

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y  
FUNCIONAL DE LA ASPARTATO  
QUINASA DE *Saccharomyces cerevisiae***

**Pablo Marina Losada**

Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

407 307  
14 ENE. 2003

Firma del M. responsable de Tesis  
*Pablo Marina Losada*

TD  
115

Sevilla, febrero de 2003



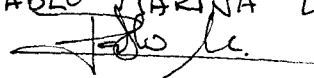
TN 3.1.1  
115

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae* sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado: PABLO MARINA LOSADA  


Sevilla, a 5 de MARZO de 199<sup>2003</sup>

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

R. 21961.



# CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA ASPARTATO QUINASA DE *Saccharomyces cerevisiae*

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla  
por el Licenciado

**Pablo Marina Losada**

Directora:

**Dra. Isabel López Calderón**

Profesora Titular

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

El Doctorando

La Directora de la Tesis

Sevilla, enero de 2003

## **ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1. Los aminoácidos en los seres vivos	1
2. La producción industrial de aminoácidos	1
3. La producción de treonina en <i>S. cerevisiae</i>	3
4. Las aspartato quinasa en los seres vivos. La aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	7
5. Cambios que afectan a la regulación de las aspartato quinasa	13
<b>OBJETIVOS</b>	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
<b>Materiales</b>	
1. Microorganismos	18
1.1. Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	18
1.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2. Plásmidos	19
3. Medios de cultivo	19
3.1. Levaduras	20
3.2. Bacterias	20
4. Oligonucleótidos	20
5. Productos químicos y proteínas	21
5.1. Reactivos	21
5.2. Enzimas y otras proteínas	23
5.3. Resinas	24
5.4. Otros	24
<b>Métodos</b>	
1. Condiciones de cultivo	25
1.1. Bacterias	25
1.2. Levaduras	25
2. Determinación del sexo	25
3. Cambio de sexo	25
4. Obtención de diploides	26
5. Esporulación	26
5.1. Medio líquido	26
5.2. Medio sólido	26
6. Disección de ascas y análisis meiótico	26
7. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	27
8. Purificación y concentración de ADN	27
8.1. Tratamiento con fenol	27
8.2. Precipitación con etanol	27
9. Manipulación enzimática del ADN	28
9.1. Digestión con enzimas de restricción	28
9.2. Reacción con ligasa del fago T4	28
10. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	29
11. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	29
12. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR	29
13. Transformación de <i>E. coli</i>	29
14. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	29

15. Determinación de la concentración de proteínas	30
16. Purificación de la aspartato quinasa	31
16.1. Purificación parcial de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	31
16.2. Purificación de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	31
16.3. Purificación de la aspartato quinasa como una fusión con la glutation-S-transferasa (GST) expresada en <i>E. coli</i>	32
16.4. Purificación de la aspartato quinasa como una fusión con la glutation-S-transferasa (GST) expresada en <i>S. cerevisiae</i>	33
17. Ensayo de actividad aspartato quinasa	33
18. Concentración de proteínas	34
18.1. Concentración de proteínas por precipitación con sulfato amónico	34
18.2. Concentración de proteínas por exclusión de agua mediante PEG	34
19. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	35
20. Electroforesis de proteínas en condiciones nativas sobre geles en gradiente	36
21. Cromatografía de filtración en gel mediante FPLC	37
22. Ensayos Western y ELISA	38
22.1. Ensayo Western	38
22.2. Ensayo ELISA	39
<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
1. Efecto de la mezcla de alelos de <i>HOM3</i> sobre la actividad aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	40
2. Purificación de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i> como una fusión con la glutation-S-transferasa	42
2.1. Producción y purificación en <i>E. coli</i>	42
2.2. Producción y purificación en <i>S. cerevisiae</i>	44
3. Análisis de la estructura cuaternaria de la AQf	46
4. Purificación de la AQwt	49
5. Análisis de la estructura cuaternaria de la AQwt	52
6. Efecto de la treonina en la estructura de las AQwt y AQf	54
7. Relación entre la inhibición por treonina y el cambio conformacional de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	59
8. Purificación de la AQf-R2	62
9. Análisis de la estructura cuaternaria de la AQf-R2	64
10. Efecto de la treonina en la estructura de la AQf-R2	66
11. Análisis de la protección por treonina de las AQf y AQf-R2 frente a inactivación térmica	68
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>71</b>
1. Efecto de la combinación de alelos de <i>HOM3</i> en una cepa diploide de <i>S. cerevisiae</i>	71
2. Estructura cuaternaria de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	73
3. Efecto de la inhibición por treonina sobre la estructura de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	80
4. Relación entre los fenómenos de inhibición por treonina y cambio conformacional de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	83
5. Efecto de la mutación R2 sobre la capacidad de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i> de unirse a treonina	87

6. Modelo teórico del proceso de inhibición por treonina de la aspartato quinasa de <i>S. cerevisiae</i>	89
<b>CONCLUSIONES</b>	91
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	92

# **INTRODUCCIÓN**



# INTRODUCCIÓN

## 1. LOS AMINOÁCIDOS EN LOS SERES VIVOS

Los aminoácidos se definen generalmente como moléculas en las que se combinan al menos un grupo amino con un grupo carboxilo. Sobre este esqueleto, multitud de radicales y modificaciones pueden añadirse para dar forma a un sinnúmero de estructuras posibles. En la naturaleza pueden encontrarse aminoácidos en conformaciones *L*, *D* y  $\omega$ , cumpliendo diversas funciones. En los seres vivos, como los sillares estructurales a partir de los cuales se construyen las proteínas, se pueden encontrar veinte tipos de aminoácidos diferentes (aunque uno de ellos, la prolina, es más propiamente un iminoácido). Con la excepción de la glicina, la adición de un radical en el carbono  $\alpha$  los hace ópticamente activos y aparecen únicamente en su conformación *L*. Los animales superiores, incluido el hombre, carecen de la capacidad de producción de ocho de estos aminoácidos (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina) y en otros dos casos los niveles de producción son insuficientes (arginina y histidina). Estos aminoácidos forman el grupo de los esenciales y, mientras que en los rumiantes se obtienen en buena parte a través de la flora bacteriana del rumen, en los animales monogástricos es necesario ingerirlos en la dieta (Fuller *et al*, 1979; Leuchtenberger, 1996). Una dieta pobre en cualquiera de ellos puede dar lugar a problemas de malnutrición.

Varias de las fuentes fundamentales de alimento animal y humano a nivel mundial, como el pescado, la soja, el maíz o el trigo, son deficitarios en metionina, lisina y treonina. En los países del tercer mundo, estas limitaciones combinadas con la falta de dietas equilibradas hacen de la malnutrición el principal problema sanitario, dada su influencia en el estado del sistema inmunitario y en el estado general del organismo. En la producción de origen animal, es generalizada la utilización de suplementos nutricionales en los que se incluyen los aminoácidos esenciales, sobre todo en los sectores avícola y porcino.

## 2. LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE AMINOÁCIDOS

A la luz de estos datos, resulta obvio que la producción industrial de estos aminoácidos esenciales tiene un interés comercial. Sin embargo, aparte de su uso como suplementos nutricionales (54% de toda la producción de aminoácidos; Leuchtenberger, 1996), también se emplean en la industria de los aditivos alimentarios (38%). Desde los inicios del siglo pasado son conocidas las posibilidades de los aminoácidos en la industria alimentaria (Crueger y Crueger,

1990; Esaki *et al.*, 1996; Leuchtenberger, 1996). En la actualidad se utilizan como saborizantes (alanina, aspártico, fenilalanina, glicina y glutámico), conservantes (cisteína, glicina, histidina y triptófano) y en la producción de aditivos varios (arginina, cisteína, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina y treonina). Aparte de su uso en alimentación, entre los otros campos a los que se aplica la producción de aminoácidos (8%) destacan la reciente expansión de su uso como terapéuticos (arginina, aspártico, asparragina, cisteína, glutamina, histidina, metionina, fenilalanina y tirosina) y en la industria cosmética (cisteína, serina). Toda esta demanda hace que la producción en el año 1996 fuera comercializada por un valor de tres mil millones de dólares, con unas amplias perspectivas de crecimiento gracias sobre todo al desarrollo de nuevas aplicaciones en industrias no relacionadas con la alimentación (Leuchtenberger, 1996).

En la producción de aminoácidos se emplean fundamentalmente cuatro estrategias (Crueger y Crueger, 1990; Leuchtenberger, 1996). En general es el sistema mas barato de producción de aminoácidos es la síntesis química. La producción de glicina, *DL*-metionina, *DL*-alanina o *DL*-triptófano suelen hacerse de esta forma. Sin embargo, tiene el inconveniente de que, salvo en el caso de la glicina que es ópticamente inactiva, lo que se produce es un racemato en el que se mezclan isómeros *D* y *L*. Si resulta rentable, la comercialización de este se puede hacer directamente. En caso contrario, se hace necesario un proceso de separación previo de ambas formas. En algunos casos, es posible la producción química de *L*-aminoácidos directamente mediante síntesis asimétrica a partir de compuestos proquirales (Leuchtenberger, 1996).

Alternativamente puede utilizarse la extracción a partir de hidrolizados proteicos. Se utiliza principalmente en la producción de cisteína, leucina, asparragina y tirosina. Sin embargo, también es posible usarlo como método de producción de complejos de aminoácidos ya que tiene la ventaja de que, a partir de materias primas ricas en proteínas (queratina, plumas), pueden obtenerse todos los aminoácidos proteínogénicos (Leuchtenberger, 1996).

La catálisis enzimática se basa en la utilización de enzimas o células inmovilizadas para la transformación de una materia prima. Suele utilizarse para la selección de los *L*-aminoácidos a partir de una mezcla de isómeros que resulta mas barato producir químicamente, aunque también se usa en procesos de producción (Crueger y Crueger, 1990; Leuchtenberger, 1996). Un ejemplo de este caso y que está tomando cierta relevancia en los últimos tiempos es el uso de las *D* y *L*-hidantoinasas, que permiten procesar de forma asimétrica polímeros de *D,L*-hidantoinas 5' monosustituidas para dar lugar a *D* o *L*-*N*-carbamoil aminoácidos. A partir de ellos es sencillo obtener los aminoácidos por eliminación enzimática o química del radical carbamoil (Crueger y Crueger, 1990; Altenbuchner *et al.*, 2001).

Por último, están los procesos basados en la fermentación microbiana. El trabajo pionero de Kinoshita *et al.* (1957) sobre la producción de glutamato monosódico en *Corynebacterium glutamicum* abrió la puerta al desarrollo de los procesos de fermentación como métodos de producción de aminoácidos. En la actualidad la síntesis de glutamato, lisina y treonina se realiza principalmente a través de la utilización de cepas mutantes superproductoras de estos aminoácidos. Suelen utilizarse glucosa o fructosa como fuentes de carbono, aunque el desarrollo de cepas capaces de crecer en materiales de desecho de otras industrias (melazas, hidrolizados de almidón) ha permitido reducir los costes de producción, haciendo estos procesos más rentables y competitivos. Para este cometido, la práctica totalidad de las aplicaciones se basan en la utilización de organismos procariotas, al ser estos más plásticos genéticamente y capaces de dar lugar a niveles de producción muy superiores a los de eucariotas (Niederberger, 1989).

Existen diferentes maneras de conseguir cepas como las descritas, capaces de superproducir aminoácidos (Enei e Hirose, 1984; Crueger y Crueger, 1990; Leuchtenberger, 1996; Esaki *et al.*, 1996). En primer lugar es posible obtener cepas auxótrofas que no sintetizan un compuesto responsable de la regulación de una ruta biosintética concreta. De este modo, la cepa se libera de los fuertes mecanismos de retroinhibición y represión a los que suelen estar sujetas, respectivamente, las enzimas responsables de la regulación de la ruta y los genes que las codifican. Por otro lado, es posible obtener cepas en las que, por mutación, esta regulación desaparece total o parcialmente. El método más utilizado es la selección de mutantes resistentes a análogos tóxicos de los aminoácidos que se quieren superproducir, siendo esta superproducción la responsable de la resistencia. La competencia que se establece entre el análogo tóxico y el aminoácido se encuentra en estas cepas desnivelada en favor de este último, dado que aparece en una cantidad anormalmente alta. De este modo se diluye la toxicidad del análogo. Por último, durante las últimas dos décadas ha sido relevante la utilización de técnicas de ingeniería genética para combinar el efecto de varias mutaciones en la misma cepa o aumentar la dosis de los genes cuya intervención es importante. Todas estas posibilidades no son excluyentes y, de hecho, ha sido combinando varias de ellas como se han conseguido los mejores resultados (Crueger y Crueger, 1990). En la actualidad existen numerosos ejemplos de cepas de bacterias, generalmente corinebacterias y enterobacterias, diseñadas y construidas específicamente para la producción de aminoácidos (Enei e Hirose, 1984; Niederberger, 1989; Crueger y Crueger, 1990; Leuchtenberger, 1996; Esaki *et al.*, 1996).

### 3. LA PRODUCCIÓN DE TREONINA EN *Saccharomyces cerevisiae*

Como ya se ha comentado, la treonina es uno de los aminoácidos esenciales menos

abundantes en varios de los alimentos que constituyen la base de la mayor parte de las dietas animales y humanas. Su producción se realiza fundamentalmente mediante procesos de fermentación en los que se utilizan cepas superproductoras de *Brevibacterium flavum*, *Providentia rettgeri*, *Serratia marcescens* y *E. coli* (Leuchtenberger, 1996). En todos los casos se utilizan cepas mutantes en las que los enzimas fundamentales de la ruta no son regulables por los productos finales de esta en bacterias. La demanda anual se sitúa por encima de las diez mil toneladas (Leuchtenberger, 1996) y principalmente está destinada a la producción de suplementos nutricionales y como precursor de varios agentes saborizantes de uso común (Sulser *et al.*, 1967).

El grupo en el que se ha realizado la presente tesis está interesado en el desarrollo de cepas de *S. cerevisiae* superproductoras de treonina, cuya aplicación pueda tener interés desde un punto de vista industrial. Si, en términos de producción de aminoácidos, los organismos eucarióticos no pueden competir con los procarióticos (Niederberger, 1989), ¿porqué plantearnos la posibilidad de la producción en levaduras? La utilización de levaduras nace como una alternativa a la producción de aminoácidos en bacterias, dadas las ventajas que presenta y que pueden hacer interesante su empleo. Es un organismo ampliamente reconocido como seguro, no infeccioso, comestible y de uso común. Son además un alimento de alto valor nutricional, sobre todo en cuanto a contenido de proteínas y de vitaminas. Su consumo puede hacerse a través de los alimentos en cuya producción se usan o directamente, como masa prensada. Esta puede además utilizarse como suplemento nutricional en la alimentación animal y humana, añadiéndola directamente en la dieta. Todas estas cualidades se combinan con el amplio conocimiento que se tiene de la fisiología, la bioquímica y la genética de *S. cerevisiae*, lo cual facilita su estudio y manipulación. Por último, las levaduras se vienen utilizando desde hace miles de años en la producción de alimentos de gran consumo como el pan, la cerveza, el vino, etc. En la actualidad el número e importancia de empresas que los utilizan, principalmente en el ramo de la alimentación, hace que la producción y el consumo anual de levaduras industriales sea difícilmente cuantificable. Conviene señalar que para muchas de estas empresas las masas de levadura que han cumplido su ciclo de producción son un residuo. La utilización de una cepa superproductora de treonina permitiría obtener a partir de ellas una biomasa enriquecida la cual podría considerarse como un subproducto comercializable. De este modo sería posible transformar un residuo en una fuente de ingresos alternativa.

En *S. cerevisiae* el aspártico es el punto de partida para la biosíntesis de los aminoácidos pertenecientes a la familia que lleva su nombre (Jones y Fink, 1982). De él parte la ruta biosintética común de la metionina y la treonina (Figura 1.1), cuya producción se separa a partir de la homoserina. La rama que lleva a la producción de metionina está fuertemente controlada, dirigiendo la mayor parte del flujo hacia la producción de treonina. La transformación de esta en  $\alpha$ -



efector final al producto de *GCN4* (Hinnebush, 1988). Este es un activador transcripcional que interacciona con secuencias reguladoras específicas situadas en los promotores de los genes diana. En la ruta de síntesis de la treonina, tanto *HOM3* como *HOM2* y *THR1* están sujetos a este tipo de control (Rafalski y Falco, 1988; Mountain *et al.*, 1991). Este mecanismo de control es una de las principales diferencias que presenta la producción de aminoácidos en levaduras, frente a bacterias. En estas, en general los mecanismos de regulación génica de la síntesis de aminoácidos son específicos de ruta y cursan en forma de control negativo de la expresión (Niederberger, 1989).

Por otra parte, a nivel de los enzimas que intervienen en la ruta de síntesis de treonina, existen una serie de controles específicos post-traduccionales que actúan sobreponiéndose al control general. El principal punto de regulación de la síntesis de treonina es el paso catalizado por la aspartato quinasa, producto del gen *HOM3*. El aspartato es transformado en b-aspartil-P en un proceso de fosforilación típico, que utiliza el ATP como origen del fosfato y en el que el  $Mg^{2+}$  participa como cofactor. La aspartato quinasa está sujeta a un fenómeno de retroinhibición de su actividad por treonina, funcionando como cuello de botella y controlando la entrada de flujo metabólico en la ruta (Stadtman *et al.*, 1961). De forma similar se regula la homoserina quinasa, producto del gen *THR1*, aunque en mucha menor medida. Así, este paso resulta menos importante en la regulación de la producción de treonina.

En *S. cerevisiae*, se ha descrito la existencia de una chaperona, denominada Fkbp12 y producto del gen *FPR1*, cuya actividad resulta fundamental para la regulación de la aspartato quinasa por treonina (Alarcón y Heitman, 1997). Esta función se definió como resultado del análisis de la interacción física entre la chaperona y la aspartato quinasa, descubierta a partir de un experimento de doble híbrido, comprobado a través de un segundo experimento de doble híbrido usando un sistema diferente y recomprobado a través de varios experimentos de copurificación. En el mutante *fpr1* descrito en el mismo estudio, las aspartato quinasa que se obtienen resultan insensibles a retroinhibición por treonina. Pese a que la chaperona está definida como una peptidil prolil isomerasa, aún no se conocen con exactitud los residuos concretos sobre los que actúa ni la naturaleza de las modificaciones que lleva a cabo sobre la estructura de la aspartato quinasa. Se realizó un intento de definir la región concreta de la aspartato quinasa a través de la cual se realizaba la unión, mediante la repetición del experimento de doble híbrido con formas truncadas de *HOM3*. Resultó imposible detectar ningún tipo de unión utilizando el extremo aminoterminal (hasta el residuo 394), el carboxiloterminal (desde los residuos 261 y 388 hasta el extremo) y con la zona central del gen (fragmento 261-394). Esto parece indicar que, o bien el contacto se realiza a través de varios puntos separados en la estructura primaria de la aspartato quinasa pero juntos en la terciaria, o bien que, siendo responsable de la unión una región concreta, esta resulta incapaz de

adoptar una estructura reconocible por la chaperona cuando el enzima se fragmenta de la forma descrita en el experimento.

#### 4. LAS ASPARTATO QUINASAS EN LOS SERES VIVOS. LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae*

En la actualidad se conocen los genes que codifican para aspartato quinasas en una gran variedad de organismos procariotas, arqueas y eucariotas. Mientras que en muchos casos estos genes se han descubierto a través de investigaciones orientadas al estudio del metabolismo de aminoácidos, en otros se han descubierto por homología de secuencia, a veces como resultado de la secuenciación del genomio completo del organismo en cuestión. Aunque en general presentan un cierto grado de homología entre sí, forman un grupo bastante heterogéneo en cuanto a secuencia, estructura y regulación. Su número también es variable pudiendo encontrarse organismos que solo tienen una aspartato quinasa y organismos que presentan tres aspartato quinasas diferentes (Truffa-Bachi, 1973; Patte, 1996; Azevedo *et al.*, 1997; base de datos BRENDA ([www.brenda.uni-koeln.de](http://www.brenda.uni-koeln.de))). Resulta interesante comentar que, en cualquier caso, el grado de homología que presentan entre si permite generalmente complementar una mutación de pérdida de función con la aspartato quinasa de otro organismo (Kalinowski *et al.*, 1991; Shaul y Galili, 1992; Omori *et al.*, 1993; Nishiyama *et al.*, 1995; Hernando-Rico *et al.*, 2001). Adicionalmente hay que mencionar que, en bacterias y plantas, la aspartato quinasa aparece como una fusión con la homoserina deshidrogenasa (Truffa-Bachi, 1973 ; Azevedo *et al.*, 1992; Patte, 1996; Azevedo *et al.*, 1997). En este caso, la porción homoserina deshidrogenasa aparece como un añadido en el extremo carboxiloterminar del enzima. Aunque las dos actividades aparecen de forma separada dentro del mismo polipéptido, ambas están sujetas a la misma regulación por producto final.

El origen de las diferencias en la estructura y el número de aspartato quinasas probablemente procede de la estructura de la ruta y su regulación en cada organismo. En bacterias y plantas, a partir del aspártico se sintetizan los aminoácidos lisina, metionina y treonina, compartiendo la parte inicial de la ruta hasta la síntesis del  $\beta$ -aspartato-semialdehído (Figura 1.2). En este punto se bifurca, siendo este sustrato por un lado de la dihidropicolinato sintasa, en la ruta de síntesis de lisina, y por el otro de la homoserina deshidrogenasa, en la ruta de síntesis de treonina y metionina. En hongos, como ya se ha referido para *S. cerevisiae*, solo los dos últimos aminoácidos derivan del aspartato ya que la lisina se sintetiza a partir del glutamato por la llamada vía del  $\alpha$ -aminoadipato, de forma totalmente independiente (Bhattacharjee, 1983).

Aunque en cada organismo la regulación del flujo metabólico a través de la ruta se ha

adaptado a su fisiología para satisfacer las necesidades de cada uno de los productos finales, sin embargo, en todos los casos se ha observado la tendencia a controlar la ruta limitando el flujo a través del primer paso común de la misma. El problema de la regulación de la ruta es probablemente responsable de la multiplicidad de aspartato quinasa que presentan algunos organismos, como *E. coli* (Truffa-Bachi, 1973), *Bacillus subtilis* (Moir y Paulus, 1977), *Arabidopsis thaliana* (Azevedo *et al.*, 1997) o *Zea mays* (Muehlbauer *et al.*, 1994; Azevedo *et al.*, 1997). En estos, la solución ha sido el desarrollo de varias aspartato quinasa cuya síntesis e inhibición se produce de forma diferente por los productos finales, configurando un sistema de control metabólico que asegura un aporte suficiente de lisina, metionina y treonina. Aquellos organismos en los cuales está presente una sola aspartato quinasa, existe un sistema de regulación complejo en el que se combinan los efectos de los varios productos finales obtenidos desde el aspártico. Esto da lugar a aspartato quinasa regulables a nivel de actividad por los productos finales de la ruta. En bacterias, suele depender de la unión conjunta a treonina y lisina (*B. flavum*, Shiio y Miyajima, 1969; *S. mutans*, McCarron y Chang., 1978; otros), siendo la excepción casos como el de la aspartato quinasa de *S. marcescens*, inhibible exclusivamente por treonina (Omori *et al.*, 1993). Como se ha comentado con anterioridad, en *S. cerevisiae* la aspartato quinasa es inhibible por treonina (Stadtman *et al.*, 1961).

Los monómeros de aspartato quinasa presentan una serie de dominios y motivos muy conservados. Es posible definir, de forma mas o menos general, tres regiones dentro de la estructura del monómero. Siendo el enzima de interés en esta Tesis, tomaremos el caso de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* como modelo (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Representación esquemática de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* que se obtiene de la base de datos Interpro ([www.ebi.ac.uk/interpro](http://www.ebi.ac.uk/interpro)) del servicio informático del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI).

La región aminoterminal, desde el extremo hasta el residuo 300 aproximadamente, está generalmente considerada como responsable de la actividad, reconociéndose en ella un dominio propio de quinasa de aminoácidos. Por su parte, la carboxiloterminal, desde el residuo 360 aproximadamente hasta el extremo, suele asociarse a la polimerización del enzima y a la regulación de este por concentración de aminoácidos. En ella se pueden reconocer dominios de respuesta a concentración de aminoácidos. Como ya se ha comentado, en el caso de los enzimas bifuncionales



aspartato quinasa-homoserina deshidrogenasa, tras el dominio regulador aparece la mitad homoserina deshidrogenasa. En cualquier caso, entre los dominios catalítico y regulador normalmente se define un tercer dominio, probablemente flexible. Este hace de puente, mediando el intercambio de información entre ambos extremos.

En la región aminoterminal del enzima aparecen varios dominios que han podido relacionarse con la actividad del enzima. Como se ha comentado ya, en conjunto suelen reconocerse como un dominio quinasa de aminoácidos. Dentro de este, el motivo KFGG suele encontrarse muy próximo al extremo aminoterminal del enzima. La excepción son las plantas, en las que las aspartato quinasa se encuentran en los cloroplastos, de modo que el motivo KFGG suele estar precedido por un péptido señal de unos cien residuos que dirige su localización (Azevedo *et al.*, 1997). Es uno de los determinantes principales de las aspartato quinasa, en las que se encuentra muy conservado. Solo se ha descrito una variación que afecte a este motivo y es el cambio del residuo de fenilalanina por uno de tirosina (*Thermus thermophilus*, Kobashi *et al.*, 1999; *Helicobacter pylori*, Tomb *et al.*, 1997; *Mycobacterium tuberculosis*, Cole *et al.*, 1998; *Corynebacterium glutamicum*, Kalinowski *et al.*, 1991; y otros) o isoleucina (*Sulfolobus tokodaii*, Kawarabayasi *et al.*, 2001) en las aspartato quinasa de algunas especies de bacterias y arqueobacterias. Su integridad resulta de particular importancia para la actividad de la proteína (Chen *et al.*, 1993), como demuestra la pérdida completa de actividad a la que da lugar su eliminación en *S. cerevisiae* (Arévalo-Rodríguez, 1996). Del mismo modo, en un experimento de mutagénesis dirigida contra la región que comprende este motivo, también en *S. cerevisiae*, ninguno de los cambios encontrados afectaba al motivo en si, de acuerdo con la hipótesis de que estos residuos son esenciales para la actividad (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999). Las mutaciones obtenidas a partir del mismo experimento en residuos cercanos al motivo KFGG afectaban a la afinidad de la aspartato quinasa por sus dos sustratos. Sin embargo, su función concreta no está clara.

El motivo DPR (aspártico, prolina, arginina) se sitúa en la región central del enzima, hacia el extremo carboxiloterminal de la porción considerada como catalítica, dentro de un dominio relativamente conservado. También parece estar relacionado con la actividad del enzima, estando conservado a lo largo de las secuencias de todas las aspartato quinasa conocidas (Parsot y Cohen, 1988). En cualquier caso y al igual que en el caso del motivo KFGG, su función concreta, estando relacionada con la actividad, no está del todo clara. Resulta interesante comentar que en el experimento de mutagénesis del motivo KFGG anteriormente referido aparecían mutaciones en zonas relativamente alejadas del propio motivo. Además, como se ha comentado al mencionar el estudio en el que se publicó la existencia de la chaperona Fkbp12 (Alarcón y Heitman, 1997),

resultó imposible detectar ningún tipo de unión cuando se utilizaron fragmentos de *HOM3*. En conjunto, estos resultados parecen indicar que residuos muy alejados en la estructura primaria del enzima pueden estar interaccionando en la estructura terciaria del mismo. De esta forma, los motivos KFGG y DPR podrían estar situados en una misma estructura tridimensional responsable de la actividad, siendo así difícil definir a nivel de estructura primaria una región concreta como responsable de esta o como reconocible por Fkbp12. Del mismo modo se explicaría la dificultad encontrada para asignar con exactitud una función específica a estos dos motivos.

Como ya se ha comentado, la región carboxilterminal generalmente es considerada como responsable de la regulación y de la polimerización del enzima (AKI-HDHI de *E. coli*; Veron *et al.*, 1972; Théze y Saint-Girons, 1974; Sibilli *et al.*, 1980; Fazel *et al.*, 1983; AKI-HDI de *S. marcescens*, Omori *et al.*, 1993). Recientemente, a través de un análisis de secuencia iterativo conocido como PSI-Blast, se ha definido un tipo de dominio denominado como ACT (Aspartate kinase-Chorismate-TyrA; Aravind y Koonin, 1999). Este dominio se encuentra asociado a enzimas regulables por concentración de aminoácidos o purinas, en las que aparece en número entre uno y cuatro. A partir de la cristalización de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, producto del gen *serA* de *E. coli*, se ha podido estudiar la estructura tridimensional de estos dominios (Schuller *et al.*, 1995). En este caso, el enzima es un homotetrámero inhibible por serina, con un único dominio ACT por monómero. En la estructura cuaternaria los dominios ACT quedan enfrentados entre sí por parejas. A cada domino ACT se une una molécula de serina, la cual probablemente quede estabilizada por interacciones con el dominio enfrentado. Así, cuatro moléculas de serina pueden unirse por cada enzima para dar lugar a la inhibición. En el caso de *S. cerevisiae* aparecen dos dominios por monómero, insinuando la posibilidad de que ambos pudieran interaccionar, creando una estructura homóloga que se forma en la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa de *E. coli*. De esta forma, en cuanto a regulación cada monómero podría funcionar de forma separada, independientemente de la estructura cuaternaria del enzima. Sin embargo, no hay estudios publicados que apoyen esta hipótesis. De hecho, cuestiones tan fundamentales como el número de sitios de unión a treonina por monómero están aún por contestar.

Un análisis de homología de secuencia realizado con varias de las regiones reguladoras de aspartato quinasas más parecidas a la de *S. cerevisiae* ha permitido identificar una serie de residuos que se encuentran conservados en todas ellas (Figura 1.3). Algunos de ellos resultan muy conservados entre los dominios ACT de varios tipos de enzimas, pudiendo considerarse como generales para dominios ACT. Por otra parte, otros residuos solo se conservan en la familia de las aspartato quinasas, pudiendo considerarse como específicos de ellas. Esto indica la existencia de una arquitectura propia y general de los dominios ACT, sobre la cual se introducen variaciones en

respuesta a las necesidades de regulación de las familias de proteínas en las que aparecen (Aravind y Koonin, 1999; Anantharaman *et al.*, 2001). Esto concuerda con el modelo de evolución propuesto para los dominios ACT, según el cual son dominios modulares, originados evolutivamente de modo independiente, que se han fusionado a una gran cantidad de enzimas diferentes haciéndolas susceptibles de regulación por ligandos concretos. La localización de los dominios ACT, mayoritariamente situados en el extremo carboxilterminal de la proteína, estaría de acuerdo con un modelo de evolución como el propuesto (Aravind y Koonin, 1999; Anantharaman *et al.*, 2001).

A nivel de estructura terciaria, existen una serie de estudios que permiten suponer una estructura multiglobular para las aspartato quinasa. En el caso de los enzimas bifuncionales de *E. coli*, se ha propuesto que presentan una estructura triglobular en la que las regiones aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa estarían separadas por la región reguladora (AKI-HDHI, Fazel *et al.*, 1983; AKII-HDHII, Belfaiza *et al.*, 1984). Estos resultados concuerdan con lo propuesto para la evolución de la región reguladora, separando el enzima en módulos funcionalmente diferentes. La falta de estructuras resueltas de aspartato quinasa hace que la asociación de estos módulos en la estructura cuaternaria de la proteína no está aún clara. El reciente anuncio sobre la cristalización de la AKIII de *E. coli* (Blanco y Viola, 2002) nos hace concebir esperanzas sobre la existencia de información al respecto en un futuro cercano.

Atendiendo a su estructura cuaternaria podemos separar las aspartato quinasa en dos grupos: homopoliméricas y heteropoliméricas. De todas las aspartato quinasa descritas estructuralmente hasta el momento, no se ha dado cuenta de ningún caso monomérico, siendo el número de monómeros siempre par y variable entre dos y ocho (base de datos BRENDA ([www.brenda.uni-koeln.de](http://www.brenda.uni-koeln.de))). Las aspartato quinasa homopoliméricas proceden generalmente de la expresión un único gen, responsable de todas las aspartato quinasa de ese tipo que va a haber en el organismo. De nuevo, la excepción son las aspartato quinasa descubiertas en plantas y para las cuales hay dos genes situados en cromosomas diferentes (Azevedo *et al.*, 1997). Todas las aspartato quinasa heteropoliméricas están compuestas por dos subunidades diferentes, tradicionalmente denominadas  $\alpha$  (de mayor tamaño) y  $\beta$  (de tamaño inferior). Las dos subunidades presentan un alto grado de homología entre sí, siendo normalmente la subunidad de menor tamaño homóloga a la región carboxilterminal de la de mayor tamaño. En este caso, las dos subunidades están codificadas por un único gen que da lugar a dos mensajeros diferentes a través de la utilización de un promotor que se encuentra situado en el interior del gen, de modo que la subunidad menor es exactamente igual que la porción carboxilterminal de la subunidad mayor (Moir y Paulus, 1977; Kalinowski *et al.*, 1991; Cirillo *et al.*, 1994; Nishiyama *et al.*, 1995; Hernando-Rico *et al.*, 2001). Existen varias hipótesis planteadas para explicar la función de la subunidad menor. Aparentemente

podría estar implicada en la regulación del enzima, ya que corresponde a la región carboxiterminal, considerada tradicionalmente como asociada a la regulación y al proceso de polimerización del enzima. Sin embargo, en la actualidad los resultados publicados no son concluyentes y en muchos casos resultan incluso contrarios (Chen y Paulus, 1988; Kalinowski *et al.*, 1991; Cirillo *et al.*, 1994; Nishiyama *et al.*, 1995). La única excepción conocida a lo expuesto es el caso de la aspartato quinasa de espinaca, en el que se ha publicado la aparición de la calmodulina como una subunidad de la aspartato quinasa, apareciendo establemente asociada a la actividad y con función regulatoria (Kochhar *et al.*, 1998). Sin embargo, son varias las dudas que pesan sobre este caso, al haber sido imposible obtener los mismos resultados en los trabajos llevados a cabo en paralelo por varios laboratorios (Azevedo *et al.*, 1997; Dr. G. Galili, comunicación personal).

La adquisición de la estructura cuaternaria ocurre a través de un proceso de polimerización. Este se ha estudiado principalmente en el caso de las dos aspartato quinazas bifuncionales presentes en *E. coli*, mediante el análisis de la renaturalización de ambas enzimas tras su desnaturalización con hidrocloreuro de guanidina (AKI-HDHI de *E. coli*, Belfaiza *et al.*, 1984; Muller y Garel, 1984a y b; Vaucheret *et al.*, 1987; AKII-HDHII de *E. coli*, Dautry-Varsat y Garel, 1978). Como resultado de estos estudios se ha podido deducir un mecanismo de polimerización en el cual la estructura cuaternaria definitiva, totalmente activa y regulable, se consigue mediante un proceso secuencial (Garel y Dautry-Varsat, 1977; Vaucheret *et al.*, 1987). Se han descrito una serie de cambios conformacionales a nivel de estructura terciaria y cuaternaria que preceden a cada paso de polimerización y que son necesarios para este tenga lugar. Paralelamente, a medida que va progresando este proceso secuencial, del mismo modo el enzima va recuperando tanto sus actividades como la capacidad de regulación de estas. En el caso de la estructura de la AKI-HDHI (Vaucheret *et al.*, 1987), inicialmente dos cambios conformacionales a nivel de estructura terciaria permiten que el monómero recupere su actividad aspartato quinasa. Tras ellos es capaz de dimerizar, estructura en la cual dos nuevos cambios permiten la recuperación de la actividad homoserina deshidrogenasa, primero, y de la regulación de esta, después. A partir de aquí, puede producirse la formación del tetrámero el cual adquiere la capacidad de regular alostericamente la actividad quinasa del enzima. Un patrón similar se ha podido observar para la AKII-HDHII, pese a que su estructura cuaternaria es dimérica. Resultados similares se han obtenido bien por proteolisis parcial (AKI-HDHI de *E. coli*; Fazel *et al.*, 1983; Veron *et al.*, 1972; Sibilli *et al.*, 1980) o bien por expresión de construcciones truncadas del gen (AKI-HDHI de *E. coli*, Théze y Saint-Girons, 1974; AKI-HDI de *S. marcescens*; Omori *et al.*, 1993). En todos los casos, esta destrucción de la estructura cuaternaria conlleva que las enzimas, tetraméricas en su conformación nativa, aparezcan en forma de especies moleculares de menor número de subunidades (monómeros o dímeros). Estas

estructuras intermedias aparecen asociadas en mayor o menor medida a pérdidas secuenciales de actividad y regulación, de un modo similar al descrito para el proceso de renaturalización de la AKI-HDHI de *E. coli*. Resulta interesante la existencia de estructuras que son activas pero no inhibibles, quizás indicando una cierta intervención del estado de polimerización en la regulación de la actividad. De algún modo, estructura cuaternaria y regulación por sustrato podrían estar relacionadas. Esto permitiría dar una explicación a que el extremo carboxiloterminale sea a la vez la región reguladora y la responsable de la polimerización del enzima.

El único estudio sobre este aspecto concreto se ha publicado recientemente (Paris *et al.*, 2002). En él se describe un cambio en el tamaño aparente de la aspartato quinasa sensible a treonina de *A. thaliana* (modificada para permitir su purificación en bacterias) cuando se incubaba en presencia de esta. Los autores presentan este cambio, desde un tamaño inicial de 470 kDa hasta uno en presencia de treonina 5 mM de 320 kDa, explicándolo como procedente de un cambio en la estructura cuaternaria. Este cambio daría lugar a una estructura tetramérica. Este resultado, más que aportar nuevos datos sobre la dependencia de la regulación del enzima respecto del estado de polimerización, abre la puerta a la existencia del proceso inverso: que la regulación esté afectando a la estructura cuaternaria de algún modo.

Con anterioridad a la presente tesis, no existía ningún dato publicado sobre la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* en ninguna situación. Sin embargo, de la secuencia del gen *HOM3* no es posible deducir la existencia de un comportamiento como el definido para las aspartato quinasa heteropoliméricas producidas a partir de un único gen (Rafalski y Falco, 1988).

## 5. CAMBIOS QUE AFECTAN A LA REGULACIÓN DE LAS ASPARTATO QUINASAS

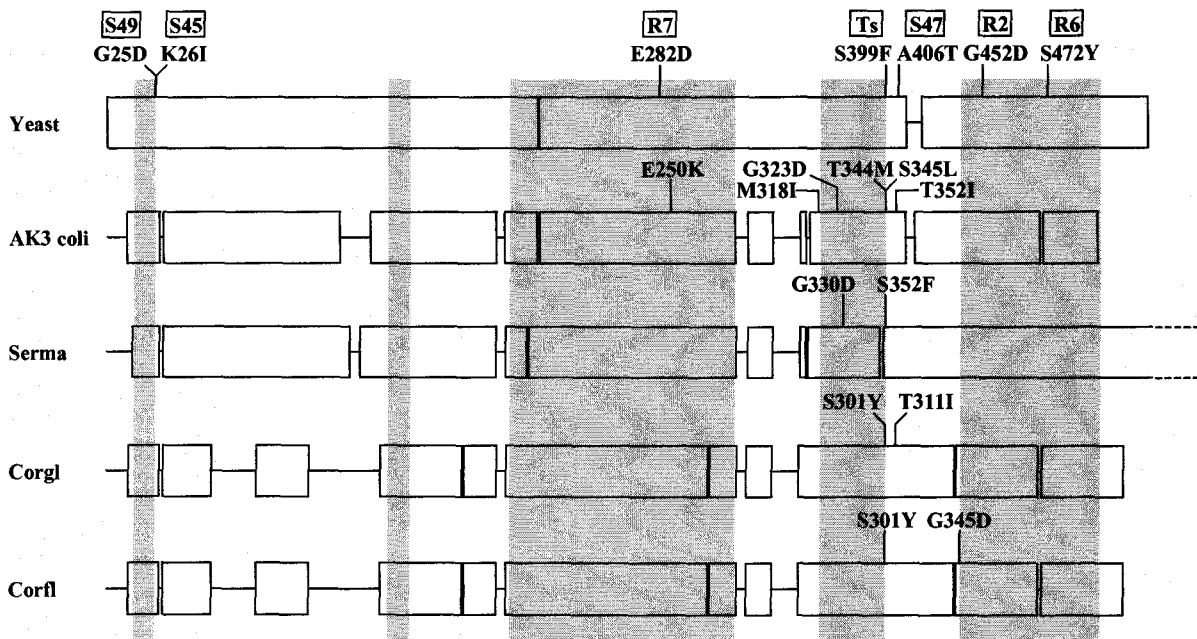
Como se ha comentado con anterioridad, existen diversas formas de obtener una cepa superproductora de uno o varios aminoácidos producto de una ruta biosintética concreta. La más efectiva ha sido la selección de cepas mutantes en las que los enzimas que catalizan los principales puntos de control de la ruta han perdido su capacidad de ser regulados. En el caso de la producción de treonina, se han obtenido cepas de varias especies de bacterias con estas características por diversos métodos de mutagénesis y selección de resistentes a hidroxinorvalina ( $\beta$ -hidroxivalerato), un análogo tóxico de la treonina (Leutchenberger, 1996; Esaki *et al.*, 1996) En *S. cerevisiae*, este tipo de mutaciones también se han descrito (Seibold *et al.*, 1981; Delgado *et al.*, 1982; Ramos y Calderón, 1992), estando asociado en ciertos fondos genéticos a un fenotipo de excretor de treonina

(Delgado *et al.*, 1982) y de resistencia a borrelidina (Seibold *et al.*, 1981).

En el laboratorio en el que se ha realizado esta Tesis se han aislado diversos alelos de *HOM3* a través de la resistencia a hidroxinorvalina que confieren, del mismo modo descrito para bacterias. Su expresión da lugar a aspartato quinasas total o parcialmente insensibles a inhibición por treonina (Ramos y Calderón, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993). Estos alelos se denominan *HOM3-R* y su introducción en una cepa de laboratorio da lugar a un incremento en la producción de treonina de entre quince y treinta veces. Estos mutantes crecen normalmente en medio mínimo, siendo capaces de dar lugar a crecimiento de una cepa Thr- en un experimento de alimentación cruzada realizado en medio sólido. Este fenotipo de excreción de treonina se tomó como asociado a la capacidad de superproducir treonina en una cepa excretora, según se había descrito anteriormente (Delgado *et al.*, 1982). Para caracterizar las mutaciones se construyeron cepas diploides que albergaban combinaciones de alelos silvestres con los distintos alelos mutantes *HOM3-R* aislados. Estas mostraron un crecimiento normal en medio mínimo, dando lugar al mismo fenotipo excretor en un experimento de alimentación cruzada realizado en medio sólido. Así pues, los alelos *HOM3-R* se consideraron dominantes frente al alelo silvestre (Ramos y Calderón, 1992). Paralelamente, se han aislado mutantes en los que las aspartato quinasas son hipersensibles a inhibición por treonina. Proceden de un experimento de mutagénesis y selección de cepas incapaces de utilizar serina y treonina (Holmber y Schjerling, 1996). Una posterior caracterización de estas cepas permitió observar que algunas de ellas eran incapaces de crecer en cualquier medio con treonina a una concentración de 1 g/L. Su análisis demostró que en todos los casos se debían a mutaciones en el gen *HOM3*. Estos alelos, que fueron denominados *HOM3-S*, daban lugar a aspartato quinasas que se inhiben completamente a concentraciones anormalmente bajas de treonina. Esta situación afecta a la entrada de flujo metabólico en la ruta produciendo un defecto en el crecimiento de la cepa por falta de metionina, que puede complementarse por la adición de metionina en cantidades normales. En este caso, se estudió el efecto de una combinación de alelos silvestre y S sobre la capacidad de crecer en medio con treonina. Las cepas diploides obtenidas no mostraron ningún defecto en su crecimiento en estas condiciones, no diferenciándose este del de una cepa silvestre. Así, el comportamiento de los alelos S fue definido como recesivo (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999).

La mayor parte de estas mutaciones y de las descritas en otros organismos se localizan en la región propuesta como reguladora, coincidiendo con su fenotipo de pérdida de regulación (Figura 1.3). Su estudio ha permitido identificar a todas como procedentes de cambios puntuales producidos, en su mayor parte, en varios de los residuos más conservados o próximos a ellos. Como ejemplo más significativo, conviene destacar el alelo *HOM3-R2* de *S. cerevisiae*, que presenta el cambio de una glicina por un aspártico en la posición 452, uno de los residuos más conservados de

la región propuesta como reguladora en las aspartato quinisas. Como resultado de este cambio, el enzima que se produce resulta completamente insensible a inhibición por treonina incluso a una concentración de 20 mM (Martín-Rendón *et al.*, 1993). Esto ratifica la relación entre el grado de conservación de estos residuos y su importancia en la regulación del enzima, pudiendo proponerse razones de tipo estructural para el efecto de mutaciones en residuos no conservados. Por otra parte, resulta interesante que algunas de las mutaciones se encuentran en residuos situados en la región propuesta como catalítica (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Representación esquemática de la homología entre las aspartato quinisas para las que se han descrito mutaciones que afectan a la regulación por treonina. El alineamiento se realizó tomando las secuencias de las distintas aspartato quinisas y se alinearon mediante el programa CLUSTAL W ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)), a través del servicio informático del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI). Las cajas marcan zonas de secuencia, dejando los huecos en el alineamiento como líneas. Las regiones coloreadas en gris corresponden a regiones conservadas.

En el caso de los mutantes S49 y S45 (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999), su hipersensibilidad procede de una drástica reducción en la capacidad de unión a los sustratos, del mismo modo que se describió durante la caracterización de la región situada alrededor del motivo KFGGG, sin que su regulación esté realmente afectada. Sin embargo, en el caso de las mutaciones de los alelos *HOM3-R7* de *S. cerevisiae* (Dr. C. Ramos, resultados sin publicar) y *E250K* de *E. coli* (Kikuchi *et al.*, 1999), situadas en el dominio catalítico de ambas enzimas, estas sí afectan a la regulación del enzima. Es posible que, de algún modo, cambios en la región catalítica puedan afectar a la

capacidad de regulación del enzima. Alternativamente, también podría ocurrir que estos cambios impidieran que el enzima se inhibiese como respuesta a su unión a treonina, sin afectar a la funcionalidad del dominio regulador. Es necesario un trabajo de caracterización más profundo para poder explicar la naturaleza del efecto que estas mutaciones tienen sobre la regulación.

Hasta esta Tesis, solo existía un estudio sobre la estructura cuaternaria de los mutantes insensibles a inhibición por producto final (Paris *et al.*, 2003). En este se presentan un análisis del dominio regulador de la aspartato quinasa sensible a treonina de *A. thaliana*, basado en la reciente descripción de los dominios ACT. Como resultado de la mutación de residuos concretos de esta región, se puede eliminar el comportamiento del enzima silvestre en presencia de treonina, presentado en un estudio anterior ya mencionado (Paris *et al.*, 2002). Si, como se ha comentado con anterioridad, el estado de polimerización está de algún modo relacionado con el fenómeno de inhibición, ya sea en un sentido, en el opuesto o en ambos. Su estudio podría resultar muy interesante para conocer como se produce la inhibición en la generalidad de las aspartato quinazas y concretamente en la de *S. cerevisiae*.



## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

El objetivo de esta Tesis ha sido profundizar en el conocimiento que se tiene de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*, producto del gen *HOM3*, cuya actividad supone el principal punto de regulación post-transcripcional de la síntesis de treonina.

El trabajo durante esta tesis se ha centrado en los siguientes aspectos:

**1. Estudio de la relación que se establece entre los distintos alelos mutantes de *HOM3* y el alelo silvestre, cuando coexisten en la misma cepa.**

Con el objeto de obtener una indicación del posible carácter polimérico de la aspartato quinasa, se ha estudiado la relación genética que se establece entre el alelo silvestre de *HOM3* y el alelo mutante *HOM3-R2*, que da lugar a una aspartato quinasa insensible a inhibición por treonina. Con ello además se pretende dar una explicación a la diversidad de resultados publicados con anterioridad para estudios similares.

**2. Análisis de la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae***

Se ha realizado una caracterización bioquímica de la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa silvestre de *S. cerevisiae*, así como de la aspartato quinasa mutante R2. Se pretende por una parte determinar la estructura nativa del enzima y por otro identificar posibles efectos sobre esta de mutaciones que afectan a la regulación de su actividad.

**3. Efecto que la unión a treonina tiene sobre la estructura de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*.**

Se ha estudiado el efecto que tiene sobre la estructura del enzima silvestre la inhibición por treonina. En este estudio se ha incluido el trabajo con la aspartato quinasa mutante R2, tratando de identificar una posible relación entre la regulación y la estructura del enzima.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

# MATERIALES

## 1. MICROORGANISMOS

Para la nomenclatura genética se han seguido las recomendaciones de "The Trends in Genetics Nomenclature Guide, 1998" (Elsevier Trends Journals, Cambridge, Gran Bretaña).

### 1.1. Estirpes de *Escherichia coli*

Las estirpes de *E. coli* utilizadas se describen en la Tabla 2.1

**Tabla 2.1.** Estirpes de *E. coli*.

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 $\alpha$	<i>F' endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 deoRA(lacZYA-argF) U169 recA1 (Φ80dlacZΔM15) λ-</i>	Hanahan (1985)
BL21	<i>F' ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) lysE</i> . Contiene el gen que codifica la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> .	Sturdiere y Moffatt (1986)

### 1.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas en esta Tesis se describen en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Origen/Construcción
ΣA3u	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3</i>	I. V.
ΣA3u MATa	<i>MATa ura3</i>	Cambio de sexo de la cepa ΣA3u
ΣA3u 2n	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3/ura3</i>	Cruzamiento de las cepas ΣA3u y ΣA3u MATa
ΣA3hu	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 hom3Δ</i>	I. V.
ΣA3uR2	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 HOM3-R2</i>	Inserción del alelo <i>HOM3-R2</i> en la cepa ΣA3hu por recombinación homóloga
ΣA3uHR2 2n	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3/ura3 HOM3/HOM3-R2</i>	Cruzamiento de las cepas ΣA3uR2 y ΣA3u MATa
ΣA3uR2 MATa	<i>MATa ura3 HOM3-R2</i>	Esporulación de la cepa ΣA3uHR2 2n
ΣA3uR2 2n	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3/ura3 HOM3-R2/HOM3-R2</i>	Cruzamiento de las cepas ΣA3uR2 y ΣA3uR2 MATa
F4	<i>MATa thr4</i>	G.C.
F15	<i>MAT<math>\alpha</math> thr1 arg4</i>	G.C.

I. V.: Isabel Velasco. Dpto. de Genética, Fac. de Biología, Univ. de Sevilla.

G. C.: Grupo Cruzcampo S. A., Sevilla.

## 2. PLÁSMIDOS

En las Tablas 2.3 y 2.4 se relacionan los vectores y plásmidos utilizados en esta Tesis para bacterias y levaduras respectivamente.

**Tabla 2.3.** Vectores y plásmidos para *E.coli*.

Nombre	Características relevantes	Referencia u origen
pGEX-5X-1	Vector de expresión de fusiones traduccionales con GST. La expresión está controlada por el promotor <i>tac</i> , inducible por IPTG.	A. P.
pGEX-HOM3	Inserción del fragmento <i>SaII</i> de pGEM-T-HOM3 en la diana para <i>SaII</i> de pGEX-5X-1.	Esta Tesis

A.P.: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia.

**Tabla 2.4.** Vectores y plásmidos para *S. cerevisiae*.

Nombre	Características	Referencia u origen
pGEM-T-Easy	Vector de clonación de fragmentos generados mediante PCR con extremos de A colgante.	PR. Kobs (1997)
pGEM-T-HOM3	Inserción del fragmento amplificado por PCR con los oligos hom3U y hom3L. Contiene la ORF del gen <i>HOM3</i> flanqueada por dianas para <i>SaII</i> .	Esta Tesis
pEG-KT	Vector de expresión de fusiones traduccionales a GST. La expresión está controlada por el promotor híbrido <i>CYC-GAL1</i> , inducible por galactosa.	Mitchell <i>et al.</i> (1993)
pEG-HOM3	Inserción del fragmento <i>SaII</i> de pGEM-T-HOM3 en la diana para <i>SaII</i> de pEG-KT.	Esta Tesis
pEG-HOM3 $\Delta$ BgIII	Eliminación el fragmento <i>BgIII</i> de pEG-HOM3.	Esta Tesis
pMR3-R2	Inserción de <i>HOM3-R2</i> en YRp17.	Martín-Rendón <i>et al.</i> (1993)
pEG-R2	Inserción del fragmento <i>BgIII</i> de pMR3-R2 en la diana para <i>BgIII</i> de pEG-HOM3 $\Delta$ BgIII.	Esta tesis
pMR3	Inserción del gen <i>HOM3</i> en YRp17.	Martín-Rendón <i>et al.</i> (1993)
pME1-H3	Inserción del fragmento <i>BamHI-HpaI</i> de pMR3 que contiene el gen <i>HOM3</i> , en YE <sub>p</sub> 24, abierto con <i>BamHI-PvuII</i> .	Esta Tesis
pGAL-HO	Inserción del gen que codifica la endonucleasa HO de <i>S. cerevisiae</i> en el vector YCp50, bajo el control del promotor de <i>GAL4</i> , inducible por galactosa.	Herskowitz y Jensen (1991)

PR.: Promega, Madison, EE.UU.

## 3. MEDIOS DE CULTIVO

En todos los casos, para la preparación de medio sólido se utilizó agar 2%.

### 3.1. Levaduras

Los aminoácidos y bases requeridos por cada cepa se prepararon como soluciones concentradas y se añadieron tras la esterilización del medio a las concentraciones indicadas por Sherman *et al.* (1986).

Medio mínimo SD: glucosa 2%, sulfato amónico 0.5% e “YNB w/o aminoacids and ammonium sulphate” (YNB) 0.17%.

Medio mínimo SDPro: glucosa 2%, prolina 0.1% e YNB 0.17% (Grenson *et al.*, 1970). El medio SDPro+AHV para la selección de cepas resistentes a hidroxinorvalina (AHV) se preparó añadiendo esta al medio estéril, a una concentración final de 1.6 g/L.

Medio mínimo SGal: galactosa 4%, sulfato amónico 0.5% e YNB 0.17%.

Medio de esporulación SPO: glucosa 0.05%, acetato potásico 1% y extracto de levadura 0.1%.

Medio rico YPD: glucosa 2%, bacto-peptona 2% y extracto de levadura 1%.

### 3.2. Bacterias

Medio rico LB: extracto de levadura 0.5%, bacto-triptona 1% y NaCl 0.5%. El medio selectivo LB+Amp para la selección estirpes resistentes a ampicilina se preparó añadiéndola al medio estéril. Desde una solución a 100 g/L, se diluyó hasta una concentración final de 50 mg/L para medio líquido y 100 mg/L para medio sólido.

Medio SOB: triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5% y KCl 1.25 mM. Se ajusta a pH 7 con NaOH y, tras esterilizar el medio por autoclave, se añade MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 10 mM.

## 4. OLIGONUCLEÓTIDOS

En la Tabla 2.5 se detallan los oligonucleótidos para PCR utilizados en esta Tesis.

Tabla 2.5. Oligonucleótidos para PCR.		
Nombre	Secuencia 5'-3' y posición relativa	Origen
hom3U	GAATTCGTCGACCAATGGATTCCAAC +3 nt desde el origen de traducción del gen <i>HOM3</i> . Solo son complementarios los últimos 16 nt. Incluye dianas para <i>EcoRI</i> y <i>SaII</i> .	B. M.
hom3L	GAATTCGTCGACTTCTTGTCCGCCAC (Cadena complementaria) +1804 nt desde el origen de traducción del gen <i>HOM3</i> . Solo son complementarios los últimos 14 nt. Incluye dianas para <i>EcoRI</i> y <i>SaII</i> .	B. M.

B. M.: Boehringer Mannheim, Alemania.

## 5. PRODUCTOS QUÍMICOS Y PROTEÍNAS

### 5.1. Reactivos

Acetato de litio	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Acetato potásico	Panreac Química, Barcelona
Ácido acético	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Ácido cítrico	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Ácido fórmico	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Ácido sulfúrico	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Acrilamida	Boehringer Mannheim, Alemania
Acrilamida (BN-PAGE)	Serva, Heidelberg, Alemania
ADN (esperma de salmón)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Agar	Pronadisa, Madrid
Agarosa	Pronadisa, Madrid
Alcohol isoamílico	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Aminoácidos	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Ampicilina	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
ATP	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Bacto-peptona	USB Corp., Cleveland, EE.UU.
Bacto-triptona	Panreac Química, Barcelona
Bases nitrogenadas	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
BCIP	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Bisacrilamida	Serva, Heidelberg, Alemania
Bis/Tris	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Bromuro de etidio	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
CaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Coomasie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Coomasie Blue G	Serva, Heidelberg, Alemania
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
dNTP	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
DTE	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Etanol	Prolabo, Merck, Darmstadt, Alemania

Extracto de levaduras	Pronadisa, Madrid
Fenol	USB Corp., Cleveland, EE.UU.
Ficoll 400	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Formamida	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Galactosa	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Glicerol	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Glucosa	Prolabo, Merck, Darmstadt, Alemania
Glutation reducido	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Hepes	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Hidroxinorvalina	Degussa A. B. M., Frankfurt, Alemania
IPTG	Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania
Isopropanol	Carlo Erba, Milán, Italia
KCl	Panreac Química, Barcelona
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Metanol	Prolabo, Merck, Darmstadt, Alemania
MgCl <sub>2</sub>	Prolabo, Merck, Darmstadt, Alemania
NaCl	Panreac Química, Barcelona
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
NADH	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
NaHCO <sub>3</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
NaOH	Panreac Química, Barcelona
NBT	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
OPD	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
PEG	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
PEP	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Perhydrol	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Persulfato amónico	Amresco, Solon, EE.UU.
SDS	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Sulfato amónico	Prolabo, Briare, Francia
Sulfato de protamina	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Tricina	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania



Triclorometano	Panreac Química, Barcelona
Tris	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
“YNB w/o aminoacids and ammonium sulphate”	Difco, Becton-Dickinson, Sparks, EE.UU.
<b>5.2. Enzimas y otras proteínas</b>	
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
BSA (ELISA)	Serva, Heidelberg, Alemania
Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa, fabricado en cabra	Nordic, Tilburg, Holanda
Anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina, fabricado en cabra	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Aprotinina	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
ARNasa (páncreas bovino)	Boehringer Mannheim, Alemania
Enzimas de restricción	Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania
Factor Xa	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia
$\gamma$ -globulina bovina	Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania
Leupeptina (hemisulfato)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Ligasa de ADN	Boehringer Mannheim, Alemania
Marcadores de uso cromatográfico de alto y bajo PM	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia
Ovoalbúmina	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Pepstatina A	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
PK-LDH	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Quimiostatina	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Polimerasa de PCR Ecotaq	Ecogen, Barcelona.
Polimerasa de PCR Expand HF	Boehringer Mannheim, Alemania
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Trombina	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia
Zimoliasa 20-T	Seikagaku Corp., Tokyo, Japón

### 5.3. Resinas

Blue Sepharose CL-6B	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Superdex 200	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia
Superosa 6B	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia
Glutathion Sepharose 4B (GS-4B)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia

### 5.4. Otros

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania
Marcador de tamaño (ADN) 1 kb+	Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania
Marcador de PM de rango amplio para SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania
Membrana Immobilon-P	Millipore Corp., Bedford, EE.UU.
Papel de filtro extragrueso	Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania
Perlas de vidrio ( $\phi = 0.5$ mm)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania
Placas para ensayos ELISA	Nalge-nunc International, Rochester, EE.UU.
Tripas de diálisis	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania

## MÉTODOS

### 1. CONDICIONES DE CULTIVO

#### 1.1. Bacterias

Los cultivos de bacterias se incubaron a 37°C, salvo que se indique otra temperatura. Los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm.

#### 1.2. Levaduras

Las incubaciones de cultivos de levaduras se realizaron a 30°C, salvo otra indicación. En el caso de los cultivos líquidos, estos se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm.

### 2. DETERMINACIÓN DEL SEXO

Para determinar el sexo de una cepa se cruzó esta por dos cepas de sexo conocido y opuesto (F4 y F15). Tras incubar las mezclas conjugantes, compuesta por biomasa fresca de ambas cepas sobre la que se había aplicado biomasa fresca de la cepa problema, durante 3-4 h a 30°C sobre medio rico YPD, se observó la formación de cigotos al microscopio. Se deducía que la cepa era del sexo contrario a aquella con la que conjugó.

### 3. CAMBIO DE SEXO

Cuando fue necesario cambiar el sexo una cepa, este se realizó mediante de la expresión controlada de la endonucleasa HO. Se utilizó el plásmido pGAL-HO, siguiéndose las recomendaciones descritas por Herskowitz y Jensen (1991). Tras cultivar la cepa hasta que alcanzó una  $DO_{660}$  igual a 0.7 en medio rico YPD, se recogieron las células y se lavaron extensivamente con agua destilada. La cepa se resuspendió en medio de expresión de la endonucleasa HO (medio mínimo SGal 4%), en el que se incubó durante tres horas. Posteriormente se sembraron unas 500-1000 células en medio rico YPD. Se comprobó el sexo de varias de las colonias a las que dieron lugar según la forma descrita, seleccionándose las que habían cambiado de sexo. Tras una nueva fase de crecimiento en YPD de las cepas aisladas, se seleccionaron las colonias que habían perdido el plásmido.

## 4. OBTENCIÓN DE DIPLOIDES

Los cruzamientos de cepas para obtener diploides se llevaron a cabo según los métodos convencionales descritos por Sherman *et al.* (1986). Se tomaron cantidades equivalentes de biomasa de cada uno de los conjugantes y se mezclaron sobre una caja de medio rico YPD. La mezcla conjugante se incubó a 30°C durante 3-4 h, transcurridas las cuales se resuspendió mezcla conjugante en una gota de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril, que se extendió sobre una caja de YPD, dejándola secar. Para aislar los diploides, los cigotos formados se separaron mediante un micromanipulador MSM System series 200 (Singer Instruments, Somerset, Inglaterra). El carácter diploide de las colonias resultantes se comprobó por su capacidad de esporular, así como por el fenotipo de las colonias derivadas de las esporas.

## 5. ESPORULACIÓN

### 5.1. Medio líquido

La biomasa del diploide que se deseaba esporular se transfirió a una caja de medio rico YPD y se incubó durante 24 h a 30°C. Con parte de esta biomasa se inocularon 5-10 mL de medio de esporulación SPO. Se incubó a 22°C durante al menos 4 días.

### 5.2. Medio sólido

Se extendió la biomasa que se deseaba esporular sobre una caja de medio rico YPD y se incubó durante 24 h a 30°C, transcurridos los cuales se replicó sobre una caja de medio de esporulación SPO. Se incubó a 22°C durante al menos 4 días.

## 6. DISECCIÓN DE ASCAS Y ANÁLISIS MEIÓTICO

Para el análisis de los productos meióticos procedentes de la esporulación de un diploide se siguieron básicamente los métodos descritos por Sherman *et al.* (1986). Para digerir las paredes de las ascas, una pequeña cantidad de biomasa esporulada se resuspendió en una gota de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril, con 2 mg/mL de zimoliasa 20-T, incubándose a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se extendió sobre una caja de medio YPD y las esporas de cada asca se separaron mediante micromanipulación, según se ha descrito anteriormente. La caja se incubó a 30°C y las colonias aparecidas se sembraron en los medios apropiados para determinar su fenotipo.

## 7. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*

Se siguió el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979) con algunas modificaciones. Las células procedentes de 1.5 a 5 mL de cultivo en medio selectivo LB+Amp se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en 100  $\mu$ L de solución 1 y se mantuvieron durante 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 200  $\mu$ L de solución 2 y se mantuvo la mezcla en hielo durante 5-10 min. Se añadieron 150  $\mu$ L de solución 3, se mantuvo la muestra en hielo 1-2 min y se centrifugó a 16000 g durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó con etanol, según se describe mas adelante. El precipitado final se resuspendió en 50-200  $\mu$ L de TER. Cuando se requirió mayor pureza en la preparación, se trató con fenol antes de la precipitación, según se describe a continuación.

---

➤ **Solución 1:** tris-HCl 25 mM, pH 8, glucosa 50 mM, y EDTA 10 mM.

➤ **Solución 2:** NaOH 0.2 M y SDS 1%.

➤ **Solución 3:** acetato potásico 3 M pH 4.8 y ácido fórmico 4.5%.

➤ **TER:** tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8 y ARNasa 15  $\mu$ g/mL (Sambrook *et al*, 1989).

---

## 8. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ADN

### 8.1. Tratamiento con fenol

Se usó para eliminar las proteínas de una solución de ADN. A la solución de ADN original se le añadió un volumen de solución de fenol y se mezcló bien con la ayuda de un agitador de tubos. La solución se centrifugó a 16000 g durante 5 min y se recogió la fase acuosa.

---

➤ **Solución de fenol:** fenol:triclorometano:alcohol isoamílico 25:24:1.

---

### 8.2. Precipitación con etanol

Se usó para concentrar muestras de ADN. Para ello se añadieron 2-3 volúmenes de etanol 96° frio y 1/10 de volumen de cloruro sódico 2.5 M. La mezcla se centrifugó a 16000 g, durante 15 min. El precipitado se lavó con etanol 70° frio y resuspendió en un volumen de tampón TE variable según las necesidades experimentales.

---

➤ **Tampón TE:** tris-HCl, 10 mM, EDTA, 1 mM, pH 8.

---

## 9. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DEL ADN

Para la manipulación del ADN con enzimas de restricción y de modificación se siguieron básicamente las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989).

### 9.1. Digestión con enzimas de restricción

Se utilizaron los tampones recomendados por la firma proveedora de las enzimas. Las reacciones se incubaron a 37°C durante un mínimo de 2 h.

### 9.2. Reacción con ligasa del fago T4

La ligación de un fragmento de ADN a un vector linearizado se llevó a cabo mezclando el vector y el fragmento en una proporción molar de 1:3, siendo la concentración final de ADN en la mezcla de reacción de aproximadamente 10 ng/μL. Se usaron 50 mU/μL de la ligasa y el tampón proporcionado por el fabricante. La reacción se incubó a 15°C durante un mínimo de 10 h.

---

☛ **Tampón de ligasa de T4 (10X):** tris-HCl 0.66 M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DTE 10 mM y ATP 10 mM.

---

## 10. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

La separación de fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa, sumergido en tampón según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989). La concentración de agarosa en los geles fue de 0.6-0.8% y tanto para su preparación como para la inmersión, se usó tampón TAE 1x. El gel se sometió a un voltaje de 5 V/cm proporcionados por una fuente LKB-GPS 200/400 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La densidad de las muestras se aumentó añadiendo 1/5 de volumen de tampón de carga. Como patrón se utilizó el marcador de tamaño 1 kb+ (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La tinción de las bandas de ADN se realizó durante la electroforesis añadiendo al gel bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μg/mL. El gel, iluminado con luz ultravioleta (300 nm) procedente de un transiluminador UV-3-3002 (Fotodyne Inc., Hartland, EE.UU.), se fotografió con una cámara MP4 (Polaroid, Hetfordshire, Gran Bretaña) equipada con un filtro Wratten 22A (Eastman Kodak Company, Rochester, EE.UU.) y película instantánea ISO 3000/36 tipo 667 (Polaroid, Hetfordshire, Gran Bretaña).

---

➤ **Tampón TAE (50x):** tris 2 M, ácido acético glacial 1 M, y EDTA 50 mM, pH 8

➤ **Tampón de carga:** ficoll 400 15% y azul de bromofenol 0.25%.

---

## 11. RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

El método utilizado se en basa la rotura, ayudada por congelación en N<sub>2</sub> líquido, de la malla de agarosa en que está retenido el fragmento a purificar. La banda que contiene el fragmento se extrajo del gel y se congeló a -20°C durante 12 h. Después se desmenuzó hasta no dejar fragmentos grandes, se añadió un volumen de fenol y se mezcló enérgicamente mediante un agitador de tubos durante 10 min. Tras ello, se congeló por inmersión en N<sub>2</sub> líquido durante unos segundos, se repitió la agitación y se congeló de nuevo del mismo modo durante 10 min. Finalmente, se centrifugó a 16000 g durante 15 min, se recogió la fase acuosa y se precipitaron los ácidos nucleicos con etanol del modo ya reseñado.

## 12. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN MEDIANTE PCR

Para la amplificación del gen HOM3 se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2.5, tomando como molde el plásmido pMR3 a una concentración final de 50 ng/mL. La reacción se llevó a cabo por la polimerasa Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Alemania) en su tampón con MgCl<sub>2</sub>, siguiendo lo recomendado por el fabricante y se incubó en un termociclador Progene (Techne UK limited, Cambridge, Gran Bretaña), programado con el siguiente protocolo:

1 x 2 min, 94°C ⇒ 4 x 2 min, 94°C ⇒ 31 x 2 min, 94°C

1 min, 52°C

1 min, 58°C

2 min, 68°C

2 min, 68°C ⇒ 1 x 5 min, 68 °C

## 13. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

Se usó una modificación del método del CaCl<sub>2</sub> descrito por Inoue *et al.* (1990). Las células competentes se prepararon a partir de 250 mL de un cultivo de bacterias DH5α en medio SOB, incubado a 22°C hasta una DO<sub>600</sub> de 0.6. Tras mantener el cultivo en hielo durante 10 min, se recogieron las células por centrifugación a 2500 g a 4°C. El precipitado se resuspendió en 80 mL de tampón TB frío y, tras 10-15 min en hielo, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 20 mL de tampón TB y se añadió DMSO hasta una concentración final del 7%. Tras mantenerse 10-15 min en hielo, la suspensión se repartió en viales que se congelaron

en N<sub>2</sub> líquido, almacenándose a -80°C hasta su uso.

Para la transformación se siguió el método descrito por Pope y Kent (1986). A 100 µL de estas células, descongeladas en hielo, se les añadieron 5-10 µL de la solución de ADN. La mezcla se mantuvo en hielo durante 5 min, sembrándose posteriormente sobre cajas de medio selectivo precalentado a 37°C.

---

➤ **Tampón TB:** PIPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM y KCl 250 mM. Se ajusta a pH 6.7 con KOH y se añade MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 55 mM.

---

#### 14. TRANSFORMACIÓN DE *S. cerevisiae*

Se siguió el método del acetato de litio descrito por Gietz *et al.* (1992). Las células de 10 mL de un cultivo incubado a 30 °C en medio rico YPD se recogieron mediante centrifugación al alcanzar una DO<sub>660</sub> de 0.6-0.8. Se lavaron con 10 mL de agua y a continuación con 1 mL de solución TE/AcLi, resuspendiéndose finalmente en 0.1 mL de esta misma solución. Para cada transformación se usaron 50 µL de esta suspensión a los que se añadieron 5-10 µL de la solución de ADN y 5 µL de ADN de esperma de salmón, previamente tratado según se describe en Sambrook *et al.* (1989). A esta mezcla se le añadieron 300 µL de solución PEG y se incubó a 30°C durante 30 min. Tras un choque térmico a 42°C durante 10-15 min, se recogieron las células por centrifugación y, tras lavarlas con agua destilada, se sembraron en medio selectivo.

---

➤ **Solución TE/AcLi:** acetato de litio 0.1 M, en tampón TE, pH 7.5.

➤ **Solución PEG:** PEG 4000 al 40% (p/v) en solución TE/AcLi.

---

#### 15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración total de proteínas de una solución se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976). Para ello se usó el preparado Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Como estándar se utilizaron  $\gamma$ -globulina bovina u ovoalbúmina.



## 16. PURIFICACIÓN DE LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae*

### 16.1. Purificación parcial de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*

Se partió de un cultivo de levaduras en medio mínimo SD, recogido cuando alcanzó una  $DO_{660}$  entre 1 y 1.5. Las células procedentes de 100 mL se resuspendieron en 400  $\mu$ L de tampón PBS con DTE, 1 mM y mezcla de inhibidores de proteasas, 10x. Las células se rompieron mediante agitación con perlas de vidrio en un agitador convencional de tubos. Se realizaron 8 ciclos de agitación de 30 s, con intervalos de reposo en hielo de al menos 30 s. La recuperación de las células rotas y su contenido se realizó lavando las perlas de vidrio con 4 mL de tampón PBS con DTE 1 mM, recogándose todo el volumen líquido, al cual se añadió sulfato de protamina hasta una concentración final de 1.5 g/L. Se incubó en hielo con agitación constante mediante una mosca magnética durante 30 min. Los residuos celulares y ácidos nucleicos se eliminaron con una centrifugación a 20000 g durante 30 min a 4°C.

Para la purificación parcial de la aspartato quinasa, se realizó un fraccionamiento con sulfato amónico del extracto crudo resultante. Se añadió sulfato amónico a partir de una solución concentrada a saturación a 4°C, hasta una concentración final del 30% de saturación. Se incubó en hielo con agitación constante mediante una mosca magnética durante 1 h, tras lo cual se centrifugó a 20000 g durante 30 min a 4°C. Se añadió sulfato amónico al sobrenadante hasta una concentración final del 40% de saturación, incubándose en hielo con agitación constante mediante una mosca magnética durante 1 h. Se volvió a centrifugar a 20000 g durante 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100-200  $\mu$ L de PBS con DTE 1 mM.

---

➤ **Tampón PBS:** NaCl 0.14 mM, KCl 2.7 mM,  $Na_2HPO_4$  10 mM y  $KH_2PO_4$  1.8 mM, pH 7.3.

➤ **Mezcla de inhibidores de proteasas (1x):** aprotinina 10  $\mu$ g/mL, leupeptina 25  $\mu$ g/mL, pepstatina 1  $\mu$ g/mL, quimiostatina 1  $\mu$ g/mL y EDTA 0.5 mM.

---

### 16.2. Purificación de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*

Se partió de un cultivo de la cepa  $\Sigma$ A3hu[pME1-H3] en medio mínimo SGal, recogido cuando alcanzó una  $DO_{660}$  entre 1 y 1.5. Las células procedentes de 1 L se resuspendieron en 10 mL de tampón PBS con DTE 1 mM y mezcla de inhibidores de proteasas, 5x. Las células se rompieron mediante agitación con perlas de vidrio durante 5 min en un molino de bolas Vibrogen (Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Germany), según lo especificado por el fabricante. La recuperación de las células rotas y su contenido se realizó lavando las perlas de vidrio con 4 mL de PBS con DTE 1 mM, recogándose todo el volumen líquido, al cual se añadió sulfato de protamina hasta una

concentración final de 1.5 g/L. La solución se incubó en hielo con agitación constante mediante una mosca magnética durante 30 min. Los residuos celulares y ácidos nucleicos se eliminaron con una centrifugación a 20000 g durante 30 min a 4°C.

Para la purificación de la aspartato quinasa, inicialmente se llevó a cabo un fraccionamiento con sulfato amónico, del mismo modo que en la purificación parcial. En este caso se resuspendió el precipitado final en 10 mL de Hepes, 50 mM, pH 7.5, con glicerol al 10%. Este volumen se filtró a través de una columna de Blue Sepharose CL-6B (1.5 x 5 cm), equilibrada en Hepes 50 mM, pH 7.5, la cual se lavó posteriormente con al menos 5 volúmenes de Hepes 50 mM, pH 7.5. La aspartato quinasa se eluyó con un gradiente lineal de 100 mL desde el tampón de lavado hasta tampón PBS 4x. Se recogieron fracciones de 2 mL, registrando su  $DO_{280}$  y la actividad aspartato quinasa.

### **16.3. Purificación de la aspartato quinasa como fusión con la glutation-S-transferasa (GST) expresada en *E. coli***

Se partió de un cultivo de la cepa BL-21 transformada con el plásmido pGEX-HOM3. Se preparó un inóculo de 1 L en medio LB+Amp y se cultivó a 37°C hasta que alcanzó una  $DO_{600}$  próxima a 2. En este punto se enfrió el cultivo hasta 22°C, momento en el cual se indujo la expresión de HOM3 por la adición de IPTG hasta una concentración final de 0.1 mM. Tras 45 min, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 20 mL de tampón PBS con mezcla de inhibidores 2x. Las células se rompieron mediante sonicación con un sonicador Branson modelo 250 (Branson Ultrasonics, Danbury, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la rotura, se realizaron 8 ciclos de 30 s a nivel 5. La suspensión resultante se trató con Triton X-100 1%, ARNasa (50 µg/mL) y ADNasa (25 µg/mL) a 37°C en agitación durante 30 min. Los residuos celulares se eliminaron mediante una centrifugación a 20000 g durante 30 min a 4°C. El volumen resultante se filtró a través de una columna de GS-4B (1 x 2 cm), previamente equilibrada con al menos 30 volúmenes de tampón PBS. La aspartato quinasa de fusión se liberó de la columna por digestión de la fusión GST-aspartato quinasa. Al volumen de matriz GS4B se le añadieron 15 U de factor Xa en y se incubó la mezcla a 22°C durante 12 h con agitación constante. Para recoger la aspartato quinasa de fusión, se dejó decantar la columna y se dejó eluir, lavando la columna con el volumen de tampón PBS necesario para alcanzar un volumen final de 1.5 mL. Dependiendo de las necesidades, el resultado se congeló directamente o en glicerol 20%.

---

➤ **IPTG:** IPTG 0.1 M en H<sub>2</sub>O estéril.

➤ **Solución de factor Xa:** 1 U/µL en tampón PBS.

---

#### **16.4. Purificación de la aspartato quinasa como fusión con la glutatión-S-transferasa (GST) expresada en *S. cerevisiae***

Se partió de un cultivo de la cepa  $\Sigma$ A3hu transformada con el plásmido de producción de la aspartato quinasa de fusión silvestre o mutante R2. Se recogieron las células de 1 L de medio mínimo SGal a una  $DO_{660}$  entre 1 y 2 y se resuspendieron en 4 mL de tampón PBS con mezcla de inhibidores de proteasas 10x. Las células se rompieron mediante agitación con perlas de vidrio en un homogenizador MSK (B. Braun-Melsungen AG, Melsungen, Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizaron 3 ciclos de 10 s a 4000 rpm, con intervalos de reposo de 15 s y refrigeración constante por  $CO_2$ . La recuperación de las células rotas y su contenido se realizó lavando las perlas de vidrio con 40 mL de tampón PBS, recogándose todo el volumen líquido, al cual se añadió sulfato de protamina hasta una concentración final de 1.5 g/L. Se incubó en hielo con agitación constante mediante una mosca magnética durante 30 min. Los residuos celulares y ácidos nucleicos se eliminaron mediante una centrifugación a 20000 g durante 30 min a 4°C. El volumen resultante se filtró a través de una columna de GS-4B (1 x 2 cm), previamente equilibrada con al menos 30 volúmenes de tampón PBS. La fusión GST-aspartato quinasa unida a la columna se eluyó incubándola con 1.5 mL de tampón de elución durante 10 min, en agitación a temperatura ambiente. El resultado se dializó cuatro veces contra 500 mL de tampón PBS, durante al menos 45 min cada vez. Al volumen resultante se le añadieron 15 U de trombina y se incubó a 22°C durante 12 h con agitación constante. Para eliminar la GST o las fusiones GST-aspartato quinasa no digeridas, se incubó el volumen resultante de la digestión con trombina con la columna usada previamente (reequilibrada en tampón PBS) durante al menos 45 min a 22°C con agitación constante. El resultado se eluyó dejando decantar la columna y lavándola con el volumen de tampón PBS necesario para alcanzar un volumen final de eluido de 1.5 mL. Dependiendo de las necesidades de trabajo, el resultado se congeló directamente o en glicerol 20%.

---

☛ **Tampón de elución:** glutatión reducido 10 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8.

☛ **Solución de trombina:** 1 U/ $\mu$ L en tampón PBS.

---

#### **17. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ASPARTATO QUINASA**

La actividad aspartato quinasa se ensayó cuantificando la transformación de NADH en  $NAD^+$  asociada a la liberación de ADP en el sistema acoplado piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (PK/LDH) (Spencer y Wedler, 1984). La desaparición de NADH da lugar a una

disminución en la absorbancia a 340 nm. Para la medida de la  $DO_{340}$  nm se utilizaron varios modelos de espectrofotómetro: DU-640 con controlador de temperatura "Peltier" (Beckman Instruments, Glenrothes, Gran Bretaña), Lambda 5 (Perkin Elmer, Wellesley, EE.UU.) y UV-3000 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón).

Salvo que se indique lo contrario, para las medidas de actividad aspartato quinasa se añadió una cantidad de enzima determinada a la mezcla de ensayo y se incubó al menos 2 min a 30°C. La reacción se inició por la adición de aspartato hasta una concentración final de 10 mM, manteniendo la mezcla de medida también a 30°C y registrando su curso durante un periodo de tiempo inferior a 5 min. La actividad presente en la mezcla de reacción previa a la adición de aspartato constituyó la actividad basal del sistema y se restó de la actividad total obtenida para cada medida. El volumen de medida fue siempre de 0.5 mL.

Para el cálculo de la actividad se tomó siempre el intervalo de tiempo superior a dos minutos con un descenso lineal de absorbancia, en el que la pendiente fuera mayor. El coeficiente de extinción molar del NADH se tomó como  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

---

➤ **Mezcla de ensayo:** PEG 6000 5%, Hepes 50 mM, pH 7.5, KCl 10 mM, PEP 5 mM, ATP 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NADH 0.3 mM y aproximadamente 10 U/mL de PK/LDH.

---

## 18. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

### 18.1. Concentración de proteínas mediante precipitación con sulfato amónico

Cuando fue necesario concentrar una muestra de proteínas hasta volúmenes inferiores a 200  $\mu\text{L}$ , se utilizó la precipitación de estas con sulfato amónico como medio de concentración. A la solución de proteínas se añadió sulfato amónico en polvo hasta una concentración final del 50% de saturación. La mezcla se incubó con agitación constante en hielo durante un mínimo de 1 h, tras lo cual se centrifugó la muestra a 20000g, durante 30 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en un volumen variable de tampón PBS con o sin glicerol 20%, según las necesidades experimentales.

### 18.2. Concentración de proteína por exclusión de agua mediante PEG

Cuando fue necesario concentrar una muestra de proteínas hasta volúmenes no inferiores a 200  $\mu\text{L}$ , la muestra original se introdujo en una tripa de diálisis de un tamaño de poro inferior a 8000 Da. Esta se cubrió con PEG 8850 en polvo, responsable de la absorción gradual del volumen líquido de la muestra, manteniéndose a 4°C. Conocido el volumen de partida, la pérdida de volumen de la muestra se controló de forma aproximada a través del peso de la tripa de diálisis,

considerando que 1 mL de agua pesa 1 g. Una vez se alcanzó el volumen deseado se lavó la tripa con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril y se recuperó la muestra lavando extensivamente las paredes de la tripa de diálisis con el volumen de muestra restante.

## 19. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Los geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) se prepararon de 1 mm de espesor según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). Para la realización de las electroforesis se utilizó un dispositivo de electroforesis vertical Miniprotean 3 (Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizaron geles al 10% de acrilamida/bisacrilamida, con un gel de empaquetamiento al 4%.

Las muestras, que se mantuvieron en hielo en todo momento, se diluyeron con un volumen de reactivo Laemmli y se calentaron a 100°C durante 5 min, cargándose en el gel inmediatamente después. Para su conservación se almacenaron a -20°C. Las electroforesis se desarrollaron con el gel sumergido en tampón de electroforesis, a 30 mA (constante), utilizando una fuente LKB-GPS 200/400 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y a temperatura ambiente. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador de rango amplio para SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania).

Las bandas de proteína se revelaron mediante un tratamiento de 30 min con solución de tinción y de aproximadamente 12 h en solución de destinción.

---

➤ **Mezcla acr. /bisacr. (30% T, 2.67% C):** 29.2% (p/v) de acrilamida y 0.8% (p/v) de bisacrilamida en agua desionizada.

➤ **Gel de poliacrilamida al 10%:** tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, mezcla de acr./bisacr. diluida hasta el 10% T y SDS 0.1%. La reacción de polimerización se desencadena por la adición de persulfato amónico hasta el 0.05% y TEMED hasta el 0.05%.

➤ **Gel de empaquetamiento al 4%:** tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, mezcla de acr./bisacr. diluida hasta el 4% T y SDS 0.1%. La reacción de polimerización se desencadena por la adición de persulfato amónico hasta el 0.05% y TEMED hasta el 0.1%.

➤ **Tampón de electroforesis:** tris 25 mM, glicina 0.2 M y SDS 0.1%, pH 8.3.

➤ **Reactivo Laemmli:** tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, glicerol 5%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.0125%.

➤ **Solución de tinción:** metanol 10%, ácido acético 10% y Blue Brilliant R-250 (azul de coomasie)

0.025%.

➤ **Solución de destinción:** metanol 10% y ácido acético 10%.

---

## 20. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES NATIVAS SOBRE GELES EN GRADIENTE

Los geles de poliacrilamida nativos azules (“Blue Native”-PAGE, BN-PAGE) se prepararon y desarrollaron de acuerdo con el sistema descrito por Schägger *et al.* (1994), en el cual la asociación de las proteínas a azul de coomasie les confiere la misma carga neta negativa en superficie, permitiendo que su separación en gel dependa exclusivamente de su tamaño molecular. Los geles se prepararon con un gradiente continuo desde el 5 al 18% de acrilamida/bisacrilamida.

Las muestras se prepararon en tampón PBS con glicerol 15% y para su conservación se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las electroforesis se desarrollaron a un máximo de 500 v y 15 mA, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Como marcadores de tamaño se utilizaron los marcadores de uso cromatográfico de alto peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), BSA y OVA, preparados en tampón de carga y cargados por parejas de pesos moleculares separados.

Las bandas de proteína se revelaron por sucesivos tratamientos de 4-12 h con solución de destinción. Para la determinación del tamaño de las bandas se definió para cada gel una recta de calibrado a partir de la representación del logaritmo del peso molecular de los marcadores frente a la relación entre la migración de la banda principal del marcador y la migración del frente de la electroforesis.

---

➤ **Mezcla acr. /bisacr. (49.5% T, 3% C):** 48% (p/v) de acrilamida y 1.5% (p/v) de bisacrilamida en agua desionizada.

➤ **Tampón del gel:** BisTris/HCl 50 mM pH 7.

➤ **Solución de poliacrilamida al 5%:** tampón del gel, pH 7 y mezcla de acr./bisacr. diluida hasta el 5% T. La reacción de polimerización se desencadena por la adición de persulfato amónico hasta el 0.05% y TEMED hasta el 0.05%.

➤ **Solución de poliacrilamida al 18%:** tampón del gel pH 7, mezcla de acr./bisacr. diluida hasta el 18% T y glicerol 20%. La reacción de polimerización se desencadena por la adición de persulfato amónico hasta el 0.025% y TEMED hasta el 0.025%.

➤ **Tampón del cátodo:** BisTris/HCl 50 mM, tricina 50 mM, Serva Blue G (azul de coomasie) 0.02% pH 7.

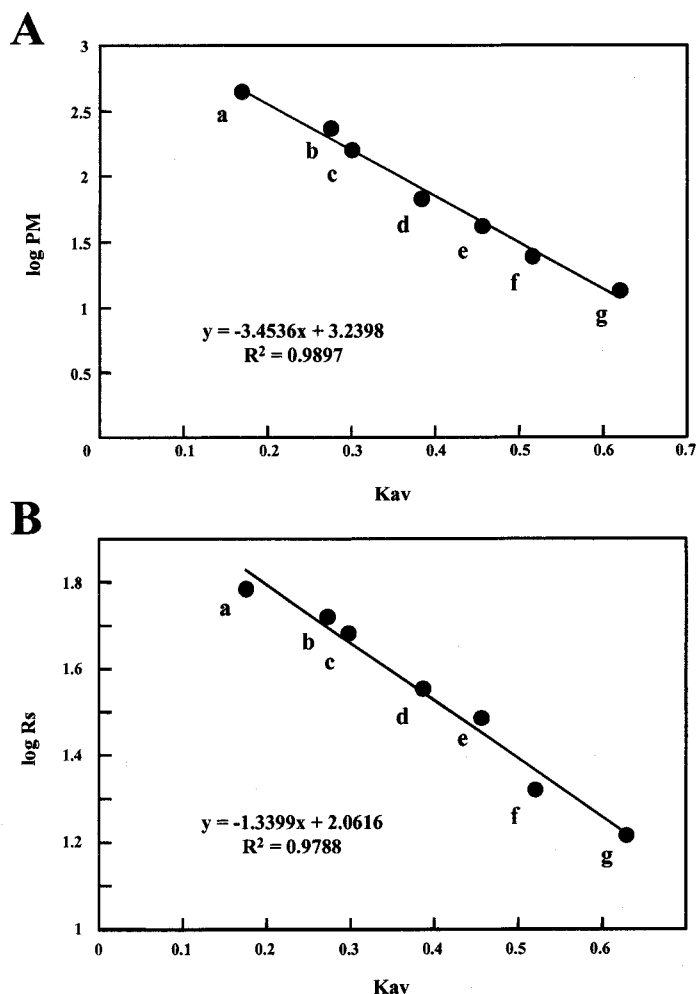
➤ **Tampón del ánodo:** tampón del gel pH 7.

➤ **Tampón de carga:** tampón del gel pH 7 y glicerol 15%.

➤ **Solución de destinción:** isopropanol 10% y ácido acético 10%.

## 21. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL MEDIANTE FPLC

La cromatografía de exclusión se realizó mediante FPLC a temperatura ambiente utilizando una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), previamente equilibrada en el tampón de lavado recomendado por el fabricante. Las muestras se cargaron en tampón PBS y su elución se desarrolló a un flujo de 0.5 mL/min en el tampón de lavado, mantenido por una bomba Pump P-500 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se recogieron fracciones de aproximadamente 0.11 mL y se evaluó la presencia de proteína midiendo la  $DO_{254}$  mediante un monitor UV-MII (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) provisto de un filtro de 254 nm, representándose mediante un registrador REC111 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La presencia de aspartato quinasa se determinó midiendo actividad aspartato quinasa y mediante ensayos ELISA.



---

**Figura 2.1. Rectas de calibrado de la columna Superdex 200 HR 10/30, atendiendo al PM y al  $R_s$  de los marcadores.** Se muestran las representaciones del log del PM (cuadro A) y del  $R_s$  (cuadro B) frente a la  $K_{av}$ , determinada experimentalmente por separado para cada uno de los marcadores moleculares. Como recta de calibrado se tomó la recta de mejor ajuste a cada representación. Los marcadores utilizados fueron: (a) ferritina de bazo de caballo, 440 kDa, 61 Å; (b) catalasa de hígado bovino, 232 kDa, 52.2 Å; (c) aldolasa de músculo de conejo, 158 kDa, 48.1 Å; (d) BSA, 67 kDa, 35.5 Å; (e) OVA, 43 kDa, 30.5 Å; (f) quimiotripsinógeno A de páncreas bovino, 25 kDa, 20.9 Å; (g) ribonucleasa A, 13.7 kDa, 16.4 Å. Para determinar los volúmenes de exclusión ( $V_o$ ) y total ( $V_t$ ) de la columna se emplearon azul dextrano 2000 y ATP, respectivamente.

---

Para la calibración de la columna se usaron marcadores de uso cromatográfico de alto y bajo peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), que incluyen proteínas estándar de 13.7 a 669 Kda. Cuando fue necesario equilibrar la columna en presencia de treonina 10 mM, esta se añadió en el tampón de lavado. La adición de treonina no afectó a la calibración de la columna, utilizándose la misma recta de calibrado tanto para cromatografías sin treonina como con treonina 10 mM.

---

➤ **Tampón de lavado Superdex 200 HR 10/30:**  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM y NaCl 150 mM, pH 7.

---

## 22. ENSAYOS WESTERN Y ELISA

Para la detección de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* se utilizaron los anticuerpos anti-aspartato quinasa fabricados en conejo, amablemente cedidos por el Dr. Joseph Heitman (HHMI, Centro Médico de la Universidad de Duke, EE.UU.).

### 22.1. Ensayo Western

Los ensayos de Western se realizaron utilizando la membrana de transferencia Immobilon-P y siguiendo el protocolo rápido recomendado por el fabricante.

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a la membrana Immobilon-P mediante un dispositivo de transferencia semi-seco Trans-blot (Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania) que se mantuvo a 20 v durante 25 min. El filtro se bloqueó humedeciéndolo en metanol, tras lo cual se dejó secar a 30°C durante 15 min. Los anticuerpos anti-aspartato quinasa y anti-IgG de conejo fabricado en cabra y conjugado a fosfatasa alcalina se diluyeron 1:10000 y 1:5000 respectivamente en tampón de bloqueo. Para eliminar el exceso de anticuerpos tras cada incubación, la membrana se lavó exhaustivamente con tampón TBS.

El ensayo de fosfatasa alcalina se realizó incubando la membrana en tampón de revelado durante 5-20 minutos en oscuridad. Cuando se estimó que el revelado era suficiente, se detuvo la



reacción lavando la membrana con abundante agua desionizada.

---

☛ **Tampón TBS:** tris-HCl 15 mM pH 7.5 y NaCl 0.2 M.

☛ **Tampón de bloqueo (western):** TBS, Tween 20 0.05% y BSA 1%.

☛ **Tampón de revelado:** tris-HCl 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NBT 0.033% y BCIP 0.0165%.

---

## 22.2. Ensayo ELISA

Los ensayos ELISA se hicieron siguiendo el protocolo descrito por Harlow y Lane (1988), con algunas modificaciones. Las placas se recubrieron durante 2 h a 37°C con 100 µL las muestras procedentes de FPLC diluidas 1:10 en tampón carbonato/bicarbonato y se incubaron con tampón de bloqueo durante 12 h a 4°C. Los anticuerpos anti-aspartato quinasa y anti-IgG de conejo fabricado en cabra y conjugado a peroxidasa se diluyeron 1:10000 y 1:4000 respectivamente en tampón PBS con Tween 20 0.05%. Entre cada paso se lavó con abundante tampón PBS con Tween 20 0.05%.

El ensayo de peroxidasa se realizó según lo descrito por Sorell *et al.* (1998). Se incubó la placa con 100 µL/pocillo de tampón sustrato durante varios minutos en ausencia de luz hasta que se estimó que la intensidad del color al que el ensayo da lugar era la adecuada. La reacción se detuvo con 30 µL/pocillo de ácido sulfúrico.

---

☛ **Tampón carbonato/bicarbonato:** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.15% y NaHCO<sub>3</sub> 0.293% pH 9.6.

☛ **Tampón de bloqueo (ELISA):** tampón carbonato/bicarbonato y BSA 3%.

☛ **Tampón sustrato:** citrato 49 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 101 mM pH 5. Añadir OPD hasta 0.04% y perhydrol (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) hasta 0.012%.

---

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 3.1. EFECTO DE LA MEZCLA DE ALELOS DE *HOM3* SOBRE LA ACTIVIDAD ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae*

Como ya se ha señalado con anterioridad, en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis disponemos de varios alelos mutantes de *HOM3*, denominados alelos *HOM3-R*, que presentan niveles reducidos de sensibilidad a treonina. Su presencia en una cepa de laboratorio haploide da lugar a un incremento aproximado de entre quince y treinta veces en la producción de treonina.

Se consideró la posible aplicación de estos alelos para la obtención de cepas industriales de levaduras superproductoras de treonina, mediante su introducción y expresión controlada en una de tales cepas (Farfán, 1997; Farfán *et al.*, 1999; Farfán y Calderón, 2000). Las cepas industriales son poliploides y aneuploides, presentando diversos grados de inestabilidad genética durante el proceso de fermentación, manifestada en reorganizaciones cromosómicas probablemente mediadas por procesos de recombinación, mutación y transposición (Querol *et al.*, 2002). En este entorno genético, resultaba difícil predecir el comportamiento de la introducción de uno de los alelos mutantes *HOM3-R* en cuanto a producción estable de treonina, especialmente al no conocerse la estructura de la aspartato quinasa ni los mecanismos mediante los cuales lleva a cabo su actividad y es inhibida. Con el fin de estudiar de este aspecto, inicialmente se llevó a cabo un trabajo de caracterización de la actividad de cepas diploides de laboratorio de *S. cerevisiae* que contenían combinaciones de alelos silvestres y mutantes *HOM3-R*. Se trató con ello de averiguar el efecto que tiene esta combinación sobre la actividad aspartato quinasa y su inhibición por treonina. Además nos permitiría comprobar a nivel molecular que tipo de relación genética se establece entre ambos alelos. Adicionalmente, las diferencias en la susceptibilidad frente a inhibición por treonina de las aspartato quinasa producidas podría ser indicativa del carácter mono o polimérico del enzima. Para el desarrollo de este estudio, se seleccionó el alelo *HOM3-R2*, por ser, de entre los aislados en el laboratorio, uno de los mejor caracterizados (Ramos y Calderón, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993; Farfán, 1997). Como controles del experimento se utilizaron cepas con dos copias iguales de uno u otro alelos, para poder establecer comparaciones con la cepa en la que se mezclan ambos. Según se describe en Materiales y Métodos, se construyeron tres cepas diploides con las tres combinaciones posibles de alelos silvestre y mutante *HOM3-R2*. Se denominaron  $\Sigma A3u\ 2n$  (*HOM3/HOM3*),  $\Sigma A3uR2\ 2n$  (*HOM3-R2/HOM3-R2*) y  $\Sigma A3uHR2\ 2n$  (*HOM3/HOM3-R2*), y en todos los casos se comprobó su carácter diploide a través de la capacidad de esporular, comprobando también que el

fenotipo de las esporas a las que daban lugar se correspondía con el esperado.

Las tres cepas construidas se incubaron en medio mínimo SD+Uracilo hasta una  $DO_{660}$  entre 1 y 1.5. La aspartato quinasa de cada cepa se extrajo mediante una purificación parcial, ensayándose la actividad aspartato quinasa y su inhibición por treonina 10 mM.

**Tabla 3.1.** Actividad aspartato quinasa e inhibición por treonina 10 mM de purificaciones parciales de aspartato quinasa de cepas diploides con las tres combinaciones posibles de los alelos silvestre y mutante R2. Todos los resultados son la media de, al menos, tres experimentos.

Cepa	Actividad AQ específica (U/mg proteína)		Inhibición (%)
	sin Thr	Thr10 mM	
$\Sigma A3u$ 2n	0.376±0.067	0	100
$\Sigma A3uR2$ 2n	0.106±0.002	0.107±0.01	0
$\Sigma A3u/\Sigma A3uR2$	0.198±0.005	0.064±0.007	67.7

Los resultados, que se presentan en la Tabla 3.1, revelan que las cepas con dos alelos iguales de *HOM3*, siguen un comportamiento como el descrito con anterioridad. La cepa con dos copias del alelo mutante *HOM3-R2* muestra una actividad aspartato quinasa que es aproximadamente 3.5 veces menor que la de la cepa silvestre, diferencia concordante con la ya descritas con anterioridad para el mismo alelo (Ramos y Calderón, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993). Por otra parte, mientras que la actividad aspartato quinasa de la cepa doble mutante *HOM3-R2* no se altera por adición de treonina, la de la cepa silvestre se inhibe completamente, de nuevo de acuerdo con lo ya descrito.

El estudio de la cepa heterocigótica para *HOM3* arrojó resultados intermedios entre los obtenidos para los controles, tanto en actividad aspartato quinasa como en inhibición por treonina. El hecho de que mantenga alrededor de un tercio de su actividad en presencia de treonina 10 mM, resultado intermedio entre los obtenidos para las cepas homocigóticas para *HOM3*, implica que entre los alelos silvestre y mutante *HOM3-R2* se establece una relación genética de codominancia. Este comportamiento puede explicarse mediante diferentes modelos teóricos, basados tanto en estructuras monoméricas como poliméricas de la aspartato quinasa. En el caso de una aspartato quinasa monomérica coexistirían en la célula monómeros de cada tipo y el resultado obtenido en presencia de treonina sería debido exclusivamente a la actividad de las AQf-R2, no inhibidas. En el caso de una aspartato quinasa polimérica, coexistirían en la célula polímeros con diferentes combinaciones de monómeros silvestres y mutantes, los cuales tendrían comportamientos diferentes y podrían arrojar un resultado neto en presencia de treonina como el mostrado. En ambos casos, a través de estructuras diferentes se podrían obtener los mismos resultados. Estos son interesantes desde el punto de vista de la posible introducción de estos alelos en cepas industriales, para su transformación en cepas superproductoras de treonina. En este caso, al igual que en el experimento presentado, una parte de la actividad aspartato quinasa de la cepa sería insensible a inhibición por

treonina, permitiendo probablemente incrementar su producción. Sin embargo, en un paso previo sería necesario un análisis más detallado de este fenómeno, sobre todo cuando los alelos silvestres aparecieran en número mayor, como ocurriría en una cepa industrial.

Por otra parte, a la vista de los resultados obtenidos, de la imposibilidad de sacar una conclusión en base a ellos sobre carácter polimérico del enzima y de la importancia de este dato para el desarrollo de futuros estudios, se decidió dilucidar la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*.

## 2. PURIFICACIÓN DE LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae* COMO UNA FUSIÓN CON LA GLUTATION-S-TRANSFERASA

Como punto de partida, nos propusimos desarrollar un sistema de purificación de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* que nos permitiera obtener una cantidad de proteína adecuada a los requerimientos propios de las técnicas de análisis estructural de uso corriente. Existen diversos sistemas de purificación de proteínas basados en la construcción de fusiones traduccionales de la proteína problema con otra proteína o polipéptido. Su afinidad por un compuesto determinado permite que la purificación de la fusión pueda realizarse mediante una cromatografía de afinidad o semiafinidad en una matriz que lleva conjugado ese compuesto. Para la separación de las dos mitades de la fusión mediante un tratamiento proteolítico, el sistema codifica entre ambas el sitio de reconocimiento de una proteasa.

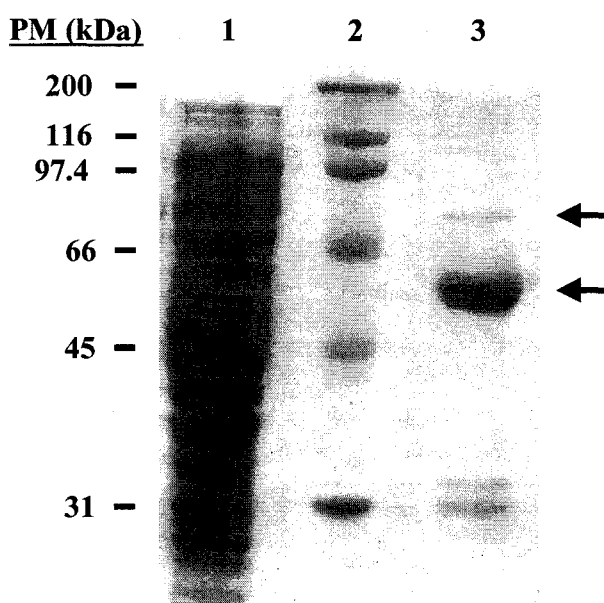
### 2.1. Producción y purificación en *E. coli*

En nuestro caso, se eligió en principio el sistema de producción en bacterias y purificación de fusiones con la glutation-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, comercializado por Pharmacia Biotech. (Smith y Johnson, 1988; Hakes y Dixon, 1992; Cheng et al., 1994; GST gene fusion handbook, revision 1, Pharmacia Biotech., 1997). La expresión de la fusión se induce por IPTG y esta se purifica a través de una matriz de sefarosa conjugada a glutation (GS-4B).

Para construir la fusión, en primer lugar se amplificó mediante PCR la ORF de *HOM3*, tomando como molde el gen *HOM3* contenido en el plásmido pMR3 (Martín-Rendón *et al.*, 1993) utilizando los oligonucleótidos especificados en la Tabla 2.5 de Materiales y Métodos, que incluyen dianas para las enzimas de restricción *SalI* y *EcoRI* en los extremos. El fragmento amplificado se insertó en el vector pGEM-T-Easy (Kobs, 1997), diseñado para clonación de fragmentos amplificados por PCR y con extremos 3' de adenina unicitenarios. Así se generó el plásmido pGEM-T-HOM3. A continuación, este se digirió con *SalI* y los fragmentos resultantes se separaron

en una electroforesis. Se extrajo del gel el fragmento que contenía la ORF de *HOM3*, el cual se insertó en la diana *SalI* del plásmido pGEX-5X-1 (Cheng et al., 1994; GST gene fusion handbook, revisión 1, Pharmacia Biotech., 1997). En este plásmido la expresión de la fusión está controlada por el promotor *tac* y contiene la secuencia que determina una diana para el factor proteolítico Xa entre los dos componentes de la fusión, para poder separarlos por digestión con esta proteasa una vez llevada a cabo la purificación. El plásmido resultante, pGEX-HOM3, se utilizó para la producción de las fusiones glutation-S-transferasa-aspartato quinasa (GST-AQf) en bacterias. Para evitar problemas derivados de la degradación de las fusiones, todo el proceso de producción se realizó utilizando la cepa de *E. coli* BL-21, que tiene deleciones en algunos de los genes responsables de las principales proteasas (Sturdier y Moffat, 1986).

Inicialmente se utilizaron las condiciones óptimas recomendadas por el fabricante (GST gene fusion handbook, revisión 1, Pharmacia Biotech., 1997). La expresión de la GST-AQf se realizó cuando el cultivo alcanzó una  $DO_{600}$  entre 0.4 y 0.7 durante un periodo de tiempo de 5-12 h, mediante la adición de IPTG hasta una concentración de 1 mM. Resultó imposible obtener ni siquiera trazas de la aspartato quinasa de fusión (AQf) cuando, en estas condiciones, se purificaba la GST en cantidades sobradamente detectables en un SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie (resultados no mostrados). La fusión apareció en la fracción precipitada durante la purificación, probablemente por la formación de cuerpos de inclusión, lo cual no es infrecuente en la producción de proteínas en bacterias (Schein, 1989).



**Figura 3.1.** SDS-PAGE de varios pasos de la purificación de la AQf, producida en bacterias. Carril 1, extracto crudo (50 µg); carril 2, marcador de PM; carril 3, fracción eluída de la matriz GS4B por digestión con factor Xa (5 µg).

Se indica el PM de cada uno de los marcadores que aparecen. Las flechas señalan, de arriba a abajo, las bandas de GST-AQf (85 kDa) y AQf (59 kDa). El desarrollo de la electroforesis y su revelado con azul de Coomassie se realizaron según se describe en Métodos (Apartado 19).

Para solucionar este problema, se modificó el protocolo de purificación atendiendo a las recomendaciones recogidas en el manual de uso del sistema de purificación. Además de utilizar un matraz de un volumen unas cinco veces superior al volumen del inóculo para mejorar la aireación del cultivo, la variación fundamental consistió en el cambio de las condiciones de inducción. La inducción se hizo añadiendo IPTG hasta una concentración de 0.1 mM, cuando el cultivo alcanzó una  $DO_{600}$  de 2, tras lo cual se incubó durante 45 min. y a 22°C (ver Materiales y Métodos). La producción se redujo de modo drástico, no siendo distinguible la banda de GST-AQf en el extracto crudo de proteínas procedente del cultivo inducido (SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie; Figura 3.1, carril 1). Sin embargo, en estas condiciones, como resultado de la purificación, se obtenían en torno a 1 mg de AQf por litro de cultivo (Figura 3.1, carril 3).

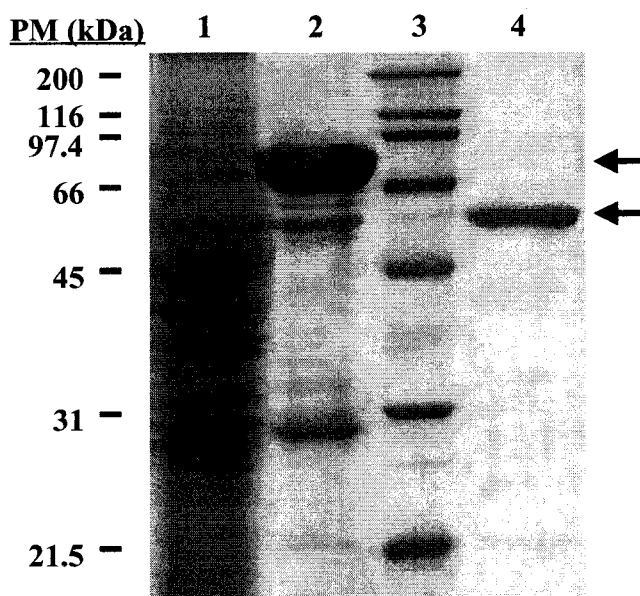
Cuando se estudió la inhibición por treonina de la AQf purificada a partir de cultivos de bacterias, en presencia de treonina 10 mM retenía el 70% de la actividad aspartato quinasa observada en ausencia de treonina. Teniendo en cuenta que en *S. cerevisiae* es necesaria la actividad de la chaperona Fkbp12 para la obtención de una aspartato quinasa inhibible por treonina (Alarcón y Heitman, 1997), el resultado obtenido sería explicable por la falta en bacterias de una actividad similar. Como ya se ha mencionado, existen datos publicados que indican que la dinámica de polimerización/despolimerización puede estar de algún modo relacionada con el proceso de inhibición del enzima (AKI-HDHI de *E. coli*, Veron *et al.*, 1972; Théze y Saint-Girons, 1974; Garel y Dautry-Varsat, 1980; Sibilli *et al.*, 1980; Fazel *et al.*, 1983; Belfaiza *et al.*, 1984; Muller y Garel, 1984a y b; Vaucheret *et al.*, 1987; AKI-HDI de *S. marcescens*, Omori *et al.*, 1993). Se han descrito estructuras no nativas en las que se observa una pérdida de la regulación del enzima por treonina, pese a que este sigue siendo activo total o parcialmente. Del mismo modo, la falta en bacterias de una actividad chaperona como la de Fkbp12 podría estar afectando a la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa purificada, siendo esta la causa del defecto que presenta en cuanto a su inhibición por treonina. Así pues, se decidió desarrollar un sistema de producción de la fusión GST-AQf en *S. cerevisiae*.

## 2.2. Producción y purificación en *S. cerevisiae*

Al igual que en bacterias, en levaduras existen sistemas de producción de fusiones a GST que han sido utilizados extensamente. En este caso, se decidió mantener el sistema de purificación que ya habíamos puesto a punto para bacterias, cambiando el plásmido de expresión de la fusión para poder producirla en *S. cerevisiae*. Para ello, se repitió la construcción de la fusión usando esta

vez el plásmido episómico pEG-KT que posee un gen *URA3* como marcador de selección en levaduras, además del sistema expresión de fusiones traduccionales a la GST de *S. japonicum* (Mitchell *et al.*, 1993). En este plásmido la expresión de la fusión se encuentra controlada por el promotor híbrido *CYC-GALI*, inducible por el cultivo en medio con galactosa como única fuente de carbono. Para la separación de las dos mitades de la fusión, el sistema incluye entre ellas una diana para trombina. Se digirió pGEM-T-HOM3 con *SalI* y los fragmentos resultantes se separaron en una electroforesis. Se extrajo del gel el fragmento que contenía la ORF de *HOM3*, el cual se insertó en la diana *SalI* de pEG-KT, quedando en fase con la ORF de la GST. El plásmido resultante se denominó pEG-HOM3. Como cepa para la producción de la GST-AQf se eligió la cepa  $\Sigma$ A3hu (Velasco *et al.*, en preparación), en la que el gen *HOM3* había sido delecionado para, en el caso de que la aspartato quinasa fuera polimérica, impedir la formación de aspartato quinasa en las que se combinaran monómeros silvestres y de fusión. En medio de inducción, la cepa transformante  $\Sigma$ A3hu[pEG-HOM3] resultó ser Hom<sup>+</sup>, lo cual indica que la fusión GST-AQf es activa. Este resultado implica que la la producción de la aspartato quinasa como una fusión no parece afectar drásticamente a su estructura. Sin embargo, es importante reseñar que, como consecuencia de su fusión a la GST, la AQf tiene un añadido de ocho aminoácidos en su extremo amino.

Con el fin de optimizar las condiciones de producción, se modificó el protocolo publicado para la producción y extracción de proteínas (Mitchell *et al.*, 1993), hasta llegar al descrito en Métodos (Apartado 16.4) y cuyo resultado se muestra en la Figura 3.2.



**Figura 3.2.** SDS-PAGE de varios pasos de la purificación de la AQf, producida en *S. cerevisiae*. Carril 1, extracto crudo (50 µg); carril 2, fracción eluida de la matriz GS4B tras el primer paso de filtración (18 µg); carril 3, marcador de PM; carril 4, fracción no retenida en la matriz GS4B durante el segundo paso de filtración, tras la digestión con



---

trombina (4  $\mu$ g). Se indica el PM de cada uno de los marcadores que aparecen. Las flechas señalan, de arriba a abajo, las bandas de GST-AQf (85 kDa) y AQf (59 kDa). El desarrollo de la electroforesis y su revelado con azul de Coomasie se realizaron según se describe en Métodos (Apartado 19).

---

Si bien la fusión no es detectable en el extracto crudo (Figura 3.2, carril 1), la cantidad de proteína de fusión purificada en la columna está en torno a 2 mg (Figura 3.2, carril 2). Como resultado final, por litro de cultivo de levaduras se obtuvieron alrededor de 1.5 mg de AQf purificada a homogeneidad, según un criterio de SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie (Figura 3.2, carril 4), dando lugar a una banda única de un tamaño similar al teórico para el monómero de AQf (59 kDa). Conviene señalar que, como resultado de la adición de los ocho residuos en su extremo amino, su tamaño teórico se incrementa en 1 kDa aproximadamente, respecto del tamaño calculado para la aspartato quinasa silvestre (Hakes y Dixon, 1992, Mitchell *et al.*, 1993). Pese a que la cepa no tiene ningún tipo de mutación en su sistema proteolítico, no se observaron señales de degradación del enzima en la muestra purificada, probablemente gracias al tratamiento continuo con inhibidores de proteasas durante el proceso de extracción de las proteínas y a la realización de todo el proceso en frío.

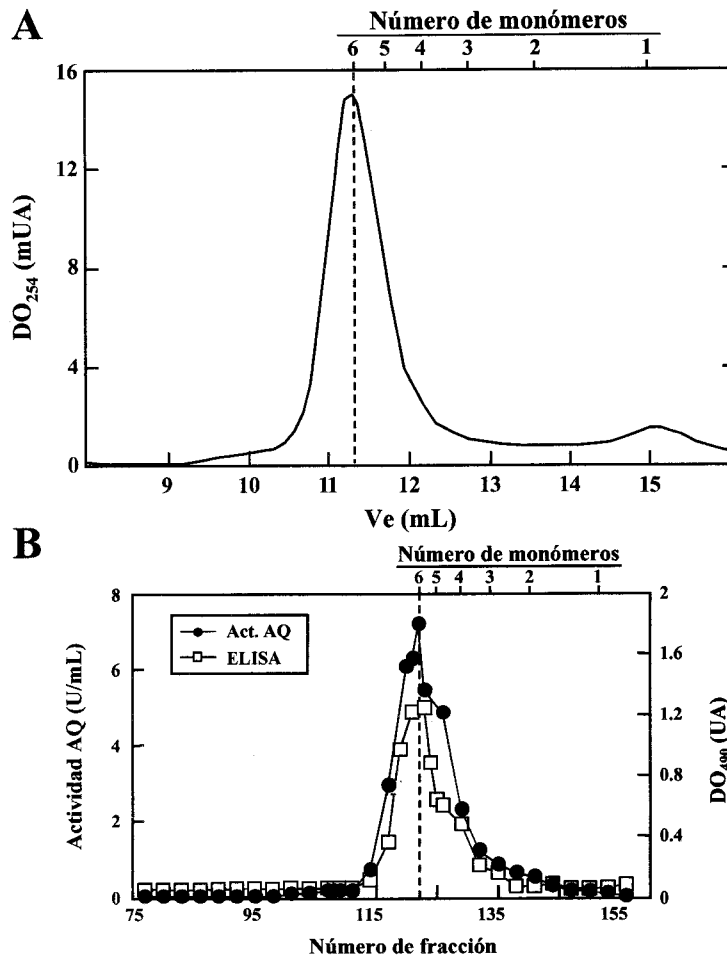
El análisis de la actividad y su inhibición por treonina resultó acorde con lo esperado (ver Tabla 3.3, pag. ), según lo ya publicado para la aspartato quinasa silvestre en de experimentos realizados con muestras parcialmente purificadas (Delgado et al, 1982; Ramos y Calderón, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993; Tabla 3.1).

### 3. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA AQf

Con el fin de determinar la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa, la muestra purificada de AQf se sometió a una cromatografía de exclusión en una columna Superdex 200 HR 10 /30, según se detalla en Materiales y Métodos. El rango de separación de esta columna va desde 10 hasta 600 kDa, con un límite de exclusión de aproximadamente 1.3 MDa. Dado que se conoce el tamaño de monómero (59 kDa), del tamaño que se determinara en este análisis se podría deducir el número de subunidades de la proteína.

En la Figura 3.3 se presentan los resultados de someter a cromatografía una muestra que contenía 0.2 mg de AQf purificada según se describe en el apartado anterior. Se recogieron fracciones de 0.11 ml. En muestras de cada una de las fracciones se ensayó la actividad aspartato quinasa (5  $\mu$ l) y ELISA (20  $\mu$ l) según se describe en Materiales y Métodos (apartados 17 y 22.2, respectivamente).

---



**Figura 3.3. Cromatografía de filtración en gel de la AQf.** Una muestra de 0.2 mg de AQf purificada se sometió a cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30. A) Representación del patrón de elución de la muestra, evaluado por su absorbancia a 254 nm, expresada en miliunidades de absorbancia (mUA), frente al volumen de elución ( $V_e$ ), representado en mL. Sobre la figura se señala la equivalencia de  $V_e$  para cada una de las especies moleculares que pueden obtenerse por adición de monómeros de AQf, hasta el tamaño de hexámero. Para mayor claridad el tamaño equivalente a hexámero aparece marcado con una línea discontinua. B) Representación de la actividad aspartato quinasa, expresada en unidades por mL, y de la cantidad de proteína determinada mediante ensayos ELISA con anticuerpos contra la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*, expresada en unidades de absorbancia a 490 nm, presentes en cada una de las fracciones recogidas durante la cromatografía. De cada fracción se tomaron volúmenes de 5 y 10  $\mu$ L para cada ensayo de actividad y ELISA, respectivamente. De nuevo, la equivalencia de  $V_e$  para cada una de las especies moleculares que pueden obtenerse por adición de monómeros de AQf aparece señalada y el tamaño equivalente a hexámero marcado con una línea discontinua.

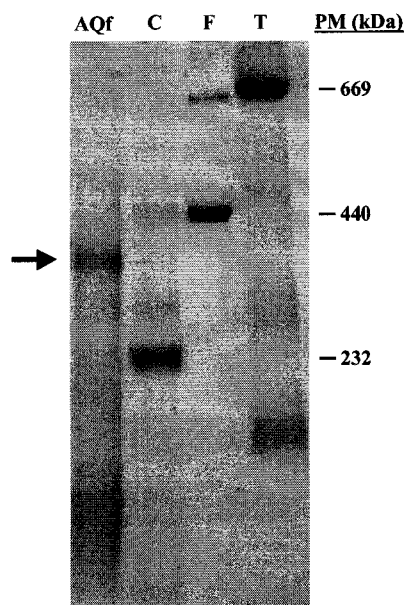
Según se observa en la Figura, la mayoría de la muestra apareció en forma de un pico con un volumen de exclusión ( $V_e$ ) equivalente al de un hexámero de AQf (Figura 3.3, cuadro A). Aunque en el análisis de la muestra en SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie no se había podido detectar ninguna banda además de la de AQf (ver Figura 2.2), en la cromatografía aparecía un segundo pico, de un  $V_e$  equivalente a un tamaño inferior al de un monómero de AQf (aproximadamente 50 kDa) y que suponía menos del 5% de la proteína cargada. La posibilidad de que este pico secundario se

debiera a la aparición de la AQf purificada en una conformación alternativa a la de hexámero quedó descartada a tenor de los resultados de los ensayos de actividad enzimática y ELISA realizados con las fracciones, ya que ninguno de los dos ensayos dio resultados positivos fuera del conjunto de fracciones que definían el pico de hexámero (Figura 3.3, cuadro B). Dado que el  $V_e$  de este pico secundario coincide con el atribuible a un dímero de GST, cabría la posibilidad de que quedara GST en la muestra, en una cantidad no detectable en el SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie. Es de señalar la fuerte tendencia a dimerizar que presenta la GST de *S. japonicum*, al ser esta la estructura en la que se presenta en la naturaleza (McTigue *et al.*, 1995; Maru *et al.*, 1996).

Para confirmar los resultados obtenidos por cromatografía decidimos utilizar un método alternativo para el análisis del tamaño de la AQf. Para ello, optamos por una técnica de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes denominada "electroforesis nativa azul" (Blue Native PAGE o BN-PAGE; Schägger *et al.*, 1994). En esta técnica, las proteínas se someten a un tratamiento suave con azul de Coomasie, el cual se asocia a la superficie de la proteína sin alterar su conformación nativa. De este modo, las proteínas mantienen su conformación nativa pero adquieren la misma carga neta negativa en su superficie, enmascarando su carga propia y permitiendo que su separación en una electroforesis desarrollada en condiciones nativas se deba exclusivamente a su tamaño. Calibrando el gel según la migración en él de varias proteínas de tamaño conocido, es posible deducir el tamaño de una proteína problema. En este caso, para separar proteínas de pesos moleculares que podían ser muy diferentes, se utilizaron geles en gradiente desde el 5 al 18% de acrilamida/bisacrilamida. Una limitación para la utilización de esta técnica consiste en que hay proteínas que no ligan azul de Coomasie en su superficie cuando están en su estado nativo. En este caso, la técnica sólo funciona para proteínas de punto isoeléctrico inferior a 6.

La Figura 3.4 muestra los resultados de un experimento de BN-PAGE realizado con una muestra de 10  $\mu$ g de AQf purificada. De la Figura se deduce que la AQf es susceptible de este ensayo, arrojando un tamaño aproximado para la banda principal de 350 kDa, que corresponde a unos 5.9 monómeros de AQf. Aparentemente la AQf no es completamente estable en esta técnica, dando lugar a una mancha difusa que se extiende desde la banda de hexámero hacia abajo. El que no puedan observarse bandas discretas aparte de la de hexámero, lleva a pensar que es un proceso que ocurre durante la electroforesis, no estando presente en la muestra original. El origen de este proceso no está claro pero puede deberse a la falta de fuerza iónica en el gel. Como ya se ha comentado, está comprobado el efecto que tiene la fuerza iónica del medio, particularmente el  $K^+$ , en la estabilización de la estructura y la actividad de la aspartato quinasa (Truffa-Bachi, 1973; Muller y Garel, 1984a; Veron *et al.*, 1985), habiéndose descrito que la AKI-HDHI de *E. coli*, cuando se analiza en PAGE nativo, muestra un comportamiento similar al detallado arriba para el

caso aspartato quinasa de *S. cerevisiae* en BN-PAGE (Moir y Paulus, 1977).



**Figura 3.4. BN-PAGE de la AQf.** Una muestra de 10  $\mu$ g de AQf purificada se analizó mediante BN-PAGE. Se señalan los marcadores moleculares cuyo PM resultó más parecido al obtenido para la AQf, indicando su peso molecular: T, tiroglobulina, 669 kDa (5  $\mu$ g); F, ferritina, 440 kDa (5  $\mu$ g); C, catalasa, 232 kDa (5  $\mu$ g).

#### 4. PURIFICACIÓN DE LA AQwt

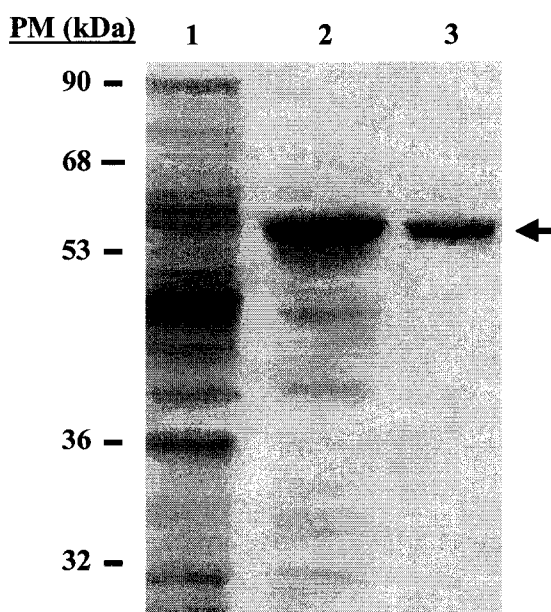
La única aspartato quinasa descrita en la literatura como hexamérica es la de *Streptococcus mutans*, con un tamaño de monómero igual a 40 kDa e inhibible de forma concertada por treonina y metionina (McCarron y Chang, 1978). La comparación de la secuencia de esta aspartato quinasa y la de *S. cerevisiae* sólo muestra un parecido limitado entre sus regiones carboxiterminales (26% de identidad entre los residuos 140 y 494 de la de *S. cerevisiae*). Por otra parte, las aspartato quinasas que han sido estudiadas estructuralmente en profundidad son tetraméricas y sus secuencias son sólo parcialmente similares a la de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*. Así pues, resultó imposible refrendar los resultados obtenidos a través de lo conocido para otras aspartato quinasas. Como ya se ha mencionado, la GST de *S. japonicum* presenta una fuerte tendencia a dimerizar, siendo esta la estructura en la que se aparece en la naturaleza (McTigue *et al.*, 1995; Maru *et al.*, 1996). No se podía descartar el que el resultado obtenido para la AQf fuera un artefacto producto de su fusión con la GST o por alguno de los tratamientos que se realizan durante su purificación. Para confirmar los resultados obtenidos en el estudio de la AQf se propuso purificar y caracterizar la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa silvestre (AQwt).

Se decidió utilizar una cepa que tuviera un alto número de copias del gen *HOM3*. Para ello, se contruyó el plásmido pME1-H3 insertando el fragmento *Bam*HI-*Hpa*I de pMR3, que contiene el gen *HOM3* bajo el control de su propio promotor, en el vector YEp24 cortado con *Bam*HI y *Pvu*II. Tanto *Pvu*II como *Hpa*I dan lugar a extremos de ADN bicatenario romos, de modo que son compatibles.

De nuevo por razones de homogeneidad del resultado, para la producción de la AQwt se utilizó la cepa  $\Sigma$ A3hu, transformada en este caso con pME1-H3, generándose la cepa que se denominó  $\Sigma$ A3hu[pME1-H3]. La purificación de la AQwt producida en esta cepa se llevó a cabo según se describe en Materiales y Métodos (apartado 16.2). En la Figura 3.5 se presenta el resultado de la electroforesis SDS-PAGE de distintos pasos de la purificación, teñidos con azul de Coomassie. Inicialmente se realizó un fraccionamiento con sulfato amónico del contenido de proteína de un extracto crudo. La mayor parte de la actividad aspartato quinasa apareció en la fracción precipitada entre el 30 y el 40% de saturación (Figura 3.5, carril 2), presentando una banda mayoritaria con un peso molecular compatible con el de la AQwt. El segundo paso consistió en una cromatografía de semiafinidad de esta fracción mediante una columna de Blue Sepharose CL-6B (Subramanian, 1984). Esta matriz está diseñada para la purificación de proteínas con un sitio de unión para nucleótidos, dado que estas tienen una alta afinidad por un compuesto que se presenta conjugado a la sefaroza, denominado cibacron blue F3G-A. La presencia de AQwt en las distintas fracciones se detectó mediante ensayo de la actividad enzimática según el protocolo detallado en Material y Métodos (apartado 17).

Los primeros ensayos de purificación de la AQwt mediante esta columna mostraron la alta tendencia del enzima a agregarse. Como era de esperar, cuando la muestra, suspendida en tampón Hepes 50 mM y glicerol 10%, se filtraba a través de la columna quedaba retenida en ella la totalidad de la actividad aspartato quinasa cargada, no pudiendo detectarse actividad aspartato quinasa en el eluído (recogido siempre en fracciones de aproximadamente 2.5 ml). Sin embargo, cuando, una vez lavada la columna, se añadía una solución de ATP 10 mM con intención de eluir la AQwt, sólo era posible eluir una pequeña fracción de la actividad aspartato quinasa cargada, quedando la mayor parte retenida dentro de la columna. Este resultado podría indicar que la proteína, al concentrarse en forma de un pico de elución se agregase, precipitando dentro de la columna. Alternativamente existía la posibilidad de que la proteína se estuviera degradando de algún modo por efecto de la técnica en si. Para solucionar este problema, la elución se realizó mediante un gradiente lineal entre el tampón en el que se equilibró la columna (Hepes, 50 mM) y tampón PBS 4x. Se trataba con ello de eluir las proteínas con un gradiente salino, ya que se había observado con anterioridad que la AQwt no quedaba retenida en la columna cuando se filtraba en presencia de NaCl 50 mM. Las

fracciones en las que se detectó mayor actividad aspartato quinasa (fracciones de la 60 a la 74) se concentraron 4-6 veces mediante PEG, según se describe en Materiales y Métodos (apartado 18.2). En varias de ellas aparecía la AQwt pura, no pudiendo detectarse ninguna banda adicional cuando se sometían a SDS-PAGE, revelado con azul de Coomasie (Figura 3.5, carril 3 y resultados no mostrados). Este protocolo de purificación permitió obtener en torno a 0.5 mg de AQwt por litro de cultivo.



**Figura 3.5. SDS-PAGE de varios pasos de la purificación de la AQwt de *S. cerevisiae*.** Carril 1, extracto crudo (25  $\mu\text{g}$ ); carril 2, fracción 30-40% de saturación de sulfato amónico (12  $\mu\text{g}$ ); carril 3, fracción eluida en la cromatografía en Blue Sepharose CL-6B, concentrada 4 veces (3  $\mu\text{g}$ ). Se indica el PM y la posición relativa de cada uno de los marcadores utilizados. La flecha señala la banda de AQwt (58 kDa). El desarrollo de la electroforesis y su revelado con azul de Coomasie se realizaron según se describe en Métodos (Apartado 19).

En la Tabla 3.2 se resumen los rendimientos obtenidos en cuanto a cantidad de proteína y la actividad enzimática en cada uno de los pasos de la purificación. Según se recoge en la Tabla 3.3, los ensayos de la actividad aspartato quinasa y su inhibición por treonina dieron resultados similares a los obtenidos con la AQf, si bien la actividad específica era algo inferior. El análisis de las constantes de afinidad del enzima permitió observar una ligera diferencia en la  $K_m$  para el ATP (0.8 mM para la AQwt por 1.2 mM para la AQf). Esta diferencia, sin embargo, no puede en ningún caso explicar su menor actividad específica respecto a la de la AQf, ya que su efecto sería el opuesto, reduciendo la actividad específica de la AQf al verse reducida su afinidad por el ATP. Esta diferencia podría atribuirse a la cola de ocho aminoácidos que queda en el extremo amino de la AQf como consecuencia de su purificación en forma de una fusión. En este extremo se localiza el motivo

KFGG (residuos 18 al 21), muy conservado e imprescindible para la actividad enzimática (Arévalo-Rodríguez, 1996; Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999). Así, el octapéptido añadido podría estar interfiriendo de algún modo en la unión del enzima al ATP. Se ha descrito con anterioridad la posibilidad de que puedan ocurrir interferencias de este tipo (Hakes y Dixon, 1992), siendo necesario un estudio más a fondo para tratar de ver si es debido a esto o sólo producto de la variabilidad de la técnica. En cuanto a la diferencia entre las actividades específicas de la AQwt y AQf, podría deberse a la diferencia entre los métodos de purificación de ambas proteínas, concretamente en la filtración de la muestra de AQwt parcialmente purificada a través de la columna de Blue Sepharose CL-6B. Es necesario utilizar un tampón con baja fuerza iónica y, como ya se ha comentado, está descrita la importancia de esta en la estabilización de la aspartato quinasa y su actividad (Truffa-Bachi, 1973; Moir y Paulus, 1977; Muller y Garel, 1984a; Veron *et al.*, 1985). Su falta en este paso podría redundar en una pérdida parcial de actividad de la muestra de AQwt.

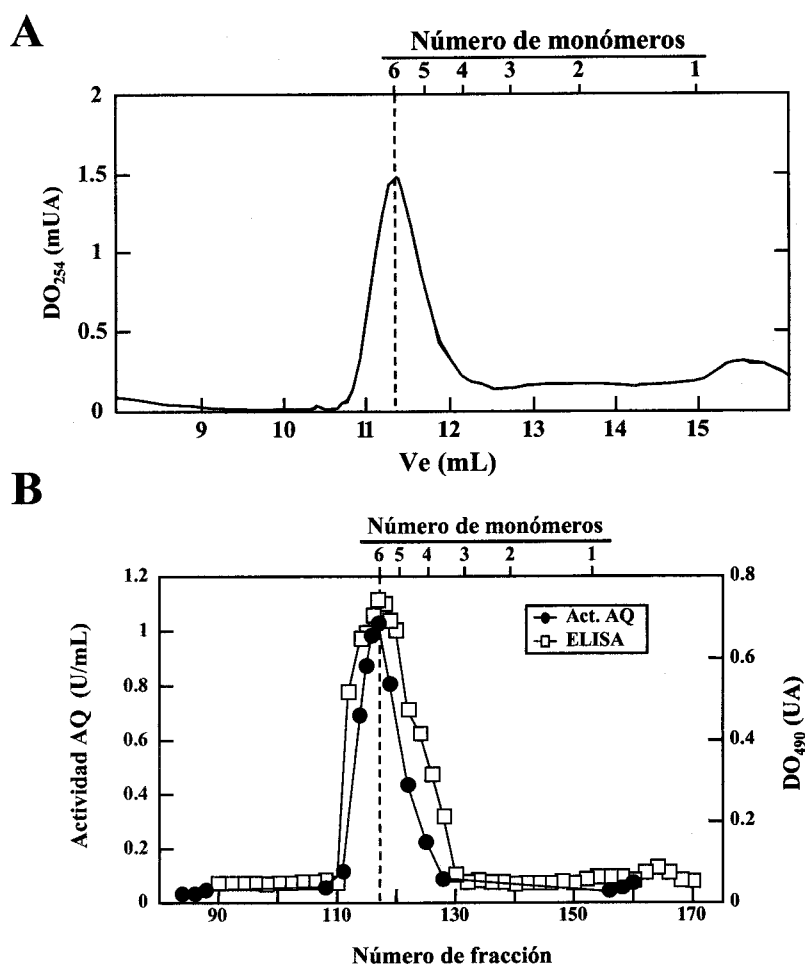
**Tabla 3.2.** Pasos de purificación de la AQwt.

Paso	Volumen (mL)	Prot. total (mg)	Actividad (U)	Act. específica (U/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto	25	89.25	104.80	1.17	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30%-40%	1.2	3.96	62.76	15.85	13.5	60
Blue-sepharose (fraccs. 61+62)	4.7	0.19	7.42	39.05	33.3	7

## 5. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA AQwt

Una muestra de 25 µg de la AQwt purificada según se describe en el apartado anterior, se sometió a cromatografía de exclusión, al igual que se había realizado con la AQf (ver apartado 3 de Resultados). En la Figura 3.6 se muestra que, al igual que ocurría con la AQf, la mayor parte de la proteína de la muestra aparecía en forma de un único pico de un V<sub>e</sub> correspondiente al de un hexámero de AQwt (Figura 3.6, cuadro A). Además, apareció un pico de un tamaño estimado inferior al de un monómero de AQwt y que suponía alrededor del 6% de toda la proteína cargada. Los ensayos de actividad y ELISA de nuevo mostraron que toda la actividad así como toda la AQwt detectable de la muestra se encontraban en las fracciones correspondientes al pico de hexámero (Figura 3.6, apartado B). El pico secundario descrito anteriormente corresponde probablemente a otra proteína cuya elución de la columna de Blue Sepharose CL-6B era posterior a la de la AQwt, aunque solapaba con esta en algunas fracciones. En las fracciones más retrasadas en las que podía

detectarse AQwt por SDS-PAGE también podía detectarse esa proteína aunque en muy baja cantidad (datos no mostrados). En las muestras estudiadas en las que no era detectable, debía estar presente en una cantidad por debajo del umbral de detección de un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie.

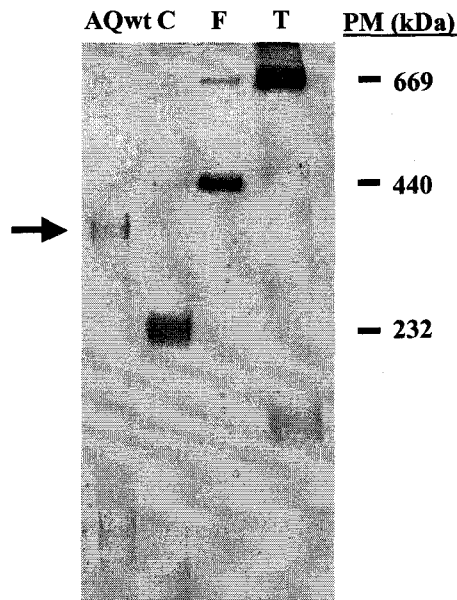


**Figura 3.6. Cromatografía de filtración en gel de la AQwt.** Una muestra de 25  $\mu$ g de AQwt purificada se sometió a cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30. Al igual que en la Figura 3.3., se muestra el patrón de elución de la muestra (Cuadro A), representando la absorbancia a 254 nm, en mUA, frente al  $V_e$ , en mL. Del mismo modo, se representan la actividad aspartato quinasa y la cantidad de proteína determinada mediante ensayos ELISA con anticuerpos contra la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* (Cuadro B) presentes en cada una de las fracciones recogidas durante la cromatografía, expresadas en unidades de actividad por mL y en unidades de absorbancia a 490 nm, respectivamente. En ambos casos, la equivalencia de  $V_e$  para cada una de las especies moleculares que pueden obtenerse por adición de monómeros de AQf aparece señalada y el tamaño equivalente a hexámero marcado con una línea discontinua.

Para confirmar los resultados anteriores, una muestra conteniendo 6.5  $\mu$ g de AQwt, purificada según se indica en el apartado anterior, se sometió a analizar en BN-PAGE. Los resultados, mostrados en la Figura 3.7, son del todo coincidentes con los obtenidos con la AQf (ver Figura 3.4). La AQwt apareció mayoritariamente en forma de una banda de un tamaño aproximado de 345 kDa



y correspondiente aproximadamente a 6 monómeros de AQwt. También en este caso se pone de manifiesto la relativa inestabilidad del enzima en esta técnica, reflejada en la mancha difusa de iguales características a las obtenidas en el estudio de la AQf.



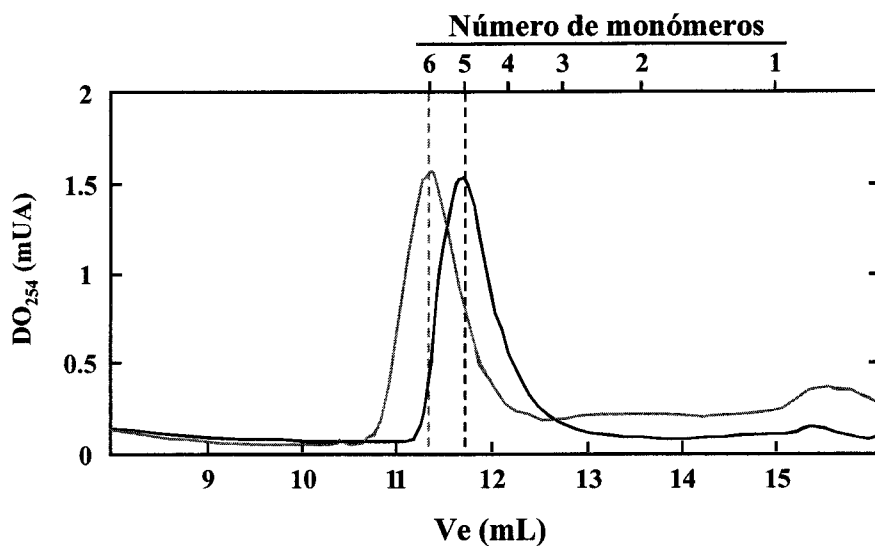
**Figura 3.7. BN-PAGE de la AQwt.** Una muestra de 6.5  $\mu$ g de AQwt purificada se analizó mediante BN-PAGE. Se señalan los marcadores moleculares cuyo PM resultó más parecido al obtenido para la AQf, indicando su peso molecular: T, tiroglobulina, 669 kDa (5  $\mu$ g); F, ferritina, 440 kDa (5  $\mu$ g); C, catalasa, 232 kDa (5  $\mu$ g).

Estos resultados junto con los ensayos de actividad en presencia y ausencia de treonina (Tabla 3.3) permitieron confirmar no sólo que la aspartato quinasa nativa se presenta en levaduras en forma de un hexámero sino además que la AQf, purificada desde levaduras a través de su fusión con la GST, tiene el mismo comportamiento que la AQwt en todas las situaciones y técnicas estudiadas.

## 6. EFECTO DE LA TREONINA EN LA ESTRUCTURA DE LAS AQwt Y AQf

Como se ha mencionado anteriormente (ver Introducción, apartados 4 y 5), la inhibición de las aspartato quinasa podría tener alguna relación con el estado de polimerización del enzima (Veron *et al.*, 1972; Théze y Saint-Girons, 1974; Sibilli *et al.*, 1980; Fazel *et al.*, 1983; Belfaiza *et al.*, 1984; Muller y Garel, 1984a y b; Vaucheret *et al.*, 1987; Omori *et al.*, 1993). Además, se han publicado casos en los que se produce una modificación de la estructura de la aspartato quinasa en respuesta a su unión a sustratos o inhibidores (Truffa-Bachi, 1973; Tilak *et al.*, 1976; Bearer y Neet, 1978; McMahon y Takahashi, 1983; Muller y Garel, 1984; Jullien *et al.*, 1988; Angeles *et al.*,

1989). En todos estos casos, la metodología empleada para estudiar el cambio conformacional, no permitió detectar cambios en la estructura cuaternaria del enzima. Sólo recientemente se ha publicado que la aspartato quinasa sensible a treonina de *A. thaliana* sufre un cambio conformacional a nivel de estructura cuaternaria por su unión a esta (Paris *et al.*, 2002). Así pues, se planteó estudiar si la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* tenía un comportamiento similar. Inicialmente se estimó conveniente hacer el estudio en condiciones en las que la aspartato quinasa se encuentra totalmente inhibida (treonina 10mM; ver Tabla 3.1). No estando claro el mecanismo a través del cual tiene lugar la inhibición, preferimos determinar inicialmente el comportamiento en un estado completamente inhibido antes de entrar a tratar pasos o estados intermedios. Para ello se realizó una cromatografía de exclusión (ver Materiales y Métodos, apartado 21) de una muestra de 25  $\mu\text{g}$  de AQwt, en la que el equilibrado de la columna y la filtración se llevaron a cabo en tampón de lavado de la columna conteniendo treonina 10 mM.



**Figura 3.8. Cromatografía de filtración en gel de la AQwt en presencia de treonina.** Una muestra de 25  $\mu\text{g}$  de AQwt purificada se sometió a cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30 equilibrada en tampón con treonina 10 mM. La presencia de proteína en el eluido se evaluó midiendo la absorbancia a 254 nm. Para hacer mas evidente la diferencia del  $V_e$  del pico de AQwt respecto del experimento realizado sin treonina, se muestra en gris el resultado presentado en el Cuadro A de la Figura 3.6. Sobre la figura aparece señalada la equivalencia de  $V_e$  para cada una de las especies moleculares que pueden obtenerse por adición de monómeros de AQwt, hasta el tamaño de hexámero. Para mayor claridad los tamaños equivalentes a hexámero (gris) y pentámero aparecen marcados con una línea discontinua.

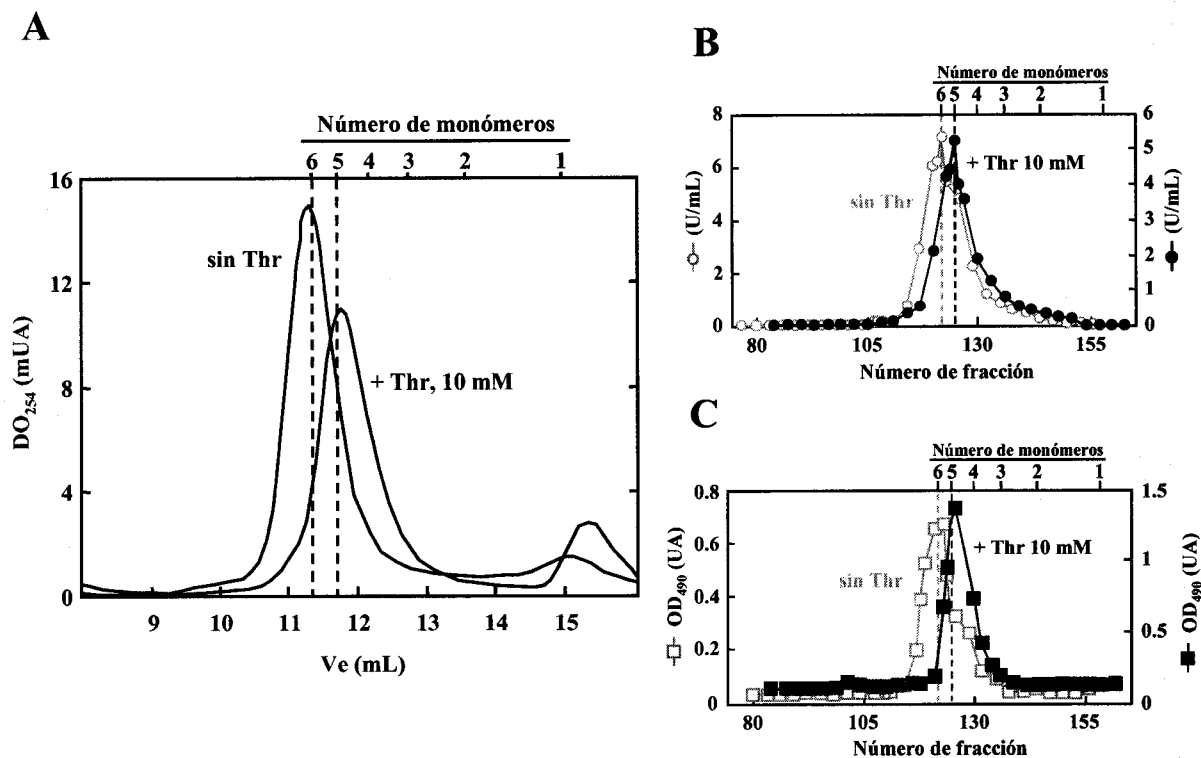
Sorprendentemente, como se muestra en la Figura 3.8, se observó un pico principal de un  $V_e$  equivalente al de un pentámero de AQwt (aproximadamente 295 kDa). Esta variación supone una diferencia del 16.67 % respecto del tamaño de la AQwt. Si la unión con la treonina implicase el paso de la forma hexamérica a una pentamérica, en la cromatografía debería detectarse un pico

correspondiente a los monómeros, que se encontraría por encima del umbral de detección. Sin embargo, según se demuestra en la Figura 3.8, no se encontró ningún pico que recogiera los monómeros que la adición de treonina habría supuestamente desplazado de su posición en el hexámero.

Para explicar este fenómeno podría aducirse que los monómeros liberados se reorganizan en forma de pentámero, aunque esta posibilidad parece poco plausible. Alternativamente, en presencia de treonina, podría tener lugar un cambio conformacional a nivel de la estructura terciaria de la aspartato quinasa. Este podría dar lugar a una estructura más compacta, sin que repercutiera en la estructura cuaternaria del enzima. Este cambio llevaría a una reducción en el radio de Stokes ( $R_s$ ) de la molécula, de modo que la AQwt migraría en una cromatografía de exclusión con un  $V_e$  coincidente con el de un pentámero, sin dar lugar a ningún otro pico adicional. Mientras que esta segunda hipótesis implica inmediatamente un posible mecanismo de reversión por liberación de la treonina, en el caso de la primera esta posibilidad resulta mucho más difícil de explicar.

Para tratar de confirmar lo observado y comprobar que también en presencia de treonina la AQwt y la AQf se comportan de la misma forma, se repitió el experimento con una muestra de AQf purificada según se describe en Métodos (apartado 16.4). En la Figura 3.9 se representa el resultado de la cromatografía de la AQf realizada en presencia de treonina (10 mM en el tampón de lavado de la columna). A modo de comparación, se incluyen los resultados obtenidos en ausencia de treonina y ya presentados en la Figura 3.3. De nuevo, la presencia de treonina provocó un cambio en el  $V_e$  del pico principal (Figura 3.9, apartado A), similar al descrito para la AQwt. En este caso también apareció un pico secundario de un tamaño coincidente con el de un dímero de GST. Este resultó más prominente que el observado sin treonina, lo que era de esperar dado que la muestra utilizada presentaba una cantidad de GST particularmente alta, según reveló su análisis mediante SDS-PAGE (resultado no mostrado). No obstante, para confirmar la naturaleza de los picos obtenidos y descartar que el pico de GST pudiera estar enmascarando AQf en una estructura cuaternaria diferente de la mayoritaria, las fracciones recogidas se sometieron a análisis de la actividad aspartato quinasa y ELISA. En ambos análisis fue imposible detectar ningún rastro de actividad o presencia de AQf fuera del pico de pentámero (Figura 3.9, cuadros B y C).

Según se comentó anteriormente, la variación en el  $V_e$  de la aspartato quinasa observada en presencia de treonina podría deberse a un cambio en la estructura terciaria del enzima, en virtud del cual adoptaría una conformación más compacta.

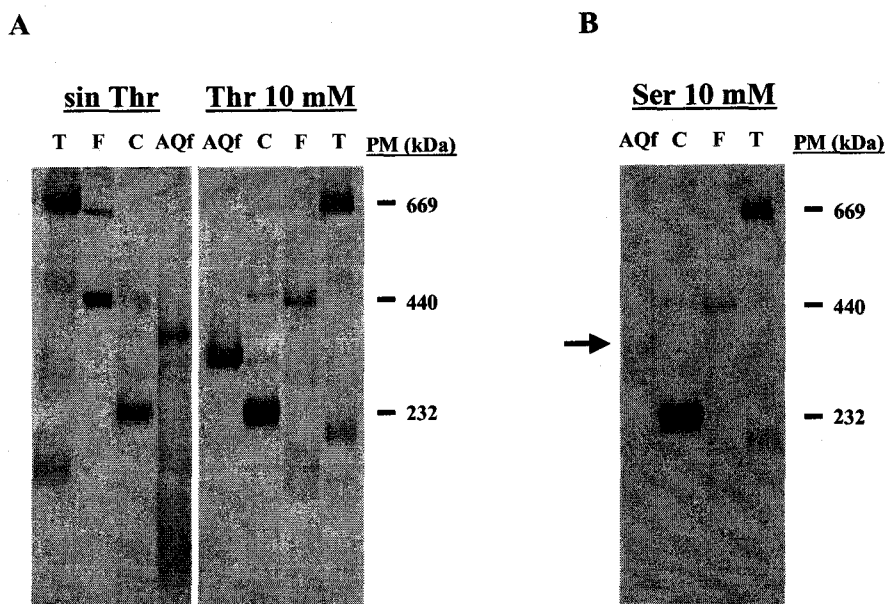


**Figura 3.9. Cromatografía de filtración en gel de la AQf en presencia de treonina.** Una muestra de 0.2 mg de AQf purificada se sometió a cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30 equilibrada en tampón con treonina 10 mM. A) La presencia de proteína en el eluido se evaluó midiendo la absorbancia a 254 nm. B) Se ensayó la actividad aspartato quinasa de las fracciones recogidas durante ambas cromatografías, con muestras de 5  $\mu$ L. C) Se determinó la cantidad de proteína en las fracciones recogidas durante la cromatografía mediante ensayos ELISA con anticuerpos contra la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*, realizados con muestras de 10  $\mu$ L.

En cada apartado se muestra en gris el resultado obtenido sin treonina y presentado en la Figura 3.3. También se muestra la equivalencia de  $V_e$  para cada una de las especies moleculares que pueden obtenerse por adición de monómeros de AQf, hasta el tamaño de hexámero. Los tamaños equivalentes a hexámero (gris) y pentámero aparecen marcados con una línea discontinua.

Para cuantificar el cambio que se produce en el volumen de la proteína, se calibró la columna en función del radio de Stokes ( $R_s$ ) de las proteínas usadas como marcadores moleculares. De este modo, se pudo determinar que en ausencia de treonina, la AQf migraba con un  $R_s$  de 61.22 Å, reduciéndose hasta 56.99 Å cuando la cromatografía tenía lugar en presencia de treonina 10 mM en el tampón de lavado.

Para comprobar el resultado obtenido por cromatografía, una muestra de AQf purificada se sometió a análisis por BN-PAGE en presencia de treonina, pese a que no estaba descrito que se pudieran añadir ligantes u otros compuestos químicos ni el efecto que esto podría tener sobre el desarrollo de la electroforesis. Se añadió treonina al tampón del gel hasta una concentración de 10 mM, incubándose las muestras y los marcadores moleculares en presencia de la misma concentración de treonina durante un mínimo de cinco minutos.



**Figura 3.10. BN-PAGE de la AQf en presencia de treonina y serina.** A) Una muestra de 10  $\mu$ g de AQf purificada se analizó mediante BN-PAGE, añadiendo treonina 10 mM en el tampón del gel. Tanto los marcadores como las muestras cargadas se incubaron en presencia de treonina 10 mM durante 10-15 min en hielo. Se señalan los marcadores moleculares cuyo PM resultó más parecido al obtenido para la AQf, indicando su peso molecular: T, tiroglobulina, 669 kDa (5  $\mu$ g); F, ferritina, 440 kDa (5  $\mu$ g); C, catalasa, 232 kDa (5  $\mu$ g). Para hacer más evidente la diferencia en la migración de la banda de AQf respecto del experimento realizado sin treonina, se muestra una imagen especular de la presentada en la Figura 3.4. B) Una muestra de 10  $\mu$ g de AQf purificada se analizó mediante BN-PAGE, añadiendo serina 10 mM en el tampón del gel. Tanto los marcadores como las muestras cargadas se incubaron en presencia de serina 10 mM durante 10-15 min en hielo. Se señalan los marcadores moleculares cuyo PM resultó más parecido al obtenido para la AQf, indicando su peso molecular: T, tiroglobulina, 669 kDa (5  $\mu$ g); F, ferritina, 440 kDa (5  $\mu$ g); C, catalasa, 232 kDa (5  $\mu$ g).

En el cuadro A de la Figura 3.10 se muestra el resultado del análisis de la AQf en BN-PAGE realizado en presencia de treonina 10 mM. A modo de comparación aparece el resultado obtenido en ausencia de treonina ya presentado en la Figura 3.4, aunque para mayor claridad se muestra su imagen especular. Como puede observarse, solo la migración de la AQf resultó afectada, no variando significativamente la migración de los marcadores moleculares. La AQf apareció como una banda única, muy densa, de un tamaño aproximado de 296.5 kDa, equivalente a 5.05 monómeros de AQf. Es interesante resaltar que en presencia de treonina no se detectó la mancha que, en ausencia de treonina, era atribuible a la falta de la fuerza iónica. Esto implica una cierta estabilización de la estructura nativa de la AQf por su unión a treonina.

Como comprobación del efecto de otros aminoácidos distintos a la treonina se realizó el mismo experimento en presencia de serina 10 mM (Figura 3.10, cuadro B), por ser este el aminoácido más parecido estructuralmente a la treonina pero que no tiene efecto sobre la actividad aspartato quinasa (Ramos y Calderón, 1992). En este caso, aparecía una banda de AQf de un

tamaño aproximado a 343 kDa, equivalente a 5.8 monómeros de AQf. Aparentemente, pese al parecido estructural la serina no tiene ningún efecto sobre la estructura de la AQf, del mismo modo que ocurre con la actividad aspartato quinasa. Por último, también se comprobó el efecto del aspártico, sustrato del enzima. En presencia de aspártico 10 mM, la AQf apareció en una banda mayoritaria de un tamaño equivalente a 5.52 monómeros (resultados no mostrados). Sin embargo, este resultado no puede considerarse significativo puesto que la adición del aspártico al tampón del gel modificó sustancialmente la migración de los controles, alterando además el desarrollo de la electroforesis de forma dramática.

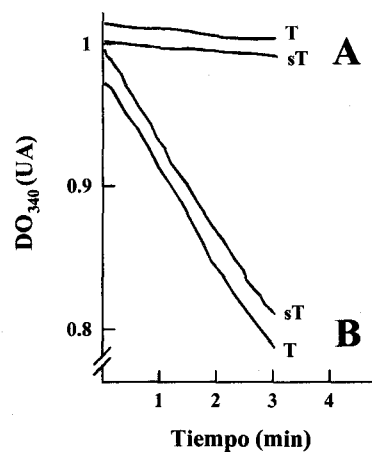
Estos resultados confirman que la aspartato quinasa sufre un cambio conformacional cuando se incuba con treonina en concentraciones en las que el enzima se encuentra completamente inhibido. Este cambio parece ser específico para la treonina y conlleva un cambio en el tamaño aparente del enzima, aproximadamente equivalente al peso molecular de un monómero. Es de señalar que, también en estas condiciones, tanto la AQwt como la AQf se comportan del mismo modo. Siendo esta última más fácil de purificar, los experimentos que siguen se llevaron a cabo exclusivamente con AQf.

## **7. RELACIÓN ENTRE LA INHIBICIÓN POR TREONINA Y EL CAMBIO CONFORMACIONAL DE LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae***

A la vista de los resultados obtenidos, parecía evidente la relación entre el cambio conformacional de la aspartato quinasa en presencia de treonina y la inhibición por este aminoácido de la actividad enzimática. Especialmente interesante resultaba la posibilidad de que el cambio conformacional fuera en sí mismo responsable de la inhibición. De ser así, el desarrollo de ambos procesos debería ser paralelo, debiendo además tener un curso temporal aproximadamente igual. Sólo de este modo podría explicarse la experiencia previa en medidas de actividad en presencia de treonina, según la cual no hay aparentemente ningún retraso en la aparición de la inhibición durante el curso de la medida, siendo esta estable y lineal en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (apartado 17).

Se desarrollaron experimentos dirigidos a definir el curso temporal y la reversibilidad de ambos procesos. Para determinar la rapidez con la que se produce la inhibición, se ensayó la actividad enzimática de dos muestras iguales de AQf, una de las cuales se había incubado previamente durante cinco minutos en treonina 10 mM. En ambos casos, la reacción se inició añadiendo 5  $\mu$ l de cada muestra a sendas mezclas de medida, que incluían ya el aspartato y la treonina a una concentración de 10 mM, homogenizándose y registrándose la actividad según se

describe en Materiales y Métodos (apartado 17). De esta forma se comparó el comportamiento de una muestra que llegaba a la medida completamente inhibida con el de otra que se inhibe en la propia mezcla de medida. Las muestras se diluyeron cien veces en la mezcla de medida, haciendo despreciable la concentración a la que quedaba la treonina de las que habían sido incubadas en ella (0.1 mM) frente a la que había en la propia mezcla de medida (10 mM). En la Figura 3.11.A se muestra el resultado del experimento descrito.



**Figura 3.11. Estudio del proceso de inhibición de la actividad aspartato quinasa por treonina y su reversión por dilución.** Se analizó el desarrollo de la actividad aspartato quinasa de muestras iguales de AQf purificada, incubadas en treonina 10 mM (+T) o sin incubar (-T). En este caso, la medida de actividad en la cubeta se inició por adición de 5  $\mu$ L de la muestra de AQf. Una vez añadida se homogeneizó la mezcla de medida durante tres segundos mediante una varilla de plástico, pasando a registrarse la actividad del modo descrito en Métodos (Apartado 17). Se muestran los resultados típicos, no habiéndose observado en ningún caso desviaciones significativas. A) Medida en presencia de treonina 10 mM. En la medida, la muestra se diluyó dos ordenes de magnitud, dejando la concentración de treonina procedente de la incubación en valores (0.1 mM) que se consideraron despreciables frente a la concentración en la mezcla de medida. B) Medida sin treonina. En la medida, la muestra se diluyó dos ordenes de magnitud, dejando la concentración de treonina en valores (0.1 mM) en los que no tiene ningún efecto sobre la actividad AQ.

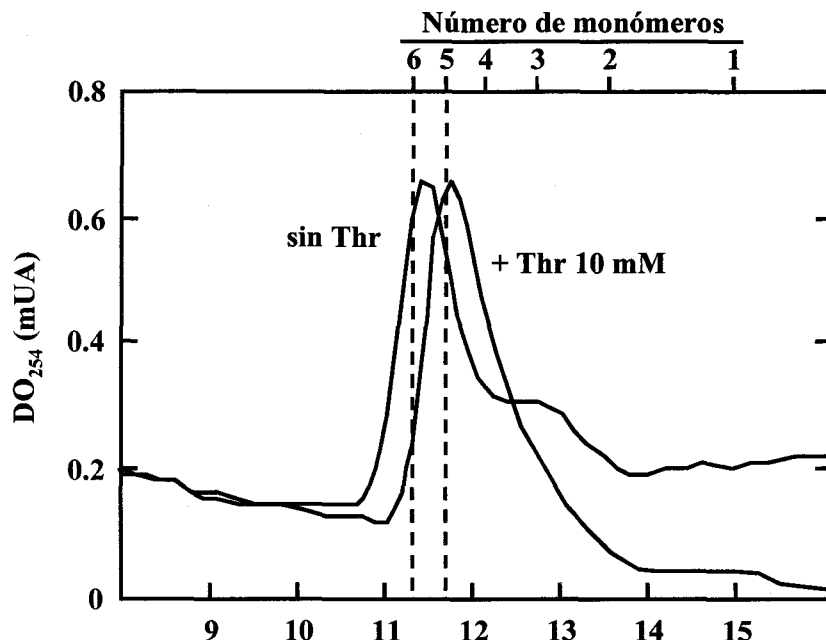
En ambos casos los resultados obtenidos fueron idénticos no solo en la actividad específica registrada (aproximadamente igual a cero), sino también en el desarrollo de la misma. No se observaron retrasos en la aparición de la inhibición de la actividad procedente de ninguna de las muestras. Así, el tiempo que se tardaba en homogeneizar la mezcla de medida conteniendo treonina 10 mM una vez añadida la muestra, unos tres segundos, era suficiente para inhibir completamente la actividad aspartato quinasa de una muestra no incubada con treonina previamente.

Para determinar si era posible revertir el fenómeno de inhibición de la aspartato quinasa se realizaron experimentos idénticos al anteriormente descrito, pero sin treonina en la mezcla de medida. Además, con ello se trató de determinar la rapidez a la que ocurre la reversión, de tener lugar. Del mismo modo que en el ensayo anterior, las muestras se diluían cien veces en la mezcla de

medida, dejando en este caso la concentración de treonina de la muestra que había sido incubada en ella hasta un valor de 0.1 mM, que se considera despreciable para la inhibición. De nuevo, tanto el resultado final de actividad como el curso de la reacción resultaron iguales para las dos reacciones (Figura 3.11.B), lo que implica que los 3 segundos de homogenización eran suficientes para una reversión completa de la inhibición de la actividad aspartato quinasa de la muestra preincubada con treonina. Estos dos experimentos permiten determinar que la inhibición por treonina no sólo es un proceso muy rápido, sino también muy rápidamente reversible por simple dilución de esta.

Con el siguiente experimento se trató de relacionar el proceso de inhibición con el cambio conformacional de la aspartato quinasa descrito. Concretamente se trataba de ver si era posible revertir el cambio conformacional que sufre AQf en presencia de treonina 10 mM y si esta reversión es tan rápida como la observada para la inhibición de la actividad enzimática. Para ello, en la cromatografía que se realizó en presencia de treonina 10 mM (experimento descrito en el apartado 6 de resultados, pág. ; Figura 3.9) se tomaron y mezclaron todas las fracciones recogidas del pico de AQf (pico de  $V_e$  equivalente al de un pentámero; fracciones 120 a 129). En ellas, la AQf se encuentra incubada en treonina 10 mM, considerándose que está en la configuración inhibida. Esta mezcla se separó en dos partes que se cromatografiaron por separado a través de la misma columna, una de ellas en presencia de treonina 10 mM en el tampón de lavado y la otra sin ella.

En la Figura 3.12, en la que se muestran los resultados de esta cromatografía, puede observarse que la realizada en presencia de treonina 10 mM dió lugar un único pico del mismo  $V_e$  que el pico del cual procedía la muestra y que se corresponde con el tamaño de un pentámero. Este resultado implica que mientras se mantiene la concentración de treonina se mantiene la estructura en la que queda el enzima tras el cambio conformacional.





---

**Figura 3.12. Análisis por cromatografía de filtración de la reversión del cambio estructural de la AQf.** Dos muestras iguales, procedentes de una mezcla de las fracciones recogidas del pico de AQf mostrado en la figura 3.9, se sometieron a cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30, equilibrada en tampón sin treonina o con treonina 10 mM. La presencia de proteína en el eluido se evaluó midiendo la absorbancia a 254 nm. Se muestra la equivalencia de  $V_e$  para cada una de las especies moleculares que pueden obtenerse por adición de monómeros de AQf, hasta el tamaño de hexámero. Los tamaños equivalentes a hexámero y pentámero aparecen marcados con una línea discontinua.

---

Sin embargo, en el caso de la cromatografía realizada sin treonina, apareció un pico mayoritario, con un  $V_e$  ligeramente mayor al del hexámero, equivalente a un PM de 337.4 kDa, que corresponde a 5.72 monómeros. Este retraso resulta muy pequeño, estando muy próximo a la propia tasa de error de la técnica para el valor de hexámero. Esto implica que la reversión del cambio conformacional debió haber ocurrido muy rápidamente durante la cromatografía, permitiendo que la AQf migrara en su conformación compacta solo durante un periodo de tiempo muy corto al inicio de la cromatografía y haciéndolo en su conformación de hexámero durante el resto del proceso, una vez revertido el cambio conformacional. Al igual que en la reversión de la inhibición, la dilución de la treonina es suficiente para que el cambio conformacional tenga lugar de una forma muy rápida.

Los resultados mostrados en la Figura 3.12 apoyan la idea de un cambio conformacional a nivel de estructura terciaria frente a otras posibles explicaciones del efecto de la treonina sobre la migración de la AQf en cromatografía de exclusión y BN-PAGE. Además, junto con los mostrados en la Figura 3.11 permiten poner de relieve la similitud en cuanto a la dinámica de los procesos de inhibición y cambio conformacional, subrayando la estrecha relación entre ellos. En base a esta relación, se desarrolló un modelo de inhibición por treonina de la aspartato quinasa según el cual la unión del enzima a treonina induce un cambio conformacional que da lugar a una estructura más compacta, en la cual el enzima es inactivo. Este proceso sería reversible por liberación de la treonina.

## 8. PURIFICACIÓN DE LA AQf-R2

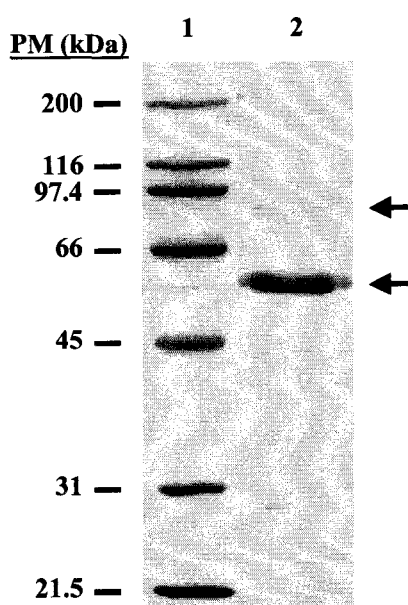
A la luz de los resultados hasta ahora descritos, pareció interesante llevar a cabo estudios similares con una aspartato quinasa insensible a inhibición por treonina. Partiendo del modelo elaborado para explicar la relación entre el cambio conformacional y la inhibición por treonina, se pueden predecir varios tipos de mutantes resistentes: mutantes con una capacidad reducida de unirse a treonina, mutantes en los que la capacidad de unirse a treonina es normal pero no se produce el cambio conformacional y, por último, mutantes en los que se llega a producir cambio conformacional pero este no conlleva una inhibición de la actividad. Quisimos comprobar si alguno

de los mutantes descritos se ajustaba a alguno de estos tipos.

Para ello se seleccionó el alelo mutante *HOM3-R2* (ya mencionado en el Apartado 1 de Resultados), que codifica una aspartato quinasa totalmente insensible a inhibición por treonina y que ha sido caracterizado a fondo en el laboratorio en el que se ha desarrollado esta Tesis (Ramos y Calderón, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993; Farfán *et al.*, 1999). El alelo mutante *HOM3-R2* presenta una mutación puntual que da lugar a un cambio en la posición 452 de la proteína, de una glicina por un aspártico. Este aminoácido es uno de los residuos más conservados del segundo dominio ACT, presente en la región carboxiterminal del enzima. Como se ha comentado, estos dominios funcionan por parejas (Aravind y Koonin, 1999) y, en el caso de las aspartato quinasa, se postulan como responsables de la unión a treonina y, por ello, de la regulación. De este modo, la razón más probable del comportamiento de la aspartato quinasa mutante R2 es que tenga una capacidad reducida de unirse a treonina.

Para la producción y purificación de la aspartato quinasa mutante R2 (AQf-R2) se recurrió de nuevo al sistema basado en la fusión con la GST de *S. japonicum*. El plásmido de producción se construyó según se describe en Materiales (Apartado 2), sustituyendo el fragmento *BgIII* de pEG-HOM3 por el mismo fragmento presente en pMR3-R2 (Martín-Rendón *et al.*, 1993). Este fragmento abarca parte del extremo 3' del gen *HOM3* (a partir del primer nucleótido de la ORF, desde el nucleótido +417 hasta el +1757) y en él encuentra la mutación R2. El plásmido resultante se denominó pEG-R2 y su introducción en la cepa  $\Sigma$ A3hu, de nuevo seleccionada como cepa para la producción de la fusión, resultó suficiente para complementar el fenotipo producido por la delección de *HOM3* cuando la cepa transformante se cultivaba en medio de expresión. Esto indica que la fusión GST-AQf-R2 es activa. Sin embargo, la cepa transformante mostraba una velocidad de crecimiento sensiblemente menor a la de la cepa transformada con pEG-HOM3, alcanzando la fase estacionaria a una  $DO_{660}$  mucho más baja (alrededor de 1). Este resultado coincide con el observado para otras cepas con esta mutación (Farfán, 1996), siendo más marcado para esta cepa probablemente por efecto de la sobreexpresión del gen.

La purificación de la AQf-R2 se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo puesto a punto para la AQf y descrito en Métodos (Apartado 16.4). En este caso el rendimiento fue inferior, dando lugar a menores cantidades de proteína por L de cultivo, debido probablemente a que no se alcanzaban concentraciones de células tan altas como en el caso de la AQf. Como consecuencia y según se observa en la Figura 3.13, la muestra final fue algo más impura, conteniendo cantidades proporcionalmente superiores de fusiones no digeridas y GST (Figura 3.13, carril 2), si bien la banda mayoritaria corresponde con lo esperado para el monómero de la AQf-R2 (59 kDa).



**Figura 3.13. SDS-PAGE del resultado de la purificación de la AQf-R2.** Carril 1, marcador de PM; carril 2, fracción no retenida en la columna GS4B durante el segundo filtrado, tras la digestión con trombina (4  $\mu$ g). Se indica el PM de cada uno de los marcadores que aparecen. Las flechas señalan, de arriba a abajo, las bandas de GST-AQf-R2 (85 kDa) y AQf-R2 (59 kDa). El desarrollo de la electroforesis y su revelado con azul de Coomassie se realizaron según se describe en Métodos (Apartado 19).

Cuando se ensayó la actividad enzimática de la muestra (ver Tabla 3.3), esta resultó unas cuatro veces menor que la del silvestre, lo cual coincide con lo ya publicado (Ramos y Calderón, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993) y lo descrito en esta Tesis (Apartado 1 de Resultados y Tabla 3.1). Sus  $K_m$  para el ATP y el aspártico son iguales a las definidas para la AQf. Finalmente, como estaba descrito (Ramos y Calderón, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993), resultó completamente insensible a inhibición por treonina, no pudiendo determinarse la  $K_i$ .

**Tabla 3.3. Parámetros cinéticos de las aspartato quinasas purificadas durante esta tesis.**

Enzima	$K_m$ Asp (mM)	$K_m$ ATP (mM)	$K_i$ Thr (mM)	Act. específica (U/mg)	$K_{cat}$ <sup>1</sup> (s <sup>-1</sup> )
AQwt	1.1	0.8	1.4	39.1	226.6
AQf	1.2	1.2	1.4	56.3	332.3
AQf-R2	1.1	1.2	na	17.8	105.2

na – no aplicable. No se observó ningún efecto en un rango entre 0.1 y 50 mM.

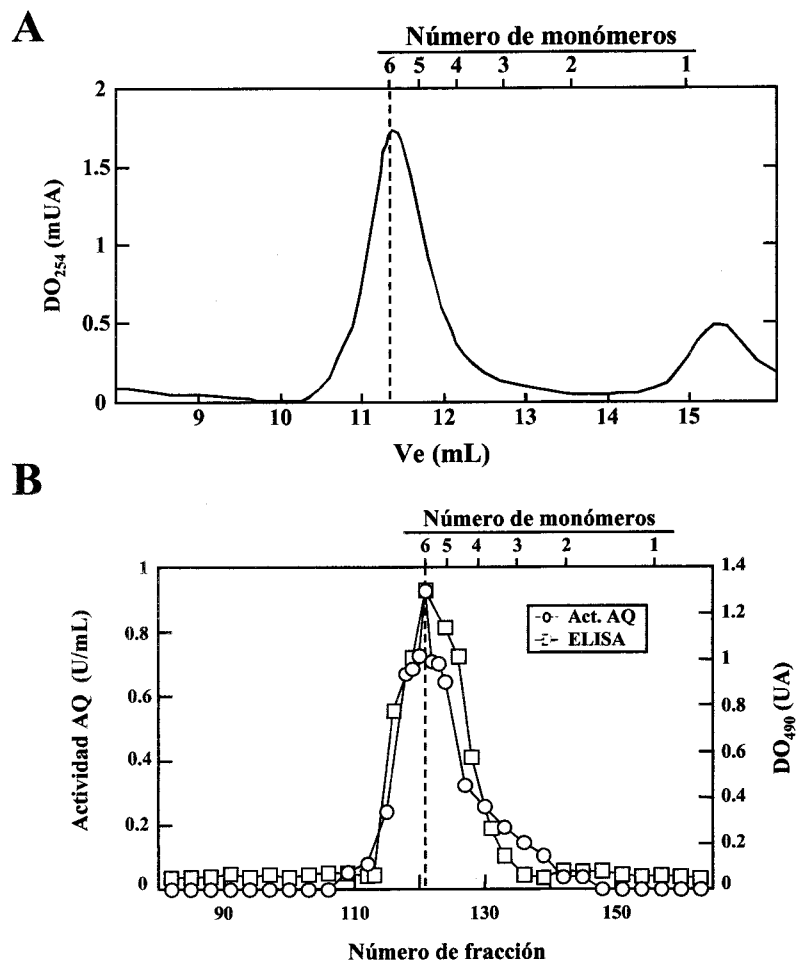
<sup>1</sup>Para los cálculos de las  $K_{cat}$ , se consideraron pesos moleculares de 348 y 354 kDa para la AQs y las AQf, respectivamente.

## 9. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA AQf-R2

La AQf-R2 purificada según se describe en el apartado anterior se sometió a una cromatografía de exclusión en ausencia de treonina en las mismas condiciones descritas

anteriormente para AQf y AQwt (ver Métodos, Apartado 21 y Resultados, Apartados 3 y 5).

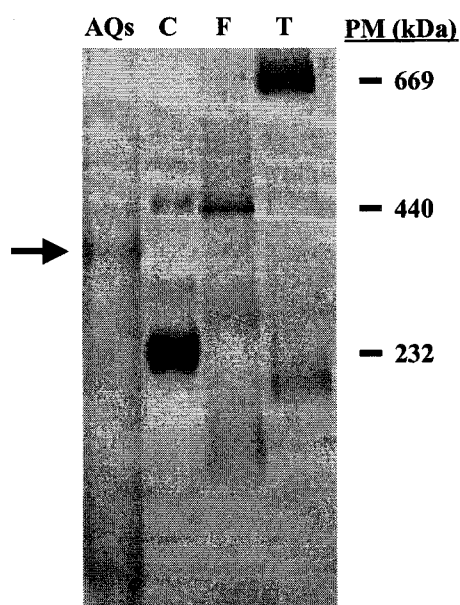
Según se observa en el Cuadro A de la Figura 3.14, se obtuvo un pico principal de proteína de un  $V_e$  equivalente al de un hexámero de AQf-R2 y uno secundario de un tamaño similar al de la GST dimerizada e inferior al de un monómero. Los ensayos de actividad enzimática y ELISA (Figura 3.14, Cuadro B) sólo detectaron presencia de aspartato quinasa en las fracciones correspondientes al pico de hexámero.



**Figura 3.14. Cromatografía de filtración en gel de la AQf-R2.** Una muestra de 40  $\mu$ g de AQf-R2 purificada se sometió a cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30. Al igual que en la Figura 3.3., se muestra el patrón de elución de la muestra (Cuadro A), representando la absorbancia a 254 nm, en mUA, frente al  $V_e$ , en mL. Del mismo modo, se representan la actividad aspartato quinasa y la cantidad de proteína determinada mediante ensayos ELISA con anticuerpos contra la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* presentes en cada una de las fracciones recogidas durante la cromatografía (Cuadro B), expresadas en unidades de actividad por mL y en unidades de absorbancia a 490 nm, respectivamente. En ambos casos, la equivalencia de  $V_e$  para cada una de las especies moleculares que pueden obtenerse por adición de monómeros de AQf-R2 aparece señalada y el tamaño equivalente a hexámero marcado con una línea discontinua.

Según se muestra en la Figura 3.15, en BN-PAGE se obtuvo un resultado similar al obtenido

para la AQf (ver Figura 3.4). La muestra migró principalmente en forma de una banda de proteína de 331.7 kDa, equivalentes a 5.62 monómeros. De nuevo, un cierto nivel de inestabilidad de la AQf-R2 en esta técnica pudo observarse en forma de una mancha difusa desde la banda de hexámero hacia posiciones correspondientes a pesos moleculares inferiores, si bien en este caso hay que considerar que la muestra presentaba una cantidad de impurezas algo mayor, como ya se ha comentado.



**Figura 3.15. BN-PAGE de la AQf-R2.** Una muestra de 7.5  $\mu$ g de AQf-R2 purificada se analizó mediante BN-PAGE. Se señalan los marcadores moleculares cuyo PM resultó más parecido al obtenido para la AQf, indicando su peso molecular: T, tiroglobulina, 669 kDa (5  $\mu$ g); F, ferritina, 440 kDa (5  $\mu$ g); C, catalasa, 232 kDa (5  $\mu$ g).

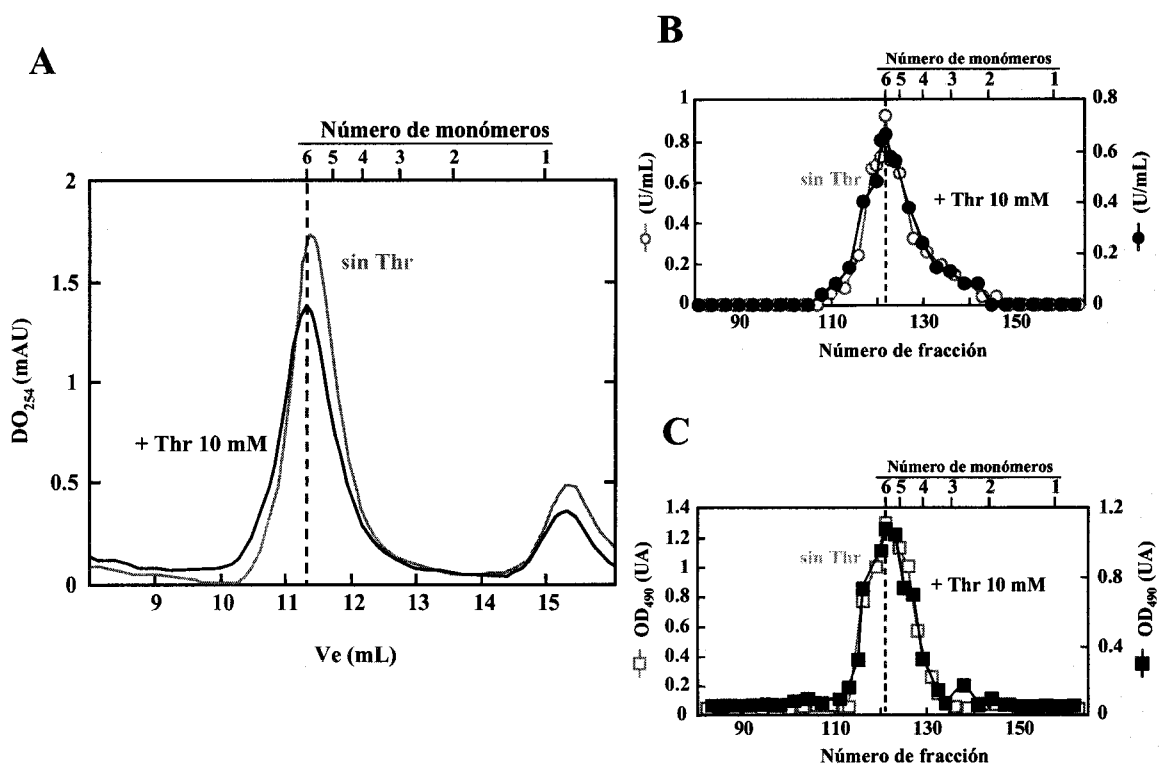
Estos resultados demuestran que la AQf-R2 se comporta igual que la AQf tanto en cromatografía de exclusión como en BN-PAGE.

## 10. EFECTO DE LA TREONINA EN LA ESTRUCTURA DE LA AQf-R2

Una vez determinado que la AQf-R2 presenta las mismas propiedades que la AQf en cuanto a su comportamiento en cromatografía y BN-PAGE, se trató de determinar cómo afecta la treonina a la configuración de este enzima. Para ello, muestras de AQf-R2 purificadas, se sometieron a cromatografía de exclusión en presencia de treonina 10 mM, del mismo modo que se describió para la AQf (Apartado 6 de Resultados; Figura 3.9).

Según se muestra en el cuadro A de la Figura 3.16, al contrario de lo que sucedía con la

AQf, la adición de treonina 10 mM en el tampón de lavado de la cromatografía no alteró en modo alguno la migración de la AQf-R2 (Figura 3.16, apartado A), apareciendo en un pico principal de un  $V_e$  equivalente al de un hexámero. Para confirmar este resultado, se analizó el conjunto de las fracciones producto de la cromatografía tanto por ensayo de actividad aspartato quinasa como por ELISA (Figura 3.16, Cuadro B). De nuevo, toda actividad enzimática y toda la AQf-R2 detectables estaban en las fracciones correspondientes al pico de hexámero, no pudiendo detectarse AQf-R2 en ninguna otra fracción.



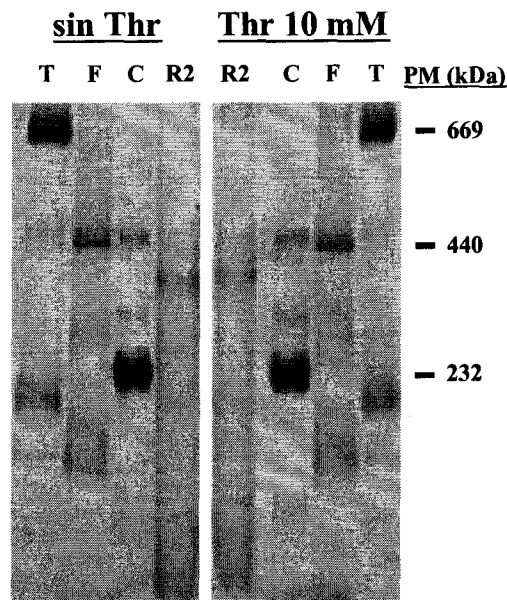
**Figura 3.16. Cromatografía de filtración en gel de la AQf-R2 en presencia de treonina.** Una muestra de 40  $\mu$ g de AQf-R2 purificada se sometió a cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30 equilibrada en tampón con treonina 10 mM. A) La presencia de proteína en el eluido se evaluó midiendo la absorbancia a 254 nm. B) Se ensayó la actividad aspartato quinasa de las fracciones recogidas durante ambas cromatografías, con muestras de 5  $\mu$ L. C) Se determinó la cantidad de proteína en las fracciones recogidas durante la cromatografía mediante ensayos ELISA con anticuerpos contra la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*, realizados con muestras de 10  $\mu$ L.

En cada apartado se muestra en gris el resultado obtenido sin treonina y presentado en la Figura 3.14. También se muestra la equivalencia de  $V_e$  para cada una de las especies moleculares que pueden obtenerse por adición de monómeros de AQf-R2, hasta el tamaño de hexámero. Los tamaños equivalentes a hexámero (gris) y pentámero aparecen marcados con una línea discontinua.

Para confirmar este resultado, una muestra de AQf-R2 se analizó por BN-PAGE, añadiendo treonina 10 mM al tampón del gel. En la Figura 3.17 se muestra el resultado obtenido, incluyéndose

para facilitar la comparación el resultado obtenido en ausencia de treonina ya presentado en la Figura 3.15, en su imagen especular. En presencia de treonina, la AQf-R2 aparece en forma de una única banda de un tamaño aproximado de 343.6 kDa, equivalente a 5.82 monómeros. En este caso, no se observó una estabilización de la AQf-R2 similar a la que la adición de treonina daba lugar en el caso de la AQf, mostrando un patrón similar al observado en ausencia de treonina.

Estos resultados parecen confirmar la supuesta incapacidad de la AQf-R2 de unirse a treonina comentada anteriormente.



**Figura 3.17. BN-PAGE de la AQf-R2 en presencia de treonina 10 mM.** Una muestra de 7.5  $\mu$ g de AQf-R2 purificada se analizó mediante BN-PAGE, añadiendo treonina 10 mM en el tampón del gel. Tanto los marcadores como las muestras cargadas se incubaron en presencia de treonina 10 mM durante 10-15 min en hielo. Se señalan los marcadores moleculares cuyo PM resultó más parecido al obtenido para la AQf, indicando su peso molecular: T, tiroglobulina, 669 kDa (5  $\mu$ g); F, ferritina, 440 kDa (5  $\mu$ g); C, catalasa, 232 kDa (5  $\mu$ g). Para hacer mas evidente la diferencia en la migración de la banda de AQf respecto del experimento realizado sin treonina, se muestra una imagen especular de la presentada en la Figura 3.15.

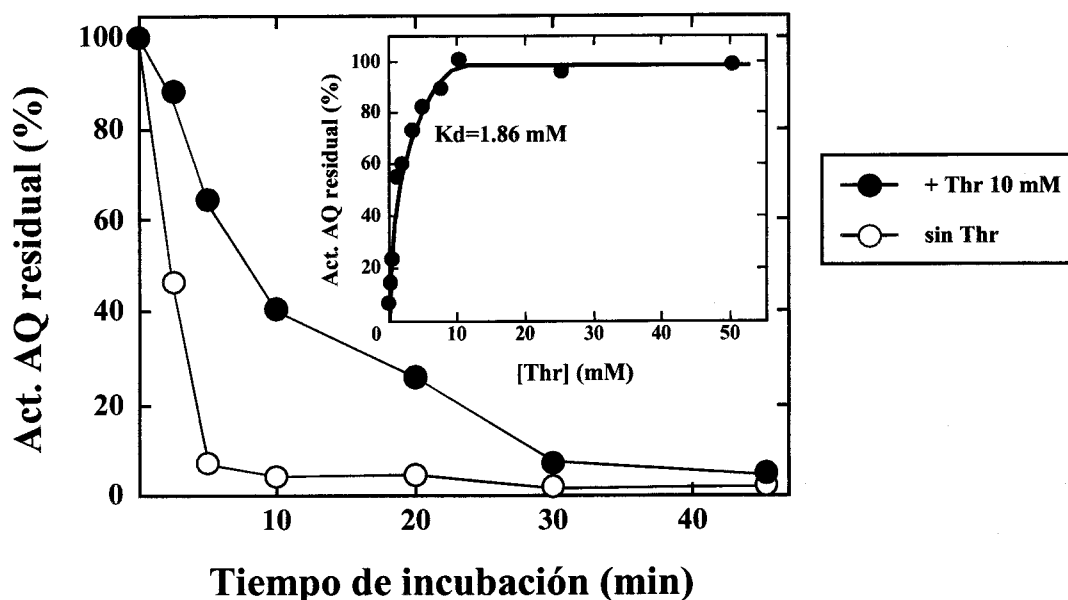
## 11. ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN POR TREONINA DE LAS AQf Y AQf-R2 FRENTE A INACTIVACIÓN TÉRMICA

Para estudiar en más en profundidad la unión de la aspartato quinasa a treonina se aprovecharon las propiedades de estabilización que tiene, ya identificadas en los distintos experimentos de BN-PAGE (Apartado 6 de Resultados; Figura 3.10 ).

Se sometieron muestras de AQf y AQf-R2 a ensayos de resistencia térmica a 55°C en presencia y ausencia de treonina 10 mM, considerando la protección de la actividad aspartato

quinasa como una indicación de la unión a treonina. Para ello, dos muestras iguales de cada enzima se incubaron a 55°C en mezcla de medida sin aspártico ni ATP, una con treonina 10 mM y la otra sin ella. A diversos tiempos se tomaron alícuotas de la mezcla, sometiéndolas a un ensayo de actividad aspartato quinasa realizado de forma normal, según lo descrito en Métodos (Apartado 17).

En la Figura 3.18 se representa la evolución de la actividad residual de la muestra de AQf en presencia y ausencia de treonina, medida como % de la actividad inicial.

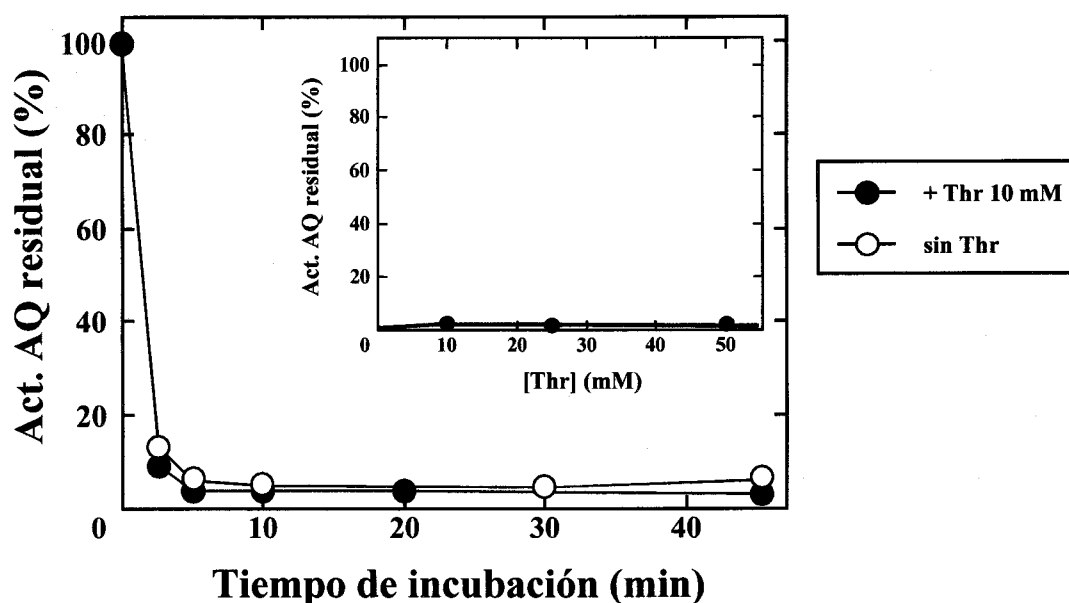


**Figura 3.18. Ensayo de protección térmica de la AQf por treonina.** Se ensayó la protección por treonina frente a inactivación térmica de la actividad aspartato quinasa de una muestra de AQf purificada. El enzima se incubó en mezcla de medida sin ATP ni aspártico durante distintos tiempos a 55 °C, en presencia y ausencia de treonina 10 mM, tras lo cual se midió la actividad de una alícuota del modo descrito en Métodos (Apartado 17). Se presenta el % de actividad residual después de la incubación, tomando como 100% la actividad de la muestra sin incubarse. Inserto: determinación de la  $K_d$  para la treonina a 55 °C de la AQf. Se incubaron muestras iguales del enzima en mezcla de medida durante cinco minutos a 55 °C, en distintas concentraciones de treonina, tras lo cual se midió la actividad de una alícuota del modo descrito en Métodos (Apartado 17). Se presenta el % de actividad residual después de la incubación, tomando como 100% la actividad de la muestra sin incubarse.

Según se deduce de la Figura 3.18, la adición de treonina 10 mM aumentó la resistencia del enzima a desnaturalización térmica. Mientras que la muestra incubada sin treonina a los cinco minutos conservaba menos del 10% de la actividad, la muestra incubada con treonina retenía en ese tiempo un 62.86%, no llegando a niveles inferiores al 10% hasta pasados 30 minutos de incubación. Se eligieron las condiciones en las que se observaba una diferencia mayor entre las muestras (5 min., 55°C), para estudiar la estabilización de la AQf en función de la concentración de treonina. Así, se incubaron mezclas conteniendo distintas cantidades de treonina (de 0 a 50 mM) y se midió la actividad enzimática residual, recogiendo los resultados obtenidos en el cuadro inserto en la Figura 3.18. A partir de esta curva pudo calcularse una constante de disociación ( $K_d$ ) para la treonina en las condiciones especificadas de 1.86 mM.



Se realizaron los mismos experimentos con muestras de AQf-R2 para determinar su comportamiento en condiciones similares. Los resultados mostrados en la Figura 3.19 muestran que la presencia de treonina en la mezcla de incubación no protege a la AQf-R2 de la desnaturalización térmica, siendo la pérdida de actividad de las muestras incubadas con y sin treonina prácticamente igual. Es de señalar que en comparación con el experimento realizado para la AQf, en ausencia de treonina la AQf-R2 resulta algo más inestable a 55°C, perdiéndose aproximadamente el 90% de la actividad de la muestra en 2.5 min frente a los 5 min determinados para la AQf.



**Figura 3.19. Ensayo de protección térmica de la AQf-R2 por treonina.** Se ensayó la protección por treonina frente a inactivación térmica de la actividad aspartato quinasa de una muestra de AQf-R2 purificada del modo idéntico al descrito para la AQf en la Figura 3.18. Inserto: determinación de la  $K_d$  para la treonina a 55 °C de la AQf-R2 realizada de modo idéntico al descrito para la AQf en la Figura 3.18.

La muestra de AQf-R2 se sometió a un experimento de desnaturalización térmica con distintas cantidades de treonina, en las mismas condiciones que se habían usado para la AQf. Según se muestra en el cuadro inserto en la Figura 3.19, no se detectó actividad en ninguna de las muestras por lo que resultó imposible determinar la  $K_d$  de la AQf-R2 para la treonina (Figura 3.19, inserto).

Considerando estos resultados, resulta probable que la mutación presente en la AQf-R2 impida la unión de la treonina al sitio regulador. De este modo se impide que el cambio conformacional llegue a producirse, pese a que el enzima es teóricamente capaz de llevarlo a cabo. En esta situación el enzima mutante R2 deja de ser regulable por treonina.

**DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

### 1. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ALELOS DE *HOM3* EN UNA CEPA DIPLOIDE DE *S. cerevisiae*

En la primera parte de este trabajo nos propusimos estudiar como afectaba a la actividad aspartato quinasa de una cepa de *S. cerevisiae* la combinación de alelos silvestres y mutantes. Mientras que en *S. cerevisiae* el estudio de los mutantes publicados había dado lugar a resultados opuestos (Ramos y Calderón, 1992; Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999), en otros organismos en los que se habían descrito mutaciones similares no se habían llevado a cabo estudios de este tipo. Decidimos realizar experimento de medida de actividad aspartato quinasa en extractos parcialmente purificados de aspartato quinasa, estableciendo como modelo de comportamiento el del extracto procedente de una cepa diploide con dos alelos diferentes de *HOM3*, silvestre y *HOM3-R2*, e isogénica para todo el resto del genomio. Como controles de este experimento se utilizaron cepas diploides isogénicas con copias iguales de uno u otro alelos. De este modo queríamos establecer la forma de relación entre alelos de distinto tipo. Además, esperábamos que los resultados del experimento pudieran darnos alguna idea sobre el supuesto carácter polimérico del enzima.

La elección del alelo *HOM3-R2* se basa en dos razones fundamentales. En primer lugar, es uno de los alelos R mejor estudiados (Ramos y Calderón, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993; Farfán, 1997). Tanto su comportamiento como su expresión han sido analizados extensivamente. En segundo lugar, resulta completamente insensible a inhibición por treonina en un rango de concentración que alcanza incluso los 20 mM. Esto resulta una ventaja frente a la utilización de uno de los alelos R que dan lugar a una aspartato quinasa parcialmente insensible a inhibición por treonina. Comenzando por el estudio del alelo R2, podríamos llegar a conocer los dos extremos de la situación, dejando para un estudio posterior el análisis de situaciones intermedias, cuya explicación podría resultar mas difícil de no conocer primero la de los casos extremos.

Los resultados obtenidos para los controles son coincidentes con lo establecido anteriormente para las aspartato quinasa producto de ambos alelos, así como para el comportamiento de cepas diploides (Ramos *et al.*, 1992; Martín-Rendón *et al.*, 1993). La aspartato quinasa obtenida de la cepa con dos alelos R2 muestra una actividad 3.5 veces inferior a la obtenida para la cepa silvestre y resulta completamente insensible a inhibición por treonina, mientras que la procedente de la cepa silvestre se encuentra completamente inhibida en estas condiciones. La aspartato quinasa extraída y purificada desde una cepa conteniendo ambos alelos arroja un resultado intermedio tanto en actividad como en inhibición. El resultado de actividad específica supone

aproximadamente la mitad del obtenido para la aspartato quinasa de la cepa silvestre, inhibiéndose casi en un setenta por ciento en presencia de treonina 10 mM. Estos resultados permiten determinar que entre ambos alelos se establece una relación de codominancia. Este tipo de relación suele estar asociada situaciones en la que el producto de los alelos puestos en combinación es monomérico o la formación de estructuras poliméricas se hace solo entre monómeros del mismo tipo, funcionando los productos de uno y otro alelos de modo independiente en cuanto a actividad e inhibición. Sin embargo, el mismo resultado puede explicarse también mediante la formación de estructuras en las que, pese a formar parte de un oligómero, cada monómero funcionara de forma independiente o, alternativamente, mediante estructuras en las que el dato obtenido de un experimento como el presentado fuera el resultado neto del comportamiento de las diferentes especies moleculares que pueden crearse por mezcla de subunidades de uno y otro tipo. En todos estos casos, la relación que se establecería sería de codominancia, siendo estructuralmente distintas de unas a otras.

Estos resultados entran en contradicción con los descritos por Ramos y Calderón (1992) y Arévalo-Rodríguez *et al.* (1999), los cuales están en contradicción entre si. En ambos artículos, se construye una cepa con combinación de alelos silvestre y mutante. En el primero, la combinación se hace con alelos R, entre los cuales está el alelo R2, aislados en un experimento de mutagénesis y selección de cepas resistentes a un análogo tóxico de la treonina: la hidroxinorvalina. El análisis de los mutantes permitió identificar la naturaleza de esta resistencia como la capacidad de superproducir treonina, procedente en todos los casos estudiados de mutaciones en *HOM3*. Los alelos mutantes aislados, que fueron denominados alelos *HOM3-R*, codifican para aspartato quinazas que han perdido la capacidad de ser reguladas por treonina. Se construyeron cepas diploides que albergaban combinaciones de alelos silvestres con los distintos alelos mutantes R aislados. Estas mostraron un crecimiento normal en medio mínimo, siendo capaces de dar lugar a crecimiento de una cepa thr- en un experimento de alimentación cruzada realizado en medio sólido. Este fenotipo de excreción de treonina se tomó como asociado a la capacidad de superproducir treonina en una cepa excretora. Así pues, los alelos R se consideraron dominantes frente al alelo silvestre. En el segundo artículo, se habían aislado mutantes en un experimento de mutagénesis y selección de cepas incapaces de utilizar serina y treonina (Holmber y Schjerling, 1996). Una posterior caracterización permitió observar que algunos de ellos eran incapaces de crecer en cualquier medio con treonina 1 g/L. El estudio de estos mutantes demostró que en todos los casos se debían a mutaciones en el gen *HOM3*. Estos alelos, que fueron denominados *HOM3-S*, daban lugar a aspartato quinazas hipersensibles a inhibición por treonina, las cuales se inhiben completamente a concentraciones anormalmente bajas. Esta situación afecta a la entrada de flujo metabólico en la ruta produciendo un defecto en el crecimiento de la cepa por falta de metionina, que puede

complementarse por la adición de metionina en cantidades normales. En este caso, se estudió el efecto de una combinación de alelos silvestre y S sobre la capacidad de crecer en medio con treonina. Las cepas diploides obtenidas no mostraron ningún defecto en su crecimiento en estas condiciones, no diferenciándose este del de una cepa silvestre. Así, el comportamiento de los alelos S fue definido como recesivo.

Los resultados obtenidos por Ramos y Calderón para la combinación de alelos silvestres y R2 son igualmente interpretables desde un punto de vista molecular en base a una relación de codominancia, siendo equivalentes a los obtenidos durante esta tesis. Una cepa con combinación de alelos silvestres y R2 crece de un modo completamente normal y la capacidad de excretar treonina procedería de la actividad de las aspartato quinazas producidas a partir de los alelos *HOM3-R2*. La contradicción entre esta explicación y la que se dio a los resultados obtenidos para la combinación de alelos silvestres y mutantes S por Arévalo-Rodríguez *et al.* podría explicarse por el diferente comportamiento de las aspartato quinazas que se forman en un experimento y otro. Sin embargo, atendiendo a la actividad específica descrita en la misma publicación para las AQs, entre cinco y ciento sesenta veces inferior a la del silvestre, el resultado fenotípico obtenido podría reinterpretarse en forma de una relación de codominancia. En esta, las AQwt y AQs actuarían de un modo independiente. La aportación de las AQs en la producción de  $\beta$ -aspartil-P sería muy inferior a la de las AQwt debido a su baja actividad y de este modo su hipersensibilidad a treonina tendría poca repercusión en el crecimiento de la cepa, siendo difícil de detectar su efecto sobre el crecimiento de la cepa.

Aún es necesario estudiar el fenómeno de codominancia descrito en mayor profundidad, sobre todo en situaciones en las que el alelo R se introduce en un fondo con más de un alelo silvestre. Sin embargo, para la posible aplicación de los alelos *HOM3-R* en la producción controlada de treonina en cepas industriales, el resultado obtenido es esperanzador. Como ya se ha señalado con anterioridad, las cepas de uso industrial son poliploides en su mayoría y presentan un grado variable de inestabilidad genómica durante el proceso de fermentación. El comportamiento de un alelo R en un fondo genético de estas características había resultado hasta el momento impredecible. Una vez determinada la existencia de una relación de codominancia entre los distintos alelos de *HOM3*, o al menos entre los alelos silvestres y *HOM3-R2*, esto permite considerar la simple introducción de un alelo R2 en una de estas cepas como una posibilidad plausible para la consecución de una cepa industrial superproductora de treonina.

## 2. ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA ASPARTATO QUINAZA DE *S. cerevisiae*

Desentrañar cual era la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* fue uno de los objetivos fundamentales de esta Tesis. Tanto desde un punto de vista teórico como práctico, este dato resulta de gran importancia, no solo para el planteamiento de futuros estudios sino también para un reanálisis de los resultados ya publicados. Así, como parte de experimento comentado en el apartado anterior, se esperaba poder sacar una indicación sobre en que estructura cuaternaria está presente la aspartato quinasa nativa de *S. cerevisiae*. Un resultado de clara dominancia o recesividad en el comportamiento del enzima habría podido ser tomado como una buena indicación del carácter polimérico del enzima.

Sin embargo, los resultados obtenidos del experimento de mezcla de alelos comentado en el apartado anterior no aportaron ningún dato del que pudiera deducirse una posible estructura polimérica de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*. Como ya se ha comentado, atendiendo a la estructura cuaternaria del enzima, un resultado como el obtenido es explicable tanto a través de estructuras monoméricas como poliméricas. Para clarificar esta situación, nos planteamos un proyecto de purificación y caracterización estructural de la aspartato quinasa. En la actualidad existen diversos sistemas de producción y purificación de proteínas, basados en diversas estrategias, que son de uso común. Nosotros nos decidimos por el sistema de purificación basado en la producción de la aspartato quinasa como una fusión con GST, la cual se puede purificar de un modo sencillo a través de la afinidad de la GST por el glutation conjugado a una matriz de sefarosa. Inicialmente planteamos la realización del proceso de producción en *E. coli*, usando un sistema desarrollado comercialmente. Coincidiendo con la obtención de nuestros primeros resultados, apareció publicado un artículo en el cual se definía una chaperona para la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* (Alarcón y Heitman, 1997). La relación entre la AQ y la chaperona se determinó a partir de un experimento de doble híbrido, comprobado a través de un segundo experimento de doble híbrido usando un sistema diferente y recomprobado a través de varios experimentos de copurificación. Esta chaperona, llamada Fkbp12 y producto del gen FPR1, no es esencial para la actividad del enzima, pero resulta determinante para la capacidad de este de inhibirse de forma normal en presencia de treonina. Una cepa con una delección de FPR1 presenta el mismo fenotipo de resistencia a hidroxinorvalina observado para las cepas con mutaciones *HOM3-R*. Aunque esta chaperona está considerada como una peptidil prolil isomerasa, ni las características del proceso de modificación de la aspartato quinasa ni la naturaleza de su efecto sobre ella están aún definidas. Tampoco se ha podido determinar por el momento si la chaperona se une de un modo permanente o transitorio a la aspartato quinasa.

No está descrito que exista en *E. coli* ningún tipo de chaperona con una actividad similar a la descrita en levaduras. De no existir, la aspartato quinasa de levadura producida en *E. coli* resultaría

igualmente insensible a inhibición por treonina, al igual que la producida en una cepa de levadura *fpr1* o *fpr1Δ*. Estas expectativas quedaron confirmadas cuando, solucionados los problemas de precipitación de la aspartato quinasa durante la purificación desde bacterias, en los ensayos de inhibición en presencia treonina 10 mM la aspartato quinasa purificada retenía aproximadamente el 70% de su actividad. Este resultado nos llevó a modificar el protocolo de producción de la aspartato quinasa puesto a punto en bacterias, pasando desde este momento a utilizar levaduras. El motivo de este cambio se encuentra en la posibilidad que existía de que la regulación por treonina tuviera que ver de algún modo con una modificación de la estructura cuaternaria del enzima. Aunque, como ya se había comentado, no existía publicación alguna en la que se hiciera referencia a un estudio de esta relación para la aspartato quinasa de ningún organismo, si existía información que podía llevar a pensar en esta posibilidad. Hay varios estudios publicados en los que se observa que cuando la aspartato quinasa pierde su estructura cuaternaria nativa, situación que se obtiene por diversos métodos, la capacidad del enzima de ser regulado alostéricamente por treonina se reduce o desaparece completamente. La destrucción de la estructura cuaternaria se consigue bien por desnaturalización con hidrocloreuro de guanidina (AKI-HDHI de *E. coli*, Belfaiza *et al.*, 1984; Muller y Garel, 1984a y b; Vaucheret *et al.*, 1987), bien por proteólisis parcial (AKI-HDHI de *E. coli*; Fazel *et al.*, 1983; Veron *et al.*, 1972; Sibilli *et al.*, 1980) o bien por expresión de construcciones truncadas del gen (AKI-HDHI de *E. coli*, Théze y Saint-Girons, 1974; AKI-HDI de *S. marcescens*; Omori *et al.*, 1993). En todos los casos, esta destrucción de la estructura cuaternaria conlleva que las enzimas, tetraméricas en su conformación nativa, aparezcan en forma de especies moleculares de menor número de subunidades (monómeros o dímeros). En su estudio estructural del proceso de renaturalización de la AKI-HDHI de *E. coli*, Vaucheret *et al.* describieron el curso temporal de la serie de pasos de renaturalización por la que los monómeros iban pasando hasta dar lugar a una AKI-HDHI completamente funcional y regulable. La recuperación de la actividad aspartato quinasa ocurre cuando el enzima se encuentra en estado monomérico, mientras que la capacidad de ser inhibida por treonina no se recupera hasta que el enzima no se encuentra en su conformación nativa de tetrámero, siendo este el último paso identificado del proceso de renaturalización. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos para las aspartato quinasa insensibles a treonina que se obtenían a partir de los alelos *HOM3-R* y por la expresión del alelo silvestre en una cepa *fpr1*, *fpr1Δ* o en bacterias, existía la posibilidad de que la estructura cuaternaria de estas aspartato quinasa fuera diferente de la propia de las producidas en una cepa silvestre de levadura, perfectamente regulables por treonina. Esto determinó que a partir de este momento la producción de la fusión GST-AQf se realizara utilizando levaduras como organismo de trabajo.

Para la producción se insertó la aspartato quinasa en un plásmido de expresión de fusiones a GST, inducible por galactosa y desarrollado para levaduras (Mitchell *et al.*, 1993). Para la producción, se escogió una cepa haploide, denominada  $\Sigma$ A3hu (Velasco *et al.*, manuscrito en preparación) y con una delección del gen *HOM3*, por razones de homogeneidad del resultado de la purificación. Toda la aspartato quinasa purificada en esta cepa procedería de la fusión GST-AQf. Si resultaba ser polimérica, el mismo experimento realizado en una cepa que expresara una aspartato quinasa endógena podría dar lugar a la purificación de estructuras híbridas en las que se combinaran monómeros de aspartato quinasa producidos a partir de la copia endógena y monómeros de la AQf. Estas estructuras podrían ser purificadas a través de la porción GST de las fusiones. Por otra parte, resulta pertinente comentar que esta cepa transformada con el plásmido responsable de la fusión, cultivada en medio de expresión (medio con galactosa como única fuente de carbono) era capaz de crecer en ausencia de treonina y metionina sin ningún retraso aparente, respecto de la cepa *HOM3* parental sin transformar. Así pues, al nivel de expresión al que se produce, la fusión tiene la actividad suficiente como para complementar la mutación *hom3* de la cepa  $\Sigma$ A3hu. Esto implica que la fusión a la GST no modifica drásticamente su estructura.

El sistema puesto a punto permitió obtener una cantidad suficiente de AQf con la que llevar a cabo una serie de experimentos de caracterización estructural. La carga de la definición del tamaño nativo de la AQf, y por extensión de su estructura cuaternaria, descansó en dos técnicas fundamentales: la cromatografía de exclusión y la separación en geles nativos azules (BN-PAGE; Schägger *et al.*, 1994). Con el uso de dos técnicas basadas en principios físicos diferentes, nuestra intención fue la de evitar artefactos que pudieran llevarnos a errores en la interpretación del tamaño de la AQf nativa. En ambos casos, en el estudio de las muestras de AQf purificadas se obtuvieron resultados similares: tanto en cromatografía de exclusión como en BN-PAGE, la AQf se comporta como un hexámero. Con las fracciones producto de la cromatografía se llevaron a cabo ensayos de actividad aspartato quinasa y de detección del enzima con anticuerpos anti- aspartato quinasa, para tratar de descartar la posibilidad de que esta pudiera aparecer en mas de una conformación no detectable por DO. En ningún caso pudo detectarse señal alguna de aspartato quinasa fuera del pico de hexámero.

El único caso conocido de aspartato quinasa hexamérica es el publicado para *Streptococcus mutans* (McCarron y Chang, 1978), en el cual el monómero tiene un PM aproximado de 40 kDa. Esta aspartato quinasa no es inhibible por aminoácidos individualmente, pero si lo es por la acción concertada de lisina y treonina (93.5% en presencia de 10 mM de cada uno de ellos). En una comparación de las secuencias de ambas proteínas, se encontró una identidad del 26% con la porción final de la secuencia de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* (la región entre los



aminoácidos 140 y 494), no encontrándose ninguna identidad apreciable con los primeros 140 aminoácidos. La escasez de parecido entre la estructura primaria y el comportamiento de ambas enzimas y el que no existiera ningún análisis del comportamiento estructural de la aspartato quinasa de *S. mutans* impidieron extraer ninguna conclusión de la coincidencia entre la estructura cuaternaria de ambas enzimas. Por otro lado, la UMP-quinasa de *E. coli*, producto del gen *pyrH*, esta clasificada como un miembro de la familia de las aspartato quinasa (Serina *et al.*, 1995). Este enzima se presenta en su conformación nativa también como un hexámero. Sin embargo, cualquier intento de encontrar coincidencias en la secuencia de ambas proteínas resultó infructuoso. Ni con toda la secuencia ni con porciones de ella pueden encontrarse regiones minimamente similares en su estructura primaria a la de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*.

Las GST aparecen en la naturaleza mayoritariamente en forma de dímero y retienen una fuerte tendencia a dimerizar incluso en el caso de formar parte de una fusión (buscar Wilce y Parker, 1994; McTigue *et al.*, 1995). Esto podría estar influyendo en la polimerización de la proteína y dando lugar a un resultado estable pero artefactual. Por ello, y dada la imposibilidad de refrendar nuestros resultados a través de lo ya publicado para otras aspartato quinasa, quisimos ratificarlos de otro modo. Para comprobar que el resultado obtenido para la AQf refleja la situación nativa de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*, nos propusimos repetir los experimentos de caracterización estructural utilizando la propia aspartato quinasa silvestre (AQwt). Para ello desarrollamos un sistema de purificación, basado en el fraccionamiento de un extracto crudo enriquecido en AQwt y la posterior purificación de esta a través de una cromatografía de semiafinidad en una matriz blue-sepharose CL-6B. Como cepa de producción se volvió a utilizar  $\Sigma$ A3hu, por las mismas razones de homogeneidad del resultado consideradas durante la producción de la fusión. En este caso, la expresión del gen *HOM3* a partir de su propio promotor desde un plásmido episómico permitió incrementar los niveles de aspartato quinasa en dos ordenes de magnitud respecto de los niveles silvestres, haciendo la purificación factible a partir de volúmenes de cultivo asequibles. Como resultado de este sistema pudimos obtener suficiente cantidad de AQwt con la que repetir los análisis que ya habíamos realizado previamente con la AQf. El resultado fue exactamente el mismo. Tanto en cromatografía de exclusión como en BN-PAGE la AQwt se comporta como un hexámero. De nuevo fue imposible detectar señal alguna de aspartato quinasa con una conformación distinta a la de hexámero ni por análisis con anticuerpos anti- aspartato quinasa ni por ensayos de actividad de las fracciones producto de la cromatografía.

El análisis de la actividad de ambas muestras purificadas, AQf y AQwt, nos permitió observar una cierta diferencia entre la actividad específica de cada y, por ende, entre sus constantes catalíticas. Mientras que para la AQf es igual a  $332.3 \text{ s}^{-1}$ , para la AQwt resultó ser igual a  $226.6 \text{ s}^{-1}$ .

Esta diferencia puede deberse a los diferentes métodos empleados en la purificación de ambas proteínas. En el caso de la AQwt, para su purificación a través de la matriz de blue-sepharose CL-6B, es necesario que vaya en un tampón en ausencia de sales. Es posible que este paso contribuya en cierto modo a una pérdida de la actividad de la muestra, dado que se ha descrito que las aspartato quinasa generalmente son mas estables en presencia de sales, particularmente K<sup>+</sup> (Truffa-Bachi, 1973; Veron *et al.*, 1985), dato que se ha corroborado para la estabilidad en solución de la aspartato quinasa durante la realización de la presente tesis. Existe la posibilidad de que la cola de ocho aminoácidos que, como producto de la fusión a la GST, se le añade a la AQf en su extremo aminoterminal esté afectando de algún modo a la actividad del enzima, incrementando su actividad específica. Sin embargo, el estudio de las constantes cinéticas de ambas aspartato quinasa mostró un resultado contrario a esta hipótesis. El análisis de la Km para el aspartato y de la Ki para la treonina dio lugar a resultados muy similares, en torno a 1.1-1.2 mM para la primera y 1.4 mM para la segunda. Por su parte, en el análisis de la Km para el ATP se obtuvo una diferencia algo mayor, siendo igual a 0.8 en el caso de la AQwt y a 1.2 en el caso de la AQf. De esta forma, si la modificación mencionada afectara a la actividad de la AQf, la menor afinidad por el ATP reduciría su actividad específica, no pudiendo de ningún modo este resultado explicar la diferencia encontrada entre las constantes catalíticas. Esto no impide, sin embargo, afirmar que existe la posibilidad de que la cola de ocho aminoácidos añadida en el extremo aminoterminal de la AQf pueda explicar el echo de que su Km para el ATP sea mas alta. Así, aunque la diferencia es pequeña y podría proceder de la propia variabilidad del método de determinación, la posibilidad de que la extensión del enzima en su extremo aminoterminal esté afectando a su capacidad de unirse a ATP resulta particularmente interesante. Se ha descrito con anterioridad la posibilidad de que esta cola pudiera interferir de algún modo con la actividad del enzima purificado a través de la fusión (Hakes y Dixon, 1992). En el caso de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*, el motivo KFGG se encuentra muy próximo al extremo amino terminal (residuos 18-21). Es uno de los determinantes principales de las aspartato quinasa, en las que se encuentra muy conservado. Solo se ha descrito una variación que afecte a este motivo y es el cambio del residuo de fenilalanina por uno de tirosina (*Thermus thermophilus*, Kobashi *et al.*, 1999; *Helicobacter pylori*, Tomb *et al.*, 1997; *Mycobacterium tuberculosis*, Cole *et al.*, 1998; *Corynebacterium glutamicum*, Kalinowski *et al.*, 1991; y otros) o isoleucina (*Sulfolobus tokodaii*, Kawarabayasi *et al.*, 2001) en las aspartato quinasa de algunas especies de bacterias y arqueobacterias. Su integridad resulta de particular importancia para la actividad de la proteína, como demuestra la pérdida completa de actividad a la que da lugar su eliminación (Arévalo-Rodríguez, 1996). Del mismo modo, en un experimento de mutagénesis dirigida contra la región que comprende este motivo, ninguno de los cambios encontrados afectaba

al motivo en si, de acuerdo con la hipótesis de que estos residuos son esenciales para la actividad AQ (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 1999). Las mutaciones obtenidas a partir del mismo experimento en residuos cercanos al motivo KFGG afectaban a la afinidad de la aspartato quinasa por sus dos sustratos, no solo el ATP. Es posible que este extremo aminoterminal añadido esté interfiriendo de algún modo con la unión del ATP, reduciendo la afinidad del enzima de fusión por él. Este fenómeno podría venir dado por la posición de esta extensión aminoterminal de la molécula, que habría de suponer algún tipo de impedimento estérico para la unión del ATP. Otra posibilidad es que la adición de esta extensión aminoterminal introdujera un cambio estructural que afectara al motivo KFGG, de modo que redujera la afinidad del enzima por el ATP. Por el momento no hay ningún dato que soporte la veracidad de ninguna de las dos hipótesis ni el porqué de que la afinidad por el aspártico no se vea afectada. Son necesarios nuevos experimentos para poder afirmar que la diferencia presentada se debe a esta circunstancia y para determinar el mecanismo a través del cual tiene lugar.

Como ya se ha planteado con anterioridad, existía la posibilidad de que la estructura cuaternaria de la aspartato quinasa estuviera de algún modo relacionada con el fenómeno de inhibición de la actividad por treonina. De este modo, resultaba fundamental la repetición del análisis estructural ya realizado para las AQwt y AQf en el caso de una aspartato quinasa producto de uno de los alelos *HOM3-R*. De nuevo se eligió el alelo R2 por las mismas razones expuestas al principio. Inicialmente quisimos definir los casos extremos, comportamiento del silvestre y de un mutante completamente insensible a inhibición por treonina, antes de pasar a estudiar situaciones intermedias que pudieran dar lugar a resultados mas confusos. Se utilizó el mismo sistema de producción y purificación que se había desarrollado para la AQf. De nuevo, y al igual que como ocurría con la AQf, la introducción del plásmido responsable de la expresión de la fusión entre el alelo *HOM3-R2* y el gen de la GST en la cepa  $\Sigma$ 3hu era suficiente para complementar el fenotipo procedente de la mutación *hom3* de la cepa, cuando esta se cultivaba en medio de expresión. Como se indicó en el caso anterior, este resultado indicaba que la fusión de la AQf-R2 a la GST no debía estar alterando drásticamente la estructura de la misma ya que esta seguía siendo activa.

Como resultado de un proceso de producción y purificación similar al realizado en el caso de la AQf se pudo obtener una muestra de AQf-R2 lo suficientemente abundante y purificada como para llevar a cabo el análisis estructural con unas ciertas garantías. De nuevo se volvieron a utilizar las técnicas de cromatografía de exclusión y BN-PAGE y de nuevo en ambas el resultado fue igual al obtenido en casos anteriores: la AQf-R2, estudiada mediante estas técnicas, se comporta como un hexámero. Nuevamente, ni por análisis con anticuerpos anti- aspartato quinasa ni por ensayos de

actividad de las fracciones producto de la cromatografía pudo detectarse ninguna señal de AQ fuera del pico de hexámero.

En este punto, resulta interesante reflexionar sobre la coincidencia en la estructura cuaternaria de las aspartato quinasa silvestre y la AQf-R2. Inicialmente se ponderó la posibilidad de que la estructura cuaternaria pudiera estar relacionada con la inhibición de la actividad, basándonos en lo publicado para varias aspartato quinasa en las que una pérdida de la estructura cuaternaria nativa redundaba en una pérdida, total o parcial, de la regulación por treonina. Sin embargo, los resultados obtenidos están en contra de esta posibilidad, al menos en cuanto a lo que a la AQ producto del alelo *HOM3-R2* se refiere. La AQf-R2 tiene la misma conformación nativa de hexámero, aportando un ejemplo de la posibilidad, de cualquier modo obvia, de que se puedan obtener aspartato quinasa insensibles a inhibición por treonina sin necesidad de alterar su estructura cuaternaria. Esto, sin embargo, no elimina la alternativa de que algo como lo comentado anteriormente ocurra para el caso de alguno de los otros alelos mutantes R y S de *HOM3* aislados.

### **3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN POR TREONINA SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae***

En la bibliografía pueden encontrarse diversos trabajos en los que se analiza el comportamiento estructural de aspartato quinasa de varios organismos en función de su unión a diversos sustratos e inhibidores (Truffa-Bachi, 1973; Tilak *et al.*, 1976; Bearer y Neet, 1978; McMahon y Takahashi, 1983; Muller y Garel, 1984; Jullien *et al.*, 1988; Angeles *et al.*, 1989). En todos ellos se presentan resultados que avalan la existencia de cambios conformacionales, de extensión variable, en presencia de alguno de los sustratos o inhibidores. Sin embargo, la naturaleza de las técnicas empleadas no permite identificar si existen cambios en el tamaño aparente asociados a los cambios conformacionales identificados.

Solo muy recientemente, mediante el uso de la técnica de cromatografía de exclusión, concretamente en una matriz del mismo tipo de la empleada durante esta Tesis (Superdex 200), se ha podido observar un cambio en el tamaño aparente de la aspartato quinasa de *A. thaliana* sensible a treonina, producto de su unión a esta (Paris *et al.*, 2002). Los autores presentan el cambio de tamaño que sufre la mencionada aspartato quinasa (modificada para permitir su purificación en bacterias), desde un tamaño inicial de 470 kDa hasta uno en presencia de treonina 5 mM de 320 kDa, explicándolo como procedente de un cambio en la estructura cuaternaria. Este cambio daría lugar a una estructura tetramérica.

Para comprobar si la AQwt de *S. cerevisiae* era capaz de dar lugar a un comportamiento similar en presencia de treonina, se repitieron los experimentos de cromatografía de exclusión en presencia de treonina 10 mM. La razón para escoger esta concentración de treonina fue similar a la que nos llevó a utilizar el alelo *HOM3-R2* en los experimentos anteriores. En presencia de esta concentración de treonina la actividad de las muestras de aspartato quinasa purificadas se inhibía completamente. Quisimos con ello estudiar el comportamiento en la situación de inhibición completa del enzima antes de pasar a trabajar sobre situaciones intermedias. Estos experimentos permitieron identificar un cambio en el tamaño aparente con el que se comportaba durante la cromatografía. Cuando se cuantificó este cambio, dio lugar a un resultado para la migración de la AQwt en presencia de treonina aproximadamente similar al que presentaría un pentámero. Este cambio supone una diferencia aproximada de unos 60 kDa. En el mismo experimento, resultó imposible detectar ningún otro pico en el que pudiera acumularse proteína procedente de la muestra. Una determinación del valor del cambio en forma de  $R_s$  para la AQf, dio como resultado valores de 61.22 Å para el caso del pico observado en ausencia de treonina y de 56.99 Å para el caso del observado en presencia de treonina 10 mM.

Los experimentos presentados se realizaron solo detectando la aparición de proteína en el eluido mediante DO. Para poder hacer además análisis de las fracciones recogidas de la cromatografía por ensayos de actividad y de detección con anticuerpos anti-aspartato quinasa, se repitió con muestras de AQf, al ser estas mas fácilmente purificables en mayor cantidad. Se obtuvo el mismo resultado: la AQf se comporta como un pentámero en presencia de treonina 10 mM. Mediante las técnicas de análisis y detección empleadas no fue posible detectar AQf en ninguna otra conformación que no fuera esta. Este dato resulta interesante, porque elimina la posibilidad de que el cambio se debiera a la pérdida de un monómero que quedara suelto y no fuera detectable. No pudo encontrarse ningún rastro de un pico de AQf que no correspondiera al de pentámero, en todo el curso de la cromatografía. Se ha descrito para la AKI-HDHI de *E. coli* que, cuando se desnaturaliza, los monómeros tienen una fuerte tendencia a formar agregados macromoleculares, tendencia interfiere con la capacidad de renaturalización de la proteína (Vaucheret *et al.*, 1987). Este comportamiento también se ha observado durante esta Tesis para el caso de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*, cuando su desnaturalización llega a dar lugar a la aparición de monómeros. Sin embargo, no fue este el caso del experimento que se comenta, en el cual tampoco fue posible detectar AQf en el  $V_0$  de la columna (en el cual aparecerían agregados macromoleculares como los descritos). La pérdida de un monómero en una estructura hexamérica supone la desaparición del 16.67% de la masa de proteína englobada en el pico, lo cual equivale a una cantidad de proteína que es perfectamente detectable a través de las tres técnicas utilizadas.

Para comprobar que el resultado obtenido era fruto de un fenómeno real y no un artefacto producto de la técnica empleada se repitió el análisis del comportamiento de la muestra de AQf en presencia de treonina 10 mM usando la técnica de BN-PAGE. No se ha descrito, que se tenga noticia, que exista la posibilidad de realizar esta técnica en presencia de otros compuestos que no sean los propios de los tampones y de la fabricación del gel. Sin embargo, decidimos repetir el análisis de la AQf en presencia de treonina 10 mM, añadiéndola a esta concentración en el tampón del gel. Los resultados obtenidos confirmaron la existencia de un cambio en el tamaño aparente de la AQf en presencia de treonina 10 mM como el descrito mediante la cromatografía de exclusión, confirmando además la posibilidad de utilizar ligantes durante el desarrollo del BN-PAGE. En BN-PAGE con treonina 10 mM, la AQf se dio lugar a una única banda aproximadamente equivalente a la que daría lugar un pentámero. Conviene comentar además un dato interesante sobre el comportamiento de las diversas aspartato quinasa en esta metodología. En el estudio mediante BN-PAGE en ausencia de treonina de las tres aspartato quinasa purificadas hasta el momento, en todos los casos había sido posible detectar una mancha de tinción que se extendía desde la banda principal hacia abajo. Siendo que la banda mayoritaria era la de hexámero y que la mancha partía netamente desde ella, este comportamiento fue atribuido un cierto grado de inestabilidad de la aspartato quinasa durante el desarrollo de la técnica, constituyendo un comportamiento común, en mayor o menor medida, a las tres AQ purificadas. Sin embargo, cuando la técnica de BN-PAGE se lleva a cabo en presencia de treonina 10 mM, además del cambio en la migración de la banda, puede observarse que la mancha detectable cuando no se añade treonina desaparece completamente. Este resultado indica que con la unión a treonina, además del cambio conformacional ya reseñado, ocurre una estabilización del enzima el cual deja de ser susceptible a inestabilización durante el desarrollo de la técnica. Como comprobación se repitió el experimento en presencia de serina 10 mM, con un resultado similar al que aparece en ausencia de treonina. El intento de repetir la técnica en presencia de aspártico dio lugar a un resultado algo confuso, alterando no solo la migración de la AQf sino todo el desarrollo de la técnica, probablemente a consecuencia de la carga negativa que su adición supone. Esto indica que, pese a que la técnica de BN-PAGE ha demostrado ser realizable en presencia de ligantes, estos no pueden ser compuestos altamente cargados.

Como control se repitieron los experimentos de cromatografía y BN-PAGE con muestras de AQf-R2, la cual no mostró ningún signo de ver afectado su comportamiento por la adición de treonina 10 mM en ninguno de los dos casos. De esta forma, en el BN-PAGE realizado en presencia de treonina 10 mM, dio lugar incluso a la misma mancha de tinción reseñada con anterioridad, producto de la inestabilidad del enzima durante el desarrollo de la técnica.

A partir de estos resultados, este cambio en el tamaño aparente de la AQf se puede explicar fundamentalmente de dos maneras. Por una, podría deberse a un cambio en la estructura del enzima, a nivel de estructura terciaria y no cuaternaria. De este modo, el cambio conformacional no comportaría pérdida de monómeros de la estructura hexamérica, sino la adopción por parte de esta de una conformación mas compacta en la que tendría un  $R_s$  menor. Esto modificaría su migración en la cromatografía de exclusión, haciendo que diera lugar a un pico con un tamaño aparente, similar en este caso era al equivalente a un pentámero. Así se puede explicar un cambio en el tamaño aparente con el que una muestra de proteína migra en una cromatografía de exclusión que no conlleve la separación en dos el pico original. La otra posibilidad se basa en la formación de pentámeros a partir de los monómeros que se liberan tras la unión de treonina. De este modo, el cambio conformacional ocurre a nivel de estructura cuaternaria, dando lugar a un cambio en el tamaño aparente con el que el enzima se comporta durante la cromatografía sin necesidad de que tenga que aparecer un segundo pico. Mientras que en la primera hipótesis queda implícita la posibilidad de que se produzca una reversión del proceso con la eliminación de la treonina, si se tiene en cuenta la segunda hipótesis, un proceso similar resulta mucho menos plausible. Además, comenzaba a resultar aparente la posibilidad de que existiera una relación entre la inhibición y el cambio conformacional. El que ambos procesos tengan lugar en presencia de treonina parecía apuntar hacia la existencia de algo mas que una relación puramente circunstancial. Empezó a tomar forma un modelo teórico de inhibición de la aspartato quinasa en el cual, la unión de esta a treonina introduce a un cambio conformacional en su estructura nativa, que tiene como resultado la inhibición de la actividad. A partir de este modelo podría predecirse la reversión del proceso por liberación de la treonina.

#### **4. RELACIÓN ENTRE LOS FENÓMENOS DE INHIBICIÓN POR TREONINA Y CAMBIO CONFORMACIONAL DE LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae***

Con la doble intención de identificar a que nivel se estaba produciendo el cambio conformacional y de verificar el modelo propuesto para explicar el proceso de inhibición, quisimos profundizar en el conocimiento que se tiene de ambos procesos, describiendo el curso temporal que siguen. Para ello, se llevaron a cabo dos experimentos en paralelo. En el primero, llevamos a cabo un estudio del curso de diversos ensayos de actividad aspartato quinasa realizados a partir de muestras incubadas en distintas condiciones. Queríamos ver por una parte la velocidad del proceso de inhibición de la actividad y por otra, si era posible revertir este proceso y en el caso de serlo, la velocidad a la que la reversión tenía lugar. En primer lugar comparamos el transcurso de los

ensayos de actividad realizados en presencia de treonina 10 mM en la mezcla de medida. Se dispararon con la adición de muestras de AQf purificadas, preincubadas en treonina 10 mM o sin preincubar. La treonina procedente de la muestra se diluye hasta 0.1 mM, lo cual es despreciable frente al valor de 10 mM en el que, como ya se ha comentado, aparece en la mezcla de medida. Con ello queríamos ver si había algún retraso en la aparición de la inhibición en el ensayo de actividad realizado a partir de la muestra preincubada sin treonina, respecto del de la muestra preincubada con treonina. En ningún caso se observó señal alguna de retraso en la aparición de la inhibición, siendo el curso de ambas reacciones paralelo y prácticamente igual a cero en ambos casos. Esto implica que el tiempo empleado en homogeneizar la mezcla de medida, unos tres segundos justo antes de comenzar a registrar el curso de la reacción, resulta suficiente para inhibir completamente la actividad enzimática de una muestra de AQf. Seguidamente quisimos comprobar si la inhibición de la actividad aspartato quinasa era un fenómeno reversible y, de serlo, cual era el curso temporal que seguía. Se realizaron ensayos de actividad en mezcla de medida sin treonina, disparados de nuevo por adición de una muestra de AQf preincubada o sin preincubar en treonina 10 mM. La treonina procedente de la muestra se diluye cien veces, quedando en un valor de 0.1 mM, en el cual no tiene ningún efecto sobre la actividad. Con ello queríamos ver si se detectaba algún retraso en la aparición de la pendiente de actividad máxima en el ensayo realizado a partir de la muestra preincubada con treonina 10 mM, respecto del de la muestra no preincubada. En ambos casos, el ensayo dio lugar a comportamientos completamente indistinguibles entre sí, dando lugar a resultados de actividad específica aproximadamente iguales. Esto implica que, de nuevo, el tiempo empleado en homogeneizar la mezcla tras la adición de la muestra de AQf, tres segundos aproximadamente, justo antes de comenzar a registrar la actividad, resulta suficiente para que se revierta completamente el fenómeno de inhibición por treonina. Esta reversión tiene lugar por pura dilución de esta hasta valores en los que no tiene efecto sobre la actividad. Estos resultados nos permiten afirmar que el proceso de inhibición se produce muy rápidamente tras la aparición de la treonina en la solución conteniendo la aspartato quinasa, siendo completamente reversible de igual manera por dilución de la treonina hasta valores de concentración iguales o inferiores a 0.1 mM, aproximadamente.

Una vez determinadas las características del curso temporal de la inhibición de la actividad aspartato quinasa por treonina y su capacidad de revertir, quisimos ver si el cambio conformacional que ocurre por adición de treonina seguía un curso temporal similar y si este fenómeno era igualmente reversible. Se partió de una muestra de AQf preincubada en treonina 10 mM, la cual se analizó en dos estudios sucesivos mediante cromatografía de exclusión realizados en presencia y ausencia de treonina 10 mM, añadida en el tampón de la cromatografía. Para asegurar que la



muestra original se encontraba en su conformación compacta, se partió del pico equivalente al de un pentámero obtenido en el experimento de cromatografía de una muestra de AQf en presencia de treonina 10 mM reseñado con anterioridad. La mezcla del conjunto de fracciones que englobaban este pico se dividió en dos, sometiéndose una mitad a una cromatografía de nuevo en presencia de treonina 10 mM y la otra a una cromatografía en ausencia de treonina. En este último caso, la dilución de la treonina ocurre muy rápidamente una vez cargada la muestra en la columna, por separación de la AQf y la propia treonina como moléculas de un tamaño muy distinto. Una vez ocurrida esta separación, el tiempo que transcurre hasta que se revierte el cambio conformacional depende del tiempo que la AQf pueda mantener unida la treonina y del tiempo que tarda en completarse la reversión del cambio conformacional una vez que la treonina se ha liberado. Cuanto más próximo sea el resultado obtenido al de la muestra original, mas tiempo habrá migrado el enzima en su conformación original durante el desarrollo de la cromatografía. Esto implicaría un proceso de reversión lento. Cuanto más próximo sea el resultado obtenido al de una muestra cromatografiada sin treonina, mas tiempo habrá migrado el enzima en su conformación relajada durante el desarrollo de la cromatografía. Esto implicaría que el cambio conformacional es reversible rápidamente.

Mientras que la muestra recromatografiada en presencia de treonina mostró el mismo comportamiento de la muestra original, de forma que la proteína cargada apareció mayoritariamente en forma de un pico único equivalente al de un pentámero, la muestra recromatografiada en ausencia de treonina mostró una reversión casi total del cambio conformacional, dando lugar a un pico mayoritario de un tamaño equivalente a 5.72 monómeros. Este resultado está próximo a la tasa de error admisible para la determinación del valor de hexámero en esta técnica, aunque en ninguno de los experimentos realizados se haya obtenido nunca una desviación frente al tamaño de hexámero superior a 0.15 monómeros. En cualquier caso, la poca diferencia entre el tamaño obtenido en este experimento respecto del obtenido para las muestras de AQf cromatografiadas en ausencia de treonina nos permite afirmar que el cambio conformacional que la AQf sufre en presencia de treonina es completamente reversible de forma rápida una vez que esta se diluye. De este modo, tanto la liberación de la treonina, una vez que su concentración se ha diluido en el medio, como la reversión completa del cambio conformacional deben ser procesos casi inmediatos.

A partir de los dos estudios llevados a cabo hemos podido estrechar la relación que existe entre los fenómenos de inhibición por treonina y de cambio conformacional. Ya no solo queda claro que ambos ocurren por la incubación de la aspartato quinasa en presencia de treonina, sino que además ambos fenómenos tienen un curso temporal similar, muy rápido y reversible de igual forma. Esto apoya la veracidad del modelo presentado para explicar el fenómeno de inhibición de la AQf

por treonina. Además, a tenor de los datos presentados, sobre todo para los experimentos de cromatografía de exclusión, en los que se demuestra la reversibilidad del cambio conformacional, resulta patente que este se debe probablemente a un cambio en la estructura terciaria del enzima, quedando a la espera de un análisis que permita afirmarlo de una forma definitiva (cristalografía en presencia y ausencia de treonina). La otra hipótesis propuesta para explicar este fenómeno, basada en la reorganización de todas las aspartato quinasa en forma de pentámeros por efecto de la treonina, queda prácticamente descartada a la luz de estos resultados.

Cambios como el descrito han sido extensivamente estudiados para una gran cantidad de proteínas estructurales y de gran tamaño. Sin embargo, también se han descrito cambios similares para varias proteínas de un tamaño similar a la aspartato quinasa, como enzimas o chaperonas (oxidorreductasa de xantina de leche de vaca, McManaman y Bain, 2002; chaperona SecB de *E. coli*, Dekker *et al.*, 2001; glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, Ahmad *et al.*, 2001; quinasa dependiente de GMP cíclico de aorta bovina, Chu *et al.*, 1997 y Chu *et al.*, 1998; gelsolina de plasma de cerdo, Doi *et al.*, 1990 y otros), en respuesta a muy diversos factores: procesos de oxidación-reducción, unión a sustratos, cofactores o inhibidores, fuerza iónica, autofosforilación, etc. En general se ha utilizado la cromatografía de exclusión como técnica fundamental junto con otras como las cromatografías de intercambio iónico e interacción hidrofóbica o el dicroísmo circular (Withka *et al.*, 1987; Francis *et al.*, 1998). Conviene señalar que, salvo en el caso de la chaperona de SecB, no se ha dado cuenta de ningún caso en el que se presente un cambio de la magnitud del que se describe para la aspartato quinasa, considerando que equivale al tamaño de una subunidad. A la luz estos datos así como de los resultados obtenidos, resulta interesante volver sobre el caso en el que se daba cuenta de un cambio conformacional similar para la aspartato quinasa sensible a treonina de *A. thaliana* (Paris *et al.*, 2002). Como ya se ha comentado, los autores interpretaban este cambio, estudiado mediante cromatografía de exclusión en una matriz igual a la empleada en esta Tesis, como producto de un cambio en la estructura cuaternaria conducente a una pérdida de subunidades. En ningún caso se hace mención de la aparición en la cromatografía de pico alguno que englobara los monómeros liberados de la estructura original u otro dato que no permita explicar los resultados del mismo modo que los obtenidos para la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*. Existe la posibilidad de que ambas proteínas respondan de maneras diferentes a la incubación en presencia de treonina. Sin embargo, si la falta de una reseña sobre la aparición de los monómeros liberados de la estructura significa que no se han podido encontrar, entonces la explicación propuesta para el comportamiento de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* sería mas ajustada a los resultados presentados para la aspartato quinasa sensible a treonina de *A. thaliana*. De

este modo, el modelo propuesto para la inhibición del enzima de *S. cerevisiae* por treonina podría hacerse extensivo al comportamiento de las aspartato quinasa de otros organismos.

## 5. EFECTO DE LA MUTACIÓN R2 SOBRE LA CAPACIDAD DE LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae* DE UNIRSE A TREONINA

Atendiendo al modelo propuesto para describir el proceso de inhibición, es predecible la existencia de tres tipos de mutantes insensibles a inhibición por treonina, que estarían afectados en los tres pasos del proceso. Por una parte, podrían existir mutantes con una capacidad reducida de unirse a treonina, que daría lugar a un incremento en la  $K_i$  por la treonina. En el caso extremo, la capacidad de unirse a treonina se podría llegar a perder completamente. Por otra parte podría ocurrir que el enzima sea capaz de unirse a treonina, pero incapaz total o parcialmente de llevar a cabo el cambio conformacional responsable de la inhibición. Por último, es teóricamente posible que existan situaciones en las que la aspartato quinasa mutante pueda unirse la treonina, dando lugar al cambio conformacional, pero que esto no redunde en la inhibición del enzima, al menos totalmente. Para poder asignar la AQf-R2 a alguno de estos grupos, era necesario realizar un estudio de su capacidad de unirse a treonina. Además, con ello queríamos apoyar la veracidad de la hipótesis propuesta para explicar el proceso, a través de la demostración de fenómenos predecibles a partir de ella.

En los estudios realizados mediante BN-PAGE en presencia y ausencia de treonina 10 mM, habíamos podido describir la estabilización de la AQf que se produce por su unión a treonina. El que la AQf-R2 no presentara un fenómeno de estabilización similar, además de ser completamente insensible a inhibición, parecía indicar que esta presentaba un defecto en su unión a treonina. La AQf-R2 presenta una mutación puntual por la que el residuo de glicina en la posición 452 es reemplazado por un residuo de aspártico. Esto supone el cambio de un residuo no polar por uno ácido. Este se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la molécula, dentro del segundo de los dominios ACT que se describen en ella (Figura clustall en introduccion), siendo uno de los residuos mas conservados entre las diferentes aspartato quinasa que se conocen. Esto apuntaba hacia la posibilidad de que este cambio hubiera alterado la capacidad de la AQf-R2 de unirse a treonina, reduciéndola drásticamente.

Se estudió la capacidad de la AQf-R2 para unirse a treonina, a través de la estabilidad que esta unión proporcionaba al enzima frente a inactivación térmica. Esta ya ha sido empleada con anterioridad de forma similar para el estudio de la unión de la aspartato quinasa de *S. mutans* a diferentes compuestos (McCarron y Chang, 1978). En nuestro caso, se estudió el comportamiento

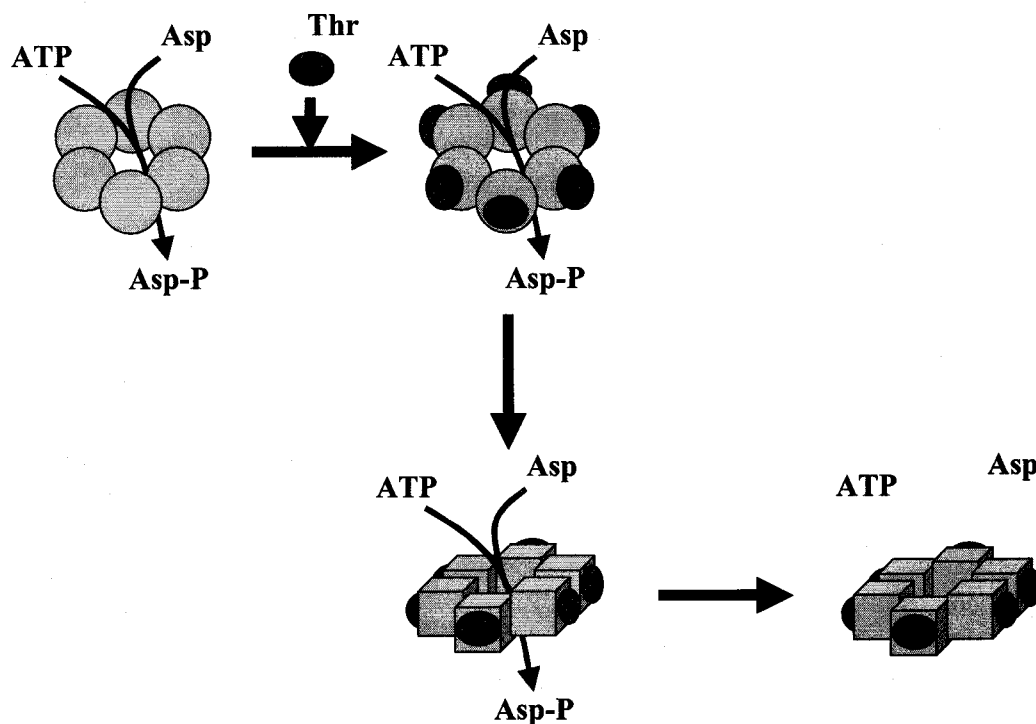
de la actividad de una muestra de AQf-R2, incubada a 55 °C en presencia y ausencia de treonina 10 mM. Este se comparó con el mismo experimento realizado con una muestra de AQf. En este segundo caso, la AQf mostró una fuerte estabilización por efecto de la adición de treonina. Mientras que la muestra incubada sin treonina perdía prácticamente toda su actividad tras cinco minutos a 55 °C, la muestra incubada con treonina no alcanzaba niveles similares de inactivación hasta después de media hora de incubación. A partir de los datos obtenidos pudo determinarse el tiempo de incubación apropiado (cinco minutos) para la realización de un análisis de la estabilización de la actividad de una muestra de AQf en función de la concentración de treonina en estas condiciones. Mediante este experimento pudo determinarse un valor para la constante de disociación ( $K_d$ ) de la treonina en estas condiciones que resultó igual a 1.82 mM, cercano a los 1.4 mM de la  $K_i$  que presenta la AQf para la treonina. En un experimento realizado en las mismas condiciones con una muestra de AQf-R2 fue completamente imposible detectar diferencias significativas en el comportamiento de las muestras procedentes de incubaciones en presencia y ausencia de treonina 10 mM. Tomando las condiciones seleccionadas para la AQf, se repitió para la AQf-R2 el análisis de la estabilización de la actividad en función de la concentración de treonina. De nuevo fue imposible detectar ningún efecto en un rango de concentraciones de treonina que iba desde 10 hasta 50 mM.

En base a los resultados obtenidos, la completa pérdida de afinidad por la treonina aparece como la explicación más probable de la incapacidad de la AQf-R2 para ser regulada por esta y dar lugar a un cambio conformacional como el observado para la AQf. Estos resultados prueban la predicción hecha respecto a la existencia de mutantes insensibles a inhibición producto de una mutación que reduce su afinidad por la treonina, hecha con anterioridad a partir de la hipótesis desarrollada para explicar el fenómeno de inhibición de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*. Además, apoya la existencia de una estabilización de la AQf por unión a treonina, ya comentada a raíz de los resultados obtenidos en los experimentos de BN-PAGE realizados con y sin treonina. Son necesarios nuevos estudios del resto de los mutantes R y S obtenidos en el laboratorio, para identificar las características del proceso de inhibición en cada uno de ellos. Entre todos, resulta particularmente interesante la aspartato quinasa producida en una cepa *fpr1*, *fpr1Δ* o en bacterias. Esta aspartato quinasa sería insensible a inhibición por treonina debido a la falta de una actividad como la de la chaperona Fkbp12, producto del gen *FPR1*. Su estudio estructural permitiría conocer datos sobre la modificación que introduce la chaperona en la estructura del enzima. El que sea solo parcialmente inhibible por treonina indica que retiene al menos parte de su afinidad por ella, pudiendo entonces ser un mutante de uno de los otros dos tipos predichos.

## 6. MODELO TEÓRICO DEL PROCESO DE INHIBICIÓN POR TREONINA DE LA ASPARTATO QUINASA DE *S. cerevisiae*

Los resultados obtenidos nos han permitido desarrollar un modelo hipotético que describe el proceso de inhibición de la AQ de *S. cerevisiae*. Además, hemos podido confirmar algunas de las predicciones que de él se deducen.

En este modelo (figura 4.1), la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* se comporta en solución como un hexámero. La aparición de la treonina en la solución y la unión de la AQ a ella da lugar a un cambio conformacional en la estructura del enzima. Este cambio se produce muy probablemente a nivel de la estructura terciaria de la proteína, sin afectar a su estructura cuaternaria y se traduce en la adopción de una conformación más compacta. Como resultado de este proceso, el enzima deja de ser activo.



**Figura 3.20. Modelo del proceso de inhibición por treonina de la aspartato quinasa de *S. cerevisiae*.** La unión de la aspartato quinasa a treonina es responsable del cambio conformacional que lleva a la inhibición de su actividad. Para simplificar la figura, se representa un proceso de inhibición en el que es necesaria una molécula de treonina por monómero. Sin embargo, este extremo no está aún determinado.

Como ya se ha comentado, resulta evidente que dicho proceso es teóricamente reversible por liberación de la treonina. Esta posibilidad se ha podido probar a través de varios experimentos

descritos en otros apartados de este capítulo. Además como ya se ha señalado con anterioridad, a partir de este modelo hay tres posibilidades predecibles para la obtención de mutantes insensibles a inhibición por treonina. De entre estas posibilidades, ha sido comprobada la existencia de al menos la primera de ellas, representada por la aspartato quinasa procedente de la expresión del alelo *HOM3-R2*, incapaz de unirse a la treonina.

Este modelo no es, sin embargo, un modelo cerrado, ya que quedan por determinarse aún distintos extremos del proceso. Aunque en la Figura 4.1 se presenta un modelo en el que la aspartato quinasa funciona como una unidad en cuanto a actividad, por el momento no se ha podido determinar si es así o si en la estructura cada monómero funciona por separado o de alguna otra forma. Del mismo modo, tampoco se ha podido determinar si el proceso de inhibición ocurre como una unidad o si cada monómero es inhibible por separado, tal y como se representa en la figura 4.1, o de algún otro modo. Son necesarios nuevos estudios para determinar cuales de estas posibilidades tienen lugar.

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Entre el alelo silvestre y el alelo mutante *HOM3-R2* se establece una relación genética de codominancia cuando coexisten dentro de la misma cepa. De este modo se pueden explicar los diferentes resultados publicados para otros alelos mutantes descritos.
2. La aspartato quinasa presenta en *S. cerevisiae* una estructura cuaternaria de hexámero.
3. El alelo mutante *HOM3-R2* da lugar a una aspartato quinasa que no puede distinguirse de la producida a través de un alelo silvestre en cuanto a su estructura cuaternaria.
4. En presencia de treonina, la aspartato quinasa de *S. cerevisiae* sufre un cambio a nivel de su estructura cuaternaria que tiene como resultado la adopción de una conformación más compacta en la cual el enzima es más estable. Este cambio conformacional se ha podido relacionar con la unión a treonina y la inhibición de la actividad del enzima, permitiendo el desarrollo de un modelo hipotético para explicar el proceso. En este modelo, la unión del enzima a treonina es responsable del cambio conformacional que se produce, siendo este responsable de la inhibición de la actividad.
5. La aspartato quinasa mutante se ha identificado como incapaz de unirse a treonina, siendo esta incapacidad la responsable del defecto que presenta en la regulación de su actividad.



## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, A., M. S. Akhtar, et al. (2001). "Monovalent cation-induced conformational change in glucose oxidase leading to stabilization of the enzyme." *Biochemistry* 40(7): 1945-55.
- Alarcón, C. M. and J. Heitman (1997). "FKBP12 physically and functionally interacts with aspartokinase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 17(10): 5968-75.
- Altenbuchner, J., M. Siemann-Herzberg, et al. (2001). "Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids." *Curr Opin Biotechnol* 12(6): 559-63.
- Anantharaman, V., E. V. Koonin, et al. (2001). "Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains." *J Mol Biol* 307(5): 1271-92.
- Angeles, T. S., P. A. Smanik, et al. (1989). "Aspartokinase-homoserine dehydrogenase I from *Escherichia coli*: pH and chemical modification studies of the kinase activity." *Biochemistry* 28(22): 8771-7.
- Angeles, T. S., P. A. Smanik, et al. (1989). "Aspartokinase-homoserine dehydrogenase I from *Escherichia coli*: pH and chemical modification studies of the kinase activity." *Biochemistry* 28(22): 8771-7.
- Aravind, L. and E. V. Koonin (1999). "Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches." *J Mol Biol* 287(5): 1023-40.
- Arévalo-Rodríguez, M. (1996). "Aislamiento y caracterización de mutaciones del gen HOM3 que alteran la regulación de la síntesis de treonina y metionina en *Saccharomyces cerevisiae*." Tesis doctoral.
- Arevalo-Rodriguez, M., I. L. Calderon, et al. (1999). "Mutations that cause threonine sensitivity identify catalytic and regulatory regions of the aspartate kinase of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 15(13): 1331-45.
- Azevedo, R. A., P. Arruda, et al. (1997). "The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants." *Phytochemistry* 46(3): 395-419.
- Azevedo, R. A., R. J. Smith, et al. (1992). "Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase." *Phytochemistry* 31: 3731.
- Bearer, C. F. and K. E. Neet (1978). "Threonine inhibition of the aspartokinase--homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli*. Threonine binding studies." *Biochemistry* 17(17): 3512-6.
- Belfaiza, J., A. Fazel, et al. (1984). "E. coli aspartokinase II-homoserine dehydrogenase II polypeptide chain has a triglobular structure." *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 16-20.
- Biswas, C., E. Gray, et al. (1970). "Multivalent feedback inhibition of aspartokinase in *Bacillus polymyxa*. 3. Purification and subunit structure of the enzyme." *J Biol Chem* 245(19): 4900-6.
- Blanco, J. and R. E. Viola (2002). "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartokinase III from *Escherichia coli*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58(Pt 2): 352-4.

Bondaryk, R. P. and H. Paulus (1985). "Cloning and structure of the gene for the subunits of aspartokinase II from *Bacillus subtilis*." *J Biol Chem* 260(1): 585-91.

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 Biochem* 72: 248-54.

Bresnick, E. H. and G. Felsenfeld (1994). "The leucine zipper is necessary for stabilizing a dimer of the helix-loop-helix transcription factor USF but not for maintenance of an elongated conformation." *J Biol Chem* 269(33): 21110-6.

Briley, P. A., L. Sibilli, et al. (1978). "The primary structure of *Escherichia coli* K12 aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I. Site of limited proteolytic cleavage by subtilisin." *J Biol Chem* 253(24): 8867-71.

Brogie, K. E. and M. Takahashi (1983). "Fluorescence studies of threonine-promoted conformational transitions in aspartokinase I using the substrate analogue 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate." *J Biol Chem* 258(21): 12940-6.

Bryan, P. A., R. D. Cawley, et al. (1970). "Isolation and characterization of a lysine-sensitive aspartokinase from a multicellular plant." *Biochem Biophys Res Commun* 41(5): 1211-7.

Casey, J. R., C. A. Pirraglia, et al. (1992). "Enzymatic deglycosylation of human Band 3, the anion transport protein of the erythrocyte membrane. Effect on protein structure and transport properties." *J Biol Chem* 267(17): 11940-8.

Chen, N. Y., S. Q. Jiang, et al. (1993). "Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase." *J Biol Chem* 268(13): 9448-65.

Chen, N. Y. and H. Paulus (1988). "Mechanism of expression of the overlapping genes of *Bacillus subtilis* aspartokinase II." *J Biol Chem* 263(19): 9526-32.

Chu, D. M., J. D. Corbin, et al. (1997). "Activation by cyclic GMP binding causes an apparent conformational change in cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 272(50): 31922-8.

Chu, D. M., S. H. Francis, et al. (1998). "Activation by autophosphorylation or cGMP binding produces a similar apparent conformational change in cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 273(23): 14649-56.

Cirillo, J. D., T. R. Weisbrod, et al. (1994). "Isolation and characterization of the aspartokinase and aspartate semialdehyde dehydrogenase operon from mycobacteria." *Mol Microbiol* 11(4): 629-39.

Clark, R. B. and J. W. Ogilvie (1972). "Aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli* K12. Subunit molecular weight and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate binding." *Biochemistry* 11(7): 1278-82.

Cohen, G. N. (1985). "Aspartate kinases I, II, and III from *Escherichia coli*." *Methods Enzymol* 113: 596-9.

Cohen, G. N. y. P., J.-C. (1963). "Some Aspects of the Regulation of Amino Acid Biosynthesis in a Branched Pathway." *CSH Symposia on Quantitative Biology* 28: 513.

Cole, S. T., R. Brosch, et al. (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." *Nature* 393(6685): 537-44.

Costrejean, J. M., N. Guiso, et al. (1975). "The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K12. Distribution and accessibility to antibodies of some epitopes of the bifunctional enzyme." *Eur J Biochem* 50(2): 431-5.

Costrejean, J. M. and P. Truffa-Bachi (1977). "Threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K12. Kinetic and spectroscopic effects upon binding of serine and threonine." *J Biol Chem* 252(15): 5332-6.

Crueger, W. and A. Crueger (1990). "Aminoacids." *Biotechnology. A textbook of industrial microbiology.* (Libro): 150-175.

Dautry-Varsat, A. and J. R. Garel (1978). "Refolding of a bifunctional enzyme and its monofunctional fragment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(12): 5979-82.

Dautry-Varsat, A. and J. R. Garel (1981). "Independent folding regions in aspartokinase-homoserine dehydrogenase." *Biochemistry* 20(5): 1396-401.

Dautry-Varsat, A., L. Sibilli-Weill, et al. (1977). "Subunit structure of the methionine-repressible aspartokinase II--homoserine dehydrogenase II from *Escherichia coli* K12." *Eur J Biochem* 76(1): 1-6.

Dekker, C., B. Agianian, et al. (2001). "Biophysical characterization of the influence of salt on tetrameric SecB." *Biophys J* 81(1): 455-62.

Delgado, M. A., J. Guerrero, et al. (1982). "Genetic and biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 2(7): 731-6.

Doi, Y., F. Kim, et al. (1990). "Weak binding of divalent cations to plasma gelsolin." *Biochemistry* 29(6): 1392-7.

Ehrlich, R. S. and M. Takahashi (1973). "Threonine-sensitive aspartokinase from *Escherichia coli*. Magnetic resonance and binding studies." *Biochemistry* 12(22): 4309-15.

Enei, H. and Y. Hirose (1984). "Recent Research on the Development of Microbial Strains for Amino Acid Production." *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (Libro) 2: 101-120.

Esaki, N., S. Nakamori, et al. (1996). "Enzymology of Amino Acid production." *Biotechnology* (Libro). 6. Products of primary metabolism.: 503-560.

Falcoz-Kelly, F., J. Janin, et al. (1972). "Revised structure of aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli* K12. Evidence for four identical subunits." *Eur J Biochem* 28(4): 507-19.

Falcoz-Kelly, F., R. van Rapenbusch, et al. (1969). "The methionine-repressible homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K 12. Preparation of the

homogeneous protein catalyzing the two activities. Molecular weight of the native enzyme and of its subunits." *Eur J Biochem* 8(1): 146-52.

Farfan, M. and I. L. Calderon (2000). "Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering." *Enzyme Microb Technol* 26(9-10): 763-770.

Farfán, M. J. (1997). "Ingeniería genética aplicada a la superproducción de treonina en *Saccharomyces cerevisiae*." Tesis doctoral.

Farfán, M. J., L. Aparicio, et al. (1999). "Threonine overproduction in yeast strains carrying the HOM3-R2 mutant allele under the control of different inducible promoters." *Appl Environ Microbiol* 65(1): 110-6.

Farfán, M. J., E. Martín-Rendón, et al. (1996). "Effect of Gene Amplification on Threonine Production by Yeast." *Biotechnology and Bioengineering* 49: 667-674.

Fazel, A., Y. Guillou, et al. (1983). "A hybrid proteolytic fragment of *Escherichia coli* aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I. Structure, inhibition pattern, dissociation properties, and generation of two homodimers." *J Biol Chem* 258(22): 13570-4.

Fazel, A., K. Muller, et al. (1983). "A triglobular model for the polypeptide chain of aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli*." *Biochemistry* 22(1): 158-65.

Fontan, E. and P. Truffa-Bachi (1978). "The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K12. Carboxymethylation of a unique cysteine induces a conformational change of the enzyme." *J Biol Chem* 253(8): 2758-62.

Fontan, E. and P. Truffa-Bachi (1978). "The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K12. Carboxymethylation of the enzyme: threonine binding and inhibition are functionally dissociable." *J Biol Chem* 253(8): 2754-7.

Francis, S. H., D. M. Chu, et al. (1998). "Ligand-induced conformational changes in cyclic nucleotide phosphodiesterases and cyclic nucleotide-dependent protein kinases." *Methods* 14(1): 81-92.

Fuller, M. F., I. Mennie, et al. (1979). "The amino acid supplementation of barley for the growing pig. 2. Optimal additions of lysine and threonine for growth." *Br J Nutr* 41(2): 333-40.

Funkhouser, J. D. and W. G. Smith (1974). "Monovalent cation effects on lysine-sensitive aspartokinase catalytic activity and allosteric regulation." *J Biol Chem* 249(23): 7580-3.

Garel, J. R. and A. Dautry-Varsat (1980). "Sequential folding of a bifunctional allosteric protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(6): 3379-83.

Garel, J. R., A. Martel, et al. (1984). "Role of subunit interactions in the self-assembly of oligomeric proteins." *Adv Biophys* 18: 91-113.

Graves, L. M. and R. L. Switzer (1990). "Aspartokinase III, a new isozyme in *Bacillus subtilis* 168." *J Bacteriol* 172(1): 218-23.

- Guiso, N. and P. Truffa-Bachi (1974). "Enzyme and enzyme fragments purification by specific immunoadsorbents. Application to structural studies of aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* 42(2): 401-4.
- Hakes, D. J. and J. E. Dixon (1992). "New vectors for high level expression of recombinant proteins in bacteria." *Anal Biochem* 202(2): 293-8.
- Harlow, E. and D. Lane (1988). *Antibodies. A laboratory manual*.
- Heck, H. d. A. and P. Truffa-Bachi (1970). "Circular dichroic and optical rotatory dispersion spectra of the threonine-inhibited aspartokinase-homoserine dehydrogenase of *Escherichia coli* K 12. Effects of ligand binding and protein denaturation." *Biochemistry* 9(14): 2776-83.
- Hernando-Rico, V., J. F. Martin, et al. (2001). "Structure of the ask-asd operon and formation of aspartokinase subunits in the cephamycin producer '*Amycolatopsis lactamdurans*'." *Microbiology* 147(Pt 6): 1547-55.
- Hinnebusch, A. G. (1988). "Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Rev* 52(2): 248-73.
- Hitchcock, M. H. and B. Hodgson (1976). "Lysine- and lysine-plus-threonine-inhibitable aspartokinases in *Bacillus brevis*." *Biochim Biophys Acta* 445(2): 350-63.
- Holmberg, S. and P. Schjerling (1996). "Cha4p of *Saccharomyces cerevisiae* activates transcription via serine/threonine response elements." *Genetics* 144(2): 467-78.
- Jacques, Y. and P. Truffa-Bachi (1976). "The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K-12. Incubation of the enzyme in alkaline conditions: dissociation and disulfide-bridge formation." *Eur J Biochem* 62(3): 485-90.
- Janin, J. (1972). "Relaxation studies on an allosteric enzyme: aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 36: 193-8.
- Janin, J. (1974). "Crystallization of *E. coli* aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I." *FEBS Lett* 45(1): 318-9.
- Jones, E. W. and G. R. Fink (1982). "Regulation of amino acids and nucleotide biosynthesis in yeast." *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression*, 2: 181-299.
- Jullien, M., S. Baudet, et al. (1988). "Allosteric transition of aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I studied by time-resolved fluorescence." *Biochimie* 70(12): 1807-14.
- Kalcheva, E. O., M. M. Faiziev, et al. (1994). "Regulation of two aspartokinase isozymes in *Streptococcus bovis*." *Can J Microbiol* 40(3): 224-7.
- Kalcheva, E. O., V. O. Shanskaya, et al. (1994). "Activities and regulation of the enzymes involved in the first and the third steps of the aspartate biosynthetic pathway in *Enterococcus faecium*." *Arch Microbiol* 161(4): 359-62.

Kalinowski, J., J. Cremer, et al. (1991). "Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*." *Mol Microbiol* 5(5): 1197-204.

Kawarabayasi, Y., Y. Hino, et al. (2001). "Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7." *DNA Res* 8(4): 123-40.

Keng, Y. F. and R. E. Viola (1996). "Specificity of aspartokinase III from *Escherichia coli* and an examination of important catalytic residues." *Arch Biochem Biophys* 335(1): 73-81.

Kikuchi, Y., H. Kojima, et al. (1999). "Mutational analysis of the feedback sites of lysine-sensitive aspartokinase of *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Lett* 173(1): 211-5.

Kobashi, N., M. Nishiyama, et al. (1999). "Aspartate kinase-independent lysine synthesis in an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*: lysine is synthesized via alpha-aminoadipic acid not via diaminopimelic acid." *J Bacteriol* 181(6): 1713-8.

Kobashi, N., M. Nishiyama, et al. (2001). "Characterization of aspartate kinase III of *Bacillus subtilis*." *Biosci Biotechnol Biochem* 65(6): 1391-4.

Kobs, G. (1997). "Cloning Blunt-End DNA Fragments Into the pGEM-T Vector Systems." *Promega Notes Magazine* 62: 15.

Kochhar, S., V. K. Kochhar, et al. (1998). "Subunit structure of lysine sensitive aspartate kinase from spinach leaves." *Biochem Mol Biol Int* 44(4): 795-806.

Leuchtenberger, W. (1996). "Aminoacids. Technical Production and Use." *Biotechnology* 6. Products of primary metabolism.: 465-502.

Mackall, J. C. and K. E. Neet (1973). "Variation of the size of the reacting form of *Escherichia coli* K12 threonine-sensitive aspartokinase-homoserine dehydrogenase with pH and effectors." *Biochemistry* 12(18): 3483-9.

Mackall, J. C. and K. E. Neet (1974). "Studies on the quaternary structure of the threonine-sensitive aspartokinase-homoserine dehydrogenase of *Escherichia coli*. A proposed subunit-interaction model." *Eur J Biochem* 42(1): 275-82.

Marshall, J. M., A. J. Brown, et al. (1994). "Conformational studies of human plasminogen and plasminogen fragments: evidence for a novel third conformation of plasminogen." *Biochemistry* 33(12): 3599-606.

Martin-Rendon, E., M. J. Farfan, et al. (1993). "Isolation of a mutant allele that deregulates the threonine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* 24(6): 465-71.

Maru, Y., D. E. Afar, et al. (1996). "The dimerization property of glutathione S-transferase partially reactivates Bcr-Abl lacking the oligomerization domain." *J Biol Chem* 271(26): 15353-7.

McCarron, R. M. and Y. F. Chang (1978). "Aspartokinase of *Streptococcus mutans*: purification, properties, and regulation." *J Bacteriol* 134(2): 483-91.

- McMahon, P. L. and M. Takahashi (1983). "Characterization of proteolysis fragments of aspartokinase I: homoserine dehydrogenase I. Fluorescence and circular dichroism studies." *J Biol Chem* 258(21): 12934-9.
- McManaman, J. L. and D. L. Bain (2002). "Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase." *J Biol Chem* 277(24): 21261-8.
- McTigue, M. A., D. R. Williams, et al. (1995). "Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel." *J Mol Biol* 246(1): 21-7.
- Mignery, G. A. and T. C. Sudhof (1990). "The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor." *Embo J* 9(12): 3893-8.
- Mitchell, D. A., T. K. Marshall, et al. (1993). "Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast." *Yeast* 9(7): 715-22.
- Moir, D. and H. Paulus (1977). "Properties and subunit structure of aspartokinase II from *Bacillus subtilis* VB217." *J Biol Chem* 252(13): 4648-51.
- Mountain, H. A., A. S. Bystrom, et al. (1991). "Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 7(8): 781-803.
- Muehlbauer, G. J., D. A. Somers, et al. (1994). "Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family." *Plant Physiol* 106(4): 1303-12.
- Muller, K. and J. R. Garel (1984). "Stepwise inactivation of *Escherichia coli* aspartokinase-homoserine dehydrogenase I." *Biochemistry* 23(4): 651-4.
- Muller, K. and J. R. Garel (1984). "Folding of aspartokinase-homoserine dehydrogenase I is dominated by tertiary interactions." *Biochemistry* 23(4): 655-60.
- Niederberger, P. (1989). "Amino Acid Production in Microbial Eukaryotes and Prokaryotes other than Coryneforms." *Society for General Microbiology Symposium* 44.: 1-23.
- Nishiyama, M., M. Kukimoto, et al. (1995). "An operon encoding aspartokinase and purine phosphoribosyltransferase in *Thermus flavus*." *Microbiology* 141 ( Pt 5): 1211-9.
- Ogilvie, J. W., L. P. Vickers, et al. (1975). "Aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli* K12 ( $\lambda$ ). Activation by monovalent cations and an analysis of the effect of the adenosine triphosphate-magnesium ion complex on this activation process." *J Biol Chem* 250(4): 1242-50.
- Omori, K. and S. Komatsubara (1993). "Role of serine 352 in the allosteric response of *Serratia marcescens* aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I analyzed by using site-directed mutagenesis." *J Bacteriol* 175(4): 959-65.
- Paris, S., C. Viemon, et al. (2002). "Mechanism of control of *Arabidopsis thaliana* aspartate kinase-homoserine dehydrogenase by threonine." *J Biol Chem*.



Paris, S., P. M. Wessel, et al. (2002). "Overproduction, purification, and characterization of recombinant bifunctional threonine-sensitive aspartate kinase-homoserine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*." *Protein Expr Purif* 24(1): 105-10.

Parsot, C. and G. N. Cohen (1988). "Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* hom gene coding for homoserine dehydrogenase. Structural and evolutionary relationships with *Escherichia coli* aspartokinases-homoserine dehydrogenases I and II." *J Biol Chem* 263(29): 14654-60.

Patte, J. C. (1996). "Biosynthesis of Threonine and Lysine." *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology (Libro)*. 528-541.

Pavagi, S., S. Kochhar, et al. (1995). "Purification and characterization of homoserine dehydrogenase from spinach leaves." *Biochem Mol Biol Int* 36(3): 649-58.

Ponting, C. P., S. K. Holland, et al. (1992). "The compact domain conformation of human Glu-plasminogen in solution." *Biochim Biophys Acta* 1159(2): 155-61.

Rafalski, J. A. and S. C. Falco (1988). "Structure of the yeast HOM3 gene which encodes aspartokinase." *J Biol Chem* 263(5): 2146-51.

Ramos, C. and I. L. Calderon (1992). "Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline." *Appl Environ Microbiol* 58(5): 1677-82.

Rao, S. S., S. Kochhar, et al. (1999). "Analysis of photocontrol of aspartate kinase in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings." *Biochem Mol Biol Int* 47(3): 347-60.

Richaud, C., J. P. Mazat, et al. (1973). "Subunit structure of aspartokinase 3 of *Escherichia coli* K12." *Eur J Biochem* 40(2): 619-29.

Schagger, H., W. A. Cramer, et al. (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." *Anal Biochem* 217(2): 220-30.

Schuller, D. J., G. A. Grant, et al. (1995). "The allosteric ligand site in the Vmax-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase." *Nat Struct Biol* 2(1): 69-76.

Seibold, M., K. Nill, et al. (1981). "Homoserine and threonine pools of borrelidin resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutants with an altered aspartokinase." *Arch Microbiol* 129(5): 368-70.

Serina, L., C. Blondin, et al. (1995). "*Escherichia coli* UMP-kinase, a member of the aspartokinase family, is a hexamer regulated by guanine nucleotides and UTP." *Biochemistry* 34(15): 5066-74.

Shailaja, M. S. and M. R. Raghavendra Rao (1976). "Methionine-repressible homoserine dehydrogenase of *Serratia marcescens*: purification and properties." *Mol Cell Biochem* 12(1): 15-22.

Shaul, O. and G. Galili (1992). "Threonine Overproduction in Transgenic Tobacco Plants Expressing a Mutant Desensitized Aspartate Kinase of *Escherichia coli*." *Plant Physiol* 100: 1157-1163.

- Shaul, O. and G. Galili (1993). "Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase." *Plant Mol Biol* 23(4): 759-68.
- Shiio, I. and R. Miyajima (1969). "Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*." *J Biochem (Tokyo)* 65(6): 849-59.
- Sibilli, L., G. Le Bras, et al. (1981). "Two regions of the bifunctional protein aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I are connected by a short hinge." *J Biol Chem* 256(20): 10228-30.
- Smith, D. B. and K. S. Johnson (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." *Gene* 67(1): 31-40.
- Sorell, L., J. A. Lopez, et al. (1998). "An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis." *FEBS Lett* 439(1-2): 46-50.
- Sritharan, V., P. R. Wheeler, et al. (1989). "Metabolism of aspartate in *Mycobacterium smegmatis*." *Eur J Biochem* 180(3): 587-93.
- Stadtman, E. R., G. N. Cohen, et al. (1961). "Feed-back Inhibition and Repression of Aspartokinase Activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 236(7): 2033-2038.
- Starnes, W. L., P. Munk, et al. (1972). "Threonine-sensitive aspartokinase-homoserine dehydrogenase complex, amino acid composition, molecular weight, and subunit composition of the complex." *Biochemistry* 11(5): 677-87.
- Subramanian, S. (1984). "Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes." *CRC Crit Rev Biochem* 16(2): 169-205.
- Sulser, H., J. DePizzol, et al. (1967). "A probable flavoring principle in vegetable-protein hydrolysates." *J. Food Science* 32: 611-615.
- Takahashi, M. and E. W. Westhead (1971). "Homoserine dehydrogenase-aspartokinase of *Escherichia coli*. Comparison of threonine saturation and enzyme conformation." *Biochemistry* 10(9): 1700-5.
- Theze, J. and I. Saint-Girons (1974). "Threonine locus of *Escherichia coli* K-12: genetic structure and evidence for an operon." *J Bacteriol* 118(3): 990-8.
- Tilak, A., K. Wright, et al. (1976). "Nuclear-magnetic-relaxation studies of the interaction of inhibitor with the threonine-sensitive aspartokinase of *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* 69(1): 249-55.
- Tomb, J. F., O. White, et al. (1997). "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*." *Nature* 388(6642): 539-47.
- Truffa-Bachi, P. (1973). "Microbial Aspartokinases." *Enzymes*, 3rd ed. 8: 509-553.
- Truffa-Bachi, P., R. Van Rapenbusch, et al. (1969). "The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K 12. Subunit structure of the protein catalyzing the two activities." *Eur J Biochem* 7(3): 401-7.

- Truffa-Bachi, P., M. Veron, et al. (1974). "Structure, function, and possible origin of a bifunctional allosteric enzyme, *Escherichia coli* aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I." *CRC Crit Rev Biochem* 2(3): 379-415.
- Vasak, M., C. Berger, et al. (1984). "Dynamic structure of metallothionein." *FEBS Lett* 168(1): 174-8.
- Vaucheret, H., L. Signon, et al. (1987). "Mechanism of renaturation of a large protein, aspartokinase-homoserine dehydrogenase." *Biochemistry* 26(10): 2785-90.
- Veron, M., F. Falcoz-Kelly, et al. (1972). "The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K12. The two catalytic activities are carried by two independent regions of the polypeptide chain." *Eur J Biochem* 28(4): 520-7.
- Veron, M., Y. Guillou, et al. (1985). "Reversible dissociation of aspartokinase I/homoserine dehydrogenase I from *Escherichia coli* K 12. The active species is the tetramer." *Eur J Biochem* 151(3): 521-4.
- Veron, M., J. C. Saari, et al. (1973). "The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K 12. Intra and intersubunit interactions between the catalytic regions of the bifunctional enzyme." *Eur J Biochem* 38(2): 325-35.
- Vickers, L. P., G. K. Ackers, et al. (1978). "Aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli* K12. Concentration-dependent dissociation to dimers in the presence of L-threonine." *J Biol Chem* 253(7): 2155-60.
- Von Dippe, P. J., A. Abraham, et al. (1972). "Kinetic and molecular properties of lysine-sensitive aspartokinase. Quaternary structure, catalytic activity, and feedback control." *J Biol Chem* 247(8): 2433-8.
- Wampler, D. E., M. Takahashi, et al. (1970). "Active subunits of the aspartokinase-homoserine dehydrogenase I complex from *Escherichia coli*." *Biochemistry* 9(21): 4210-6.
- Wedler, F. C. and B. W. Ley (1993). "Homoserine dehydrogenase-I (*Escherichia coli*): action of monovalent ions on catalysis and substrate association-dissociation." *Arch Biochem Biophys* 301(2): 416-23.
- Withka, J., P. Moncuse, et al. (1987). "Use of high-performance size-exclusion, ion-exchange, and hydrophobic interaction chromatography for the measurement of protein conformational change and stability." *J Chromatogr* 398: 175-202.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolución de la Junta de Gobierno

D. Pablo Nueva Lora de

Directora "Cooperación etnológica y musical de la Asperkte Quijano de saccherouyer" cátedra

2002 UNANIMADO SOBRESALIENTE CON LAJDE

El Vocal

3

El Vocal

2020

2003 El Vocal

Juan José  
EL PRESIDENTE

Millego

Planchuelo  
El Secretario

V. J. J. J.

Bejar  
El Secretario

J. J. J.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600106396