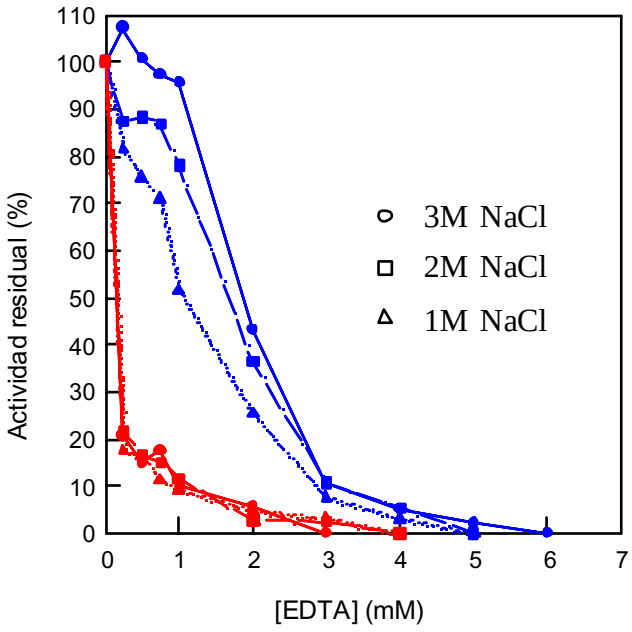

Figura 44: Inactivación de la GlcDH silvestre (●) y GlcDH D38C (●) en presencia de concentraciones crecientes de EDTA.

Por tanto, la sustitución del residuo de Cys (presente en las proteínas que forman parte de la familia MDR) por un residuo de Asp, en el centro de unión del átomo de zinc catalítico en las GlcDHs halofílicas, hace más difícil el secuestro de este átomo, reflejando una posible adaptación de la proteína a las elevadas concentraciones de sal que posee el medio en el que se encuentra. Sin embargo, actualmente no se puede confirmar esta hipótesis puesto que los cambios observados podrían ser debidos a una alteración del centro activo como consecuencia de la introducción de la mutación. Para demostrar este hecho se necesitaría resolver otras estructuras de proteínas halófilas dependientes de zinc, con el fin de analizar la naturaleza de los ligandos de dicho átomo.

BIBLIOTECA VIRTUAL

4.2.6.3.- Efecto de la temperatura sobre la estabilidad y actividad de la enzima

La sustitución del residuo Asp38 por Cys hace que la unión del zinc catalítico de la GlcDH sea muy similar a la que presentan las GlcDH termófilas y otras proteínas de la familia MDR. Con el objeto de comprobar si la presencia de dicha Cys en lugar de Asp, a distintas concentraciones salinas, modifica la estabilidad térmica de la enzima se realizaron ensayos de estabilidad y actividad con la temperatura.

Los ensayos de termoestabilidad se llevaron a cabo con muestras de proteínas en tres concentraciones distintas de NaCl (entre 1 y 3M) y a temperaturas comprendidas entre 55 y 80 ºC .Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 45, 46 y 47, en las que se ha representado el logaritmo de la actividad residual frente el tiempo de incubación.

Los datos obtenidos manifiestan que ambas proteínas muestran una mayor termoestabilidad conforme aumenta la concentración de NaCl del tampón en el que se encuentran. Este hecho es debido a que a bajas concentraciones de sal las proteínas halofílicas tienden a desestabilizarse, proceso que se encuentra favorecido por el aumento de la temperatura. Sin embargo, a elevadas concentraciones salinas las proteínas se mantienen estables, siendo la temperatura el único factor que puede perturbar su estabilidad.

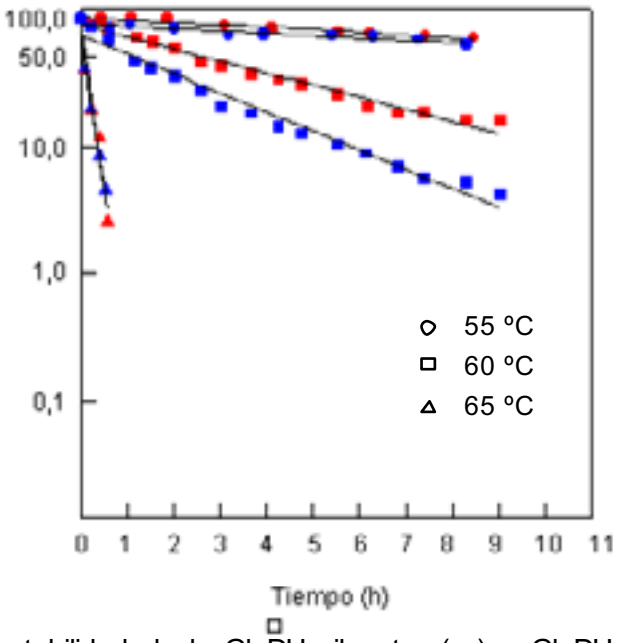

Figura 45: Termoestabilidad de la GlcDH silvestre (●) y GlcDH D38C (●) a una concentración de 1 M NaCl.

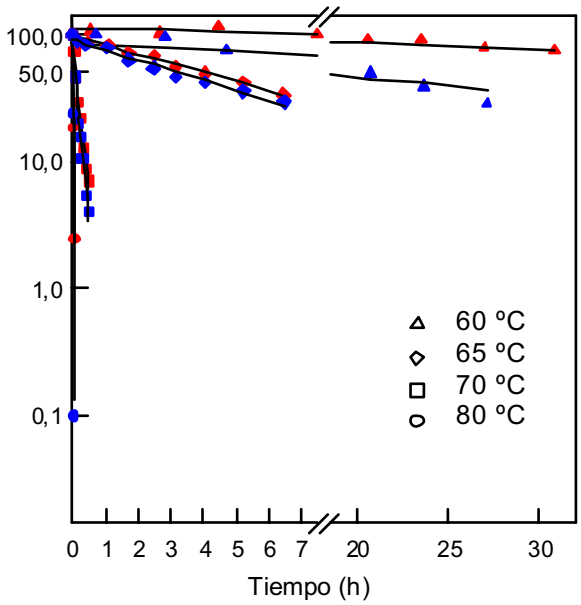

Figura 46: Termoestabilidad de la GlcDH silvestre (●) y GlcDH D38C (●) a una concentración de 2 M NaCl.

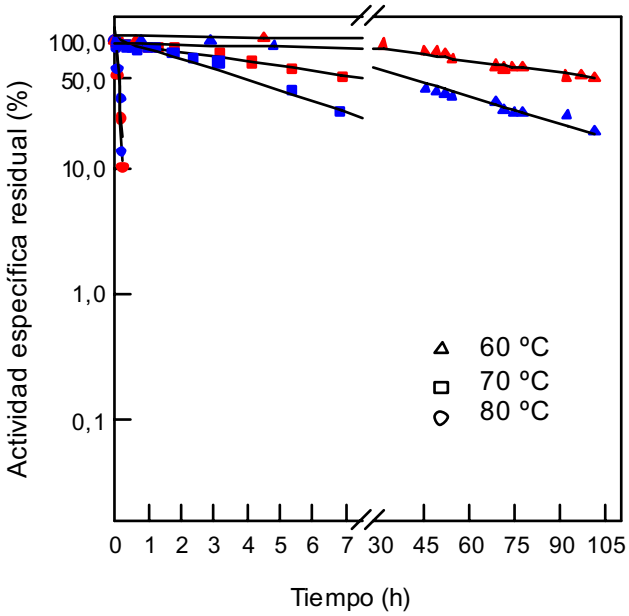

Figura 47: Termoestabilidad de la GlcDH silvestre (●) y GlcDH D38C (●) a una concentración de 3 M NaCl.

Asimismo, cuando se compararon los procesos de desactivación de ambas proteínas se observó que la GlcDH D38C es ligeramente más termoestable que la GlcDH silvestre, independientemente de la concentración de NaCl. En la Tabla 15, se muestran los tiempos de vida media calculados para cada una de las enzimas a las temperaturas y concentraciones de NaCl ensayadas. En ella se aprecia que, efectivamente, a 60 °C la GlcDH D38C presenta tiempos de vida media superiores a la GlcDH silvestre. A temperaturas superiores a 60 °C también se observa este hecho, el cual es más acusado conforme la concentración de NaCl a la que se encuentra la proteína es mayor. No obstante, los datos obtenidos a 80 °C no son relevantes, puesto que a dicha temperatura la inactivación total de ambas proteínas se produce en cuestión de segundos. Por último, a temperaturas inferiores de 60 °C, las diferencias entre los tiempos de vida media no son significativas ya que las proteínas permanecen estables durante semanas.

Tabla 15: *Tiempos de vida media a distintas temperaturas y concentraciones desal de las proteínas GlcDH silvestre y GlcDH D38C*.

	$t_{1/2}$ 1 M NaCl (h)		$t_{1/2}$ 2M NaCl (h)		$t_{1/2}$ 3M NaCl (h)	
	D38C	**Recomb.**	**D38C**	**Recomb.**	**D38C**	**Recomb**
55 ºC	33,9	37,2	(a)	(a)	(a)	(a)
60 ºC	7,4	4,6	123,7	51,33	210,6	96,27
65 ºC	0,3	0,3	9,6	8,3	(a)	(a)
70 ºC	(b)	(b)	0,3	0,2	17,2	8,25
80 ºC	(b)	(b)	0,04	0,02	0,2	0,2

(a) No determinado puesto que las proteínas permanecen estables bajo esas condiciones.

(b) No determinado puesto que las proteínas se desestabilizan en segundos.

En referencia a los estudios de la actividad con la temperatura (Figura 48), se ha observado un desplazamiento del máximo de actividad de la GlcDH D38C hacia mayores temperaturas. Concretamente, el máximo de actividad de la GlcDH silvestre se obtiene a 56 °C mientras que el de la proteína mutada se encuentra aproximadamente a 70 °C.

Los resultados obtenidos en cuanto al efecto de la temperatura sobre la estabilidad y la actividad de la proteína mutada, indican que la sustitución de Asp por Cys no sólo influye en la coordinación del zinc catalítico sino también en las propiedades termofílicas de la proteína. Como consecuencia de imitar los residuos implicados en la unión del zinc catalítico de las proteínas pertenecientes a la familia MRD en la GlcDH de *Hfx. mediterranei,* se ha conseguido una proteína ligeramente más estable a elevadas temperaturas aunque presenta menor actividad enzimática que la GlcDH silvestre.

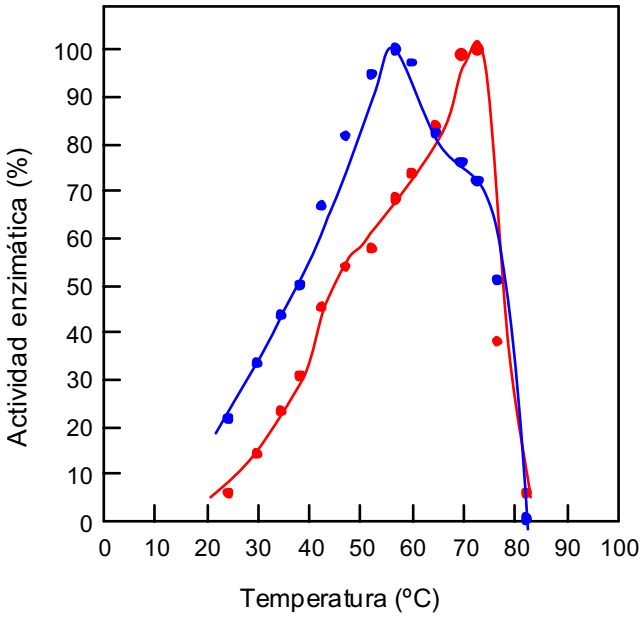

Figura 48: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la GlcDH silvestre ( ) y la GlcDH D38C ( ).

ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA GlcDH SILVESTRE Y GlcDH D38C

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

5.1.- INTRODUCCIÓN

A pesar de que la cantidad de proteínas que se han purificado a partir de microorganismos pertenecientes a la familia *Halobacteriaceae* es muy elevada, solamente se dispone de la estructura de cinco de ellas, las cuales son: malato deshidrogenasa (Dym y col., 1995) y ferredoxina de *Haloarcula marismortui* (Frolow y col., 1996), dihidrofolato reductasa de *Hfx. volcanii* (Pieper y col., 1998), catalasa-peroxidasa de *Har. marismortui* (Yamada y col., 2002), y dodecina de *Hbt. salinarum* (Bieger y col., 2003). La resolución de estas estructuras nos ha ayudado a entender las bases generales de la halofilicidad, pero aun así se requiere más trabajo para llegar a comprender el papel que desempeñan algunos residuos específicos en la tolerancia a elevadas concentraciones de sal. Por tanto, resulta muy interesante la resolución de nuevas estructuras de proteínas halófilas con el fin de ampliar nuestro conocimiento en esta área.

La GlcDH de *Hfx. mediterranei* se ha resuelto a 2,0 Å en presencia de $NADP^+$ y en ausencia de zinc permitiendo describir el plegamiento de la proteína. Sin embargo, el objetivo de esta tesis consiste en ampliar el conocimiento sobre las bases moleculares responsables de la adaptación halofílica. Para alcanzar dicho objetivo se requieren estructuras de alta resolución, con el fin de observar interacciones entre la proteína y el disolvente que la rodea.

En este capítulo se describe el empleo del mutante GlcDH D38C para estudiar el sitio de unión del átomo de zinc catalítico y para determinar la estructura de la proteína halofílica GlcDH a alta resolución. Al comienzo de este proyecto se habían establecido unas condiciones de cristalización preliminares de la enzima libre y del complejo GlcDH-$NADP^+$, así como un análisis estructural a 2,0 Å de un modelo inicial del complejo binario. Empleando material fresco se optimizaron las condiciones de cristalización y posteriormente los cristales obtenidos se caracterizaron mediante difracción de rayos-X. Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Sheffield en colaboración con los Doctores Fisher, Baker y Britton, pertenecientes al grupo del Profesor David. W. Rice.

5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1.- Cristalización y estudios preliminares de la GlcDH silvestre

La GlcDH se cristalizó mediante la técnica de "hanging drop" empleando citrato sódico como agente precipitante a 290 K. Bajo las condiciones indicadas se obtuvieron cristales tanto con la GlcDH libre como con el complejo GlcDH-$NADP^+$.

Los cristales que obtenidos a partir de la enzima libre (Figura 49) mostraron una morfología hexagonal bipiramidal (Forma I) con unas dimensiones máximas de 0,25 x 0,40 x 0,25 mm, mientras que los obtenidos a partir del complejo binario proteína-$NADP^+$ (Figura 50) presentaron una morfología ortogonal (Forma II) cuyas dimensiones máximas son 0,6 x 0,6 x 0,4 mm.

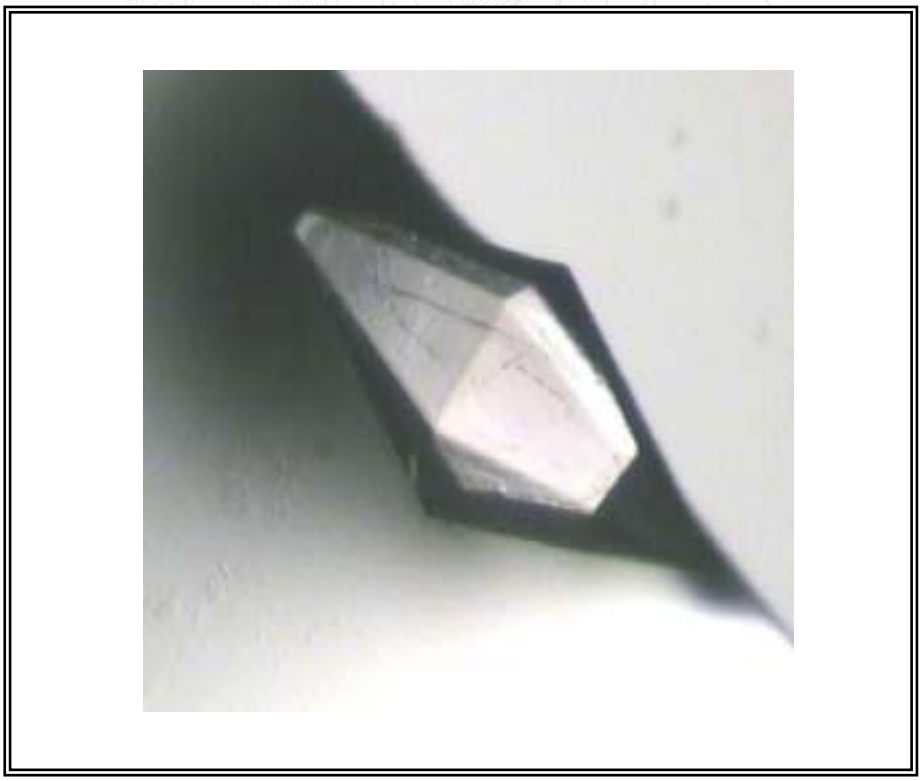

Figura 49: Cristal obtenido a partir de GlcDH libre.

Figura 50: Cristal obtenido a partir del complejo binario GlcDH-$NADP^+$.

Los cristales de Forma I se montaron en finos capilares de cuarzo y se difractaron empleando el método de rotación con rotaciones de 1º por marco. El detector utilizado fue MAR345 con doble espejo, y los rayos X Cu $K\alpha$ se produjeron con un generador de ánodo rotatorio Rigaku RU-200. Al analizar el patrón de difracción obtenido (Figura 51), se observó que este cristal pertenece a un grupo espacial hexagonal P622. Los parámetros de la celda unidad fueron $a=b$=89,1, c=214.6 Å, $\alpha=\beta=90,\gamma=120º$, siendo su volumen 1,47 x 10^6 $Å^3$. El peso molecular por subunidad de la GlcDH es de 39 kDa, lo cual es coherente con la existencia de un monómero por unidad asimétrica. Esto da un valor de V_M de 3,1 $Å^3$ Da^{-1} y un contenido de disolvente del 61 %, datos que se encuentran dentro del rango normal establecido por Matthews (Matthews, 1977) para proteínas.

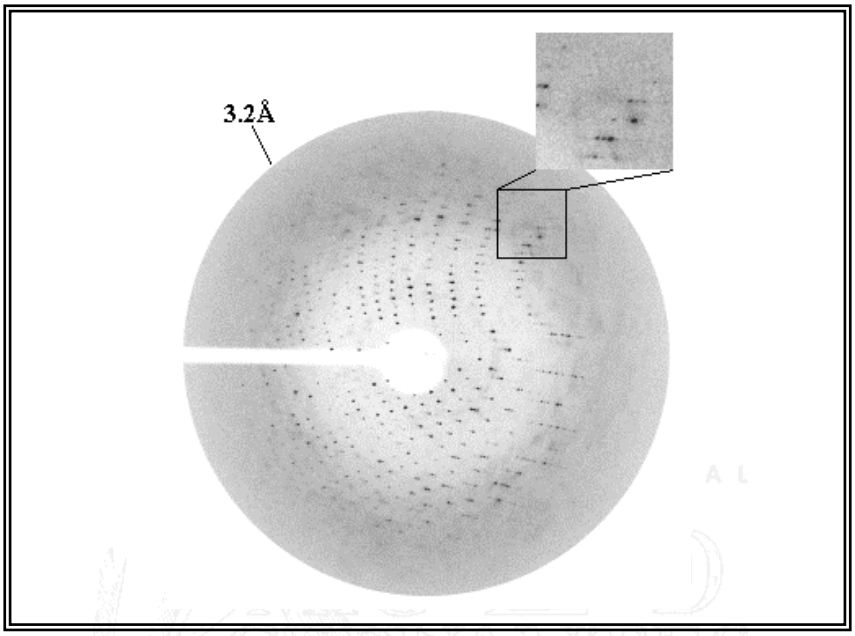

Figura 51: Imagen de difracción de rayos X obtenida a partir del cristal Forma I. El límite de difracción es de 3,2 Å.

Los cristales correspondientes a la Forma II también se montaron en finos capilares de vidrio, y recibieron el mismo tratamiento que el descrito anteriormente para los cristales de la Forma I. Los cristales de la Forma II difractaron mejor que los de la Forma I, obteniéndose difracciones entre 1,5 y 2 Å de resolución (Figura 52). Estos cristales pertenecen a un grupo espacial ortorrómbico *I*222 o $I2_12_12_1$. Los parámetros de la celda unidad fueron *a*= 61,8, *b*= 110,9, *c*= 151,7 Å, $\alpha=\beta=\gamma=90º$, siendo su volumen 1,05 x 10^6 $Å^3$. El valor de V_M (3.3 $Å^3$ Da^{-1}) y el contenido de disolvente (62,7 %) sugieren que hay un monómero en cada unidad asimétrica, al igual que sucede con el cristal de la Forma I.

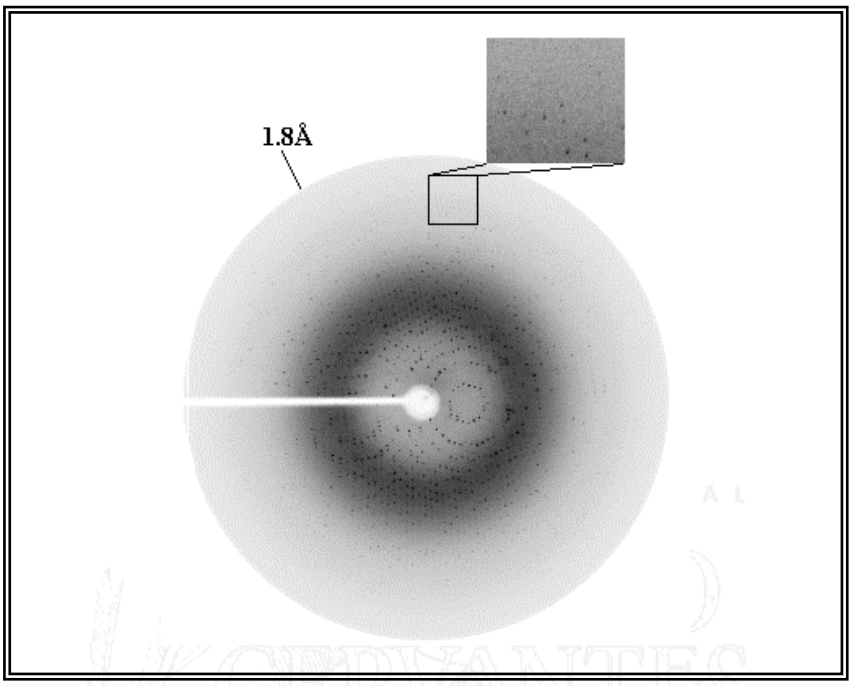

Figura 52: Imagen de difracción de rayos X obtenida a partir del cristal Forma II. El límite de difracción es de 1,8 Å.

5.2.2.- Cristalización y estudios preliminares de la GlcDH D38C

La GlcDH D38C se cristalizó con el fin de observar si la sustitución del residuo Asp 38 por Cys provoca cambios estructurales en la proteína que puedan afectar a su actividad catalítica.

Los cristales obtenidos en presencia de citrato sódico, como agente precipitante, a partir de la enzima libre (Figura 53) y el complejo binario GlcDH D38C-$NADP^+$ y zinc (Figura 54) presentaron las mismas características que los obtenidos a partir de la GlcDH recombinante, perteneciendo a los grupos espaciales P622 e I222, respectivamente.

Figura 53: Cristal obtenido a partir de la GlcDH D38C libre.

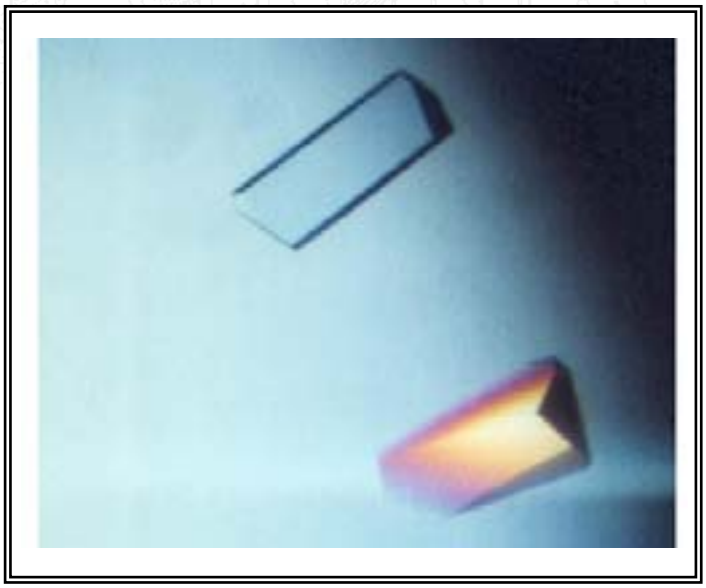

Figura 54: Cristal obtenido a partir del complejo binario GlcDH D38C- $NADP^+$ en presencia de zinc.

La GlcDH D38C también se cristalizó en presencia de gluconolactona, zinc y $NADP^+$ (Figura 55). Estos cristales presentaron una morfología ortogonal (Forma II), y al igual que los cristales obtenidos a partir del complejo binario pertenecen al

grupo espacial I222. Estos cristales difractaron entre 2,5 y 2,2 Å, siendo los parámetros de la celda unidad *a* = 61,6, *b* = 112,2, *c* = 150,5 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^{o}$.

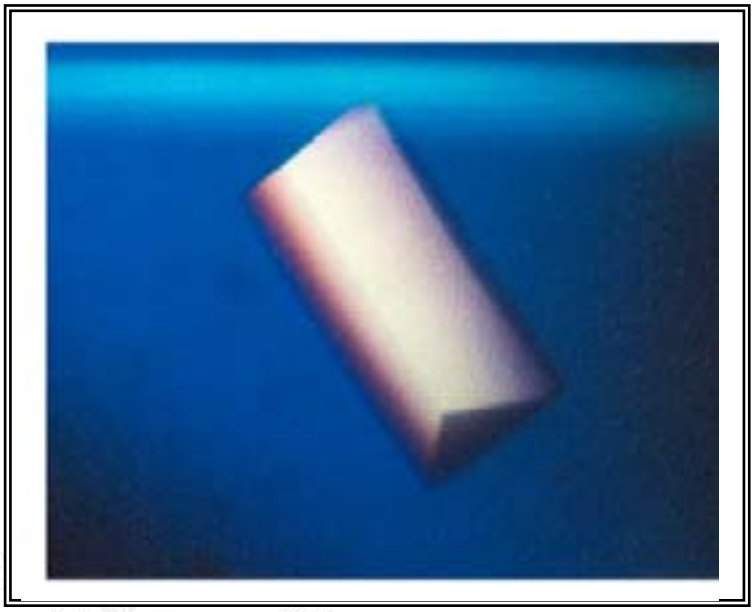

Figura 55: Cristal de GlcDH D38C obtenido en presencia de $NADP^{+}$, zinc y gluconolactona.

Empleando citrato sódico como agente precipitante no se consiguieron cristales en presencia de NADPH. Por ello, se realizaron nuevos ensayos empleando distintos kits suministrados por Hampton Research, obteniéndose resultados satisfactorios cuando el agente precipitante empleado fue MPD, el cual actúa también como crioprotector permitiendo llevar a cabo la difracción del cristal a 100 K. Una vez determinadas las condiciones óptimas de cristalización, se llevaron a cabo varios ensayos con distintas combinaciones de sustratos. En todos los casos, los cristales que se obtuvieron (Figura 56) presentaron una morfología ortogonal (Forma II) perteneciendo al grupo espacial I222, al igual que los cristales obtenidos con $NADP^{+}$, y difractaron entre 1,5 y 2,3 Å.

Figura 56: Cristal obtenido a partir complejo binario GlcDH D38C-NADPH en presencia de zinc.

Los cristales crecidos en presencia de citrato potásico como agente precipitante presentaron las mismas características que los crecidos con citrato sódico.

5.2.3.- Obtención de datos

Los cristales obtenidos como se describe en los apartados anteriores se sometieron a difracción de rayos X en las instalaciones de la Universidad de Sheffield y en el sincrotrón de Daresbury. El procesamiento de los datos y la resolución de estructuras se llevó a cabo por el grupo de investigación de la Universidad de Sheffield, junto con los que trabajé durante mis estancias en dicha Universidad. Los datos estadísticos de la difracción de rayos X de los cristales crecidos a partir de la GlcDH D38C se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16 : Datos estadísticos de la difracción de rayos X para los cristales GlcDH D38C

	Enzima libre	$NADP^+$ + Zn	$NADP^+$ + Zn + Gluconolactona	NADPH + Zn + Glucosa	NADPH + Zn	NADPH
Rango de resolución (Å)	15 – 3.55	1.50	30 – 2.2	30 – 2.0	15 -1.84	15 – 2.0
Esfera de mayor resolución (Å)	3.63 – 3.55	1.55 – 1.50	2.27 – 2.22	2.05 – 2.0	1.89 – 1.84	2.05 – 2.00
Grupo especial	P622	I222	I222	I222	I222	I222
Parámetros de la celda unidad (Å)						
a	89.4	60.5	61.6	60.1	60.5	60.7
b	89.4	109.3	112.2	106.3	108.9	108.1
c	211.5	151.9	150.5	151.9	151.2	152.6
Difracciones únicas	6269	66981	231258	247775	313406	178218
"Completeness" (%)	96.7 (100)	94.4 (93.5)	94.5 (92.9)	92.8 (89.6)	94.5 (91.5)	95.7 (99.3)
Multiplicidad	8.74 (3.4)	5.1 (4.6)	9.34 (3.96)	8.03 (2.16)	7.12 (2.23)	5.43 (2.62)
$I/\sigma I$	11.71 (2.4)	1.37 (1.01)	14.3 (3.3)	10 (1.8)	16.35 (1.82)	14.58 (2.41)
R_{merge} (%)[a]	10.2 (50.3)	0.051 (0.709)	10.3 (41.8)	9.5 (45.5)	4.7 (49)	9.2 (44.7)

* Los valores entre paréntesis se refieren a la esfera de mayor resolución.

[a] $R_{merge} = \Sigma_{hkl} \mid I_i - I_m \mid / \Sigma_{hkl} 1 I_m$, donde I_m es la media de la intensidad de difracciones.

5.2.4.- Determinación y refinamiento de la estructura del complejo binario GlcDH D38C-$NADP^+$

Los cristales del complejo binario GlcDH D38C difractaron muy bien permitiendo obtener datos a 1,6 Å de resolución (Tabla 17) (Figure 57). La estructura se resolvió por reemplazamiento molecular empleando el modelo inicial del complejo binario formado por la GlcDH silvestre–$NADP^+$, el cual fue previamente determinado mediante reemplazamiento molecular isomorfo. El programa informático REFMAC5 (Murshudov y col., 1997) se utilizó para refinar la estructura hasta 1,6 Å de resolución, y para la reconstrucción del modelo se empleó el programa TURBO-FRODO (Roussel y col., 1991). Las moléculas de agua se añadieron al modelo mediante el uso del programa ARP (Lamzin y col., 1997). La identificación de los contraiones se realizó mediante observaciones visuales teniendo en cuenta los siguientes criterios: presencia de picos iguales o superiores a 6σ en el mapa de densidad electrónica, carga y características geoquímicas de la zona, contactos con los ligandos de la proteínas o moléculas de agua próximas a estos ligandos con una disposición octaédrica, y bajos valores del factor-B asociados a moléculas de agua. El modelo final de la estructura está compuesto de una única subunidad formada por 357 aminoácidos, una molécula de $NADP^+$, un átomo de zinc, cinco iones de K^+, un ión citrato y 675 moléculas de agua.

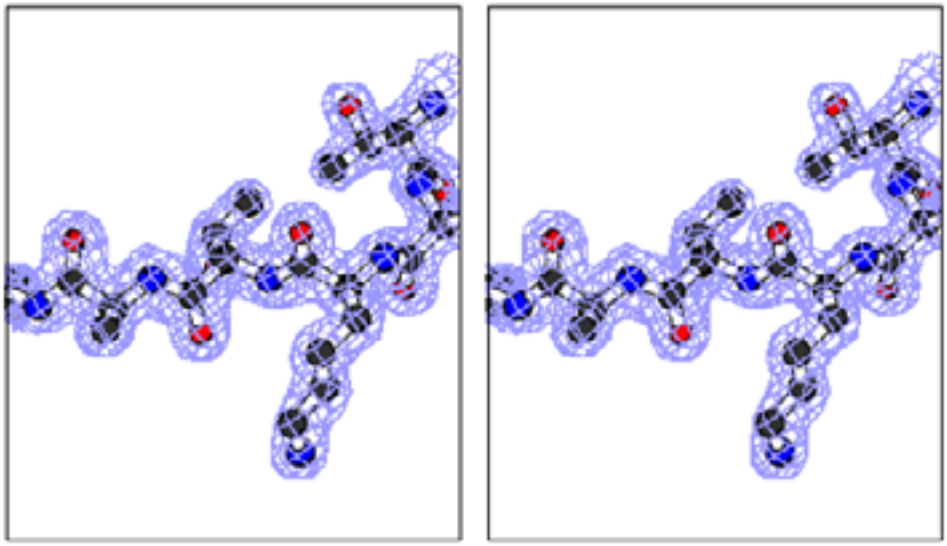

Figure 57: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica de la estructura GlcDH D38C resuelta a 1.6 Å (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

Los datos estadísticos del refinamiento de la estructura se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: *Datos estadísticos del refinamiento de la estructura GlcDH D38C en KCl en presencia de $NADP^+$ y zinc.*

Nº difracciones	62796
R_{cryst} (%)/R_{free} (%)	15.4 / 18.6
Representación de Ramachandran (%)	89.4 / 10.0 / 0.7
Rms desviación de la longitud de enlace (Å)	0.023
Rms desviación del ángulo de enlace (º)	1.55
Nº en el modelo final	
Residuos	357
Átomos de la proteína	2778
Zn^{2+} catalítico	1
Iones citrato	1
$NADP^+$	1
K^+	5
Moléculas de agua	675
Media del valor B (Å^2)	
Átomos de la proteína	25
Zn^{2+} catalítico	24
Iones citrate	36
$NADP^+$	24
K^+	29
Moléculas de agua	42

5.2.5.- Análisis de la estructura del complejo binario GlcDH D38C con $NADP^+$ y zinc

5.2.5.1.- Estructura secundaria, terciaria y cuaternaria

Al igual que en el caso de la proteína silvestre, el monómero de GlcDH D38C está formado por una cadena polipeptídica de 357 aminoácidos que se pliega dando lugar a dos dominios separados por una profunda hendidura. Dicha hendidura posee un átomo de zinc y constituye el centro activo donde se produce la reacción.

El dominio central del monómero está compuesto por los residuos comprendidos entre el número 174 y 302, ambos inclusive. En él se encuentra el sitio de unión del $NADP^+$, y debido a ello se le llamó dominio de unión al nucleótido. El resto de residuos (1-173 y 303-357) componen el segundo dominio, en el cual se hallan los aminoácidos responsables de la catálisis y de la unión de glucosa. Éste recibe el nombre de dominio catalítico.

Cada uno de los monómeros de la GlcDH está formado por 10 hélices α y 18 hebras β (Figura 58). El dominio de unión al nucleótido se compone de 6 hebras β paralelas y 5 hélices α, que forman el característico motivo $\beta\ \alpha\ \beta$ conocido como plegamiento de Rossmann (Rossmann y col., 1974). Una gran hélice α (α3) conecta el dominio de unión al nucleótido con el dominio catalítico, el cual está constituido principalmente por hebras β y comprende los extremos amino- y carboxi-terminal de la proteína.

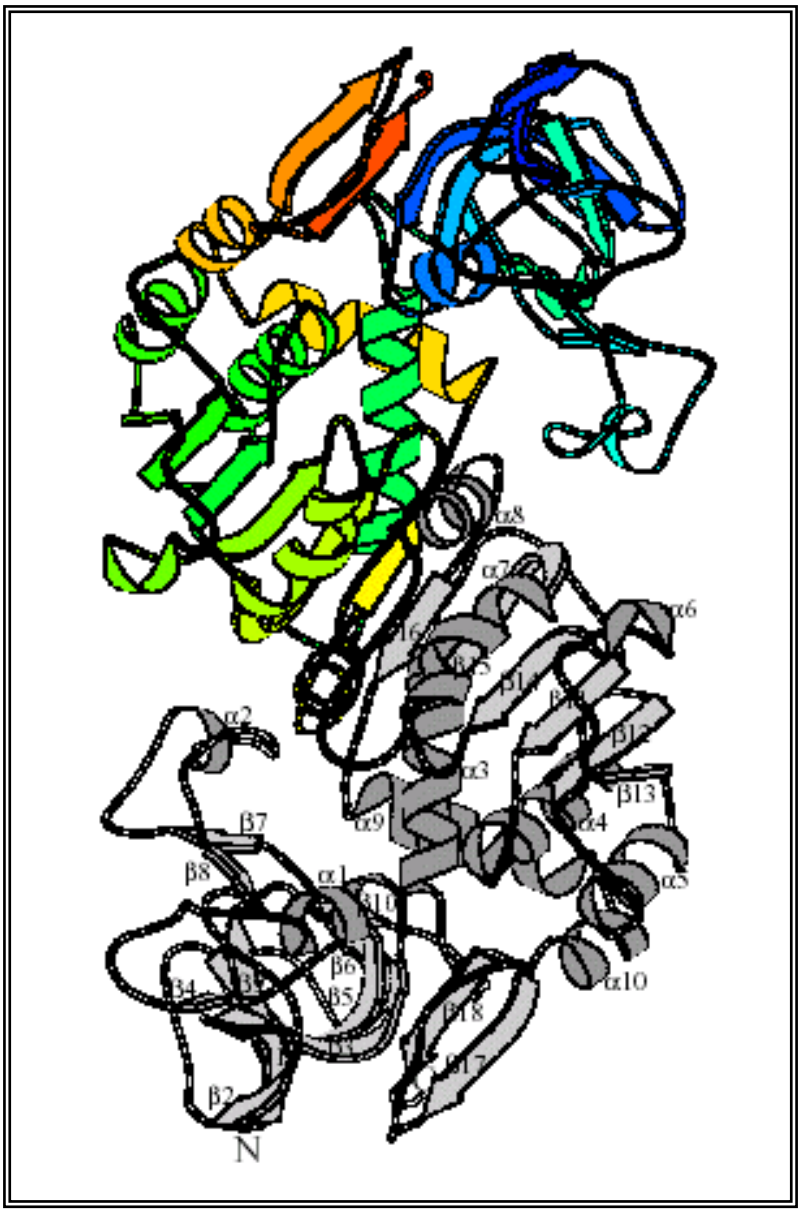

Figura 58: Representación esquemática del dímero GlcDH D38C (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

La topología de la proteína halófila es muy similar al publicado para la GlcDH de *T. acidophilum* (John y col., 1994) (Figura 59). Las diferencias más significativas entre ellas se encuentran en los la longitud de los lazos que conectan elementos de estructura secundaria, los cuales son más cortos en la proteína termófila puesto que su estructura es más compacta. En base a la estructura de las

GlcDHs halófila y termófila se realizó un alineamiento de secuencias, en el cual también se muestra las regiones con estructura secundaria (Figura 60).

Figura 59: Superposición de la estructura del monómero de GlcDH de *Hfx. mediterranei* (verde) y GlcDH de *T. acidophilum* (violeta).

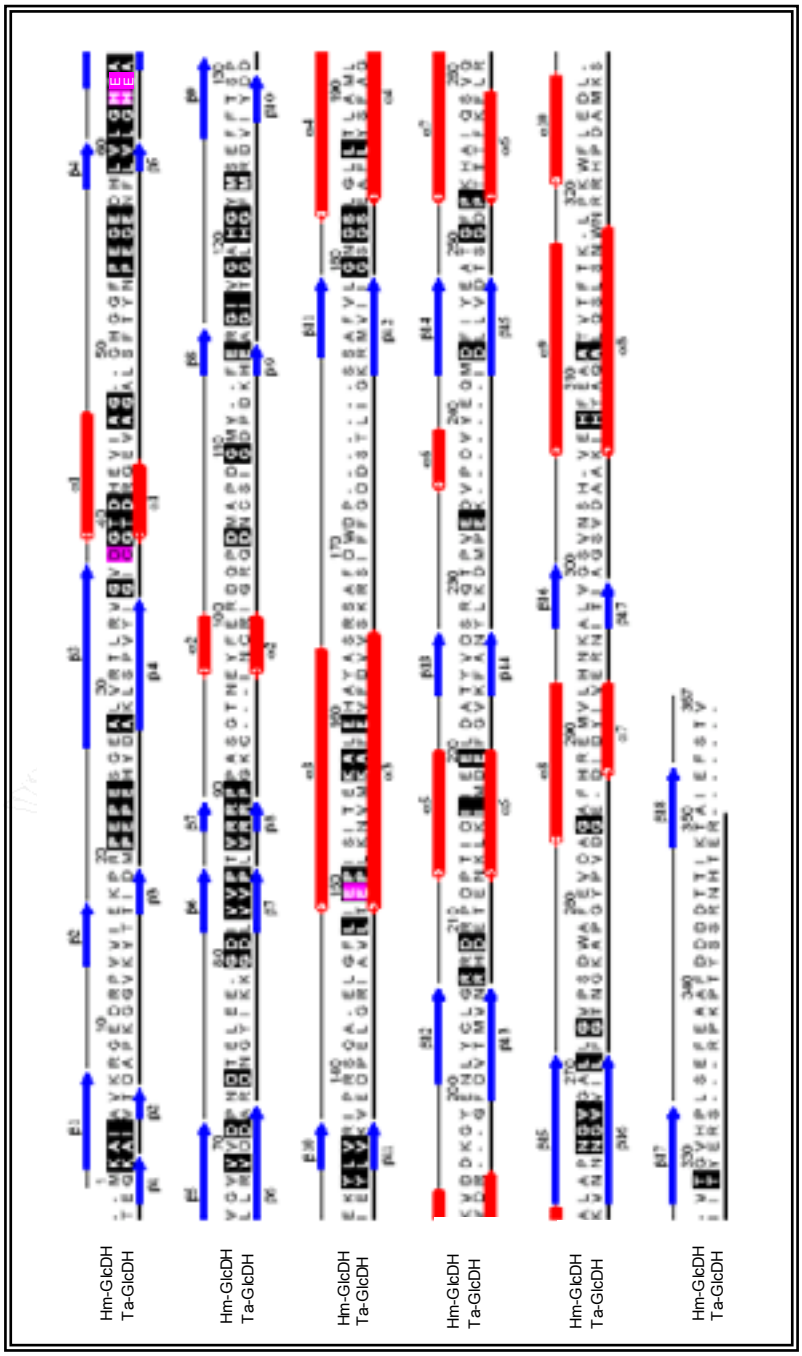

Figura 60: Alineamiento de secuencias basado en las estructuras de las GlcDHs de *Hfx. mediterranei* y *T. acidophilum,* realizado con el programa ALSCRIPT (Barton, 1993). Los residuos conservados en ambas enzimas se muestran subrayados en color negro, y los residuos cercanos al sitio de unión al zinc en rosa. Los elementos de estructura secundaria de la estructura tridimensional se muestran por encima y por debajo de las secuencias, representándose en forma de cilindros las hélices-α y en forma de flecha las hojas-β (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

5.2.5.2.- Análisis de la estructura cuaternaria

Los estudios bioquímicos realizados con anterioridad indican que la GlcDH de *Hfx. mediterranei* es un dímero (Bonete y col., 1996), mientras que GlcDH de *T. acidophilum* es un tetrámero (Smith y col., 1989) (Figura 61). Sin embargo, comparaciones entre las estructuras de ambas proteínas ponen de manifiesto que el modo de dimerización de la proteína halófila es prácticamente idéntico a la forma en la que interaccionan las subunidades A y D de la GlcDH termofílica (nomenclatura descrita en John y col., 1994). El análisis de la interfaz del dímero de la GlcDH halófila reveló que un total de 2300 $Å^2$ del área accesible al disolvente (de cerca de 50 $Å^2$) se encuentra oculta en esta interfaz, constituyendo un 14 % de la superficie del monómero. En la formación del tetrámero de la GlcDH de *T. acidophilum*, el 20% de la superficie accesible al disolvente del monómero está oculta en la interfaz del dímero entre las subunidades A y D siendo el valor del área accesible al disolvente que se encuentra oculta en esta interfaz de 1800 $Å^2$.

Este tipo de interacción también se ha observado entre las subunidades de la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH), la cual guarda una gran homología estructural con la GlcDH de *T. acidophilum* a pesar de que sus secuencias poseen una baja similaridad. Además, la HLADH es un dímero, al igual que la GlcDH de *Hfx. mediterranei*, e interesantemente el modo en el que se asocian sus dos subunidades es también idéntico al propuesto para el dímero de la proteína halófila.

En general, las proteínas que forman parte de la familia MDR muestran organizaciones estructurales muy similares, considerándose a aquellas proteínas tetraméricas como dímeros de diméros, aunque la similaridad de sus secuencias se encuentra entre el 20 y el 30% (Banfield y col. 2001). En consecuencia, enzimas con diferentes secuencias y procedentes de distintos organismos poseen una elevada homología estructural, lo cual les permite llevar a cabo funciones similares.

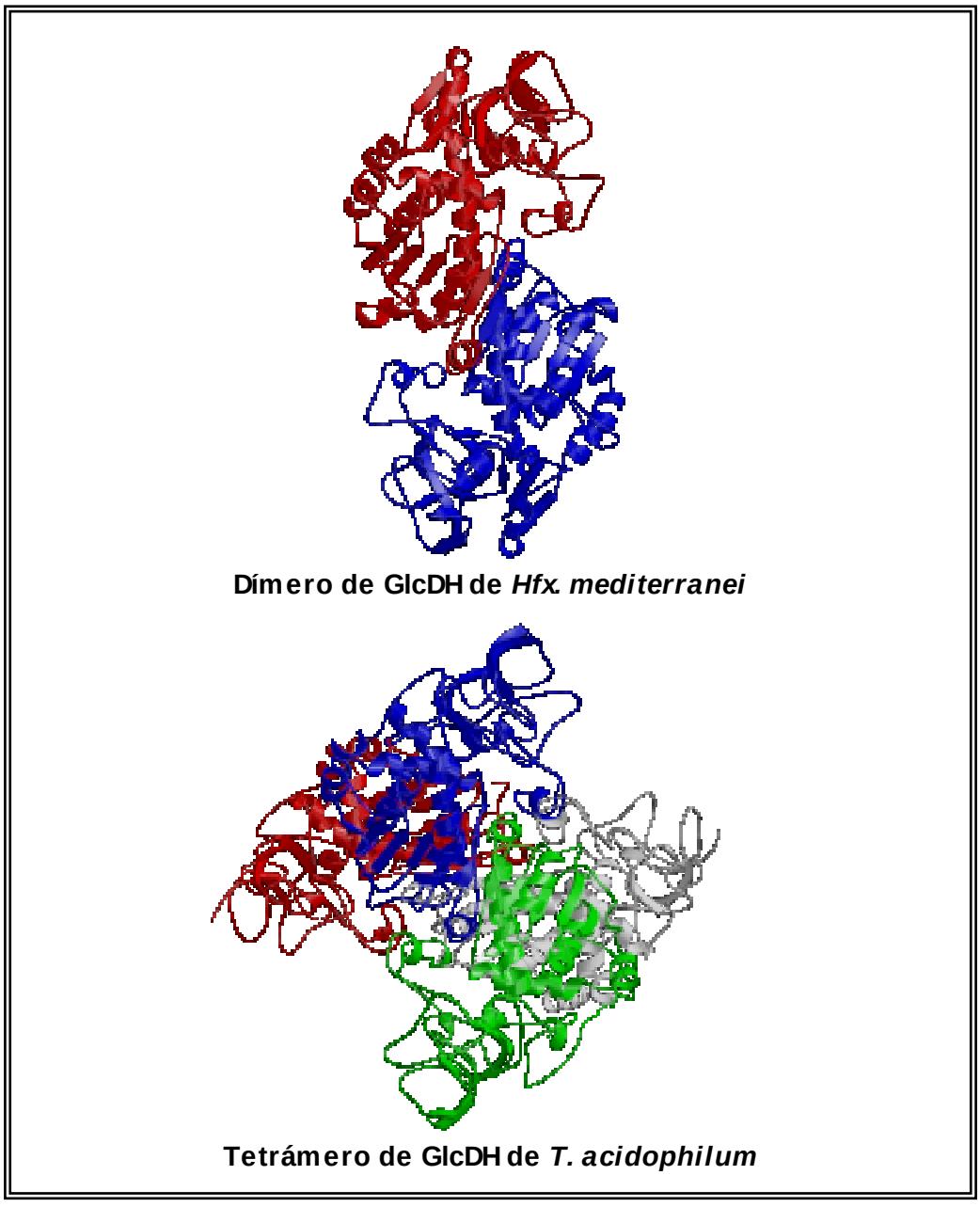

Figura 61: Estructura cuaternaria de GlcDH de *Hfx. mediterranei* y *T. acidophilum.*

5.2.5.3.- Análisis de la superficie accesible al disolvente

La comparación del carácter global de la superficie accesible al disolvente entre el dímero de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* y el tetrámero de la GlcDH de *T. acidophilum* muestra claramente un incremento del carácter acídico y una reducción del carácter no-polar en la proteína halófila (Tabla 18). Así, la densidad de carga neta para el dímero de la proteína halófila ($-2,5 \times 10^{-3}$ eÅ^2) es mucho mayor que para el tetrámero de la GlcDH termófila ($-0,6 \times 10^{-3}$ eÅ^2) (Figura 62) y comparable con los valores descritos para otras proteínas halofílicas (Frolow y col., 1996; Britton y col., 1998). Estas diferencias no se han observado en la superficie que se encuentra oculta en la interfaz del dímero de la enzima de *Hfx. mediterranei.*

Tabla 18: *Características de las zonas accesibles al disolvente en el tetrámero de GlcDH de T. acidophilum comparadas con el dímero de GlcDH de Hfx. mediterranei.*

Características de las zonas accesibles al disolvente	***H. mediterranei***		***T. acidophilum***	
	(Å^2)	**(%)**	**(Å^2)**	**(%)**
Carácter no polar	12050	44	26500	51
Carácter polar	6800	25	12700	24
Carácter negativo	6500	23	7000	13
Carácter positivo	2150	8	6350	12
Área total expuesta	27500		52550	

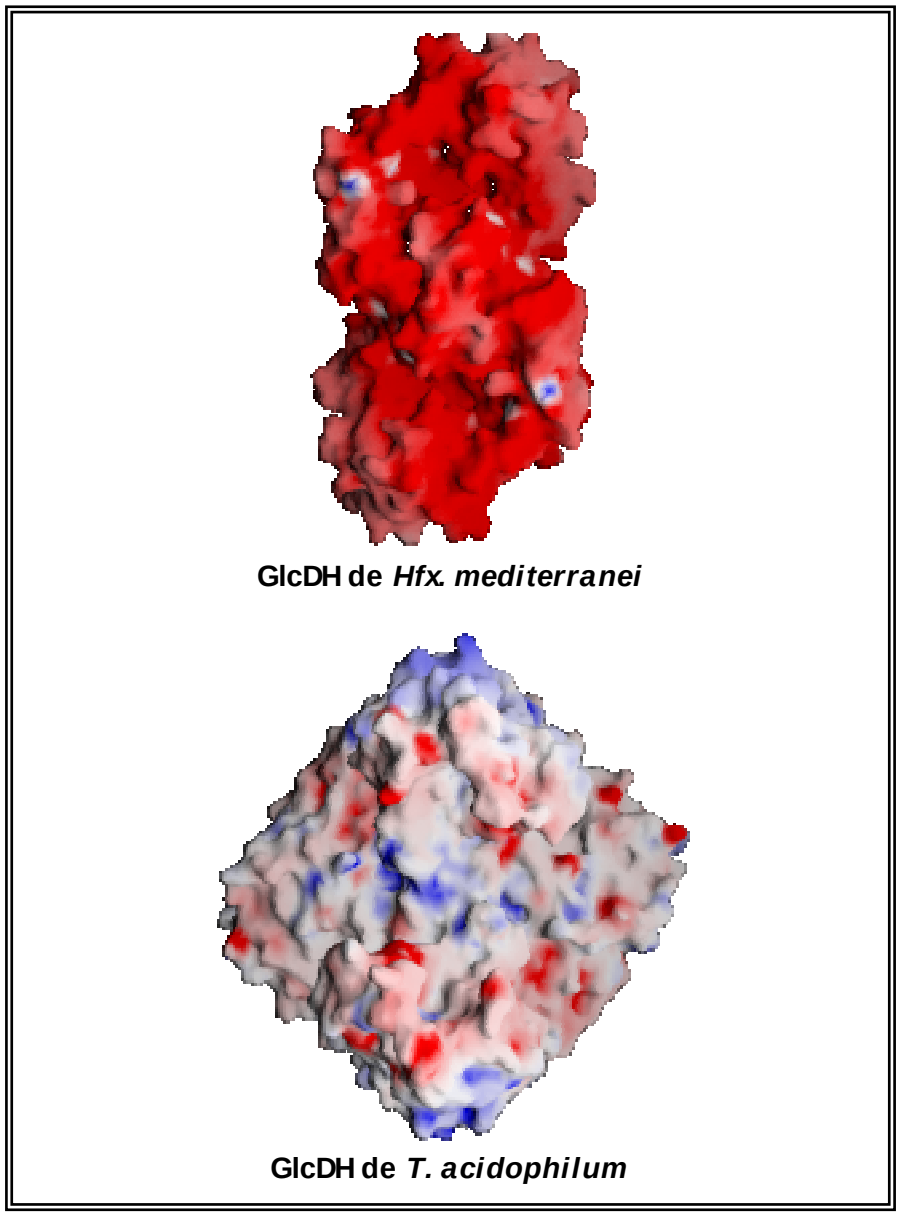

Figura 62: Comparación del potencial electrostático de la superficie de las GlcDHs. El carácter acídico se muestra en color rojo y el carácter básico en color azul.

El análisis de la naturaleza de los residuos que contribuyen a la reducción del carácter no polar en la superficie de la proteína (de un 51 % en la GlcDH termófila a un 44 % en la GlcDH halófila) muestra que dicha disminución no deriva de ningún cambio en la distribución de los residuos fuertemente hidrofóbicos, incluso la fracción del total del área accesible al disolvente correspondiente a tales residuos aumenta en la GlcDH de *Hfx. mediterranei* (Tabla 19). A pesar de que el

contenido de Ala se ha incrementado en la proteína halófila, no existen diferencias significativas en el porcentaje de residuos de este tipo expuestos a la superficie entre las GlcDHs termófila y halófila y, además, la contribución global de los residuos de alanina al carácter hidrofóbico de la superficie en ambas proteínas es pequeña. La reducción del carácter no polar en la GlcDH de *Hfx. mediterranei*, y una de las diferencias más notables entre las superficies de las proteínas halófilas y no halófilas, deriva de una importante reducción en el porcentaje del área expuesta a la superficie correspondiente a las cadenas laterales de los residuos de lisina, que desciende desde un 14,2 % en la GlcDH de *T. acidophilum* a un 4,8 % en la GlcDH de *Hfx. mediterranei*. En general, la reducción en dos veces del contenido de lisinas en la secuencia de la GlcDH halófila, se traduce en un porcentaje del área hidrofóbica de la superficie expuesta al disolvente debido a los residuos de lisina 4 veces menor, como resultado de la pérdida de los grupos alquilos de estas cadenas laterales, los cuales contribuyen en un 9,4 y 2,6 % a la superficie en las GlcDHs de *T. acidophilum* y *Hfx. mediterranei*, respectivamente (Tabla 19). Este cambio es el factor predominante en las diferencias globales relacionadas con los residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie, y ya fue anticipado en un estudio en el que se comparó la estructura de la proteína mesófila glutamato deshidrogenasa con el modelo de la enzima homóloga halófila de *Hbt. salinarum* (Britton y col., 1998). Este análisis se extendió para comparar la estructura de la malato deshidrogenasa (MDH) de *Har. marismortui* (Dym y col., 1995) con la lactato deshidrogenasa (LDH) de cazón (Abad-Zapatero y col., 1987), y como en el caso anterior también se observó una reducción global en el porcentaje del área accesible al disolvente correspondiente a las cadenas laterales de lisinas (de un 19,6 % en LDH hasta un 3,6 % en la MDH halófila). Esta tendencia no se ha detectado en los residuos de arginina, indicando que el factor importante es la reducción de grupos alquilo.

Tabla 19: *Área de la superficie accesible al disolvente calculada para determinadas cadenas laterales de GlcDH de Hfx. mediterranei (Hm) y de T. acidophilum (Ta). También se muestra el área hidrofóbica de la superficie accesible al disolvente.*

Cadena lateral	Área total accesible al disolvente		Área total hidrofóbica accesible al disolvente	
	Hm (%)	*Ta* (%)	*Hm* (%)	*Ta* (%)
Asp	13,8	9,9	3,8	2,9
Glu	18,6	10,3	5,0	4,0
Arg	7,5	10,2	2,5	3,6
Lys	4,8	14,2	2,6	9,4
His	1,5	2,5	1,0	1,8
Ser	3,2	3,8	1,7	2,0
Thr	3,7	3,6	2,1	2,4

5.2.6.- Identificación de contraiones y determinación preliminar de estructuras de moléculas de agua y de sus interacciones con la superficie de la proteína

Debido a la elevada carga negativa de la superficie de las proteínas halófilas se predijo la existencia de un significativo número de cationes en dichas enzimas. Sin embargo, el análisis del mapa de densidad electrónica de la GlcDH D38C permitió únicamente la identificación de cinco iones de potasio, los cuales se encuentran en la superficie de la proteína rodeados de cargas negativas. Cuatro de estos cationes tienen como ligandos átomos de la proteína que forman su esfera de coordinación (Figura 63a). En el quinto, interacciones carga-carga estabilizan el sitio de unión del catión, pero todos los ligandos del ión potasio son moléculas de agua de la primera esfera de hidratación (Figura 63b). A pesar del predominio de grupos carboxilo en la superficie de la proteína, de los diez ligandos de la proteína que coordinan los cinco átomos de potasio, ocho son oxígenos de grupos carbonilo de la cadena principal de la proteína, uno es un grupo hidroxilo de una treonina y sólo uno tiene una interacción directa con el grupo carboxilo de la cadena lateral de un residuo de aspártico (Asp172 OD1/ K^+ 702 (2,74 Å)). También se ha identificado en la estructura un ión de citrato en la superficie de la proteína, el cual forma

interacciones con dos residuos consecutivos de la hélice α7 (Lys254 e His255) y el anillo de adenina del $NADP^+$.

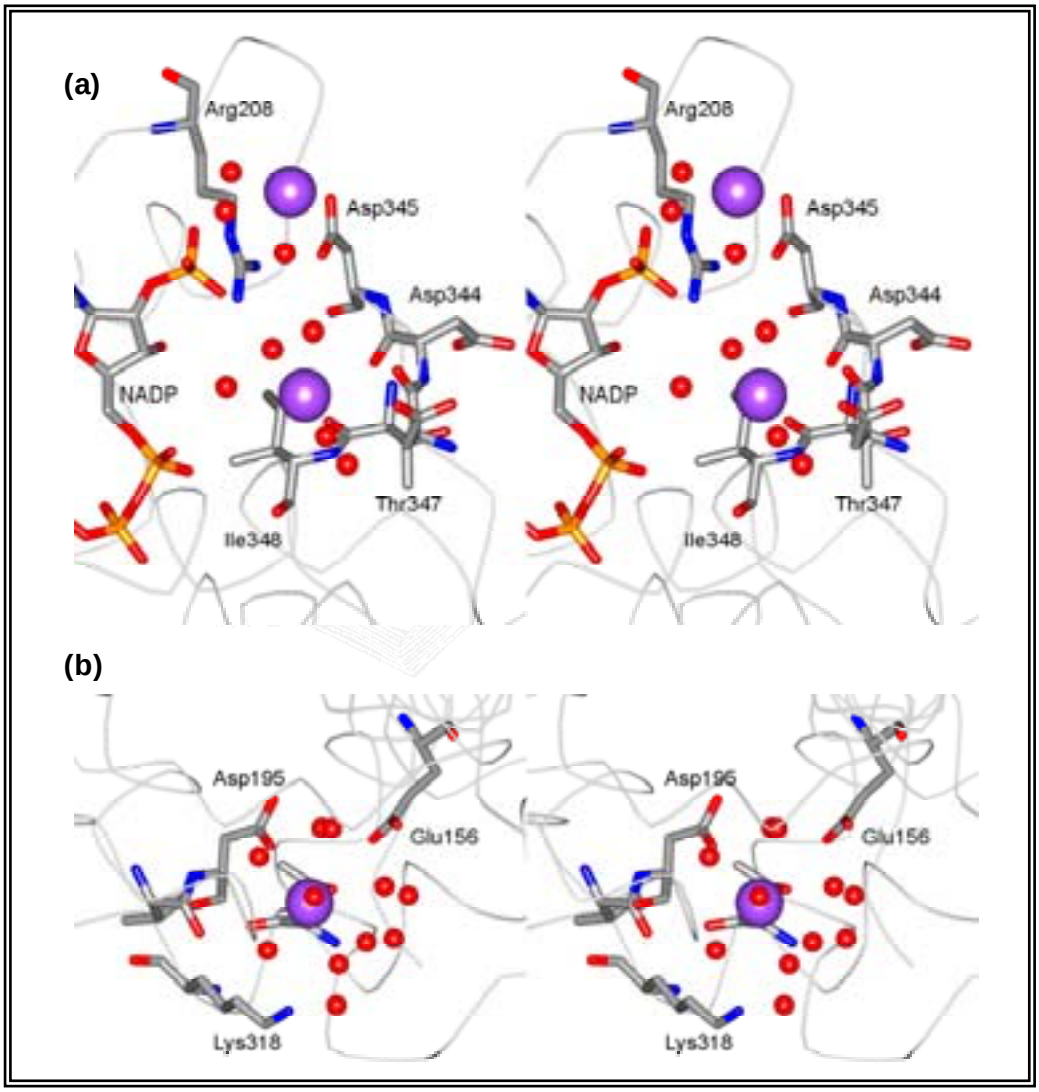

Figure 63: Visión en estéreo de la localización de tres átomos de potasio (esferas lilas). Los residuos marcados se encuentran a una distancia inferior a 3.5 Å de cada catión. Las moléculas de agua se muestran como esferas de color rojo. En (a) se puede observar el cofactor $NADP^+$, el cual se encuentra próximo a la agrupación de átomos que coordinan dos iones potasio (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

El número de contraiones identificados en otras estructuras de proteínas halofílicas, se encuentra muy próximo a la cantidad de iones de potasio observados en la GlcDH. Así, en la estructura de la ferredoxina de *Har. marismortui* se asignaron seis picos de densidad electrónica a iones de potasio, los cuales interaccionan con átomos de la proteína y con moléculas de agua (Frolow y col., 1996). En el caso de la estructura de la malato deshidrogenasa de *Har. marismortui* los contraiones identificados fueron dos átomos de Na^+ y cuatro de Cl^- por tetrámero (Richard y col., 2000; Irimia y col., 2003), los cuales contribuyen a la estabilidad de los dímeros que constituyen la proteína cuando ésta se encuentra en medios con bajas concentraciones salinas.

La esfera de solvatación de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* es extensa e incluye una red multi-capa de moléculas de agua que cubren la superficie de la proteína. El número de moléculas de agua por residuo de proteína en la GlcDH halófila es 1,9. Este valor es más elevado que la media calculada para un conjunto de 614 estructuras (1,2) depositadas en la base de datos PDB hasta julio de 2002 y resueltas entre 1,65 y 1,55 Å. Estos datos son coherentes con la idea de que las proteínas halófilas se encuentran rodeadas por una esfera de hidratación que contribuye a su estabilidad y solubilidad en los medios en los que se encuentran (Lanyi, 1974; Eisenberg y col., 1992; Frolow y col., 1996; Madern y col., 2000).

5.2.7.- Comparación del complejo binario GlcDH D38C en presencia de $NADP^+$ y zinc con el complejo GlcDH silvestre con NADPH y zinc

La estructura resuelta a 1,6 Å del complejo binario GlcDH D38C con $NADP^+$ y zinc (Figura 64) se comparó con la estructura de la GlcDH silvestre en presencia de NADPH y zinc, que ha sido refinada recientemente por el grupo de investigación de la Universidad de Sheffield. La diferencia más significante entre ambas estructuras se encuentra en los ligandos del átomo de zinc catalítico. En la enzima silvestre los cuatro ligandos del zinc catalítico son dos oxígenos de los grupos carboxilos de los residuos Glu64 y Glu150, y un átomo de nitrógeno de la His63, ocupando la cuarta posición una molécula de agua (Figura 65). En la estructura del mutante GlcDH D38C permanecen como ligandos del zinc los residuos Glu64 e His63, pero el Glu150 se encuentra demasiado alejado de dicho átomo y no forma

ninguna interacción con él. En lugar del Glu150, una molécula de agua ocupa su lugar, y en la cuarta posición se encuentra el azufre del residuo Cys38. Sorprendentemente, aunque en las dos estructuras se ha identificado una molécula de agua coordinando el átomo de zinc, su posición es diferente en cada una de las proteínas (Figuras 64 y 65). Además, existen otras diferencias estructurales como el movimiento, de 1,0 Å aproximadamente, de la hélice α1 en la estructura de la GlcDH D38C con respecto a la proteína silvestre (Figura 66).

Por tanto, al comparar estas estructuras se observa que las posiciones de los residuos His63, Glu64 y Glu150 son prácticamente las mismas, consistiendo la diferencia más significativa (además del movimiento conformacional asociado a la hélice α1) en el cambio de la posición del átomo de zinc catalítico (Figura 67).

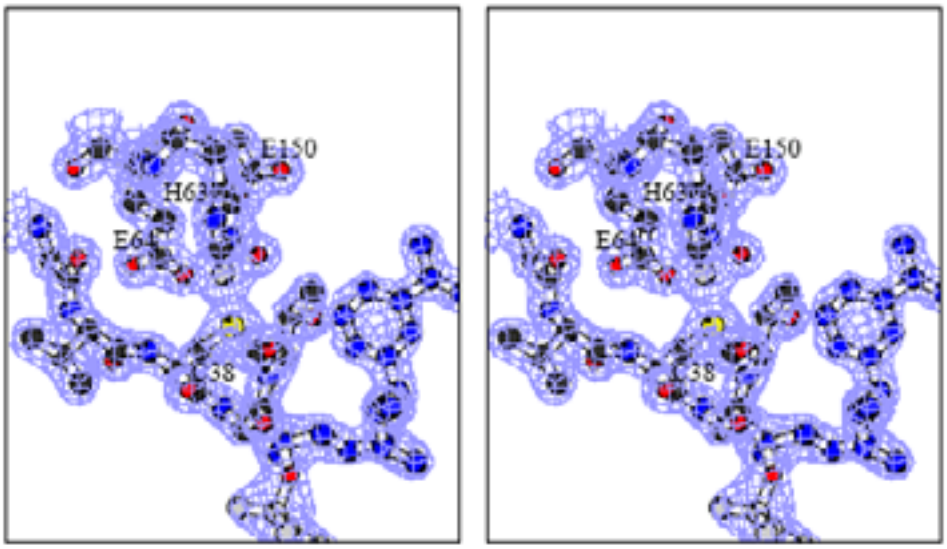

Figura 64: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica de la zona próxima al átomo de zinc y el $NADP^+$ de la GlcDH D38C en la estructura resuelta a 1,6 Å (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

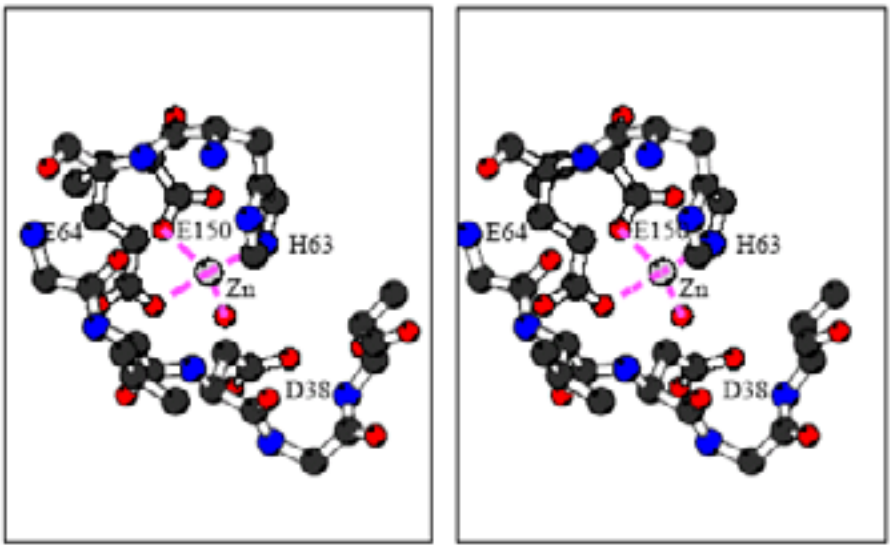

Figura 65: Visión en estéreo de los ligandos del átomo de zinc catalítico en el complejo binario GlcDH silvestre en presencia de NADPH y zinc (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

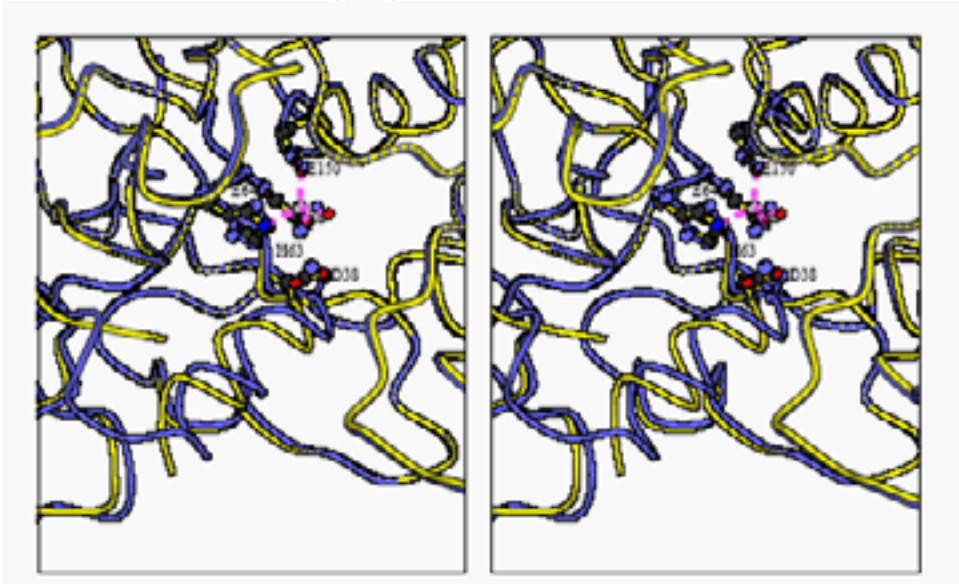

Figura 66: Movimiento de la hélice α1 entre la estructura del mutante GlcDH D38C con $NADP^+$ y zinc (azul) y la estructura de la proteína silvestre GlcDH con NADPH y zinc (amarillo) (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

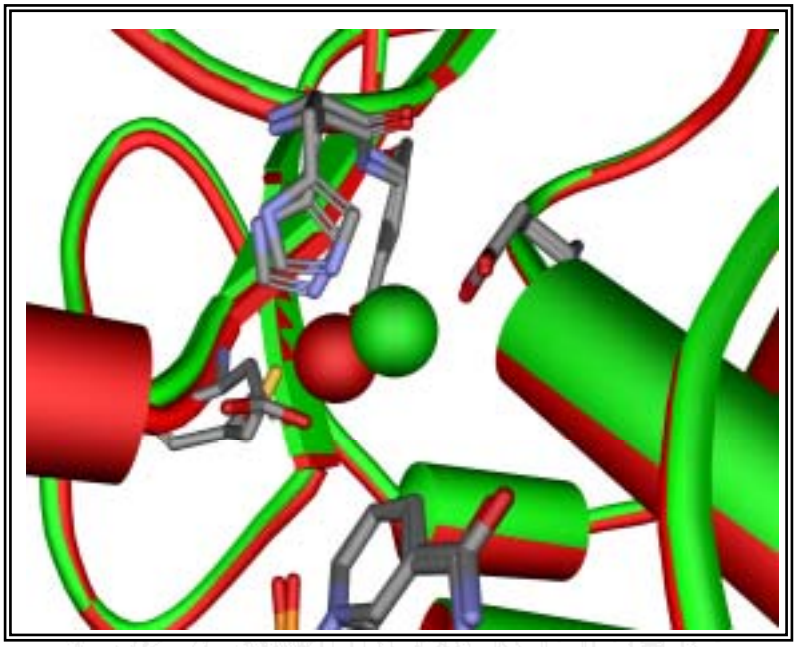

Figura 67: Superposición del sitio de unión del zinc catalítico entre las estructuras de la GlcDH silvestre con NADPH y zinc (rojo) y la GlcDH D38C en presencia de $NADP^+$ y zinc (verde) .

Aunque no existen dudas en cuanto a que la mutación D38C introduce cambios en el centro activo de la GlcDH, que pueden modificar las propiedades funcionales de la enzima, en estos momentos no se sabe con certeza porqué la actividad de la proteína GlcDH D38C es menor que la de la proteína silvestre. Además, se debe tener presente que frecuentemente las mutaciones introducidas en el centro activo de las enzimas conllevan la pérdida de la actividad de ésta, sin embargo, el mutante GlcDH D38C muestra aproximadamente un 30% de la actividad de la proteína salvaje.

La estructura del mutante GlcDH D38C también se comparó con la GlcDH del termófilo *T. acidophilum*, en la cual los ligandos del átomo de zinc son similares a los de la proteína mutada, exceptuando la molécula de agua que no se ha podido identificar puesto que su estructura está resuelta a 2,9 Å (Figura 68). Asimismo, en la comparación realizada se observó que el átomo de zinc catalítico ocupa una posición muy similar en ambas estructuras (Figura 69). Al comparar los parámetros cinéticos de la GlcDH termófila y del mutante GlcDH D38C se observa que la $K_{glucosa}$

es muy similar entre ambas proteínas (12,4 ± 2,3 para la GlcDH D38C y 10,0 ± 0,9 para la GlcDH de *T. acidophilum*), sin embargo, sí que existen diferencias en los valores de la K_{NADP} (0,044 ± 0,010 para la GlcDH D38C y 0,113 ± 0,011 para la GlcDH termófila). Por tanto, desde un punto de vista estructural el centro de unión del átomo de zinc catalítico en el mutante GlcDH D38C es más similar al de la GlcDH de *T. acidophilum* que a la GlcDH halófila. Aún así, no se puede confirmar que el movimiento del átomo de zinc en el centro activo de la proteína halófila y las diferencias en la naturaleza de los ligandos de dicho átomo constituyan una adaptación halofílica.

BIBLIOTECA VIRTUAL

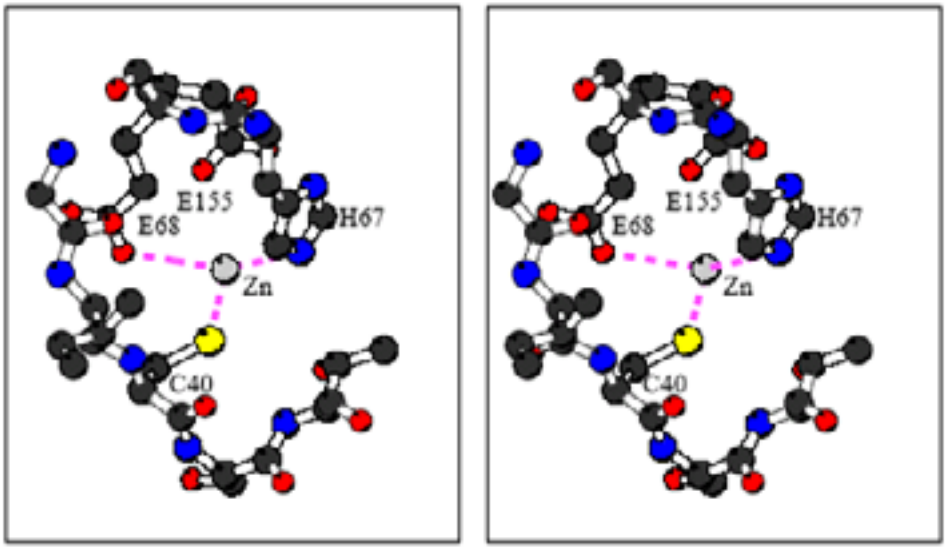

Figura 68: Visión en estéreo de los ligandos del átomo de zinc catalítico en la estructura de la GlcDH de *T. aciophilum* a 2.9 Å de resolución (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

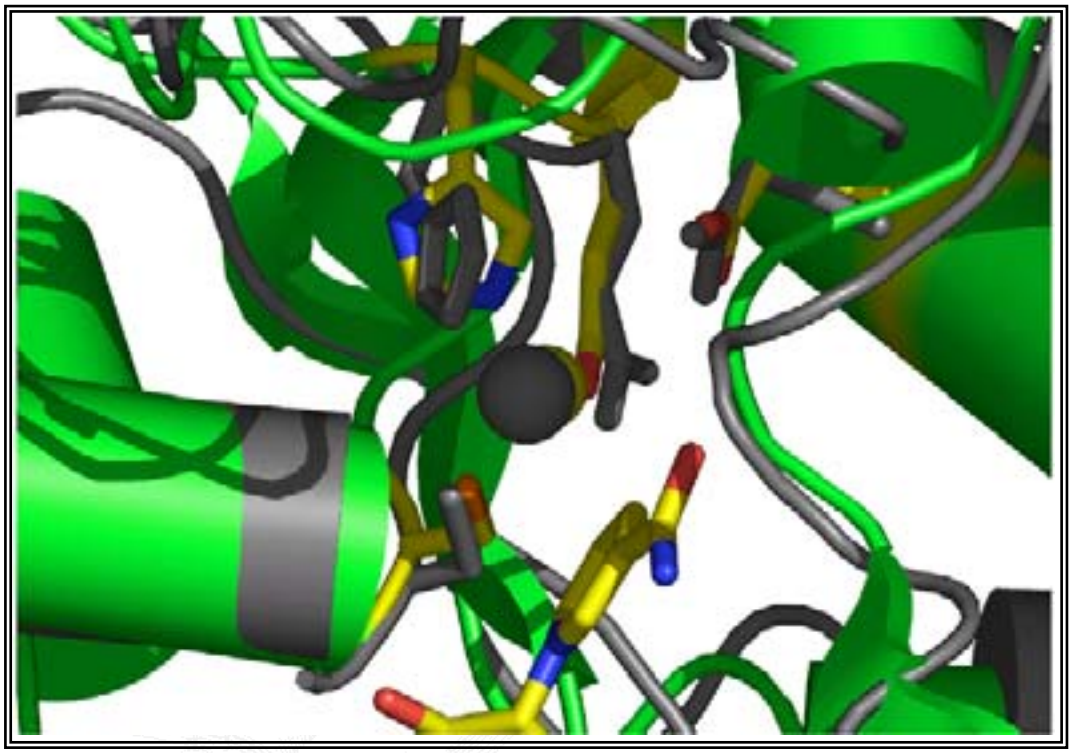

Figura 69: Superposición del sitio de unión del zinc entre la estructura del mutante GlcDH D38C (colores verde y amarillo) y la estructura de la GlcDH de *T. acidophilum* (color gris) (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

5.2.8.- Análisis de las estructuras de GlcDH D38C obtenidas en presencia de diferentes combinaciones de sustratos y productos

Es habitual que una proteína no cristalice en presencia de todas las combinaciones de sustratos y productos posibles. Frecuentemente, este hecho da lugar a estudios incompletos que son parcialmente finalizados mediante el análisis de proteínas homólogas, las cuales pueden ser por sí mismas un tanto diferentes conduciendo a situaciones confusas. No es este el caso de la proteína mutada GlcDH D38C, que se ha cristalizado en presencia de diferentes combinaciones de sustratos y productos permitiendo llevar a cabo un análisis sin precedentes sobre las relaciones estructura/función de esta proteína. En particular, la producción de cristales de los complejos ternarios no productivos, GlcDH D38C–$NADP^+$–gluconolactona y GlcDH D38C–NADPH–glucosa, ha sido de vital importancia en

este estudio. Utilizando como modelo la estructura de la GlcDH D38C en presencia de $NADP^+$ y zinc, y los datos obtenidos de la difracción de los diferentes cristales obtenidos, se resolvieron las siguientes estructuras:

- Complejo binario GlcDH D38C–NADPH en presencia y ausencia de zinc.
- Complejo ternario no productivo GlcDH D38C con NADPH, glucosa y zinc.
- Complejo ternario no productivo GlcDH D38C con $NADP^+$, gluconolactona y zinc.

Mientras que el refinamiento de estas estructuras todavía está en desarrollo por el grupo de investigación de la Universidad de Sheffield, el análisis preliminar de cada una de ellas ha aportado significativas ideas sobre las relaciones entre la estructura y función de esta proteína.

BIBLIOTECA VIRTUAL

5.2.8.1.- Análisis del complejo binario GlcDH D38C en presencia de NADPH y zinc

El análisis del mapa de densidad electrónica alrededor del NADPH y del átomo de zinc catalítico confirmó la posición del cofactor y, la coordinación tetraédrica del metal mediante tres ligandos de la proteína (Cys38, Glu150 e His63) y una molécula de agua (Figura 70). En las comparaciones realizadas entre esta estructura y la del complejo equivalente formado por GlcDH D38C y $NADP^+$ en presencia de zinc (Figura 64) no se observan diferencias significativas, no existiendo cambios conformacionales inducidos por la unión del cofactor en forma oxidada o reducida.

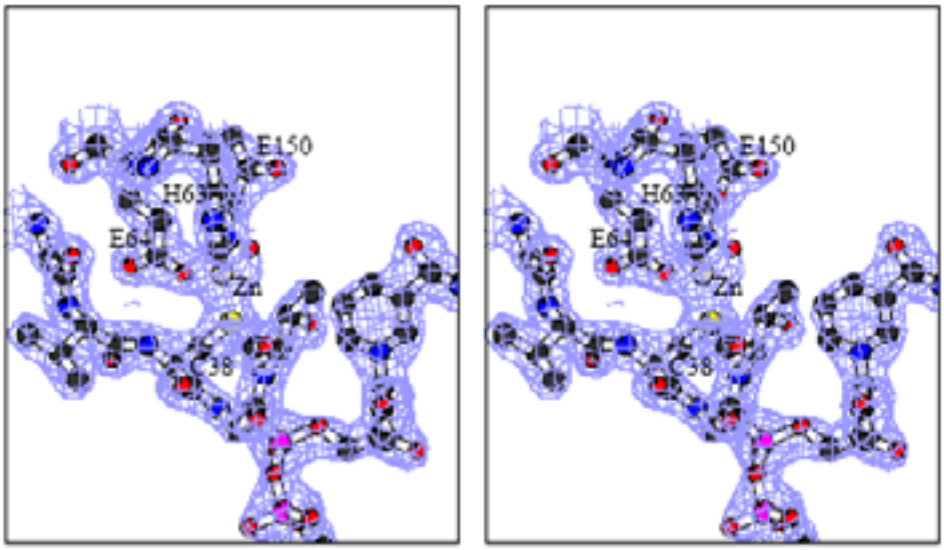

Figura 70: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica de la zona que rodea el átomo de zinc en el complejo binario GlcDH D38C en presencia de NADPH y zinc (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

5.2.8.2.- Análisis del complejo binario GlcDH D38C – NADPH en ausencia de zinc

Las comparaciones del complejo binario GlcDH D38C con NADPH en presencia y ausencia de zinc muestra que en conjunto ambas estructuras son muy similares. No obstante, existe un movimiento de la hélice α1 de aproximadamente 1,0 Å que comprende desde el residuo 37 al 51, ambos inclusive (Figura 71). En la estructura con zinc el azufre de la cadena lateral de la Cys38 es uno de sus ligandos, sin embargo, en la estructura obtenida en ausencia del metal esta interacción se ha perdido dando lugar a un cambio conformacional de la Cys38 y de la hélice α1. Curiosamente, la posición de la hélice α1 en la estructura de la GlcDH D38C sin zinc es muy similar a la observada en la estructura del complejo binario de la GlcDH silvestre en presencia de $NADP^+$ y zinc. En ésta última el residuo Asp38 no se encuentra coordinando al átomo de zinc, por tanto parece que el movimiento de la hélice α1 es un cambio conformacional relacionado con la unión del átomo de zinc por el residuo presente en la posición 38. Para confirmar este hecho se requieren más estudios estructurales puesto que no es evidente que en la GlcDH silvestre el residuo Asp38 no pueda ser ligando del átomo de zinc en otros complejos de la enzima.

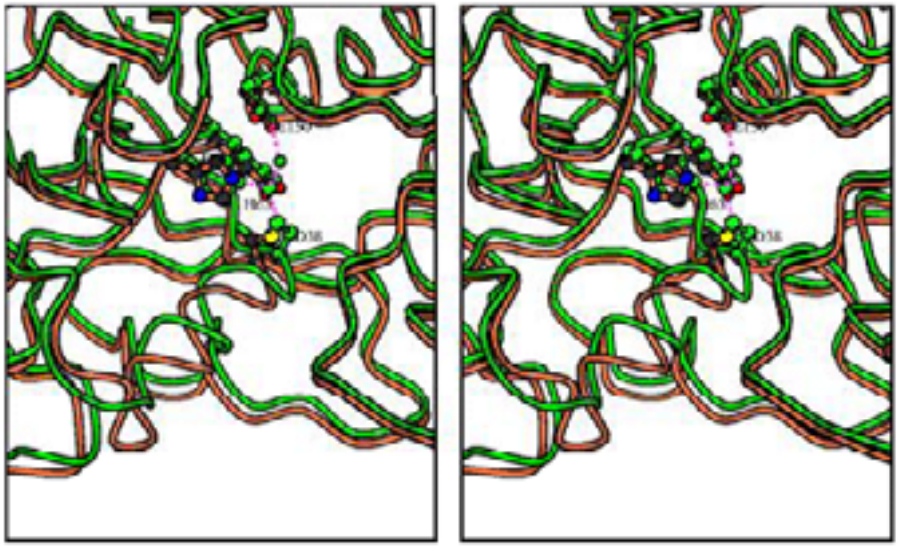

Figura 71: Visión en estéreo de la superposición de las estructuras del complejo binario GlcDH D38C con NADPH en presencia (verde) y ausencia (marrón) de zinc mostrando el movimiento de la hélice α1 (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

5.2.8.3.- Análisis del complejo ternario no productivo GlcDH D38C con $NADP^+$ y gluconolactona

El mapa de densidad electrónica del centro activo de la estructura de la GlcDH D38C con $NADP^+$, gluconolactona y zinc, se muestra en la Figura 72. La comparación de esta estructura con la del complejo binario en presencia de $NADP^+$ y zinc puso de manifiesto el movimiento (aproximadamente 10 Å) de un lazo móvil que comprende los residuos 48–51 (Gly–His–Gly–Gly). Dicho lazo aparece más alejado del centro activo (“abierto”) en la estructura resuelta en ausencia de gluconolactona, y más cercano al centro activo (“cerrado”) en su presencia (Figura 73). Si el lazo permaneciera en la conformación “cerrada” en ausencia del azúcar, su acceso al centro activo sería imposible no produciéndose ningún tipo de reacción. La interacción clave para que el lazo permanezca más cercano al centro activo es el puente de hidrógeno que se establece entre el átomo NE2 del residuo His49 y el O6 del grupo hidroxilo de la gluconolactona. Parece ser que esta interacción estabiliza la estructura de la proteína en la conformación “cerrada”. La

secuencia de este lazo, incluyendo la His49, no se encuentra conservada ni en la GlcDH de *T. acidophilum* ni en la GlcDH de *S. solfataricus.* En la proteína de *T. acidophilum*, la secuencia que se correspondería con este lazo muestra diferencias considerables, pero todavía no se ha determinado si existe un cambio conformacional similar en dicha estructura. No obstante, se han identificado estructuras similares al lazo móvil de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* en otras proteínas pertenecientes a la familia MDR, como por ejemplo la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (Eklund y col., 1981) y la alcohol deshidrogenasa de *S. solfataricus* (Esposito y col., 2002).

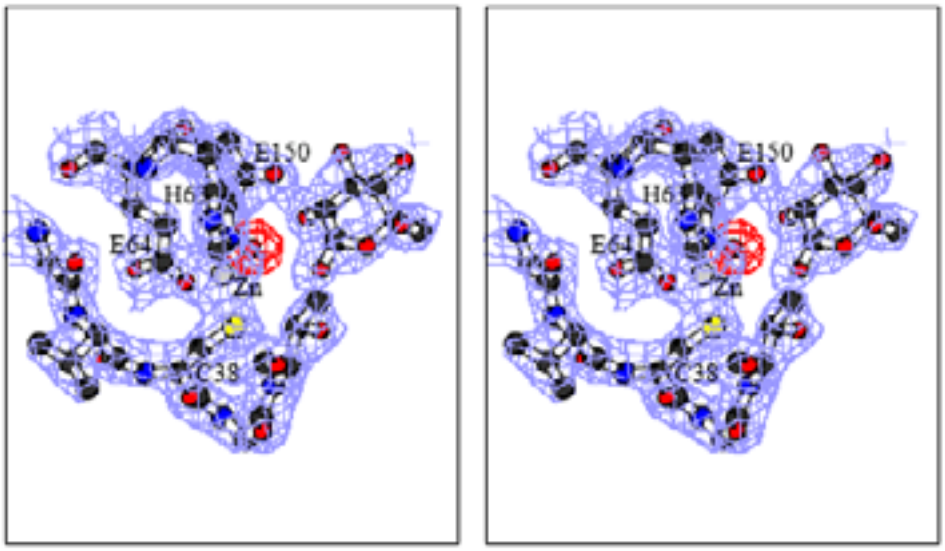

Figura 72: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica del centro activo de la proteína y alrededor de la gluconolactona en la estructura del complejo ternario no productivo GlcDH D38C en presencia de gluconolactona, $NADP^+$ y zinc. La densidad positiva (rojo) de la diferencia de los mapas en las últimas etapas de refinamiento de la estructura confirma la presencia de una molécula de agua en la esfera de coordinación del zinc, la cual ha sido incorporada en el modelo (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

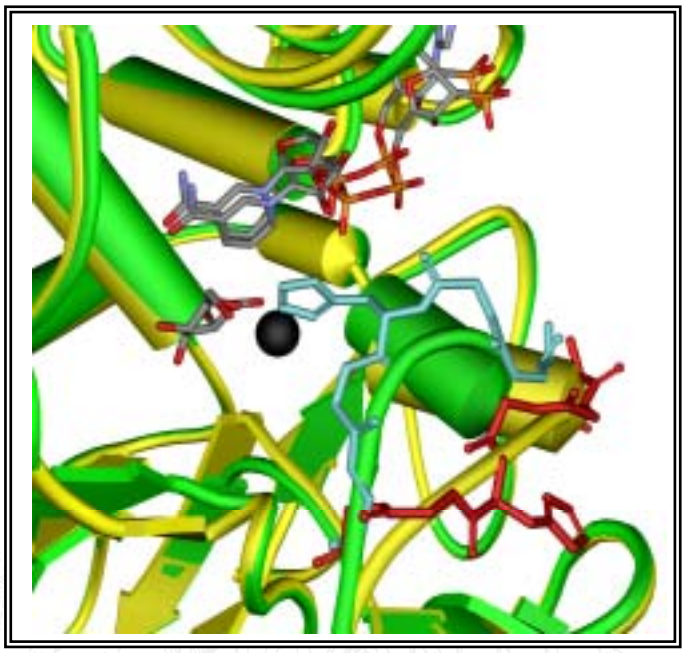

Figura 73: Cambio conformacional entre la estructura del complejo binario GlcDH D38C con $NADP^+$ y zinc (amarillo y rojo) y del complejo ternario no productivo GlcDH D38C en presencia de $NADP^+$, gluconolactona y zinc (verde y azul).

Además de la interacción entre el O6 del grupo hidroxilo de la gluconolactona y la enzima, existen otras que incluyen la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la Thr40 y el O1 del azúcar, la molécula de agua unida al zinc y el O2 de la gluconolactona, el grupo carbonilo de la cadena lateral del residuo Asn303 y el O3 del azúcar, y la cadena lateral del residuo Glu114 y el O4 de la gluconolactona. No parece existir ningún puente de hidrógeno en el que participe el O5 del azúcar. Estas interacciones se pueden observar en las Figuras 74 y 75. En la GlcDH de *T. acidophilum* todos los residuos implicados en las interacciones descritas anteriormente están conservados, con la excepción del Asn303 que se encuentra reemplazado por un Asp (en la proteína termófila). En la GlcDH de *S. solfataricus* también se encuentra conservado este patrón de secuencia, la única diferencia consiste en el reemplazamiento del Glu150 (en la GlcDH halófila) por Gln en la GlcDH termófila.

Las interacciones entre el $NADP^+$ y la proteína en este complejo (Figuras 74 y 75) incluye puentes de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo de la cadena principal de los residuos Leu272 y Ser301 y el nitrógeno del grupo amida

del anillo nicotinamida, entre el nitrógeno del grupo amida de la cadena principal del residuo Asn303 con el oxígeno del grupo amida del anillo de nicotinamida. El residuo Leu272 se encuentra reemplazado por Phe tanto en la GlcDH de *T. acidophilum* como en la de *S. solfataricus*, la Ser301 está conservada en la primera de ellas pero está sustituida por Leu en la GlcDH de *S. solfataricus*. El oxígeno 2' hidroxilo de la ribosa del anillo de nicotinamida interacciona con el OE1 y OE2 del Glu43 y con el grupo hidroxilo de la cadena lateral Thr40, y el oxígeno 3' hidroxilo con el nitrógeno de la cadena principal de la Val274. Mientras que el residuo de Thr40 se mantiene conservado en ambas enzimas termófilas, la Val274 está sustituida por Thr y Phe en la GlcDH de *T. acidophilum* y de *S. solfataricus*, respectivamente, y además el Glu43 se encuentra reemplazado por Gly en la primera de ellas.

El 2' fosfato de la adenosina está estabilizado por interacciones con las cadenas laterales de los residuos Arg207 y Arg208, ambos conservados en la GlcDH de *S. solfataricus*. Sin embargo, en la GlcDH de *T. acidophilum* el residuo Arg208 está sustituido por His. El 5' fosfato del nucleótido de nicotinamida interactúa con el nitrógeno de la cadena principal de los residuos Ser183, Leu184 y Gly39. La Gly39 se mantiene tanto en la GlcDH de *T. acidophilum* como en la de *S. solfataricus*, la Ser183 se encuentra reemplazada por Pro en la GlcDH de *S. solfataricus*, y la Leu184 por Glu e Ile en la enzima de *T. acidophilum* y de *S. solfataricus*, respectivamente. Finalmente, el O3 de la ribosa interacciona con el oxígeno de la cadena lateral de Asn181, el cual está sustituido por Ser en la GlcDH de *T. acidophilum* y por Thr en la GlcDH de *S. solfataricus*.

En base a estos resultados, no hay diferencias relevantes en cuanto a la unión del $NADP^+$ entre la GlcDH halófila y las GlcDHs termófilas. La mayoría de los residuos clave están conservados en ambas enzimas, y no hay un incremento significativo de residuos ácidos. Sin embargo, sí que existen cambios entre los aminoácidos expuestos a la superficie que afectan a la unión del coenzima. Por ejemplo, en la GlcDH halófila hay dos residuos acídicos (Glu43 y Asp345) que están sustituidos por Gly y Thr, respectivamente, en la GlcDH de *T. acidophilum*. Ambos residuos se encuentran en el dominio catalítico sobresaliendo del sitio activo en la hendidura. No obstante, estas sustituciones no suponen cambios importantes en el sitio de unión del $NADP^+$, ya que los residuos están situados aproximadamente a 7 Å del coenzima y no participan activamente en su unión. En

contraste, hay una sorprendente sustitución en el dominio de unión al nucleótido en la GlcDH halófila, la cual consiste en el cambio de un residuo ácido (presente en la enzima termófila) por fenilalanina (Phe252). Pero al igual que en el caso anterior, este residuo está en una posición alejada del $NADP^+$ no afectando a su unión. Como consecuencia de la ausencia de la estructura de la GlcDH de *T. acidophilum* en presencia de $NADP^+$, no es posible determinar cómo afectan estos cambios de secuencia a la unión del nucleótido. Por tanto, es muy difícil explicar si alguna de estas sustituciones específicas constituye una adaptación halofílica.

Como se ha comentado anteriormente, la GlcDH de *Hfx. mediterranei* es catalíticamente activa en presencia del coenzima $NADP^+$ o NAD^+, aunque muestra una marcada preferencia por el primero de ellos. Esta especificidad dual por el coenzima se ha observado también en las GlcDH de *T. acidophilum* y *Termoproteus tenax* (Smith y col., 1989; Siebers y col., 1997). Generalmente, las proteínas que unen NAD^+ tienen un residuo cargado negativamente en el extremo C-terminal de la segunda hebra β del dominio de unión al nucleótido. Esta posición está ocupada por un residuo de glicina (Gly206) en la GlcDH halófila, como era de esperar en una proteína que une preferentemente $NADP^+$, ya que la pequeña cadena lateral de dicho residuo permite el alojamiento del fosfato. En la especificidad por el $NADP^+$ los residuos más importante en la enzima halófila son Arg207 y Arg208 (Figura 75), puesto que favorecen la estabilización del grupo fosfato del $NADP^+$. Las ADHs dependientes de $NADP^+$ de *Clostridium beijerinckii* y *Thermoanaerobacter brockii* muestran un modo de reconocimiento del nucleótido similar al descrito para la GlcDH halófila. La especificidad de estas dos ADH por el NADP(H) está determinada por la presencia de un residuo neutro que interacciona con grupos hidroxilo de la ribosa de la adenosina, junto con la presencia de un residuo básico (en la posición 200) que estabiliza el 2' fosfato del $NADP^+$(Korkhin y col., 1998)

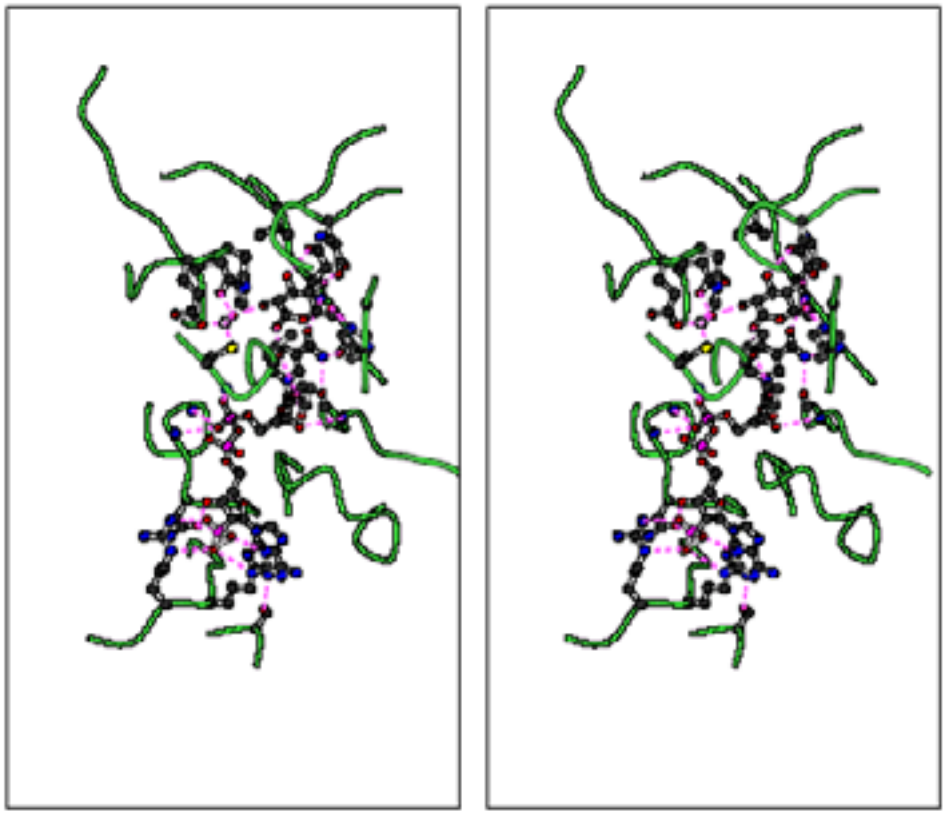

Figura 74: Visión en estéreo de las interacciones entre el $NADP^+$ y la gluconolactona con la GlcDH D38C en presencia de zinc (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

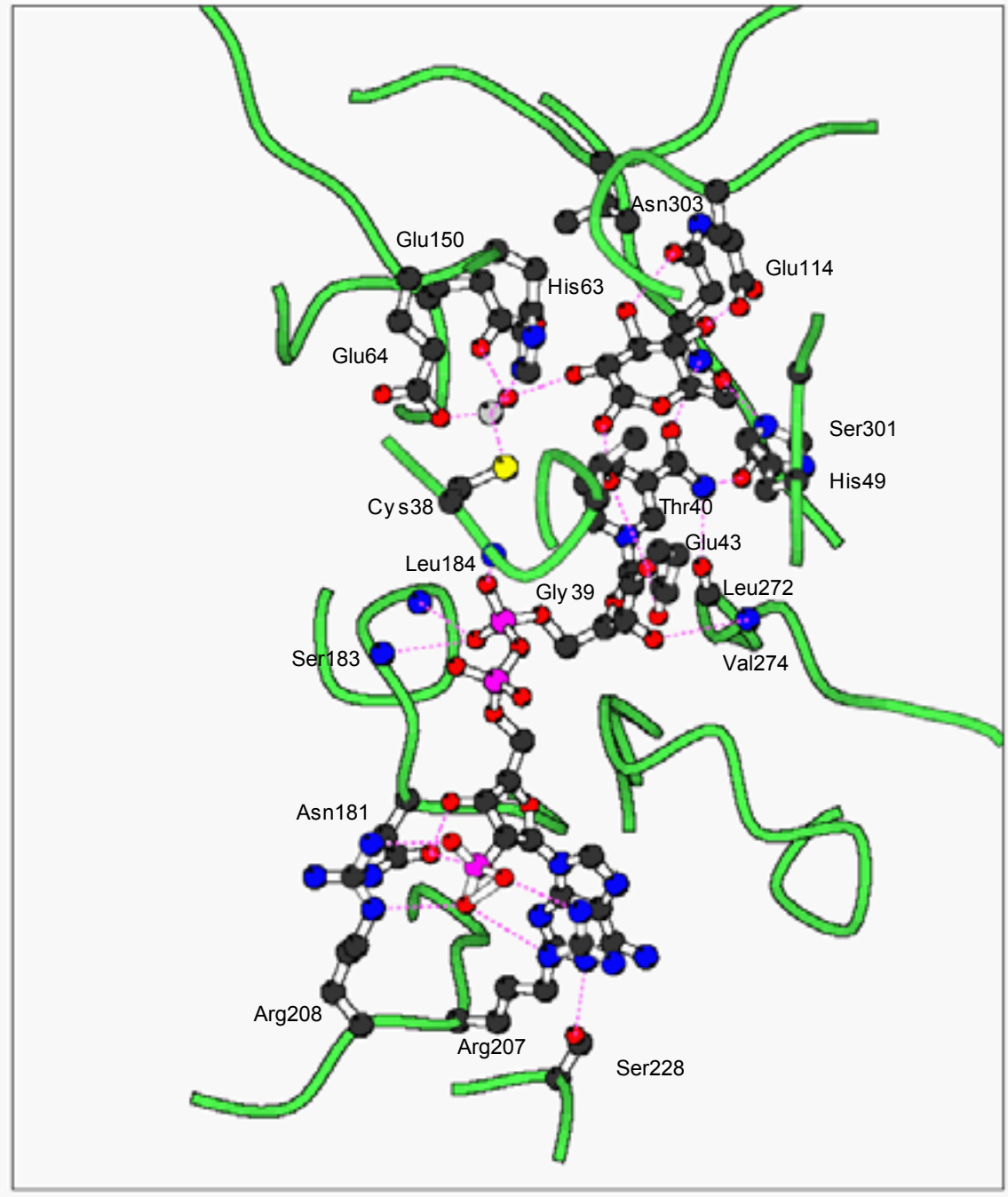

Figura 75: Interacciones entre el $NADP^+$ y la gluconolactona con la proteína en el complejo ternario no productivo de la GlcDH D38C en presencia de zinc (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

5.2.8.4.- Comparaciones entre los complejos ternarios no productivos de la GlcDH D38C

El mapa de densidad electrónica del centro activo en el complejo ternario no productivo de la GlcDH D38C en presencia de NADPH, glucosa y zinc se muestra en la Figura 76. La glucosa se encuentra claramente definida en la estructura, pero comparado con el complejo de gluconolactona su densidad es de menor calidad. No obstante, en general, las interacciones más relevantes entre la proteína con la glucosa y el NADPH son muy similares a las observadas en el complejo con gluconolactona y $NADP^+$. El lazo móvil, que comprende desde el residuo 48 al 51, se encuentra en la posición más cercana al centro activo ("cerrado") estableciendo una interacción entre la His49 y el O6 del azúcar, al igual que en el caso del complejo con gluconolactona y NADPH. En los complejos con glucosa y gluconolactona, el átomo de zinc permanece tetracoordinado por los residuos Cys38, His63, Glu64 y una molécula de agua, la cual ocupa una posición similar en ambas estructuras, sin embargo, existen diferencias relacionadas con la posición de los sustratos. En la estructura con gluconolactona, la distancia entre el O1 y O2 de dicho azúcar y el zinc es de aproximadamente 4,0 Å, de modo que se mantiene fuera de su esfera de coordinación. Sin embargo, en la estructura con glucosa, el O1 de este azúcar se encuentra más cerca del zinc, a 3,0 Å, pero a pesar de ello sigue estando fuera de la esfera de coordinación del metal. Al igual que en la estructura de la gluconolactona, el O1 de la glucosa forma un puente de hidrógeno con el residuo Thr40 y el O2 con la molécula de agua unida al zinc. Aunque en general, la estructura del centro activo de ambas estructuras es muy similar, existen pequeñas diferencias conformacionales que afectan a los residuos que forman la hélice α1 y el lazo que incluye los residuos comprendidos entre el 271 y el 281, zonas que están implicadas en la formación de interacciones con el anillo de nicotinamida y su ribosa. En la estructura con gluconolactona, el anillo de nicotinamida del $NADP^+$ está menos oculto como resultado de la aproximación entre la hélice α1 y el lazo 271-281 (Figura 77).

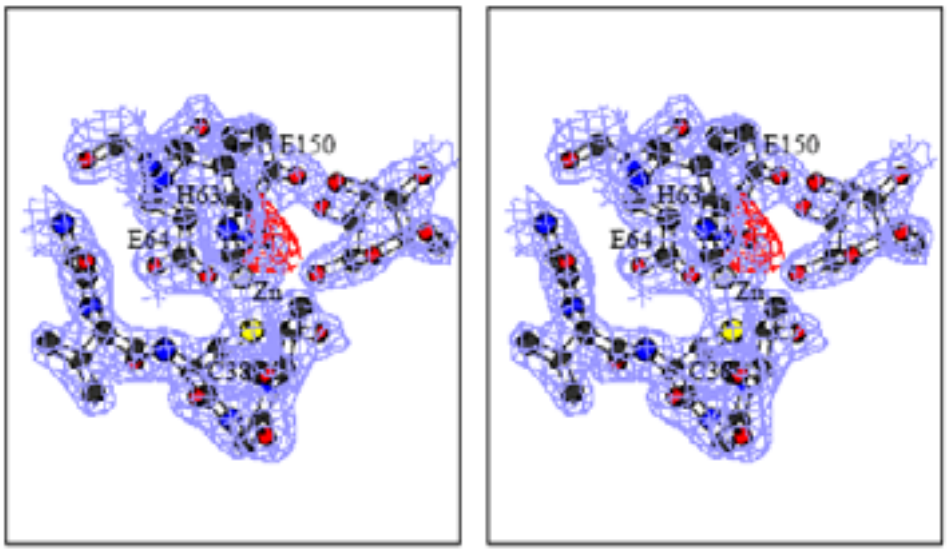

Figura 76: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica del centro activo de la proteína y alrededor de la glucosa en la estructura del complejo ternario no productivo GlcDH D38C en presencia de glucosa, NADPH y zinc. La densidad positiva (rojo) de la diferencia de los mapas en las últimas etapas de refinamiento de la estructura confirma la presencia de una molécula de agua en la esfera de coordinación del zinc, la cual ha sido incorporada en el modelo (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

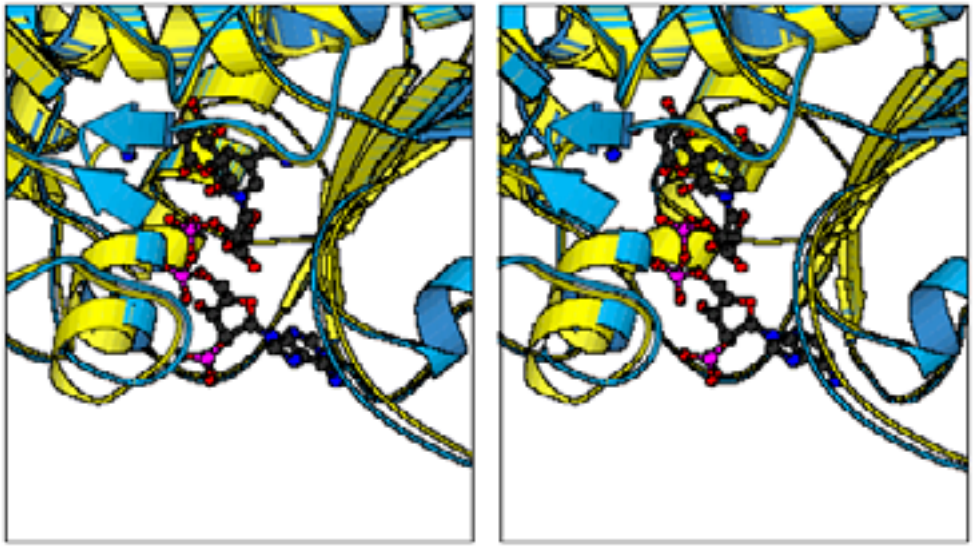

Figura 77: Visión en estéreo de la posición de la hélice α1 y el lazo 271-281 (entre la hebra β15 y la hélice α8) de los complejos ternarios no productivos GlcDH D38C con glucosa, NADPH y zinc (amarillo) y GlcDH D38C con gluconolactona, $NADP^+$ y zinc (azul) (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

Estudios recientes sobre el mecanismo catalítico de enzimas pertenecientes a la familia MDR han propuesto la existencia de dos procesos diferentes de transferencia de protones. En el mecanismo tradicional, basado en la HLADH, la transferencia del protón implica un sistema "lanzadera" a través de un residuo de serina que está conservado, la Ser48. En este mecanismo el zinc muestra una coordinación tetraédrica durante todo el proceso (Eklund y col., 1982). Estudios más actuales, basados en la alcohol deshidrogenasa de *T. anaerobacter*, proponen que la coordinación del átomo de zinc varía durante la catálisis desde un estado tetracoordinado a otro pentacoordinado en presencia del sustrato. Estos trabajos también sugieren que la molécula de agua unida al átomo de zinc podría estar implicada en la transferencia del protón, pudiendo originar cambios en la carga del zinc (Kleifeld y col., 2003).

En las estructuras de los complejos binarios de GlcDH D38C el átomo de zinc está tetracoordinado, permaneciendo la molécula de agua atrapada en el centro activo de la proteína por el anillo de nicotinamida del nucleótido y el azúcar. Por tanto, asumiendo que durante la catálisis el O1 de la glucosa o gluconolactona se aproxima a la esfera de coordinación del zinc, sería posible la formación de especies pentacoordinadas similares a las observadas en otros miembros de la familia MDR. Sin embargo, el zinc también podría permanecer tetracoordinado durante la catálisis enzimática. Como ácido fuerte de Lewis, existe la posibilidad de que la molécula de agua unida al zinc pierda un protón convirtiéndose en un ión hidroxilo. Este protón podría ser estabilizado por los grupos carboxilos de los residuos Glu64 o Glu150. Si este fuera el caso, desde la molécula de agua se formaría un puente de hidrógeno con el O2 del grupo hidroxilo del azúcar, el cual se encuentra aproximadamente a 2,8 Å (en el complejo con glucosa). La distancia entre el O2 y O1 de la glucosa es aproximadamente 2,6 Å, siendo posible la formación de un puente de hidrógeno entre dichos átomos. Por tanto, el papel de este hidroxilo consistiría en actuar como sumidero para la eliminación del protón del O1 del grupo hidroxilo del azúcar en los estados iniciales de la catálisis. No obstante, se requieren más estudios para confirmar este mecanismo y definir de forma precisa el papel del zinc y otros residuos del centro activo. El hecho de que en la GlcDH de *S. solfataricus* el Glu150 se encuentre reemplazado por una Gln, parece indicar que la estabilización del protón eliminado de la molécula de agua se llevaría a cabo por parte del Glu64. Posteriormente, el paso del alcóxido a

gluconolactona ocurriría mediante la transferencia del hidruro al $NADP^+$. Después de la liberación del producto, el grupo carboxilo protonado volvería a su estado de ionización inicial mediante la transferencia de un protón al disolvente antes de que la catálisis comience de nuevo. El esquema del mecanismo catalítico propuesto para la GlcDH D38C se muestra en la Figura 78.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

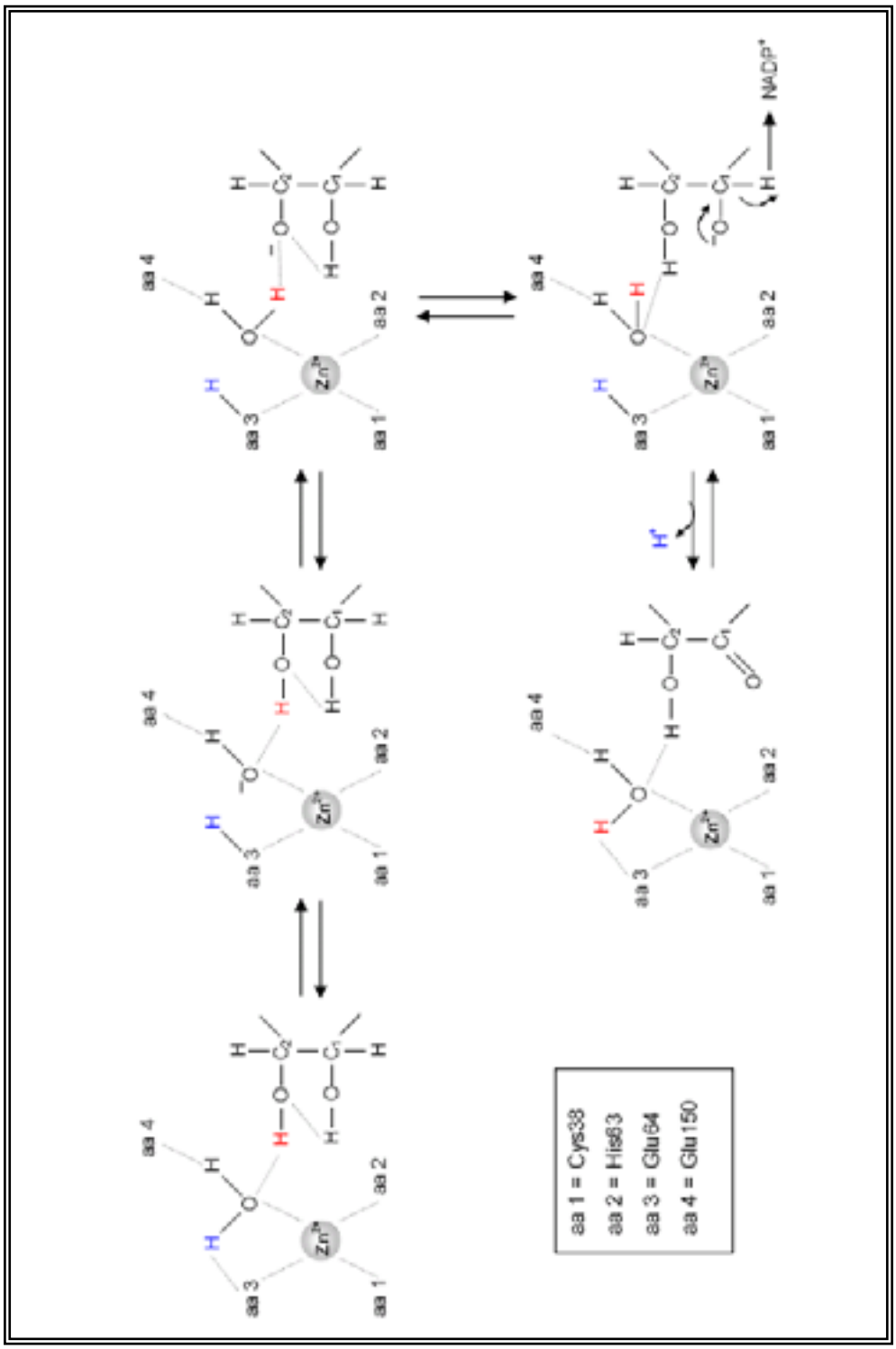

Figura 78: Mecanismo catalítico propuesto para la GlcDH D38C.

ESTUDIO DE LA HALOADAPTACIÓN DE GlcDH POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

6.1.- INTRODUCCIÓN

Desde que los microorganismos halófilos extremos fueron descubiertos, y se averiguó que su medio interno es isotónico con respecto al medio externo en el que viven, uno de los campos de investigación más importantes ha sido el estudio de los mecanismos de haloadaptación de sus proteínas.

En 1974, Lanyi publicó que las enzimas halofílicas presentaban una mayor proporción de aminoácidos ácidos que sus proteínas homólogas no halofílicas. Desde entonces, una gran cantidad de genes de microorganismos halófilos se han clonado y secuenciado, confirmando la naturaleza acídica de las proteínas resultantes. Sin embargo, hasta el momento, sólo se han resuelto cinco estructuras de proteínas halofílicas, observándose en todos los casos que el exceso de residuos cargados negativamente se encuentra en la superficie de las mismas. De este modo, se favorece la formación de la esfera de hidratación que permite a las proteínas ser estables y solubles en el medio en el que se encuentran. Asimismo, las proteínas halófilas también presentan un incremento de los residuos serina y treonina, y una reducción de los residuos hidrofóbicos valina, isoleucina, leucina y fenilalanina. Posteriormente, el grupo dirigido por el Profesor David Rice propuso que la reducción del carácter hidrofóbico de la superficie de las proteínas halofílicas no es consecuencia de la pérdida de residuos hidrofóbicos, como se había postulado anteriormente, sino de la reducción del número de residuos de lisina expuestos en la superficie de éstas. El significado de esta observación es complejo, pero parece ser que la presencia de los grupos alquilos asociados a los residuos de lisina en la superficie de la proteína podrían perturbar la formación de la esfera de hidratación, ocasionando la desnaturalización y agregación de este tipo de proteínas en presencia de las elevadas concentraciones de sal en las que se encuentran (Britton y col., 1998).

Durante los últimos años se han realizado diferentes estudios con el objetivo de establecer las bases moleculares de los mecanismos de haloadaptación. Para ello se han empleado técnicas muy diversas, desde la comparación de proteínas halofílicas con sus homólogas mesofílicas (Wright y col., 2003) hasta ensayos de mutagénesis dirigida (Madern y col., 1995; Jolley y col., 1997) o estudios

estructurales (Richard y col., 2000; Irimia y col., 2003). En todos estos trabajos, se ha llegado a la conclusión de que en la adaptación halofílica es tan importante el aumento de residuos ácidos de la superficie de la proteína, como la organización estructural de éstos, puesto que se han observado agrupaciones de residuos de Asp o Glu que forman centros de unión de K^+ o Na^+ en presencia de elevadas concentraciones de sal. De forma que las cargas de los residuos tienden a repelerse unas a otras a bajas concentraciones salinas, dando lugar a la desestabilización de las proteínas en dichas condiciones.

Con el objetivo de determinar el efecto de las lisinas en la adaptación halofílica se ha construido un triple mutante de la GlcDH de *Hfx. mediterranei*. Tres residuos de aspártico situados en la superficie de la proteína se han sustituido por tres residuos de lisina (D172K, D216K, D344K). En la estructura de la GlcDH de *Hfx. mediterranei*, el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo Asp172 se encuentra formando interacciones con una agrupación de moléculas de agua cercana a un átomo de potasio (Figura 79 a). La cadena lateral del Asp216 interacciona con moléculas de agua situadas en la superficie de la proteína (Figura 79 b), y la del Asp344 interactúa con el solvente y también forma puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos Thr346 y Thr347 (Figura 79 c). En este capítulo se describe la construcción del triple mutante así como un análisis bioquímico y estructural de la proteína mutada.

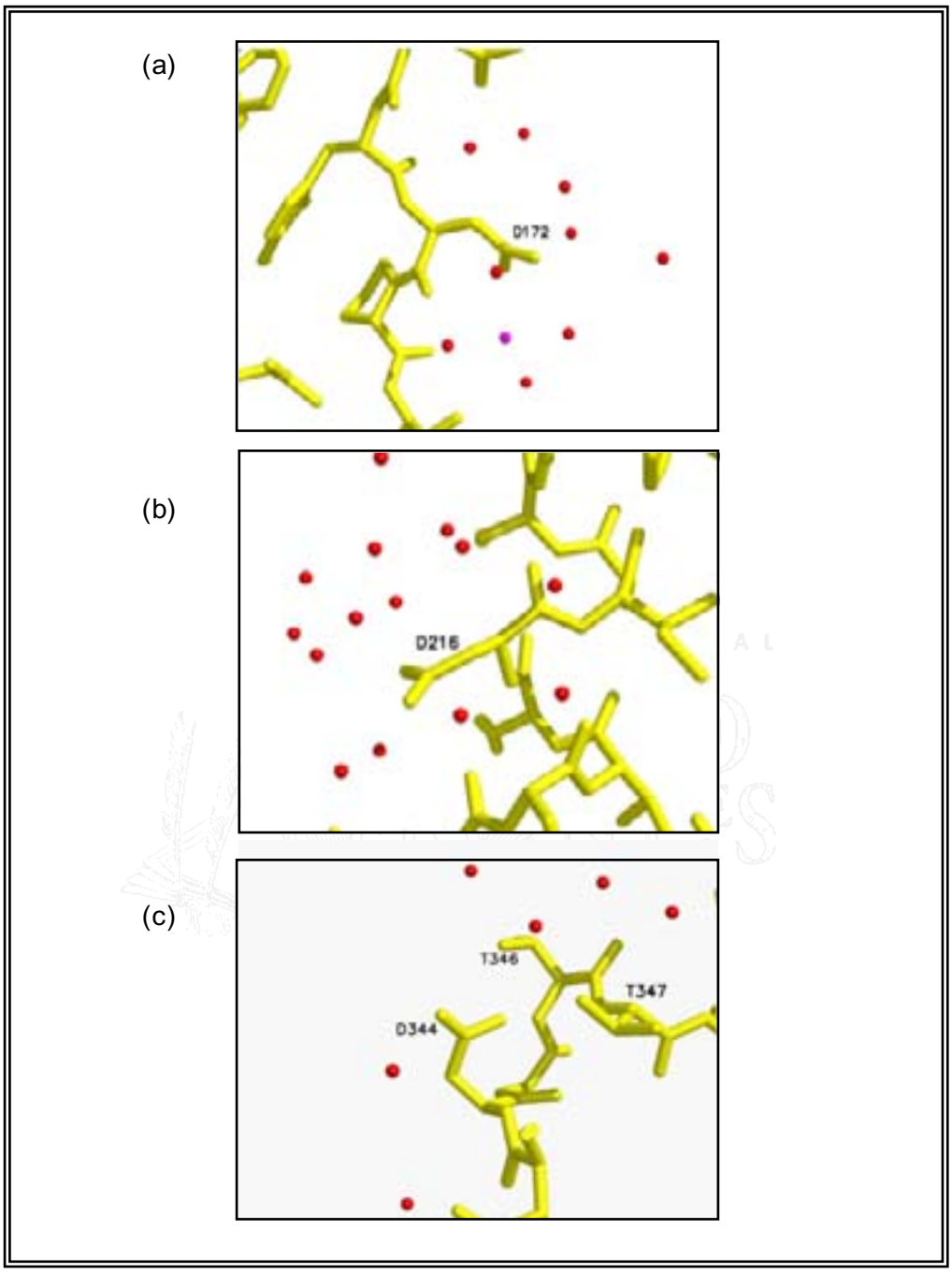

Figura 79: Esquema estructural de las zonas cercanas a los residuos D172 (a), D216 (b) y D344 (c) de la estructura GlcDH D38C resuelta a 1,6 Å. Las moléculas de agua se muestran en color rojo y los iones de potasio en color rosa (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

6.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1.- Construcción del triple mutante GlcDH D172K, D216K, D344K

La construcción del triple mutante de GlcDH se inició con la incorporación de la mutación D172K. Para ello se desnaturalizó el plásmido pGEM-Hm GlcDH mediante un tratamiento alcalino (Figura 80), y posteriormente se llevó a cabo la reacción de mutagénesis con el kit Gene Editor™ *in vitro* Site Directed Mutagenesis System empleando el oligonucleótido GlcDH D172K.

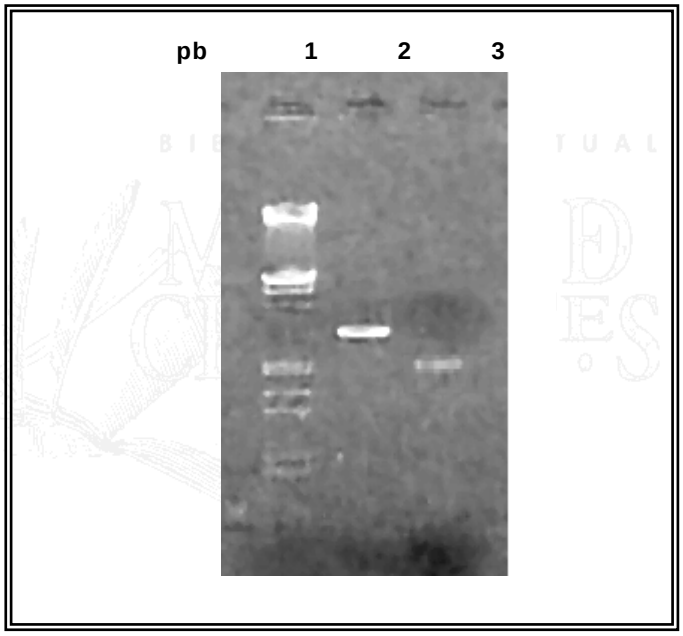

Figura 80: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pGEM-HmGlcDH desnaturalizado.

Calle 1: Marcadores de tamaño. Marker III (Fermentas)
Calle 2: pGEM-HmGlcDH
Calle 3: pGEM-HmGlcDH desnaturalizado

De todos los transformantes obtenidos, se analizaron 5 observándose la mutación deseada en 4 de ellos. Por tanto, la efectividad del proceso para la mutación D172K fue de un 80%, superándose en un 20% aproximadamente la efectividad esperada.

Seguidamente, se utilizó el plásmido pGEM-HmGlcDH D172K para llevar a cabo la reacción de mutagénesis con el oligonucleótido GlcDH D216K. El método empleado fue el mismo que el descrito anteriormente, seleccionando también cinco transformantes al azar para analizar su DNA plasmídico. En este caso, la mutación D216K se observó en tres de los plásmidos analizados, de modo que la efectividad del proceso fue del 60%

La tercera y última mutación se incorporó al plásmido pGEM-HmGlcDH D172K, D216K mediante PCR empleando la DNA polimerasa *Pfu Turbo* (Stratagen). En este caso se emplearon dos oligonucleótidos, el GlcDH D344K For y el GlcDH D344K Rev, puesto que el proceso se lleva a cabo con DNA bicatenario, no siendo necesario el paso previo de desnaturalización de DNA para la incorporación de la mutación.

La reacción de PCR se preparó siguiendo las recomendaciones de la casa suministradora de la DNA polimerasa, y las condiciones de la PCR se optimizaron, obteniendo los mejores resultados al aplicar las siguientes condiciones:

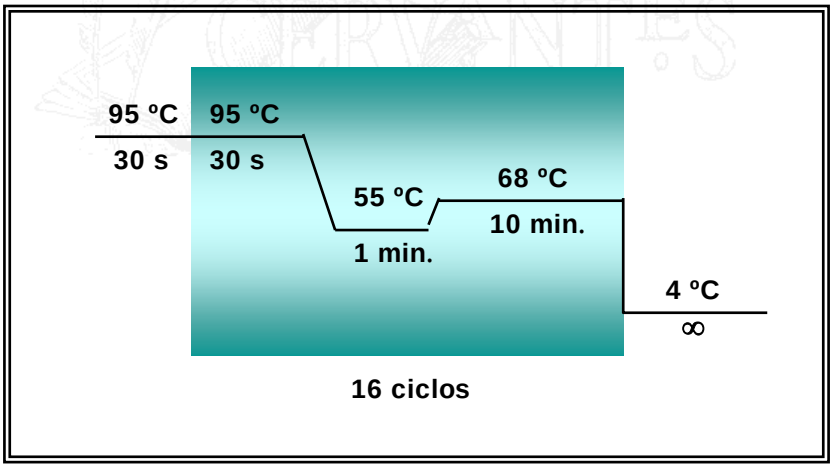

Figura 81: Programa de PCR empleado para incorporar la mutación D344K.

El producto de PCR obtenido se digirió con *Dpn*I, y a continuación se transformó en *E. coli* XL1-Blue. De todas las colonias que crecieron, se seleccionaron 10 al azar para aislar su DNA plasmídico, secuenciándose 5 de ellos. Tras analizar las secuencias obtenidas, se observó que cuatro plásmidos habían incorporado la mutación D344K.

Para dar por finalizada la construcción del triple mutante GlcDH D172K, D216K, D344K, se llevó a cabo la secuenciación del gen completo empleando los oligonucleótidos GlcForw y GlcRev. De este modo se comprobó que las únicas mutaciones presentes en el gen de la GlcDH fueron las deseadas.

6.2.2.- Expresión, renaturalización y purificación del triple mutante

El plásmido pGEM-HmGlcDH D172K D216K D344K se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I. A continuación, se realizó la reacción de ligación con el vector de expresión pET3a, digerido previamente con las mismas endonucleasas, y se transformó en *E. coli* JM109, obteniéndose clones positivos con la construcción pET3a-HmGlcDH D172K D216K D344K.

El plásmido pET3a-HmGlcDH D172K D216K D344K se empleó para transformar *E. coli* BL21(DE3). Tras llevar a cabo el ensayo de expresión, se aislaron las fracciones celulares soluble e insoluble, observándose que la proteína expresada se encuentra en la fracción correspondiente a los cuerpos de inclusión (Figura 82), al igual que sucedió en la expresión de la GlcDH silvestre y de los mutantes GlcDH D38C y GlcDH D38A.

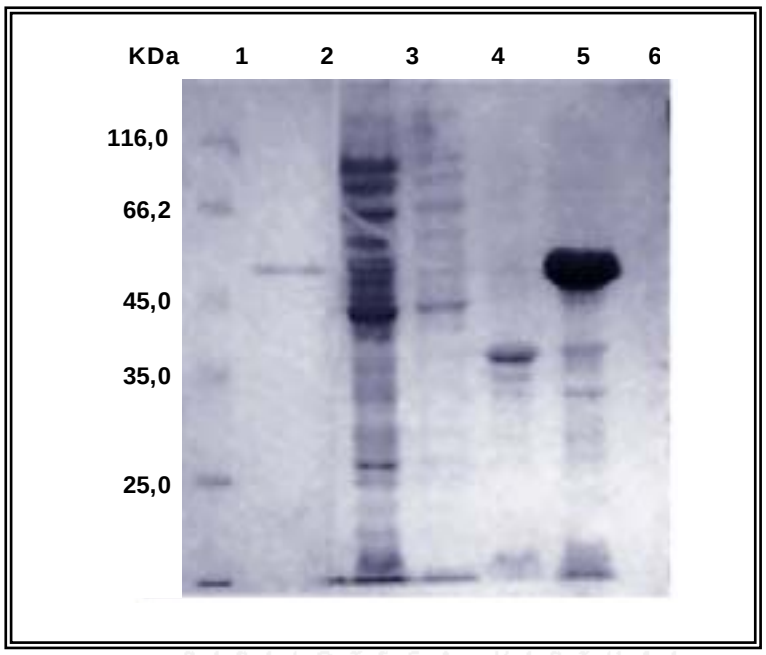

Figura 82: SDS-PAGE de las fracciones aisladas tras la expresión de la proteína GlcDH D172K D216K D344K.

Calle 1: Marcadores de peso molecular (Fermentas)
Calle 2: Hm-GlcDH
Calle 3: Fracción soluble pET3a
Calle 4: Fracción soluble pET3a-HmGlcDH D172K, D216K, D344K
Calle 5: Cuerpos de inclusión pET3
Calle 6: Cuerpos de inclusión pET3a-HmGlcDH D172K, D216K, D344K

Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en presencia del tampón 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Urea, 50 mM DTT y 2 mM EDTA. Y la renaturalización de la proteína se realizó mediante dilución rápida (1:20) empleando el tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,4 con 1 mM EDTA y diversas concentraciones de KCl o NaCl. En las Figuras 83 y 84 se observa que en todos los casos ensayados, el proceso de renaturalización de la proteína mutada es prácticamente igual que el de la proteína silvestre. Por tanto, las mutaciones introducidas en la superficie de la proteína no afectan a su proceso de renaturalización.

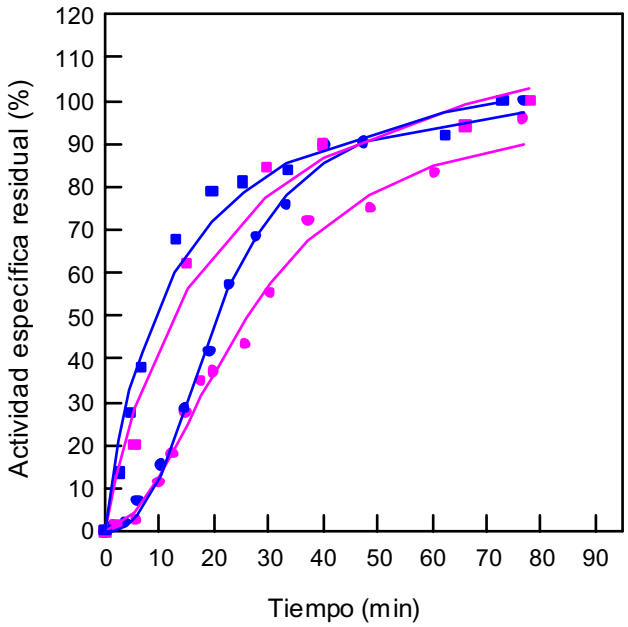

Figura 83: Comparación del proceso de renaturalización del triple mutante ( ) con la GlcDH silvestre ( ) en presencia de NaCl.

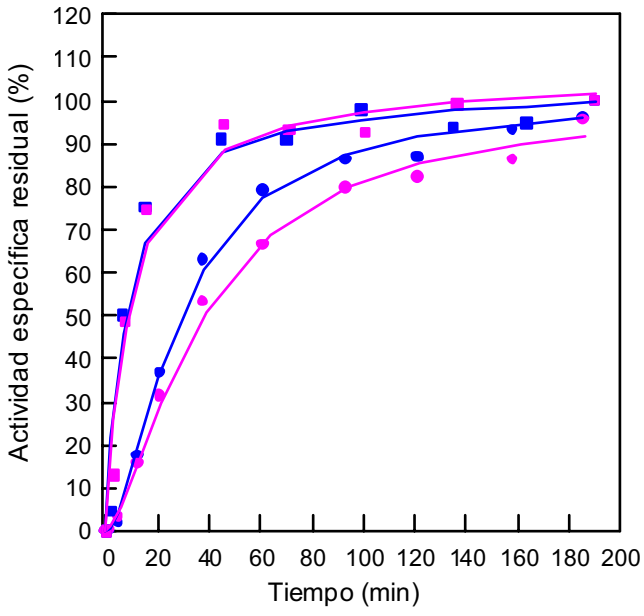

Figura 84: Comparación del proceso de renaturalización del triple mutante ( ) con la GlcDH silvestre ( ) en presencia de KCl.

La purificación de la proteína GlcDH D172K D216K D344K (Figura 85; Tabla 20) se realizó siguiendo el método descrito en Materiales y Métodos. No obstante, las fracciones de proteína obtenidas a partir de la DEAE-celulosa con una concentración superior a 1mg/ml, fueron dializadas frente a 50 mM tampón fosfato pH 7,4, 1 M NaCl y 1 mM EDTA, ya que en presencia de 2 M NaCl se observaron precipitados de proteína. Este hecho indica que se han alterado las características halofílicas de la proteína GlcDH D172K, D216K, D344K, puesto que precipita bajo determinadas condiciones (2 M NaCl o KCl) en las que la GlcDH silvestre es estable durante meses.

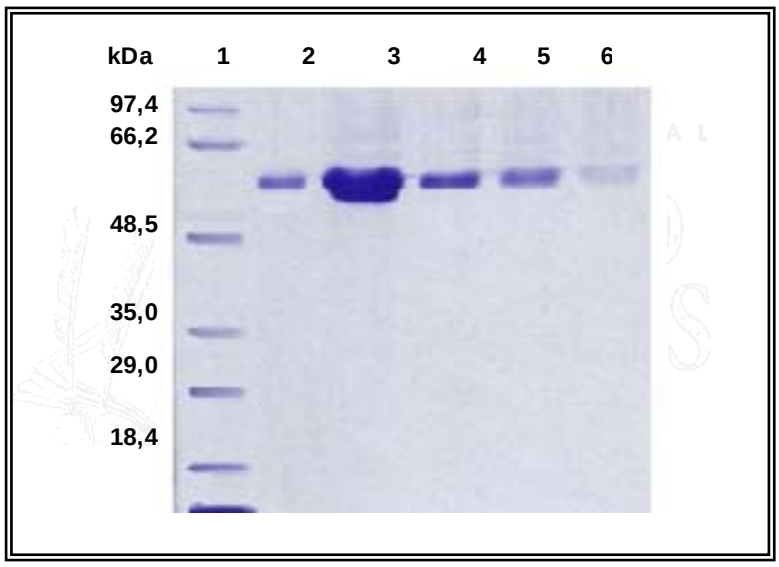

Figura 85: SDS-PAGE de las fracciones de GlcDH D172K D216K D344K purificadas tras la cromatografía en DEAE-celulosa.

Calle 1: Marcadores de peso molecular (Sigma)
Calle 2: GlcDH silvestre
Calle 3-6: Fracciones purificación GlcDH D172K, D216K, D344K

Tabla 20: *Purificación de la proteína GlcDH D172K, D216K, D344K*

Fracción enzimática		Vol. (ml)	U_T	mg_T	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Renaturalización enzimática en Tris-HCl 20mM pH 7.4, 2M NaCl, 1mM EDTA		600	5208	42	1,00	100
Precipitación $(NH_4)_2SO_4$	**Sobrenadante**	600	4838	35	1,11	93
DEAE-celulosa		9	3852	23	1,35	74

6.2.3.- Caracterización de la proteína GlcDH D172K D216K D344K

BIBLIOTECA VIRTUAL

6.2.3.1.- Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos $V_{máx}$ y K_m se calcularon ajustando los datos obtenidos a la ecuación de velocidad inicial correspondiente a un mecanismo secuencial ordenado Bi-Bi (Ecuación 3). En las Figuras 86 y 87 se muestran las gráficas obtenidas, observando que las rectas son intersectantes cuando se varia la concentración de glucosa y de $NADP^+$.

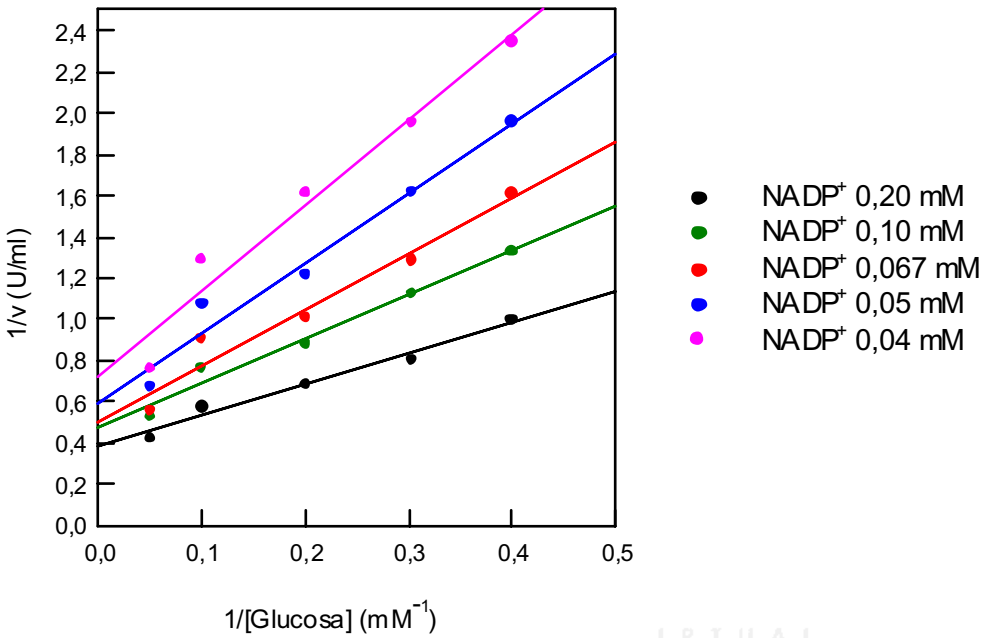

Figura 86: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de glucosa

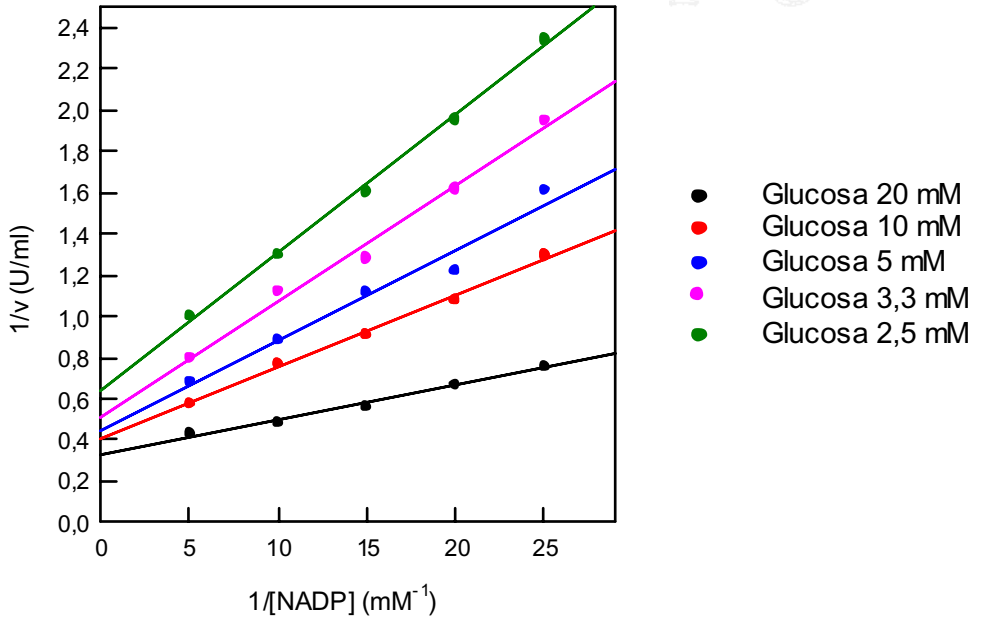

Figura 87: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de $NADP^+$.

En la Tabla 21 se muestran los valores obtenidos para todos los parámetros cinéticos calculados. En este caso, a diferencia de lo ocurrido con el mutante GlcDH D38C, no existen diferencias significativas entre los valores estimados para los parámetros cinéticos correspondientes a la GlcDH silvestre y al triple mutante. Es decir, las mutaciones incorporadas en la superficie de la proteína no han modificado las propiedades catalíticas de ésta, puesto que se encuentran alejadas del centro activo de la enzima.

Tabla 21: *Parámetros cinéticos de la GlcDH silvestre y triple mutante.*

	K_{NADP^+} (mM)	$K_{glucosa}$ (mM)	$V_{máx}$ (U/mg)	K_{cat} x 10^{-3} (min^{-1})	$K_{cat}/K_{glucosa}$ x 10^{-3} (mM^{-1} min^{-1})
GlcDH Silvestre	0,035±0,004	2,8±0,3	397±15	31±1	11±2
GlcDH Triple mutante	0,046±0,011	3,2±0,8	350±40	27±3	8±3

Los estudios de mutagénesis dirigida realizados con la dihidrolipoamida deshidrogenasa de *Hfx. volcanii* (Jolley y col., 1997) y con la malato deshidrogenasa de *Har. marismortui* (Madern y col., 1995) muestran resultados similares, ya que en ninguno de los casos se observan grandes diferencias en las K_m de los sustratos al sustituir un residuo ácido de la superficie por un aminoácido de naturaleza distinta. Al igual que sucede con la GlcDH D172K D216K D344K, dichas mutaciones se encuentran alejadas del centro activo y no tienen ninguna influencia sobre él.

6.2.3.2.- Efecto de la concentración de sal sobre la actividad enzimática

El efecto de la concentración de sal sobre la actividad enzimática del triple mutante y de la proteína silvestre se muestra en las Figuras 88 y 89. En ellas se observa que el triple mutante muestra su máximo de actividad cuando el tampón tiene entre 0,5 y 1 M de NaCl o KCl, mientras que el máximo de actividad de la GlcDH silvestre se alcanza a 1,5 M de NaCl o KCl. Además, a bajas concentraciones de sal la actividad del triple mutante es mayor que la de la proteína silvestre, mientras que a altas concentraciones de sal sucede lo contrario, las

actividades de la proteína silvestre son mayores. Estos datos indican que la proteína mutada requiere una menor concentración de sal para alcanzar su máximo de actividad, es decir, sus características halofílicas se han modificado siendo ahora menos tolerante a las altas concentraciones de sal.

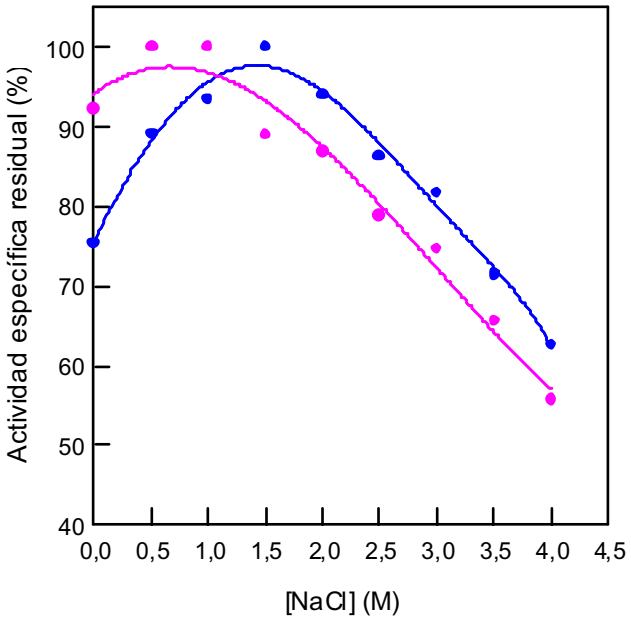

Figura 88: Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad enzimática de la GlcDH D172K, D216K, D344K ( ) y de la GlcDH silvestre ( ).

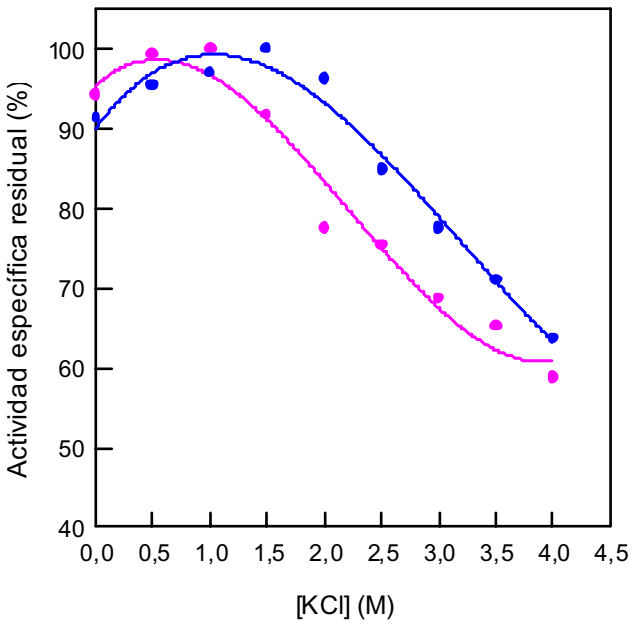

Figura 89: Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad enzimática de la GlcDH D172K, D216K, D344K ( ) y de la GlcDH silvestre ( ).

En el caso de la dihidrolipoamida deshidrogenasa se han obtenido resultados similares. Cuando el residuo Glu423 se sustituyó por Ser, Gln o Ala la proteína resultó ser siempre menos activa, sin embargo cuando dicho aminoácido fue sustituido por otro residuo ácido como el Asp, la proteína mutada presentó actividades muy próximas a las de la proteína silvestre en presencia de elevadas concentraciones de sal (Jolley y col., 1997). Estos datos demuestran que la posición de los residuos ácidos expuestos en la superficie de las proteínas halófilas es tan importante como su número, puesto que la sustitución de un único residuo puede modificar las propiedades halofílicas de una proteína.

6.2.3.3.- Efecto de la concentración de sal sobre la estabilidad enzimática

El efecto de la concentración de sal sobre la estabilidad enzimática de la GlcDH silvestre y triple mutante, se estudió incubando las proteínas en diversas concentraciones de KCl a dos temperaturas distintas. Al representar el logaritmo de la actividad específica residual frente al tiempo de incubación (Figuras 90 y 91) se observó una mayor estabilidad tanto de la proteína mutada como de la silvestre al aumentar la concentración de sal, independientemente de la temperatura. Sin embargo, a bajas concentraciones de sal la proteína mutada es ligeramente más estable que la GlcDH silvestre, acentuándose esta diferencia cuando la concentración de KCl es de 0,25 M y el ensayo se lleva a cabo a temperatura ambiente.

En la Tabla 22 se muestran los tiempos de vida media de cada una de las proteínas bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Tal y como se había deducido a partir de las gráficas, el triple mutante es más estable a concentraciones inferiores de 0,5 M de KCl, puesto que los tiempos de vida media obtenidos en esas condiciones son mayores que con la GlcDH silvestre. Sin embargo, a concentraciones superiores de KCl 1 M la proteína GlcDH D172K, D216K, D344K se mantiene estable durante el tiempo ensayado, al igual que la proteína silvestre.

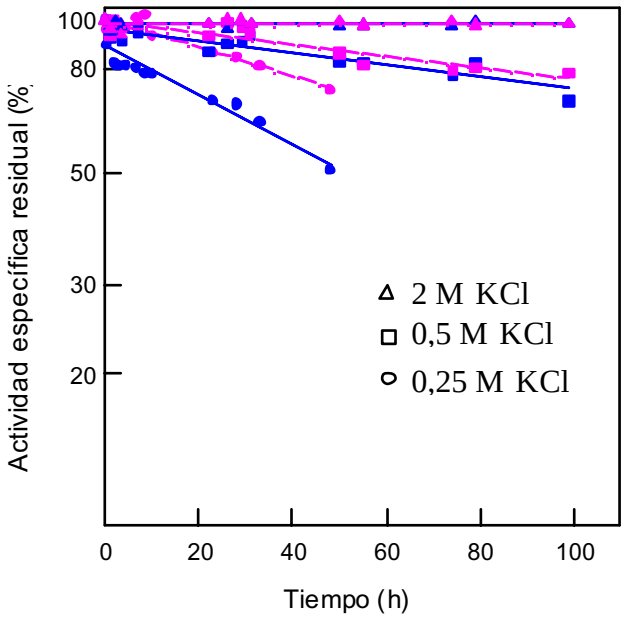

Figura 90: Estabilidad de la GlcDH silvestre (●) y del triple mutante (●) a temperatura ambiente en presencia de distintas concentraciones de KCl.

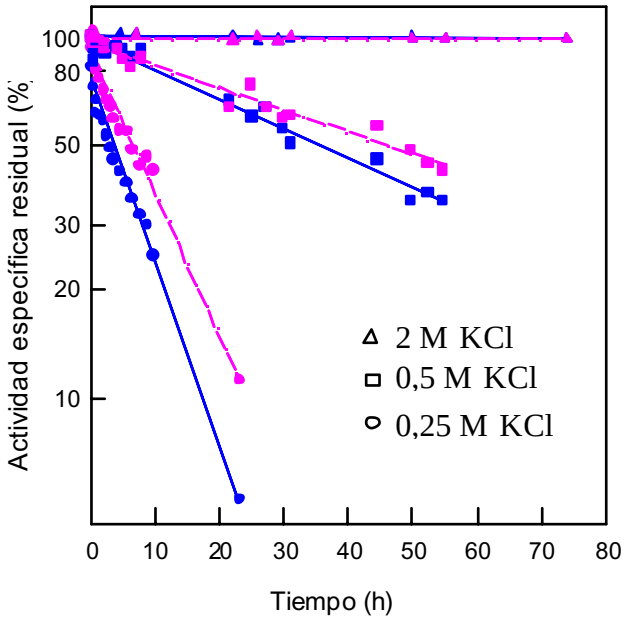

Figura 91: Estabilidad de la GlcDH silvestre (●) y del triple mutante (●) a 40 °C en presencia de distintas concentraciones de KCl.

Tabla 22: *Tiempos de vida media de la GlcDH silvestre y triple mutante a distintas temperaturas y concentraciones de KCl.*

	$T_{1/2}$ 25 ºC (h)		$T_{1/2}$ 40 ºC (h)	
	Triple mutante	**Silvestre**	**Triple mutante**	**Silvestre**
0.25 M KCl	245.8	141.75	17.8	13.6
0.50M KCl	618.8	582.5	113.3	85.5
> 1 M KCl	> 1 semana	> 1 semana	> 1 semana	>1 semana

Las actividades del triple mutante y de la proteína recombinante son muy similares a concentraciones de sal óptimas, y los parámetros cinéticos de ambas proteínas son prácticamente iguales. Por tanto, en base a los resultados obtenidos, parece que las mutaciones D172K, D216K y D344K en la GlcDH sólo afectan a sus propiedades halofílicas, de modo que la proteína mutada alcanza el máximo de actividad a concentraciones de sal menores que la proteína silvestre, aunque todavía requiere elevadas concentraciones de sal para ser estable. Sin embargo, en estudios similares con la dihidrolipoamida deshidrogenasa de *Hfx. volcanii*, la introducción de una única mutación (E423Q, E423S o E423A) produce una enzima menos activa que la silvestre. Aunque cuando el E423 es reemplazado por otro residuo acídico (Asp) el mutante muestra una pérdida muy pequeña de la actividad con respecto a la enzima silvestre.

La sustitución de los residuos de Asp por Lys en la superficie de la proteína, ha provocado una ligera disminución de la halofilicidad de la GlcDH mutada. Este efecto puede ser debido a que el aumento de residuos de lisina en la superficie de la proteína, y por tanto de grupos alquilo, dificultan la formación de la esfera de hidratación necesaria para que estas enzimas sean estables en los medios en que encuentran. Por tanto, parece que la disminución de residuos de Lys en la superficie de la proteína sí que constituye una adaptación halofílica, aunque se necesitan más estudios para confirmar dicha hipótesis.

6.2.4.- Cristalización en presencia de K^+ de la GlcDH silvestre y triple mutante

La enzima GlcDH D172K D216K D344K se cristalizó en presencia de 1 mM $NADP^+$ y 1 mM $ZnCl_2$ empleando citrato potásico como agente precipitante (Figura 92), independientemente de la sal de potasio que contenía el tampón frente a la cual fue dializada. Sin embargo, la GlcDH silvestre sólo cristalizó, bajo las mismas condiciones, cuando el tampón en el que se encontraba la proteína contenía KF.

Todos los cristales obtenidos, tanto del triple mutante como de la proteína silvestre, presentaron las mismas características que los cristales crecidos en presencia de citrato sódico, a pesar de que éstos últimos se difractaron a temperatura ambiente.

Los datos estadísticos de los estudios preliminares de difracción de todos los cristales obtenidos a partir de la proteína GlcDH y GlcDH D172K D216, D344K se resumen en las Tablas 23 y 24.

Figura 92: Cristales obtenidos a partir del complejo binario GlcDH D172K D216K D344K- $NADP^+$ en presencia de zinc.

Tabla 23: *Datos estadísticos de la difracción de rayos X para los cristales de GlcDH D172K D216K D344K*

Tampón diálisis	**Pi 50mM pH 7,4 KF 1 M**	**Pi 50mM pH 7,4 KCl 1 M**	**Pi 50mM pH 7,4 KBr 1 M**
Rango de resolución (Å)	15-2,3	20-2,2	20-2,5
Esfera de mayor resolución (Å)	2,35-2,30	2,25-2,20	2,56-2,50
Grupo espacial	I222	I222	I222
Parámetros celda (Å)			
A	61,5	62,0	61,0
B	107,1	106,2	107,2
C	152,4	152,4	152,9
Difracciones únicas	171513	210158	144784
"Completeness" (%)	98,4 (93,8)	98,4 (96,1)	97,7 (95,5)
Multiplicidad	7,68 (2,66)	8,25 (2,3)	8,35 (2,21)
$I/\sigma I$	13,17 (1,65)	12,05 (1,58)	12,7 (1,54)
R_{merge} [a]	7,7 (59,7)	9,4 (57,6)	6,2 (54,5)

* Los valores entre paréntesis se refieren a la esfera de mayor resolución.

[a] $R_{merge} = \sum_{hkl} | I_i - I_m | / \sum_{hkl} I_m$ donde I_m es la media de la intensidad de las difracciones.

Tabla 24: *Datos estadísticos de la difracción de rayos X para los cristales de GlcDH silvestre.*

Tampón diálisis	**Pi 50mM pH 7,4, KF 2M**
Rango de resolución (Å)	20-1,86
Esfera de mayor resolución (Å)	1,90-1,86
Grupo espacial	I222
Parámetros celda (Å)	
A	60,5
B	108,5
C	152,8
Difracciones únicas	287981
"Completeness" (%)	94,5 (62,5)
Multiplicidad	7,15 (1,63)
I/σI	14,29 (0,59)
R_{merge}	5,7 (93,8)

* Los valores entre paréntesis se refieren a la esfera de mayor resolución.

[a] $R_{merge} = \sum_{hkl} | I_i - I_m | / \sum_{hkl} I_m$ donde I_m es la media de la intensidad de las difracciones.

6.2.5.- Estudios estructurales del triple mutante

Los estudios estructurales de los cristales obtenidos a partir de la proteína mutada han sido realizados bajo la supervisión del grupo de investigación dirigido por el Profesor David W. Rice. Estos estudios se encuentran todavía en su etapa inicial, pero ya se ha obtenido una estructura en presencia de KBr de la proteína mutada cristalizada con $NADP^+$ y zinc. Las comparaciones entre esta estructura y la obtenida a partir de GlcDH D38C a alta resolución, muestra que la introducción de las tres mutaciones (D172K, D216K, D344K) no ha producido ningún cambio significativo en la estructura de la GlcDH (Figura 93a, b, c). En el estudio de la estructura de este mutante se observa que la sustitución del residuo Asp por Lys en

la posición 172 provoca una desorganización en la densidad electrónica de la nueva cadena lateral, sin embargo, en las posiciones 216 y 344 la densidad de las cadenas laterales está bien definida. Además, el análisis del mapa de densidad electrónica reveló la presencia de cinco densidades electrónicas bastante grandes, que se han asignado inicialmente a iones bromuro. Dos de estos iones se localizan cerca de la cadena lateral del residuo Lys216, y ninguno de ellos tiene su equivalente en la estructura de la GlcDH D38C resuelta a 1,6 Å. Por otro lado, se han identificado cinco iones potasio en la estructura del triple mutante, que sí que ocupan posiciones similares a las observadas en la estructura del mutante GlcDH D38C.

La superposición de la estructura de la GlcDH silvestre con $NADP^+$ y zinc cristalizada en presencia de NaCl, y la estructura del triple mutante con $NADP^+$ y zinc cristalizada en presencia de KBr se muestra en la Figura 94. En esta Figura se observa que la introducción de las mutaciones no ha producido cambios en la estructura de la proteína. Sin embargo, la cristalización con KBr ha permitido la identificación de cinco iones bromuro, los cuales no se habían observado previamente. Desde un punto de vista bioquímico, es evidente que las propiedades halofílicas de la proteína mutada se han alterado. No obstante, es necesario refinar el resto de estructuras del triple mutante y determinar nuevas estructuras de dicha proteína a alta resolución para analizar con más detalle los cambios moleculares que se han introducido.

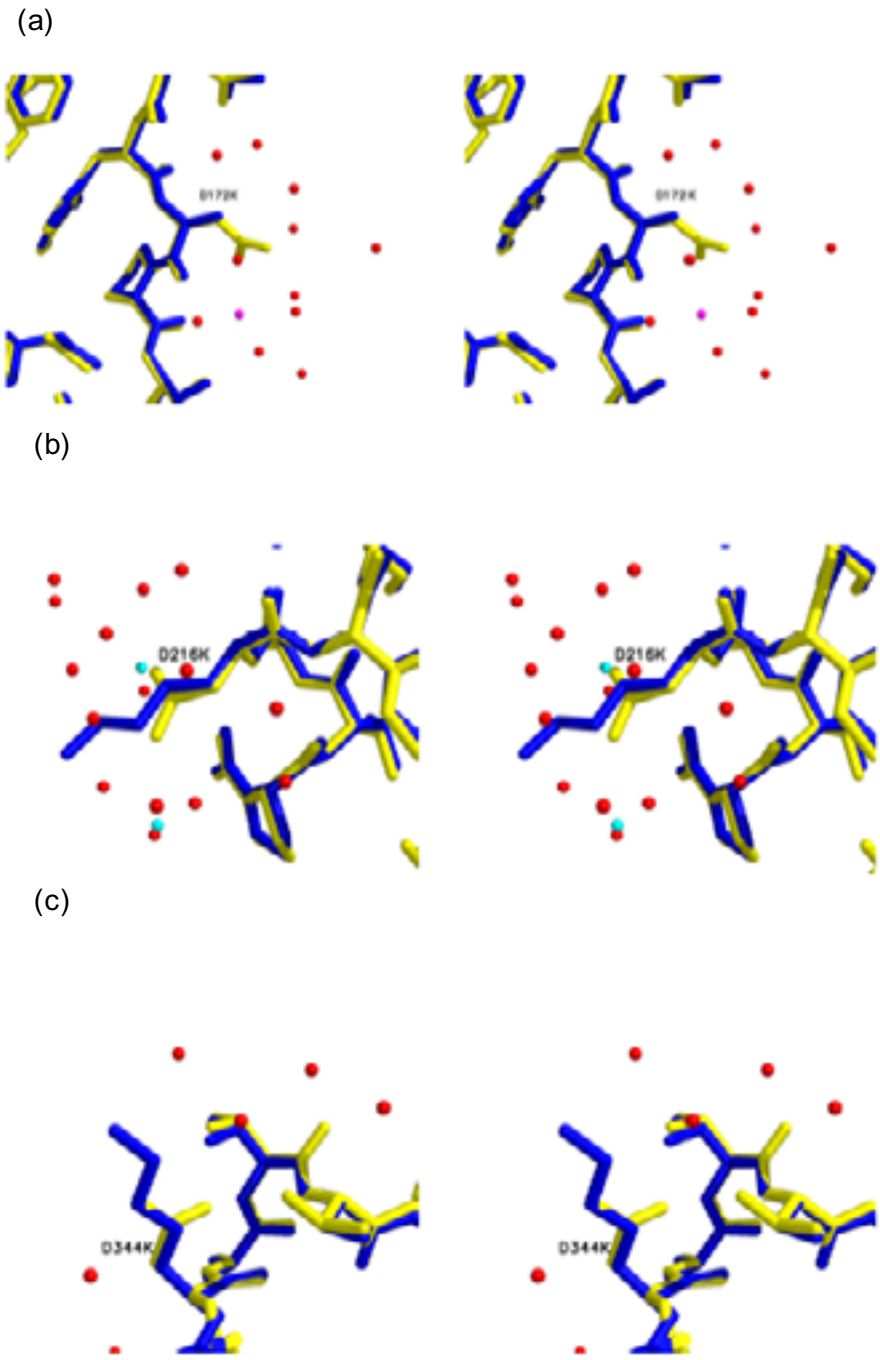

Figura 93: Visión en estéreo de la comparación de las regiones próximas a las mutaciones D172K (a), D216K (b) y D344K (c) de la estructura del triple mutante (azul) con la GlcDH D38C (amarillo) (Cortesía del grupo de investigación del Profesor David Rice).

CONCLUSIONES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

7.- CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

1. El método de expresión, renaturalización y purificación desarrollado para la GlcDH de *Hfx. mediterranei* es rápido, sencillo y eficaz, obteniéndose la enzima pura y concentrada en un solo paso cromatográfico.
2. Dado que los parámetros cinéticos y funcionales de la GlcDH recombinante y la GlcDH aislada a partir de *Hfx. mediterranei* son muy similares, se puede concluir que desde un punto de vista cinético ambas enzimas son idénticas.
3. La GlcDH de *Hfx. mediterranei* se ha cristalizado bajo condiciones que imitan los ambientes en los que se encuentran las proteínas halófilas.
4. La GlcDH de *Hfx. mediterranei* es la proteína halófila cuya estructura se ha obtenido a mayor resolución. Su superficie está recubierta de cargas negativas debido al aumento de residuos ácidos, dándose a su vez un descenso de los residuos hidrofóbicos expuestos como consecuencia de la pérdida de lisinas, confirmándose las hipótesis propuestas hasta la fecha sobre la haloadaptación de las proteínas halofílicas.
5. La mutación del residuo Asp38 (residuo próximo al átomo de zinc catalítico) por Ala o Cys conlleva la pérdida o reducción de la actividad enzimática. Este hecho sugiere que el residuo Asp38 es de vital importancia en la catálisis enzimática, bien como residuo clave en la unión del zinc catalítico o bien como residuo implicado en el reconocimiento de sustratos.
6. El reemplazamiento del residuo Asp38 por Cys, aminoácido comúnmente presente en la misma posición en otras proteínas pertenecientes a la superfamilia MDR, produce una proteína con una actividad enzimática y eficiencia catalítica menor que la GlcDH silvestre. Asimismo, la proteína GlcDH D38C es sensiblemente más termoestable que la proteína silvestre. La presencia del Asp38 en la proteína halófila podría constituir una adaptación halofílica, no obstante, para confirmar dicha hipótesis es necesario el estudio de nuevas proteínas halófilas que contengan zinc en su centro activo.

7. El mutante GlcDH D38C se ha cristalizado en presencia de diferentes combinaciones de productos y sustratos, mediante el empleo citrato sódico/potásico o MPD como agentes precipitantes, permitiendo observar las interacciones establecidas entre la proteína y sus sustratos.
8. El análisis de las estructuras de los complejos de la GlcDH D38C, con $NADP^+$ y gluconolactona o NADPH y glucosa, revela la presencia de un lazo móvil constituido por los residuos 48-51 (Gly-His-Gly-Gly). Este lazo móvil aparece "cerrado" en presencia de glucosa o gluconolactona y "abierto" en ausencia del azúcar. Además, el residuo His49 está implicado en la unión de glucosa, sugiriendo que el movimiento del lazo es necesario para que ocurra la catálisis.
9. A partir de los estudios estructurales realizados con el mutante GlcDH D38C se ha propuesto un mecanismo catalítico, en el cual la molécula de agua unida al átomo de zinc pierde un protón convirtiéndose en un ión hidroxilo. Este protón podría estar estabilizado por el residuo ácido Glu64. El ión hidroxilo puede captar un protón del grupo hidroxilo (O1) del azúcar mediante una red de puentes de hidrógeno que incluye al O2 del grupo hidroxilo de la glucosa. Posteriormente, el paso del alcóxido a gluconolactona se produce por la transferencia de un hidruro al $NADP^+$.
10. La sustitución de tres residuos Asp, localizados en la superficie de la GlcDH, por tres residuos Lys produce una proteína menos halotolerante, aunque mantiene la misma actividad enzimática y parámetros cinéticos que la GlcDH silvestre.
11. La GlcDH silvestre y GlcDH D172K D216K D344K se han cristalizado en presencia de citrato potásico como agente precipitante y diferentes sales de potasio, entre las que se encuentran KF, KCl y KBr. En los estudios preliminares de la estructura del triple mutante se han identificado diez contraiones por subunidad, que se corresponden con cinco iones bromuro y cinco iones potasio. Las posiciones de los iones potasio son equivalentes a las observadas en la estructura de la GlcDH D38C resuelta a 1,6 Å. Los iones bromuro se han localizado cerca de las cadenas laterales de los residuos mutados, no observándose iones cloruro en posiciones similares en la estructura de la GlcDH D38C.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

8.- BIBLIOGRAFÍA

Abad Zapatero, C., Griffith, P., Sussman, L. y Rossman, M. G. (1987) Refined crystal structure of dogfish M4 apo-lactate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.,* **198:** 445-467.

Andreesen, J. R. y Gottschalk, G. (1969). The ocurrence of a modiffied Entner-Doudoroff pathw ay in *Clostridium aceticum*. *Arch. Microbiol*., **69:** 160-170.

Antón, J., Meseguer, I. y Rodríguez Valera, F. (1988) Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol*., **54:** 2381-2386.

Antón, J., Roselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F. y Amann, R. (2000) Extremely Halphilic *Bacteria* in Crystallizer Ponds from Solar Salterns. Appl. *Environ. Microbiol*., **66:** 3052-3057.

Baker, P. J., Britton, L. K., Rice, D. W., Rob, A. y Stillman, T. J. (1992) Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucletotide binding fold. *J. Mol. Biol*., **228:** 662-671.

Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech*., **10:** 411-421.

Banfield, M. J., Salvucci, M. E., Baker, E. N. y Smith, C. A. (2001) Crystal structure of the NADP(H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2,3 Å resolution. *J. Mol. Biol*., **306:** 239-250.

Barns, S. M., Delw iche, C. F., Palmer, J. D. y Pace, N. R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophily from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, **93:** 9188-9193.

Barton, G. J. (1993) ALSCRIPT – a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Eng*., **6:** 37-40.

Bass, S. y Yang, M. (1997) Expressing cloned genes in *Escherichia coli*. Folding proteins. *Protein Function*, 29-55.

Bell, S. D. y Jackson, S. P. (1998) Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol*., **6:** 222-228.

Bieger, B., Essen, L. O. y Oesterhelt, D. (2003) Cristal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*. *Structure*, **11:** 375-385.

Bischoff, K y Rodwell V. W. (1996) 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase from *Haloferax mediterranei*: Purification, Characterisation, and Expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*., **178:** 19-23.

Blecher, O., Goldman, S. y Mevarech, M. (1993) High expression in *Escherichia coli* of the gene coding for dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaebacterium *Haloferax volcanii.* Reconstitution of the active enzyme and mutation studies. *Eur. J. Biochem*., **216**, 199-203.

Blow, D. (2002) *Outline of crystallography for biologists*. Oxford University Press.

Bonete, M. J., Pire, C., Llorca, F. I., y Camacho, M. L. (1996) Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS Lett*., **383:** 227-229.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemestry*, **72:** 248-254.

Branden, C. y Tooze, J. (1999) *Introduction to protein structure*. Capítulo 18. GARLAND Science Publishing. Union Square West, New York.

Breksa III, A. P. y Garrow, T. A. (2002) Random mutagenesis of the zinc-binding motif of betaine-homocysteine methyltransferasa reveals that Gly214 is essential. *Arch. Biochem. Biophys*., **399:** 73-80.

Britton, K. L., Stillman, T. J., Yip, K. S. P., Forterre, P., Engel, P. C. y Rice, D. W. (1998) Insights into the molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. *J. Biol. Chem*., **273:** 9023-9030.

Britton, K. L., Baker, P. J., Fisher, M., Ruzheinikov, S., Gilmour, J., Bonete, M. J., Ferrer, J., Pire, C., Esclapez, J. y Rice, D. W. (2004) Insights into origins of salt tolerance from the structure of *Haloferax mediterranei* glucose dehydrogenase. *Nature Structural Biology*. Sometido a publicación.

Brown, J. R., y Doolittle, W. F. (1997) *Archaea* and the Prokaryote to Eukaryote transition. Microbiol. *Mol. Biol. Rev.*, **61:** 456-502.

Brügger, K., Redder, P., Qunxin, S., Confalonieri, F., Zivanovic, Y. y Garrett, R. A. (2002) Mobile elements in archaeal genomes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **206:** 131-141.

Bullock, C. (2000) The Archaea – a biochemical perspective. Biochem. *Molec. Biol. Ed.*, **28:** 186-194.

Camacho, M. L., Rodríguez Arnedo, A. y Bonete, M. J. (2002) NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*: cloning, sequence determination and overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **209:** 155-160.

Cann, I. K. O. y Ishino, Y. (1999) Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics*, **152:** 1249 -1267.

Carrió, M. M., Cubarsi, R. y Villaverde, A. (2000) Fine architecture of bacterial inclusión bodies. *FEBS Lett.*, **471:** 7-11.

Cavalier-Smith, T. (2002) The neomuran origin of archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52:** 7-76.

Cendrin, F., Chroboczek, J., Zaccai, G., Eisenber, H. y Mevarech, M. (1993) Cloning, sequencing, an expression in *Escherichia coli* of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaebacterium *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*, **32,** 4308-4313.

Cerdán Villanueva, E., Freire Picos, M. A., González Siso, M. J., Rodríguez Torres, A. M. (1997) *Biología Molecular: Avances y técnicas generales*. Universidad de La Coruña.

Cleland, W. W. (1979) Stadistical analysis of enzyme kinetic data. *Methods Enzymol.*, **63:** 103-138.

Cleland, W. W. (1982) The use of pH studies to determine chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions. *Methods Enzymol*., **87:** 390-405.

Cleland, W. W. (2000) Low-barrier hydrogen bonds and enzymatic catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **382:** 1-5.

Cleton-Jansen, A. M, Goosen, N., Fayet, O., Van de Putte, P. (1990) Clonning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **172:** 6308-6315.

Collaborative Computational Project Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst*. **D50:** 760-763.

Connaris, H., Chaudhuri, J. B., Danson, M. J. y Hough D. W. (1999) Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng*. **64**, 38-45.

Danson, M. J. y Hough, D. W. (1992) The enzymology of archaebacterial pathways of central metabolism. *Biochem. Soc. Symp*., **58:** 7-21.

De Bernardez, E., Schwarz, E. y Rudolph, R. (1999) Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol*., **309**: 217-236.

De Bernardez, E. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol*., **12**: 202-207.

De Moreno, M.R., Smith, J.F. y Smith, R.V. (1985) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie Blue-Silver stain procedure. *Anal. Biochemistry*, **151:** 466-470.

Duine, J. A., Frank, J. y Zeeland, J. K. (1979) Glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: a quinoprotein. *FEBS Lett.*, **108:** 443-446.

Dym, O., Mevarech, M. y Sussman, J. L. (1995) Structural feature that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an *Archaebacterium*. *Science*, **267:** 1344-1346.

Ebel, D., Faou, P., Franzetti, B., Kernel, B., Madern, D., Pascu, M., Pfister, C., Richard, S. y Zaccai, G. (1999) Molecular interactions in extreme halophiles – the solvation – stabilization hypothesis for halophilic proteins. Pág. 227-237. En Oren, A. (Ed.) *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. CRC Press, Boca Raton.

Edwards, K. J., Barton, J. D., Rossjohn, J., Thorn, J. M., Taylor, G. L. y Ollis, D. L. (1996) Structural and sequence comparisons of quinone oxidoreductase, ζ-crystallin, and glucose and alcohol dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **328:** 173-183.

Eguchi, T., Kuge, Y., Inoue, K., Yoshikawa, N., Mochida, K. y Uwajima, T. (1992) NADPH Regeneration by Glucose Dehydrogenase from *Gluconobacter scleroides* for l-Leucovorin Synthesis. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56:** 701-703.

Ehrig, T., Hurley, T. D., Edenberg, H. J. y Bosron, W. F. (1991) General base catalysis in a glutamine for histidine mutant at position 51 of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **30:** 1062-1068.

Eichler, J. (2001) Biotecnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol. Adv.*, **19:** 261-278.

Eisenberg, H. (1995) Life in unusual environments - progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **318:** 1-5.

Eisenberg, H., Mevarech, M. y Zaccai, G. (1992) Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Adv. Protein Chem.*, **43:** 1-62.

Eklund, H. y Branden, C. I. (1976) Three dimensiional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2,4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **102:** 27-59.

Eklund, H., Plapp, B. V., Samama, J. P. y Branden, C. I. (1982) Binding of substrate in a ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **257:** 14349-14358.

Eklund, H., Samma, J. P., Wallen, L., Brändén, C. L., Akeson, A. y Jones, T. A. (1981) Structure of a triclinic ternary complex of horse liver alcohol deshydrogenase at 2,9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **146:** 561-587.

Esposito, L., Sica, F., Raia, C. A., Giordano, A., Rossi, M., Mazzarella, L. y Zagari, A. (2002) Crystal structure of the alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* at 1,85 Å resolution. *J. Mol. Biol*., **318:** 463-477.

Fisher, M. (1999) Structural studies of β-keto acyl carrier protein reductase from *Escherichia coli* and *Brassica napus*. (Tesis Doctoral). Department of Molecular Biology and Biotechnology. University of Sheffield.

Forterre, P. (1997) Archaea: what can we learn from their sequences?. *Curr. Opin. Genet. Develop*., **7:** 764-770.

Forterre, P., Brochier, C. y Hervé, P. (2002) Evolution of the Archaea. *Theor. Popul. Biol.*, **61:** 409-422.

Franzetti, B., Schoehn, G., Ebel, C., Gagnon, J., Ruigrok, R. W. H. y Zaccai, G. (2001) Characterization of a novel complex from halophilic archaebacteria which displays chaperone-like activities *in vitro*. *J. Biol. Chem*., **276:** 29906-29914.

Frolow, F., Harel, M., Sussman, J. L., Mevarech, M. y Shoman, M. (1996) Insights into protein adaptation to a satured salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat. Struct. Biol*., **3:** 452-458.

Fukuchi, S., Yoshimune, K., Wakayama, M., Moriguchi, M. y Nishikawa, K. (2003) Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *J. Mol. Biol*., **327:** 347-357.

Georgiou, G. y Valax, P. (1999) Isolating inclusión bodies from Bacteria. *Methods Enzymol*., **309:** 48-59.

Giardina, P., De Biase, H. G., De Rosa, M., Gambacorta, A. y Buonocore, V. (1986) Glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J*., **239:** 517-522.

Gilbert, B. (1975) *Investigation of molecular structure: spectroscopic and diffraction methods.* Pág. 123-130. Ed. Mills & Boon Limited, London.

Gupta, R. S. (1998) What are archaebacteria: life's third domain or modern prokaryotes related to Gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Molec. Micro*., **29:** 695-707.

Gutierrez, M. C., Kamekura, M., Holmes, M. L., Dyall-Smith, M. L. y Ventosa, V. (2002) Taxonomic characterization of *Haloferax* sp. ("*H. alicantei*") strain Aa 2.2: description of *Haloferax lucentensis* sp. nov. *Extremophiles*, **6:** 479-483.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*., **166:**554-558.

Hartmann, R., Sickinger, H. D. y Oesterhelt, D. (1980) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, **77:** 3821-3825.

Hochstein, L. I. y Lang, F. (1991) Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Hfx. Denitrificans*. *Arch. Biochem. Biophys*., **228:** 380-385.

Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C and Stetter, K. O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417:** 63-67.

Irimia, A., Ebel, C., Madern, C., Richard, S. B., Cosenza, L. W., Zaccai, G. y Vellieux, F. M. D. (2003) The oligomeric states of *Haloarcula marismortui* malate dehydrogenase are modulated by solvent components as shown by crystallographic an biochemical studies. *J. Mol. Biol*., **326:** 859-873.

James, P. L. y Anthony, C. (2003) The metal ion in the active site of the membrane glucose dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Bioch. Biophys. Acta,* **1647:** 200-205.

John, J., Crennell, S. J., Hough, D. W., Danson, M. J. y Taylor, G. L. (1994) The crystal structure of glucose dehydrogenase from *Thermoplasma acidophilum*. *Structure*, **2:** 385-393.

Jolley, K. A., Rapaport, E., Hough, D. W., Danson, M. J., Woods, W. G. y Dyall-Smith, M. (1996) Dihydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*: homologous overexpression of the cloned gene. *J. Bacteriol*., **178:** 3044-3048.

Jolley, K. A., Rusell, R. J. M., Hough, D. H. y Danson, M. J. (1997) Site-directed mutagenesis and halophilicity of dihidrolipoamide dehydrogenase from the halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Eur. J. Biochem*., **248:** 362-368.

Jörnvall, H., Persson, B. y Jeffery, J. (1987) Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.,* **167:** 195-201.

Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. y Ghosh, D. (1995) Short-chain dehydrogenase/reductases (SDR) *Biochemestry*, **34:** 6003-6013.

Juez, G., Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A. y Kusher, D. J. (1986) *Haloarcula hispanica* sp. nov. and *Haloferax gibbonsii* sp. nov., two new species of extremely halophilic archaebacteria. *Syst. Appl. Microbiol*., **8:** 75-79.

Juez, G., Rodríguez-Valera, F., Herrero, N. y Mojica, F. J. M. (1990) Evidence for salt-associated restriction pattern modifications in the archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. *J. Bacteriol.,***172:** 7278-7281.

Karlin, S., Brocchieri, L., Trent, J., Blaisdell, B. E. y Mrázek, J. (2002) Heterogeneity of genome and proteome content in Bacteria, Archaea and Eukaryotes. *Theor. Popul. Biol*., **61:** 367-390.

Kennedy, S. P., Ng, W. V., Salzberg, L., Hood, L. y DasSarma, S. (2001) Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res.,* **11:** 1641-1650.

Kersters, K. y De Ley, J. (1968) The ocurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. Antonie van Leeuwnghoek. *J. Microbio. Serol*., **34**: 393-408.

Kleifeld, O., Frenkel, A., Martin, J. M. L. y Sati, I. (2003) Active site electronic structure and dynamics during metalloenzymes catalysis. *Nature Struct. Biol.,* **10:** 98-103.

Korkhin, Y., Kalb, A. J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. y Frolow, F. (1998) NADP-dependente bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* y *Thermoanaerobacter brockii*. *J. Mol. Biol*., **278:** 967-981.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227:** 680-685.

Lamzin, V. S. y Wilson, K. S. (1997) Automated building of solvent structure combined with standard restrained refinement. *Methods Enzimol*., **277:** 269-305.

Lanyi, J. K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **38:** 272-290.

Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D. y Poch, O. (2002) Comparative análisis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res*., **30:** 5382-5390.

Lilie, H., Schwarz, E. y Rudolph R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol*., **9:** 497-501.

López García, P., Abad, J. P., Smith, C. y Amils, R. (1992) Genomic organization of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: physical map of the chromosome. *Nucleic Acids Res*., **20:** 2459-2464.

Madan, A. y Sonawat, H. M. (1996) Glucose Dehydrogenase from *Halobacterium salinarium*: Purification and Salt Dependent Stability. Physiol. *Chem. Phys. & Med. NRM*., **28:** 15-28.

Madern, D., Ebel, C. y Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, **4:** 91-98.

Madern, D., Pfister, C. y Zaccai, G. (1995) Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J. Biochem*, **230:** 1088-1095.

Madigan, M. T. y Oren, A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr. Opin. Microbiol*., **2:** 265-269.

Makinen, M. W., Maret., W. y Yim, M.B. (1983) Neutral metal-bound waer is the base catalyst in liver alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80:** 2584-2588.

Makino, Y., Ding, J. Y., Negoro, S., Urabe, I. y Okada, H. (1989) Purification and characterization of new glucose dehydrogenase from vegetative cells of *Bacillus megaterium*. *J. Ferment. Bioeng*., **67:** 372-379.

Mancinelli, R. L. y Hochstein, L. I. (1986) The occurrence of denitrification in extremly halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett*., **35:** 55-58.

Matsushita, K. y Adachi, O. (1993) Bacterial quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase, in: Davidson, V. L. (Ed), *Principles and Application of Quinoproteins*, Marcel Dekker, New York, pág. 47-63.

Matthews, B. W. (1977) *The proteins* **Vol. 3,** Pág 468-477. H. Neurath & R.L. Hill, 3ª Edición, New York: Academic Press.

Mevarech, M., Frolow, F. y Gloss, L. M. (2000) Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem*., **86:** 155-164.

Miller, S., Janin, J., Lesk, A. M. y Chothia, C. (1987) Interior and surface of monomeric proteins. *J. Mol. Biol*., **196:** 641-656.

Mojica, F. J., Juez, G. y Rodríguez Valera, F. (1993) Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst*I sites. *Mol. Microbiol.,* **9:** 613-621.

Mondstadt, G. M. y Holldorf, A. W. (1990) Arginine deaminase from *Halobacterium salinarum*: purification and properties. *Biochem. J.*, **273:** 739-745.

Montalvo-Rodríguez, R., López Garriga, J., Vreeland, R. H., Oren, A., Ventosa, A. y Kamekura, M. (2000) *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int. J. Sist.. Evol. Microbiol*., **3:** 1065-1071.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A. y Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structure by the maximum likelihood method. *Acta Crystallogr*., **53:** 240-255.

Ng, W. V., Ciufo, S. A., Smith, T. M., Bumgarner, R. E., Baskin, D., Faust, J., Hall, B., Loretz, C., Seto, J., Slagel, J., Hood, L. y DasSarma, S. (1998) Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic archaeon: megaplasmid or minichromosome? *Genome Res*., **8:** 1131-1141.

Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, F. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K. H., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L. y DasSarma, S. (2000) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, **97:** 12176-12181.

Ohshima, T., Ito, Y., Sakuraba, H., Goda, S. y Kawarabayasi, Y. (2003) The *Sulfolobus tokodaii* gene ST1704 codes highly thermostable glucose dehydrogenase. *J. Mol. Catal.* Part B Enzym., **23:** 281-289.

Olsthroom, A. J. J. y Duine, J. A. (1998) On the mechanism and specificity of soluble, quinoprotein glucose dehydrogenase in the oxidation of aldose sugars. *Biochemistry*, **37:** 13854-13861.

Oren, A. (1991) Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of fumarate. *J. Gen. Microbiol*., **137:** 1387-1390.

Oren, A. (2002) Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*., **28:** 56-63.

Oren, A. (2002) *Halophilic microorganisms and their environment*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, The Netherlands.

Oren, A. y Trüpper, H. G. (1990) Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of dimethylsulfoxide and trimethylamine N-oxide. *FEMS Microbiol. Lett*., **70:** 33-36.

Otwinowski, Z. y Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*., **276:** 307-326.

Oubrie, A. (2003) Structure and mechanism of soluble glucose dehydrogenase and other PQQ-dependent enzymes. *Bioch. Biophys. Acta,* **1647:** 143-151.

Person, B., Zigler, J. S. y Jornvall, H. (1994) A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductase (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinine oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur. J. Biochem.,* **226:** 15-22.

Pfeifer, F., Krüger, K., Röder, R., Mayr, A., Ziesche, S. y Offner, S. (1997) Gas vesicle formation in halophilic Archaea. *Arch. Microbiol*., **167:** 259-268.

Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M. y Herberg, O. (1998) Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihidrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure*, **6:** 75-88.

Pire, C. (1998) $NAD(P)^+$- glucosa deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*. Propiedades moleculares, mecanismo cinetico y clonaje. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.

Pire, C., Camacho, M. L., Ferrer, J., Hough, D. W. y Bonete, M. J. (2000) NAD(P)$^+$-glucose dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*: kinetic mechanism and metal content. *J. Mol. Catal*. Part B Enzym., **10:** 409-417.

Pire, C., Esclapez, J., Ferrer, J. y Bonete, M. J. (2001) Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS Lett*., **200:** 221-227.

Ramaswamy, S., Park, D. H. y Plapp, B. V. (1999) Substitutions in a flexible loop of horse liver alcohol dehydrogenase hinder the conformational change and unmask hydrogen transfer. *Biochemistry*, **38:** 13951-13959.

Rhodes, G. (2000) *Crystallography Made Crystal Clear. A guide for users of macromolecular models*. Capítulos 2-4. Academic Press, Inc. Orlando, Florida.

Richard, S. B., Madern, D., Garcin, E. y Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation: novel solvent-protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*, **39:** 992-1000.

Rodríguez Valera, F. y Lillo, J. A. G. (1992) Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev*., **103:** 181-186.

Rodríguez Valera, F., Juez, G. y Kushner, D. J. (1983) *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate utilizing extreme halophile. *System. Appl. Microbiol*., **4:** 369-381.

Rodríguez Valera, F., Ruiz Barraquero, F. y Ramos Cormenzana, A. (1980) Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *J. Gen. Microbiol*., **119:** 535-538.

Rossmann, M. G., Moras, D. y Olsen, K. W. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, **250:** 194-199.

Roussel, A. y Cambillav, C. (1991) TURBO_FRODO. In Silicon Graphics Geometry Partners Directory. Pág: 77-78.Silicon Graphics. Mountain View, CA.

Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1990) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, **74:** 5463-5467.

Siebers, B., Wendisch, V. F. y Hensel, R. (1997) Carbohydrate metabolism in *Thermoproteus tenax:* in vivo utilization of the non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway and characterization of its first enzyme, glucose dehydrogenase. *Arch. Microbiol*., **168:** 120-127.

Smith, L. D., Budgen, N., Bungard, S. J., Danson, M. J. y Hough, D. W. (1989) Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeacterium, *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem. J*., **261:** 973-977.

Stoeckenius, W., Lozier, R. H. y Bogomolni, R.A. (1979) Bacteriorhodopsin and purple membrane of halobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **505:** 215-278.

Tindall, B. J. y Trüpper, H. G. (1986) Ecophysiology of the anaerobic halophilic archaebacteria. *Syst. Appl. Microbiol*., **7:** 202-212.

Tipton, K. F. y Dixon, H. B. (1979) Effects of pH on enzymes. *Methods Enzymol*., **63:** 183-234.

Tomilson, G. A. y Hochstein, L. I. (1972) Isolation of carbohydrate metabolizing, extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol*., **18:** 698-701.

Tomilson, G. A. y Hochstein, L. I. (1976) *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing extremely halophilic bacterium. *Can. J. Microbiol*., **22:** 587-591.

Torreblanca, M., Rodríguez Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. y Kates, M. (1986) Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *System. Appl. Microbiol*., **8:** 89-99.

Woese, C. R. (2002) On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **99:** 8742-8747.

Woese, C. R. y Fox, G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, **74:** 5088-5090.

Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. l. (1990) Toward a natural system of organism: proposal for the domains: Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, **87:** 4576-4579.

Wright, D. B., Banks, D. D., Lohman, J. R., Hilsenbeck, J. L. y Gloss L. M. (2002) The effect of salts on the activity and stability of *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii* dehydrofolate reductases. *J. Mol. Biol*., **323:** 327-344.

Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. y Tanaka, N. (2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nat. Struct. Biol*., **9:** 691-695.

Yamada, M., Elias, M. D., Matsushita, K., Migita, C. T., Adachi O. (2003) *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. *Biochim. Biophys. Acta,* **1647:** 185-192.

Yamamoto, K., Kurisu, G, Kusunoki, M., Tabata, S., Urabe, I., Osaka S. (2001) Crystal structure of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 at 1.7 Å resolution. *J. Biochem*., **129:** 303-312.

APÉNDICE I

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

APÉNDICE I: DESCRIPCIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS

El significado de los marcadores genéticos que describen los genotipos de las cepas empleadas durante el desarrollo de este trabajo se muestra a continuación:

- *dcm*: mutación en la citosina metilasa. Bloquea la metilación de la citosina en la secuencia 5' ...G^mCAGG... 3' o 5' ...C^mCTGG... 3'.
- (DE3): el gen que codifica la T7 RNA polimerasa está integrado en el genoma del microorganismo.
- *end* A1: mutación en endonucleasa A. Aumenta la calidad del DNA aislado a partir de esta cepa, impidiendo su degradación.
- F^-: cepa que no contiene el episoma F.
- F': contiene el episoma F', plásmido de *E. coli* con fragmentos del cromosoma bacteriano. El episoma F' posee las características que se marcan entre corchetes, cuyo significado es:
  - *lac* I^q: mutante del gen *lac* I que sintetiza aproximadamente diez veces más represor que el tipo salvaje. Esta superproducción del represor inhibe la transcripción del operón *lac* en ausencia de inductor.
  - *lac* ZΔM15: mutación por deleción que elimina las secuencias del gen *lac* Z que codifica para la porción amino-terminal de la β-galactosidasa. El péptido expresado puede formar parte en la α-complementación para formar la β-galactosidasa activa.
  - pro A^+B^+ : mutación en el metabolismo de la prolina. Cuando se crece en medio mínimo este microorganismo requiere la presencia de prolina, ya que es incapaz de sintetizarla.
  - *tra*D36: mutación que suprime la transferencia por conjugación del factor F.
  - Tn 10 (Tc^R): transposón que confiere resistencia frente a tetraciclina
- *gal*: indica la incapacidad de la cepa para emplear galactosa.
- *gyr* A96: mutación en DNA girasa. Confiere resistencia al ácido nalidíxico, que en condiciones normales inhibiría la actividad enzimática.

- *hsd* R17 (r_{K12}^-, m_{K12}^-): mutación que proporciona la pérdida en la actividad de restricción, pero no de modificación de la enzima Eco K, una enzima de restricción tipo I. El DNA clonado será metilado, y por tanto protegido frente a la restricción si el vector fuera después introducido en una cepa *hsd* +.
- *hsd* S_B (r_B^-, m_B^-): mutación que elimina tanto la restricción como la metilación del DNA en la secuencia $TGA(N)_8TGCT$.
- *mut* S: cepa incapaz de corregir los desapareamientos de las hebras de DNA permitiendo obtener un alto porcentaje de mutantes.
- *omp* T: mutación que produce la carencia de una proteasa favoreciendo la obtención de proteínas recombinantes intactas.
- *rec* A1: mutación en una ATPasa DNA dependiente, esencial para la recombinación genética en *E. coli*. Previene la recombinación del DNA introducido con el DNA de la célula, asegurando la estabilidad de los insertos.
- *rel* A1: mutación que elimina el factor estricto que actúa en la inhibición de síntesis de rRNA cuando se detiene la síntesis de proteínas. Esta mutación permite la síntesis de rRNA en ausencia de síntesis de proteínas.
- *sup* E44: incluye un supresor para las mutaciones ámbar (mutaciones que convierten cualquier otro codón en el codón de terminación UAG) del tRNA. El supresor inserta una glutamina en el codón UAG.
- *thi*1: mutación en el metabolismo de la tiamina. Cuando se crece en medio mínimo este microorganismo requiere la presencia de tiamina, ya que es incapaz de sintetizarla.
- Tn 10: la cepa contiene un transposón que confiere resistencia frente a tetraciclina.
- Δ(*lac-pro*AB): deleción en el segmento cromosomal que abarca el operón *lac* y los genes vecinos que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de prolina.

APÉNDICE II

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

APÉNDICE II: MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS

- **Plásmido pCR®2.1:**

El vector de clonaje pCR2.1 (Invitrogen) es un plásmido de 3,9 Kb, confiere resistencia frente a los antibióticos ampicilina y kanamicina, y contiene el origen de replicación junto con una porción del gen lac Z de *E. coli*. Ese fragmento codifica los primeros 146 aminoácidos de la β-galactosidasa para la α-complementación (Figura 95).

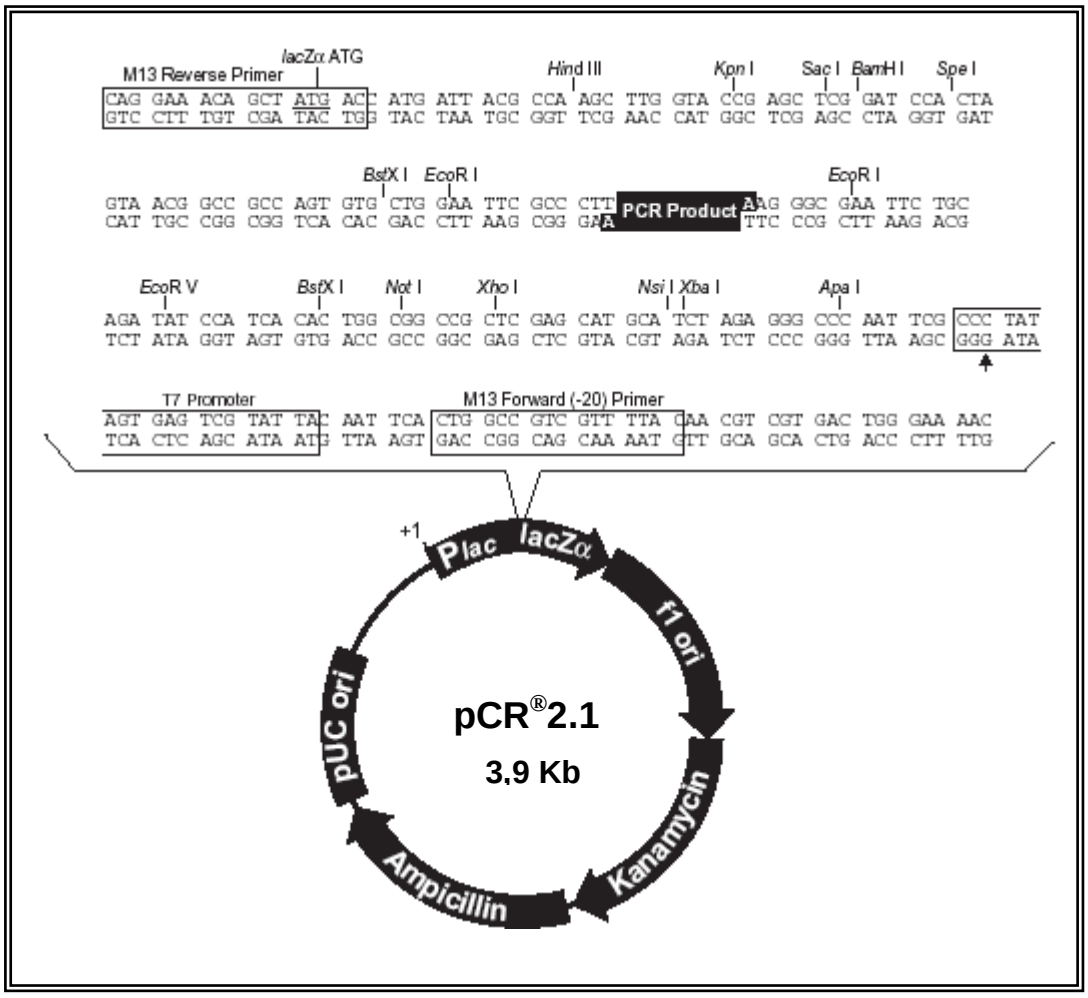

Figura 95: Mapa del vector de clonaje pCR2.1.

Además, la casa comercial suministra el plásmido en forma lineal con dos residuos de tiamina (T) en los extremos 3', aumentando la eficacia de la reacción de ligación entre el producto de PCR y el vector. Esto es debido a que las condiciones de PCR empleadas en la amplificación del gen incluyen un tiempo de elongación final en el que la polimerasa añade residuos de adenina (A) en su extremo 3' (Figura 96).

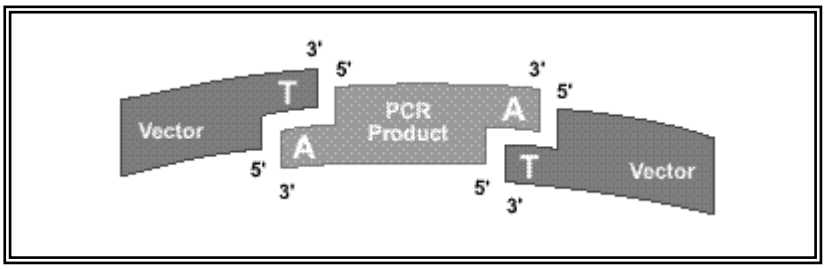

Figura 96: Esquema de la ligación del vector pCR2.1 y el producto de PCR.

- **Plásmido pET3a:**

El vector de expresión pET3a (Novagen) tiene un tamaño de 4,6 Kb, confiere resistencia frente al antibiótico ampicilina y posee el promotor y terminador de la T7 DNA polimerasa. Entre estas últimas secuencias se inserta el gen que se desea expresar (Figura 97).

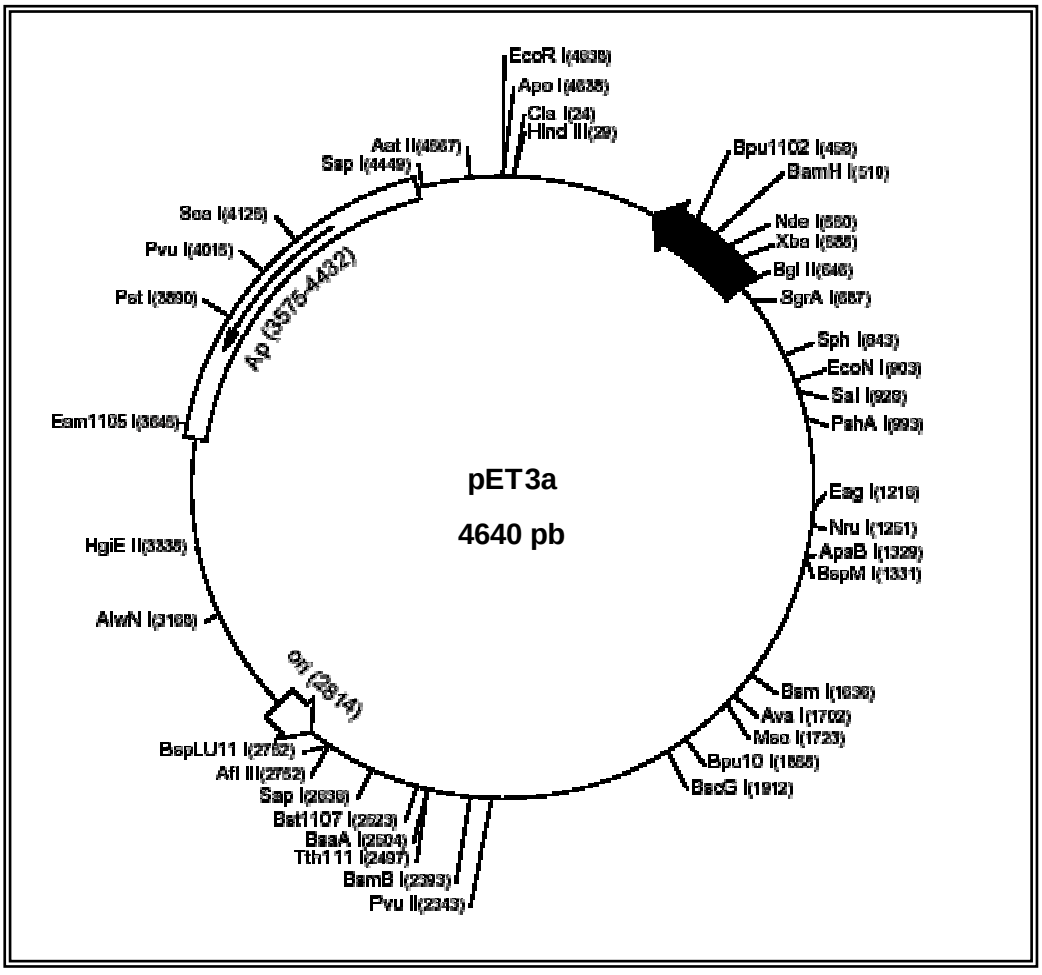

Figura 97: Mapa del vector de expresión pET3a.

- **Plásmido pET14b:**

El vector de expresión pET14b (Novagen) es muy similar al pET3a. Su tamaño sólo se diferencia en 31 pb y ambos confieren resistencia frente a ampicilina (Figura 98).

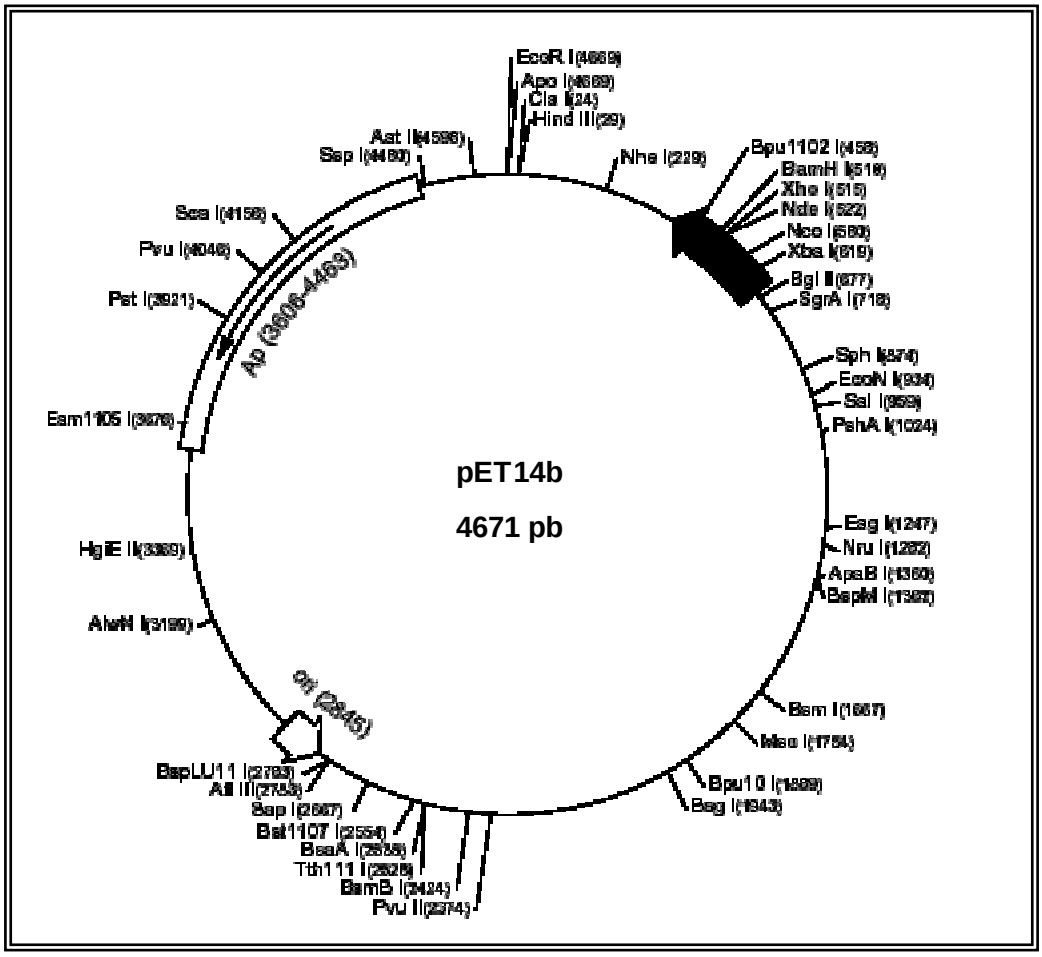

Figura 98: Mapa del vector de expresión pET14b.

La diferencia entre ellos consiste en que el plásmido pET14b incluye una cola de histidinas y la secuencia de reconocimiento de la trombina (proteasa) en el extremo N-terminal de la región de expresión (Figura 99). La inserción de dichos aminoácidos facilitan la detección y posterior purificación de la proteína sobreexpresada.

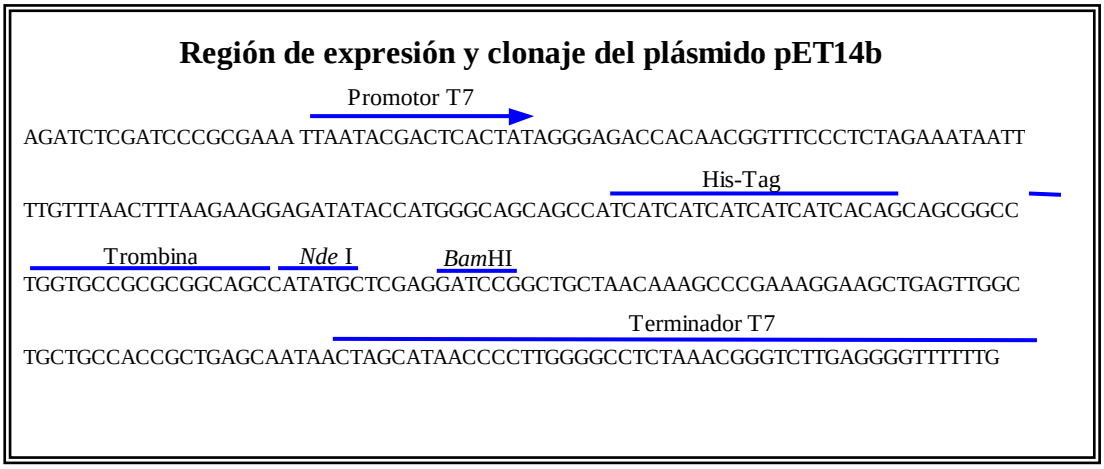

Figura 99: Detalle de la región de expresión y clonaje.

- **Plásmido pGEM®-11Zf(+)**

El vector pGEM®-11Zf(+) (Promega) es un plásmido de 3,2 Kb, posee el gen TEM-1 β-lactamasa que confiere resistencia frente a ampicilina y permite llevar a cabo la selección por color de los clones positivos, puesto que tiene incorporada una porción del gen LacZ de *E. coli* dentro de la cual se encuentra una región de clonaje múltiple (Figura 100).

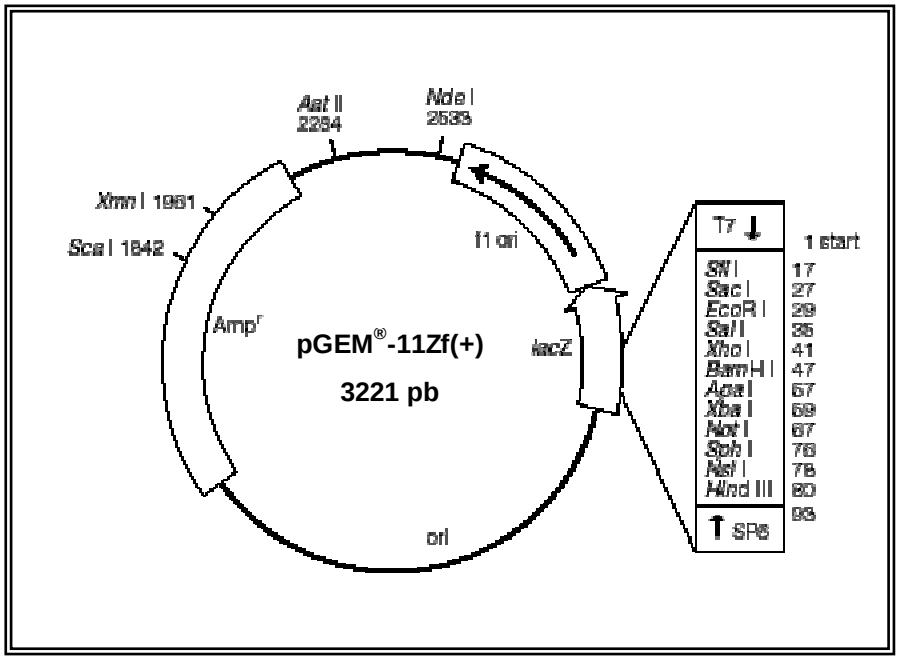

Figura 100: Mapa del vector pGEM®-11Zf(+).

APÉNDICE III

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

APÉNDICE III: ABREVIATURAS

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADP	Difosfato de adenosina
Amp	Ampicilina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
Ec.	Ecuación
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
E_T	Enzima total
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
GCG	Genetics computer group
GlcDH	Glucosa deshidrogenasa
Har.	*Haloarcula*
Hbt.	*Halobacterium*
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacinil]-etanosulfónico
Hfx.	*Haloferax*
hGlcDH	Glucosa deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*
HLADH	Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo
IPTG	Isopropil-β-D-galactósido
Kan	Kanamicina
K_{av}	Coeficiente de partición
Kb	Kilobases
K_{cat}	Constante catalítica
kDa	KiloDalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LBHB	Enlace de hidrógeno de baja barrera
LDH	Lactato deshidrogenasa

MDR	Superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media
mg_T	Miligramos de proteína totales
Mpb	Megapares de bases
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
Mr	Masa molecular
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleótido
$NADP^+$	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ORF	Marco abierto de lectura
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PFGE	Electroforesis de campo pulsante
PHA	Polihidroxyalcanoato
PQQ	Pirrolquinoleína quinona
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribosómico
SDH	Sorbitol deshidrogenasa de hígado de oveja
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDR	Superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
sGlcDH	Glucosa deshidrogenasa de *Sulfolobus solfataricus*
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
tGlcDH	Glucosa deshidrogenasa de *Thermoplasma acidophilum*
Tris	Tri-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
U_T	Unidades de actividad enzimática totales
V_e	Volumen de elución
$V_{máx}$	Velocidad máxima
V_o	Volumen muerto
V_t	Volumen total
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactosidasa

APÉNDICE IV

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

APÉNDICE IV: ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática del árbol filogenético universal 3
Figura 2: Filogenia del Dominio *Archaea* basado en secuencias de rRNA 16S de especies cultivadas y no cultivadas 5
Figura 3: Vías del catabolismo de glucosa 13
Figura 4: Descripción del mecanismo cinético de GlcDH de *Hfx. mediterranei* 16
Figura 5: Alineamiento de secuencias de aminoácidos 18
Figura 6: Estructura de la subunidad de la GlcDH de *B. megaterium* 23
Figura 7: Visión en estéreo de la estructura del monómero de la GlcDH de *T. acidophilum* 24
Figura 8: Representación esquemática del sitio de unión del zinc estructural en la GlcDH de *T. acidophilum* 25
Figura 9: Representación esquemática del sitio de unión del zinc catalítico en la GlcDH de *T. acidophilum* 26
Figura 10: Esquema de la transferencia del protón en la HLADH 28
Figura 11: Esquema del centro de unión del zinc catalítico de la ADH de hígado durante la conversión del complejo ternario 30
Figura 12: Programa de PCR de amplificación 37
Figura 13: Descripción de la técnica de mutagénesis dirigida empleando el kit GeneEditor™ *in vitro* Site Directed Mutagenesis System 39
Figura 14: Descripción de la técnica de mutagénesis dirigida empleada para incorporar mutaciones en DNA bicatenario 40
Figura 15: Seis celdas unidad en una estructura cristalina 50
Figura 16: Esquema de los método más empleados en la cristalización de proteínas 51
Figura 17: Descripción de la técnica de cristalización “hanging drop” 54
Figura 18: Montaje de cristales de proteína en capilares de cuarzo 56
Figura 19: Imágenes de lazos de nylon empleados en la recolección de cristales 57
Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la amplificación por PCR 64

Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión con las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI 65
Figura 22: Localización de la GlcDH recombinante mediante SDS-PAGE 66
Figura 23: Renaturalización de la GlcDH recombinante obtenida a partir del vector de expresión pET3a 69
Figura 24: Efecto de los agentes solubilizantes en el proceso de renaturalización 70
Figura 25: Renaturalización de la GlcDH recombinante a partir de los vectores de expresión pET3a y pET14b 72
Figura 26: Efecto de la concentración de proteína en el proceso de renaturalización 73
Figura 27: Efecto del tipo de sal y su concentración en el proceso de renaturalización de la GlcDH recombinante 74
Figura 28: Purificación de la glucosa deshidrogenasa recombinante 76
Figura 29: Determinación de Mr de GlcDH recombinante y salvaje 78
Figura 30: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de glucosa 80
Figura 31: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de $NADP^+$ 80
Figura 32: Dependencia del Log $V_{máx}$ con el pH 83
Figura 33: Dependencia del Log ($V_{máx}/K_m$) con el pH cuando el sustrato variable es el $NADP^+$ 84
Figura 34: Dependencia del Log ($V_{máx}/K_m$) con el pH cuando el sustrato variable es glucosa 84
Figura 35: Centro de unión del zinc catalítico en la GlcDH de *T. acidophilum* 88
Figura 36: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión con *Bam*HI 89
Figura 37: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA desnaturalizado 90
Figura 38: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones realizadas con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I 91
Figura 39: Localización de las proteínas sobreexpresadas GlcDH D38A y GlcDH D38C mediante SDS-PAGE 92
Figura 40: Comparación del proceso de renaturalización de las proteínas mutadas GlcDH D38C y GlcDH D38A con la GlcDH silvestre 93

Figura 41: SDS-PAGE de diversas fracciones correspondientes a la purificación de las proteínas GlcDH D38A y GlcDH D38C 94
Figura 42: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de glucosa 96
Figura 43: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de $NADP^+$ 96
Figura 44: Inactivación de la GlcDH silvestre y GlcDH D38C en presencia de concentraciones crecientes de EDTA 98
Figura 45: Termoestabilidad de la GlcDH silvestre y GlcDH D38C a una concentración de 1 M NaCl 100
Figura 46: Termoestabilidad de la GlcDH silvestre y GlcDH D38C a una concentración de 2 M NaCl 100
Figura 47: Termoestabilidad de la GlcDH silvestre y GlcDH D38C a una concentración de 3 M NaCl 101
Figura 48: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la GlcDH silvestre y GlcDH D38C 103
Figura 49: Cristal obtenido a partir de la GlcDH D38C libre 106
Figura 50: Cristal obtenido a partir del complejo binario GlcDH D38C-$NADP^+$ 107
Figura 51: Imagen de difracción de rayos X obtenida a partir del cristal Forma I 108
Figura 52: Imagen de difracción de rayos X obtenida a partir del cristal Forma II 109
Figura 53: Cristal obtenido a partir de la GlcDH D38C libre 110
Figura 54: Cristal obtenido a partir del complejo binario GlcDH D38C-$NADP^+$ en presencia de zinc 110
Figura 55: Cristal de GlcDH D38C obtenido en presencia de $NADP^+$, zinc y gluconolactona 111
Figura 56: Cristal obtenido a partir del complejo binario GlcDH D38C en presencia de NADPH 112
Figura 57: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica de la estructura GlcDH D38C resuelta a 1,6 Å 114
Figura 58: Representación esquemática del dímero de GlcDH D38C 117

Figura 59: Superposición de la estructura del monómero de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* y GlcDH de *T. acidophilum* 118
Figura 60: Alineamiento de secuencias basado en las estructuras de las GlcDHs de *Hfx. mediterranei* y *T. acidophilum* 119
Figura 61: Estructura cuaternaria de GlcDH de *Hfx. mediterranei* y *T. acidophilum* 121
Figura 62: Comparación del potencial electrostático de la superficie de las GlcDHs 123
Figura 63: Visión en estéreo de la localización de tres átomos de potasio 126
Figura 64: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica de la zona próxima al átomo de zinc y el $NADP^+$ de la GlcDH D38C 128
Figura 65: Visión en estéreo de los ligandos del átomo de zinc catalítico en el complejo binario GlcDH silvestre en presencia de NADPH y zinc 129
Figura 66: Movimiento de la hélice α1 entre la estructura del mutante GlcDH D38C con $NADP^+$ y zinc y la estructura de la GlcDH silvestre con NADPH y zinc 129
Figura 67: Superposición del sitio de unión del zinc catalítico entre las estructuras de la GlcDH silvestre con NADPH y zinc y la GlcDH D38C en presencia de $NADP^+$ y zinc 130
Figura 68: Visión en estéreo de los ligando del zinc catalítico en la estructura de la GlcDH de *T. acidophilum* a 2,9 Å de resolución 131
Figura 69: Superposición del sitio de unión del zinc entre la estructura de GlcDH D38C y la de GlcDH de *T. acidophilum* 132
Figura 70: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica de la zona que rodea el zinc en el complejo binario GlcDH D38C en presencia de NADPH y zinc 134
Figura 71: Visión en estéreo de la superposición de las estructuras del Complejo binario GlcDH D38C con NADPH en presencia y ausencia de zinc 135
Figura 72: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica del centro activo del complejo ternario no productivo GlcDH D38C-gluconolactona-$NADP^+$ en presencia de zinc 136
Figura 73: Cambio conformacional entre la estructura del complejo GlcDH D38C con $NADP^+$ y zinc, y del complejo ternario no productivo GlcDH D38C en presencia de $NADP^+$, gluconolactona y zinc 137

Figura 74: Visión en estéreo de las interacciones entre el $NADP^+$ y la gluconolactona con la GlcDH D38C en presencia de zinc 140
Figura 75: Interacciones entre el $NADP^+$ y la gluconolactona con la proteína en el complejo ternario no productivo de la GlcDH D38C en presencia de zinc 141
Figura 76: Visión en estéreo del mapa de densidad electrónica del centro activo del complejo GlcDH D38C-glucosa-NADPH en presencia de zinc 143
Figura 77: Visión en estéreo de la posición de la hélice α1 y el lazo 271-281 de los complejos ternarios no productivos GlcDH D38C con glucosa, NADPH y zinc y GlcDH D38C con gluconolactona, $NADP^+$ y zinc 143
Figura 78: Mecanismo catalítico propuesto para la GlcDH D38C 146
Figura 79: Esquema estructural de las zonas cercanas a los residuos D172, D216 y D344 en la estructura GlcDH D38C resuelta a 1,6 Å 150
Figura 80: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del plásmido pGEM-HmGlcDH desnaturalizado 151
Figura 81: Programa de PCR empleado para incorporar la mutación D344K 152
Figura 82: SDS-PAGE de las fracciones aisladas tras la expresión de la proteína GlcDH D172K D216K D344K 154
Figura 83: Comparación del proceso de renaturalización del triple mutante con la GlcDH silvestre en presencia de NaCl 155
Figura 84: Comparación del proceso de renaturalización del triple mutante con la GlcDH silvestre en presencia de KCl 155
Figura 85: SDS-PAGE de las fracciones de GlcDH D172K D216K D344K purificadas tras la cromatografía en DEAE celulosa 156
Figura 86: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de glucosa 158
Figura 87: Representación doble inversa de la velocidad inicial frente a la concentración de $NADP^+$ 158
Figura 88: Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad enzimática de la GlcDH D172K D216K D344K y de la GlcDH silvestre 160
Figura 89: Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad enzimática de la GlcDH D172K D216K D344K y de la GlcDH silvestre 160
Figura 90: Estabilidad de la GlcDH silvestre y triple mutante a temperatura ambiente en presencia de distintas concentraciones de KCl 162

Figura 91: Estabilidad de la GlcDH silvestre y triple mutante a 40 ºC en presencia de distintas concentraciones de KCl 162
Figura 92: Cristales obtenidos a partir del complejo binario GlcDH D172K D216K D344K - $NADP^+$ en presencia de zinc 164
Figura 93: Visión en estéreo de la comparación de las regiones próximas a las mutaciones D172K, D216K y D344K de la estructura del triple mutante con la GlcDH D38C 168
Figura 94: Superposición de los complejos binarios con $NADP^+$ y zinc de la GlcDH silvestre y triple mutante cristalizadas con NaCl y KBr respectivamente 169
Figura 95: Mapa del vector de clonaje pCR2.1 194
Figura 96: Esquema de la ligación del vector pCR2.1 y el producto de PCR 195
Figura 97: Mapa del vector de expresión pET3a 196
Figura 98: Mapa del vector de expresión pET14b 197
Figura 99: Detalle de la región de expresión y clonaje 198
Figura 100: Mapa del vector pGEM®-11Zf(+) 199

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

APÉNDICE V

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

APÉNDICE V: ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición aminoacídica de GlcDH de *Hfx. mediterranei*, *T. acidophilum* y *S. solfataricus* 20
Tabla 2: Cepas de *E. coli* utilizadas 33
Tabla 3: Plásmidos utilizados 34
Tabla 4: Oligonucleótidos específicos diseñados 35
Tabla 5: Programas empleados en la resolución de estructuras 58
Tabla 6: Actividades máximas obtenidas en diferentes ensayos de renaturalización variando la temperatura y la composición del tampón 71
Tabla 7: Purificación de Glucosa Deshidrogenasa recombinante 75
Tabla 8: Proteínas patrón empleadas para realizar la determinación de Mr de GlcDH 77
Tabla 9: Especificidad de sustratos y coenzimas de GlcDH salvaje y recombinante 79
Tabla 10: Constantes cinéticas calculadas a partir de velocidades iniciales 82
Tabla 11: Valores de $V_{máx}$, K_m y V/K para los sustratos glucosa y $NADP^+$ 82
Tabla 12: Valores de pK de los parámetros cinéticos para la GlcDH de *Hfx. mediterranei* 85
Tabla 13: Purificación de la GlcDH D38C 95
Tabla 14: Parámetros cinéticos de la proteína silvestre y mutante 97
Tabla 15: Tiempos de vida media a distintas temperaturas y concentraciones de sal de las proteínas GlcDH silvestre y GlcDH D38C 102
Tabla 16: Datos estadísticos de la difracción de rayos X para los cristales de GlcDH D38C 113
Tabla 17: Datos estadísticos del refinamiento de la estructura GlcDH D38C en KCl en presencia de $NADP^+$ y zinc 115
Tabla 18: Características de las zonas accesibles al solvente en el tetrámero de GlcDH de *T. acidophilum* comparadas con el dímero de GlcDH de *Hfx. mediterranei* 122
Tabla 19: Área de la superficie accesible al solvente calculada para determinadas cadenas laterales de GlcDH de *Hfx. mediterranei* y *T. acidophilum* 125

Tabla 20: Purificación de la proteína GlcDH D172K D216K D344K 157
Tabla 21: Parámetros cinéticos de la GlcDH silvestre y triple mutante 159
Tabla 22: Tiempos de vida media de la GlcDH silvestre y triple mutante a distintas temperaturas y concentraciones de KCl 163
Tabla 23: Datos estadísticos de la difracción de rayos X para los cristales de GlcDH D172K D216K D344K 165
Tabla 24: Datos estadísticos de la difracción de rayos X para los cristales de GlcDH silvestre 166

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

RESUMEN

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

RESUMEN

Haloferax mediterranei es un microorganismo halófilo extremo clasificado dentro del Domino *Archaea*. Este microorganismo es capaz de crecer en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Para el catabolismo de dicho azúcar *Hfx. mediterranei* utiliza la vía modificada de Entner-Doudoroff. La primera enzima de esta vía es la glucosa deshidrogenasa (GlcDH), que cataliza la oxidación de glucosa a glucono-1,5-lactona en presencia de $NAD(P)^+$.

Con el fin de estudiar las propiedades estructurales de las proteínas halófilas, el gen de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* se expresó en el huésped mesófilo *E. coli*, obteniéndose la proteína en forma de cuerpos de inclusión. La renaturalización de la GlcDH recombinante se llevó a cabo mediante dilución rápida empleando tampones con elevada concentración de sal. El proceso de purificación desarrollado es rápido y eficaz, consiguiéndose la enzima pura y concentrada en un solo paso cromatográfico. La caracterización de la GlcDH recombinante reveló que las propiedades moleculares y cinéticas de ésta enzima son prácticamente idénticas a las que presenta la GlcDH aislada de *Hfx. mediterranei*.

La GlcDH se cristalizó utilizando la técnica de "hanging drop" o gota colgante obteniéndose dos tipos de cristales, y su estructura se resolvió a 2,0 Å mediante reemplazamiento molecular isomorfo empleando diferentes metales pesados. Análisis de la estructura de la GlcDH de *Hfx. mediterranei* mostró que la superficie de la proteína posee una elevada carga negativa, como consecuencia del incremento de residuos ácidos, y una disminución de residuos hidrofóbicos debido a la pérdida de residuos de lisina expuestos en la superficie.

Mediante mutagénesis dirigida se construyeron dos mutantes (GlcDH D38A y GlcDH D38C) para estudiar el centro de unión del zinc catalítico. Los estudios bioquímicos de ambos mutantes y el estudio estructural de GlcDH D38C demostraron que el Asp38 es un residuo clave en la catálisis enzimática, como

ligando del átomo de zinc o como residuo implicado en el reconocimiento de sustratos. La estructura obtenida a partir del complejo binario GlcDH D38C-$NADP^+$ se resolvió a 1,6 Å permitiendo observar las interacciones de las moléculas de agua e iones con la superficie de la proteína. También se construyó otro mutante en el que se modificaron varios residuos que podrían estar implicados en la adaptación de la GlcDH a medios con elevada concentración de sal. Concretamente, se sustituyeron tres residuos ácidos (Asp) situados en distintas zonas de la superficie de la proteína por tres residuos básicos (Lys), obteniéndose una enzima ligeramente menos tolerante a altas concentraciones de sal. Por último, la proteína mutada GlcDH D172K D216K D344K se cristalizó en presencia de diferentes sales de potasio con el fin de analizar las bases moleculares de la halotolerancia.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES