



Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

Desarrollo de métodos fluorescentes de medida de actividad quinasa de PknG de *Mycobacterium tuberculosis*, enzima clave en la infección por este patógeno

Joaquín Dalla Rizza Aishemberg

Orientador: Dr. Matías Möller

Laboratorio de Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

Gracias a Matías Möller, por todo lo que me enseñó durante este trabajo, por su buena disposición para planificar y discutir los experimentos realizados, y por la simpatía de todos los días.

Gracias a Ana Denicola, por permitirme realizar mi pasantía final en el Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, y por el apoyo brindado en todo el proceso.

Gracias a Magdalena Gil, por permitirme llevar a cabo este trabajo que originalmente formaba parte de su proyecto de posgrado, por acompañarme en mis primeros pasos en el laboratorio, y por toda la proteína que tan amablemente me donó para poder realizar los experimentos.

Quiero también agradecer a todos mis compañeros de los laboratorios de Fisicoquímica Biológica y Enzimología por estar a disposición para darme una mano en todo momento y por la buena onda en el día a día.

Por último, quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron durante la carrera, a mis amigos y compañeros de estudio, y a mi familia por todo el apoyo que me dieron en esta etapa.

Tabla de contenido

Resumen.....	4
I.- Introducción	5
1.1.- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.2.- Fosforilación en vías de señalización	6
1.3.- Quinasas de serinas y treoninas (STPKs).....	8
1.4.- Proteína quinasa G	9
1.5.- GarA Sustrato fisiológico de PknG.....	11
1.6.- Métodos para la medida de actividad quinasa	16
II.-Objetivos	18
Objetivo general:.....	18
Objetivos específicos:.....	18
III.- Materiales y métodos	19
3.1.- Transformación y expresión de GarA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
3.1.1.- Preparación de células quimiocompetentes.....	19
3.1.2.- Transformación de células quimiocompetentes con pET 28a e inducción de expresión	20
3.1.3.- Purificación de GarA.....	21
3.1.4.- Identificación por MALDI-TOF	22
3.2.- Ensayo de fosforilación por PknG	23
3.3.- Derivatización de proteínas	23
3.3.1.- Dansilación de lisozima	23
3.3.2.- Dansilación de GarA	25
3.3.3.- Derivatización de GarA con isotiocianato de fluoresceína	25
3.4.- Ensayo de fosforilación de GarA derivatizada por PknG.....	26
3.5.- Anisotropía de fluorescencia	26
3.6.- Espectro de excitación de anisotropía de fluorescencia.....	28
3.7.- Experimentos de unión a ANS.....	28
3.8.- Cursos temporales de fosforilación	28
IV.- Resultados y discusión	32
4.1.- Purificación de GarA.....	32
4.2.- Espectrometría de masa MALDI-TOF	35
4.3.- Dansilación de lisozima	36
4.4.- Derivatización de GarA.....	41

4.4.1.- Dansilación	41
4.4.2.- Derivatización con isotiocianato de fluoresceína	47
4.5.- Cinéticas con unión a ANS.....	48
4.6.- Ensayo acoplado	51
V.- Conclusiones	58
VI.- Perspectivas	59
VII.- Bibliografía	60

Resumen

Mycobacterium tuberculosis, el agente etiológico de la tuberculosis, constituye un grave problema de salud pública a escala mundial. La quinasa PknG de *M. tuberculosis* ha emergido como un posible blanco farmacológico ya que juega un rol crítico en la regulación del metabolismo del glutamato en dicho organismo. Se sabe además que PknG es secretada al interior del fagosoma del macrófago y estaría involucrada en la inhibición de la maduración del mismo siendo esencial para la supervivencia del bacilo dentro del macrófago. Sería muy útil contar con un método continuo de medida de actividad quinasa para PknG que permitiera tanto la caracterización cinética de la enzima como la evaluación de posibles inhibidores.

En el presente trabajo nos propusimos desarrollar métodos continuos de medida de actividad quinasa de PknG tomando ventaja del cambio estructural de su sustrato fisiológico, GarA, al fosforilarse. Para ello se marcó GarA con las sondas fluorescentes cloruro de dansilo y fluoresceína isotiocianato (ambas sensibles a la polaridad del entorno) esperando observar cambios espectrales en la emisión de fluorescencia ocasionados por el cambio conformacional de GarA. Además se realizaron experimentos de anisotropía de fluorescencia para observar cambios en el tiempo de correlación rotacional entre las especies fosforilada y desfosforilada. En otra aproximación, se utilizó 1,8-ANS en los ensayos de fosforilación de GarA por PknG, con el objetivo de evaluar si existe unión diferencial al ANS por parte de las conformaciones fosforilada y desfosforilada. Con ninguno de estos abordajes se pudieron observar cambios asociados con la cinética de fosforilación.

Por último, se midieron cursos temporales de fosforilación utilizando un ensayo enzimático acoplado que permite seguir la reacción por fluorescencia debido al consumo de NADH. Con este último abordaje se determinaron los parámetros cinéticos de PknG $K_m = 1.9 \times 10^{-6} \text{ M}$ y $k_{cat} = 1.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

I.- Introducción

La enfermedad tuberculosa o tuberculosis constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial, siendo superada solo por el VIH / SIDA como la principal causa de muerte en todo el mundo debido a un solo agente infeccioso ¹. Según la organización mundial de la salud tan solo en 2012 8,6 millones de personas contrajeron la enfermedad, incluyendo 1,1 millones de casos de personas infectadas con VIH, y 1,3 millones murieron por tuberculosis, de entre los cuales 320.000 habían sido diagnosticados VIH-positivos. En particular en Uruguay, según el informe epidemiológico del año 2013 de la Comisión honoraria para la lucha antituberculosa y enfermedades prevalentes (CHLA-EP), durante ese año se registraron un total de 852 casos de tuberculosis (25,1 casos por 100.000 habitantes). De ellos 785 fueron casos nuevos y 67 casos previamente tratados. Esto representa un aumento de 32 casos (3,9%) en relación al año 2012.

Esta enfermedad infecto-contagiosa es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, y se estima que actualmente un tercio de la población mundial es portadora de dicho patógeno (<http://www.tballiance.org/why/the-tb-pandemic.php>). Hoy día existen tratamientos con varios agentes anti-infecciosos que se clasifican en agentes de primera y segunda línea, en base a su efectividad y sus potenciales efectos adversos ². Sin embargo, inconvenientes como la larga duración del tratamiento (alrededor de 6 meses) ², la aparición de cepas multirresistentes y ultrarresistentes, y los casos de co-infección con VIH que complejizan el tratamiento ³, conducen a la necesidad del desarrollo de estrategias alternativas que sean más eficientes. Para esto es importante identificar nuevos blancos farmacológicos y encontrar nuevas drogas capaces de controlar y eliminar la infección.

1.1.- Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis, bacteria Gram positiva perteneciente al orden de los actinomicetos, es un parásito intracelular facultativo que infecta principalmente macrófagos alveolares, y cuya patogenicidad está directamente

relacionada con su capacidad de supervivencia en su célula huésped ⁴. Generalmente, los microorganismos que son endocitados por macrófagos, son degradados en el interior de estos últimos en el compartimiento intracelular denominado fagolisosoma, que se forma tras la fusión del fagosoma en el cual ingresa el microorganismo, con el lisosoma. El lisosoma contiene en su interior, entre otros componentes, una batería de enzimas hidrolíticas que son quienes se encargarán mayoritariamente de la eliminación del patógeno. No obstante, *M. tuberculosis* no pasa por este proceso, ya que interactúa con su hospedero inhibiendo la maduración del fagolisosoma, logrando así su supervivencia. Los mecanismos moleculares involucrados en esta estrategia de evasión no están esclarecidos aún ⁵.

1.2.- Fosforilación en vías de señalización

La fosforilación es una modificación post-traducciona l de proteínas frecuente, que sirve de herramienta tanto a organismos procariotas como eucariotas para la regulación de una gran variedad de procesos biológicos, y que tiene un rol principal en la señalización celular. Las enzimas que llevan a cabo las reacciones de fosforilación de proteínas se denominan proteínas quinasas. En eucariotas estas enzimas transfieren el fosfato γ de la molécula de ATP (o GDP) a los grupos alcohol de residuos específicos de las proteínas sustrato ⁶. En contraposición, existen enzimas encargadas de desfosforilar proteínas, denominadas fosfatasas. Por lo tanto, un atributo importante de la fosforilación de proteínas es su reversibilidad. Quinasas y fosfatasas permiten la interconversión entre configuraciones fosforiladas y desfosforiladas de sus proteínas sustrato, haciendo de esta modificación covalente un interruptor on/off bidireccional reutilizable (figura 1). ⁷

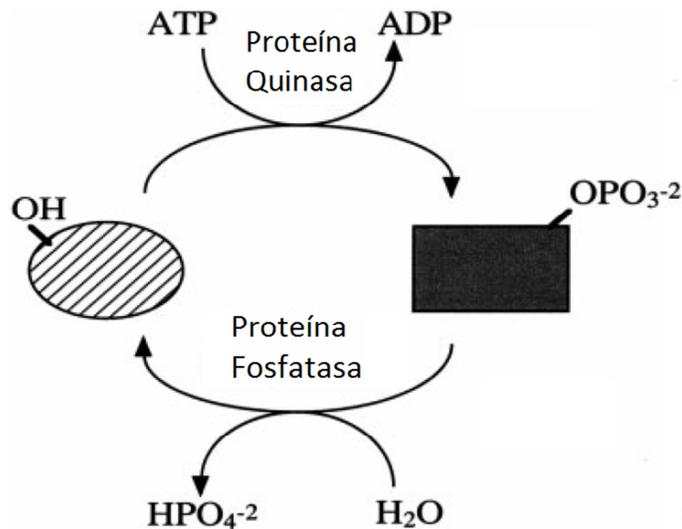


Figura 1. Esquema que representa la interconversión entre formas funcionalmente diferentes de proteínas por causa de la fosforilación y defosforilación. Extraído de ⁷.

En organismos procariotas, este mecanismo regulatorio es llevado a cabo principalmente por quinasas de histidina y sus correspondientes reguladores de respuesta, los cuales actúan conjuntamente en lo que se denominan sistemas de dos componentes ⁸. Sin embargo, la acumulación de secuencias de genomas bacterianos, y el uso de anticuerpos anti-fosfoproteínas evidenciaron la existencia de proteínas quinasas de serina y treonina (STPKs) (en principio atribuidas exclusivamente a eucariotas) en organismos procariotas ⁹. La función biológica que cumplen los distintos sistemas va a estar directamente relacionada a sus propiedades. Una diferencia destacable entre las respuestas por quinasas de histidina y STPKs es la estabilidad de sus productos de fosforilación. A pH neutro el fosfo-aspartato (el aspartato es uno de los residuos fosforilados por los sistemas de dos componentes) tiene una vida media de unas pocas horas, mientras que las fosfo-serinas y fosfo-treoninas pueden mantenerse estables por semanas. Por lo tanto mientras las respuestas por sistemas de dos componentes son de corta duración y su acción es finalizada por la hidrólisis espontánea del grupo fosfato, las respuestas por STPKs tendrían un efecto a largo plazo que requiere la presencia de fosfatasas para atenuar su efecto ¹⁰. En particular, se ha demostrado que las STPKs de *M. tuberculosis* actúan sobre proteínas

relacionadas en una gran variedad de procesos, incluyendo regulación transcripcional, metabolismo celular, biosíntesis de la pared celular, replicación celular, respuestas frente a estrés, y patogenicidad^{9; 11}.

1.3.- Quinasas de serinas y treoninas (STPKs)

Las STPKs pertenecen a la familia de las proteínas quinasas. El motivo estructural que identifica a las proteínas de ésta familia es su dominio catalítico ampliamente conservado en el cual de entre 12 subdominios se destacan dos: Una secuencia rica en glicinas cercanas a un residuo de lisina hacia el extremo N-terminal del dominio catalítico que interviene en la unión del nucleótido donador del grupo fosfato, y un subdominio en la región central del dominio catalítico que contiene un residuo de aspartato altamente conservado que es importante para la actividad enzimática de la quinasa^{6; 11}. Particularmente, las STPKs se caracterizan por contener en su estructura un bucle de activación fosforilable, que consiste en una secuencia de entre 15-33 aminoácidos que modula su actividad quinasa. El mismo bloquea el sitio activo de la enzima cuando se encuentra en estado desactivado, y al fosforilarse sufre un rearrreglo que estabiliza la conformación activa de la quinasa¹². Otra característica de las STPKs de bacterias es que en general presentan actividad autocatalítica¹⁰.

En el genoma de *M. tuberculosis* se identificaron once genes codificantes para STPKs nombrados alfabéticamente de *pknA* a *pknL*, exceptuando *pknM*, anotado previamente como gen de STPK, pero que no posee ninguna característica quinasa reconocible^{8; 9}.

Los genes que codifican para PknA y PknB se encuentran dentro de un operón que regula mecanismos relacionados a la pared celular, y sus funciones descritas hasta ahora tienen que ver con la división y la morfología celular^{9; 13}. Además PknB participaría en la regulación del metabolismo del glutamato junto a PknG¹⁴. PknD controlaría la expresión génica por fosforilación alternativa de reguladores del factor sigma¹³. Por último, se demostró que PknE se expresa en presencia de óxido nítrico, por lo que podría estar vinculada a la inhibición de la apoptosis del huésped en condiciones de infección¹³.

De las once STPKs identificadas en el genoma de *M. tuberculosis*, se propone que solo PknG y PknK tendrían localización citoplasmática, ya que el resto de las quinastas presentan un dominio transmembrana en su secuencia de aminoácidos ⁴.

1.4.- Proteína quinasa G

Si bien no han sido elucidados los mecanismos moleculares por los cuales *M. tuberculosis* inhibe la maduración fagolisosomal, Walburger y colaboradores demostraron que la proteína quinasa G (PknG) cumple un rol protagónico en este proceso, siendo necesaria su actividad quinasa para modular la fusión entre fagosoma y lisosoma ⁴. Su implicancia en la supervivencia en el hospedero, hace de esta proteína quinasa un blanco atractivo para el diseño de drogas para el tratamiento de la enfermedad tuberculosa.

PknG es una proteína con una masa molecular de 81,577 Da, que presenta tres dominios estructurales distintos: un dominio rubredoxina (Rbdx), el dominio quinasa, y un dominio tetratricopéptido (TPR) ¹⁵ (figura 2). El dominio rubredoxina se encuentra hacia el extremo N-terminal de la quinasa. Este dominio se caracteriza por la presencia de dos pares de cisteínas con la capacidad de coordinar una molécula de hierro, y que podría participar en reacciones con transferencia de electrones. Estas características sugieren que podría funcionar como un sensor del entorno redox de PknG que module su actividad en función del mismo ¹⁴. De hecho, está demostrado que PknG presenta mayor actividad en un entorno oxidante, respecto a la actividad observada en un ambiente reductor ¹⁶. Además ha sido demostrado que la actividad de PknG puede ser modulada por este dominio a través de un mecanismo novedoso, en el cual las cisteínas del dominio Rbdx actúan como nucleófilos frente a ácido oleico nitrado, inhibiendo luego la actividad quinasa de PknG ¹⁷. Hacia el extremo C-terminal, se encuentra el dominio TPR, que es el responsable de la dimerización en la estructura cristalográfica resuelta por Scherr y colaboradores. Este tipo de motivo interviene generalmente en interacciones proteína-proteína ¹⁸, y su presencia en la estructura de PknG está relacionada a su dimerización *in vivo* ¹⁹. Por último, el dominio quinasa se

encuentra entre los dominios TPR y Rbdx. Tanto el dominio TPR, como el dominio Rbdx son imprescindibles para que la quinasa presente su actividad catalítica característica ¹⁶.

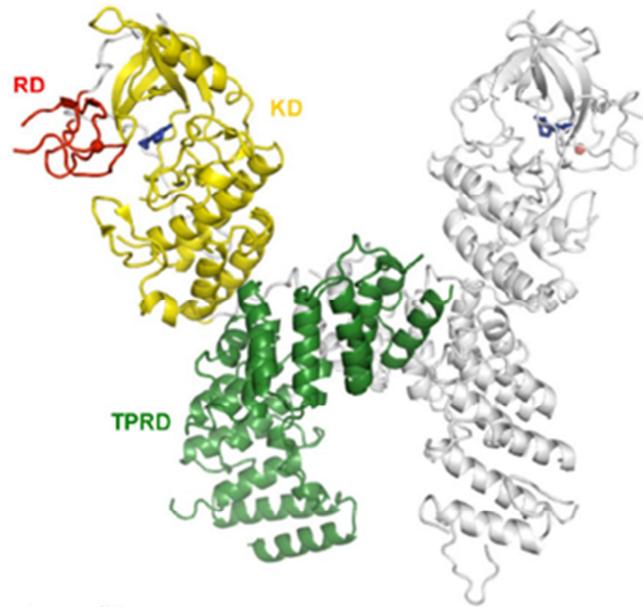


Figura 2. Estructura de PknG en forma de dímero dilucidada por cristalografía de rayos X. En rojo se observa el dominio rubredoxina, en amarillo el dominio quinasa, y en verde el dominio tetratricopéptido. Extraído de ¹⁵.

Como se mencionó anteriormente, en las quinasas de serina y treonina es común encontrar un bucle de activación que presenta sitios fosforilables que modula la actividad quinasa ¹⁴. En particular PknG no presenta sitios de fosforilación en su bucle de activación ¹⁵, y sin embargo tiene actividad autocatalítica pudiendo fosforilar hasta cuatro residuos de su región N-terminal ¹⁴, que no es esencial para su actividad, pero sí multiplica la velocidad de fosforilación aproximadamente unas cinco veces cuando se encuentra fosforilada ¹⁴. O'Hare y colaboradores evidenciaron que la fosforilación del extremo N-terminal es importante para el reclutamiento de uno de sus sustratos fisiológicos y para la estabilización del complejo enzima sustrato ¹⁴, mecanismo que previamente se había observado en la quinasa PknB ²⁰.

Además de su rol en la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro del macrófago, se reportaron otras funciones de PknG. Wolff y colaboradores vincularon la expresión de PknG a la resistencia a antibióticos que presenta el patógeno en condiciones de infección ²¹, mientras que O'Hare y colaboradores evidenciaron su rol en la regulación del metabolismo del glutamato a través de la fosforilación de la proteína GarA ¹⁴ (de sus siglas en inglés por *Glycogen Accumulation Regulator*) (Rv1827). GarA actúa en lo que sería un punto de control del metabolismo del glutamato modulando las actividades de las enzimas α -cetoglutarato decarboxilasa (KGD), glutamato deshidrogenasa (GDH), y glutamato sintasa (GS) ^{14; 22}.

Un método sencillo y eficiente para medir la actividad quinasa de PknG de manera continua en el tiempo, serviría como herramienta para profundizar en la caracterización de esta enzima, y para la evaluación "high-throughput" de posibles drogas inhibitorias. Para desarrollar dicho método, en este trabajo se buscó tomar ventaja del efecto que tiene la fosforilación de GarA por PknG en sus propiedades fisicoquímicas (que se desarrollará más adelante en el texto).

1.5.- GarA Sustrato fisiológico de PknG

La proteína GarA de *M. tuberculosis* está compuesta por 162 aminoácidos, y básicamente consta de un dominio FHA (por sus siglas en inglés por *Forkhead-associated*) hacia su extremo C-terminal, y de una estructura lineal hacia el extremo N-terminal de 43 aminoácidos con forma de brazo extendido que presenta una gran movilidad ²⁰. Los dominios FHA tienen aproximadamente entre 80-120 aminoácidos y presentan en su estructura un plegamiento característico con 11 hojas beta en forma de sándwich ²³. Estos dominios tienen la capacidad de reconocer y unir motivos peptídicos que presentan al menos una treonina fosforilada con gran especificidad, por lo que son módulos que participan en interacciones proteína-proteína ²⁴.

Una gran cantidad de organismos pertenecientes al orden de los actinomicetos presentan en su genoma el gen ortólogo de *garA*, compartiendo más de un 70% de identidad aminoacídica en sus productos de expresión. Por

alineamiento de múltiples secuencias se constató una alta conservación en la región que corresponde al dominio FHA, así también como la conservación de una secuencia de aminoácidos en la región N-terminal ²⁰. Esta proteína conservada en los actinomicetos está totalmente ausente en los organismos eucariotas ²⁴.

A través de un abordaje proteómico, en el año 2005 Villarino y colaboradores ²⁰ identificaron a GarA como sustrato *in vivo* de PknB, demostrando que la misma es fosforilada en la treonina 22 de su brazo móvil del extremo N-terminal. Además, evidenciaron que es necesario que la quinasa se encuentre fosforilada en las treoninas 171 y 173 en su bucle de activación para la formación de un complejo estable entre enzima y sustrato. Estas observaciones los llevaron a concluir que el dominio FHA interactúa con el bucle de activación de la quinasa a través de sus fosfotreoninas como se muestra en la figura 3.

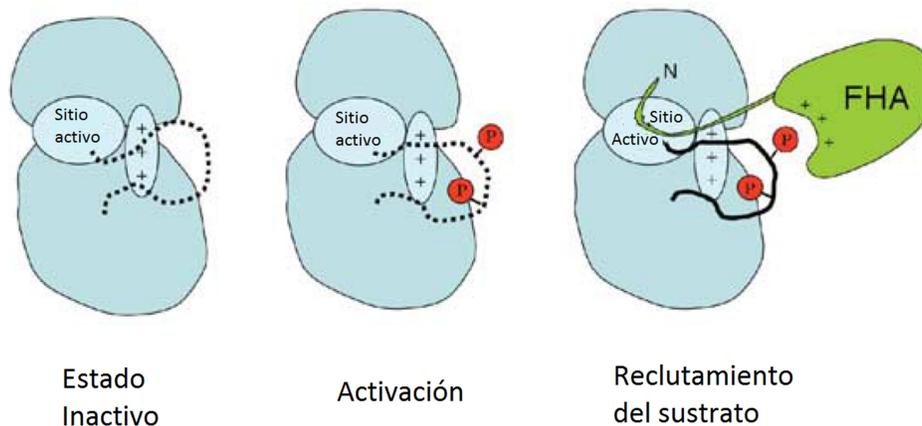


Figura 3. Activación de PknB (representada en color celeste) por fosforilación en su bucle de activación. Esta modificación permite el reclutamiento de GarA (representada en verde) a través de su dominio FHA. Extraído de ²⁴.

Posteriormente, O'Hare y colaboradores identificaron a GarA como sustrato de PknG ¹⁴. En ese trabajo, se propusieron evaluar si esta quinasa tiene o no acción biológica sobre GarA, ya que la proteína quinasa G de *Corynebacterium glutamicum* (que comparte un 45% de la identidad proteica con PknG de *M. tuberculosis*) participa en la regulación del metabolismo del

glutamato en dicho organismo a través de la fosforilación de la proteína ortóloga a GarA, Odhl. Con los resultados de este trabajo demostraron que PknG fosforila a GarA en la treonina 21, aminoácido adyacente al sitio de fosforilación por acción de PknB (treonina 22), y que la fosforilación del sustrato por una u otra quinasa son eventos mutuamente excluyentes. Por lo tanto reportan por primera vez un sustrato *in vivo* de PknG. Más resultados presentados en esta publicación, sumados a posteriores trabajos de otros grupos^{12; 22}, sirvieron para comenzar a esclarecer el rol de PknG y PknB en la regulación del metabolismo del glutamato en *M. tuberculosis* a través de la fosforilación de GarA.

GarA actúa modulando las actividades de tres enzimas relacionadas al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) que tienen como sustrato al α -cetoglutarato, metabolito precursor en la síntesis de glutamato. Estas enzimas son la α -cetoglutarato decarboxilasa (KGD), la glutamato deshidrogenasa dependiente de dinucleótido de nicotinamida y adenina (GDH), y la subunidad alfa de la glutamato sintasa (GS). En la figura 4 se muestra un esquema del modo de acción de PknG a través de GarA propuesto por Nott²².

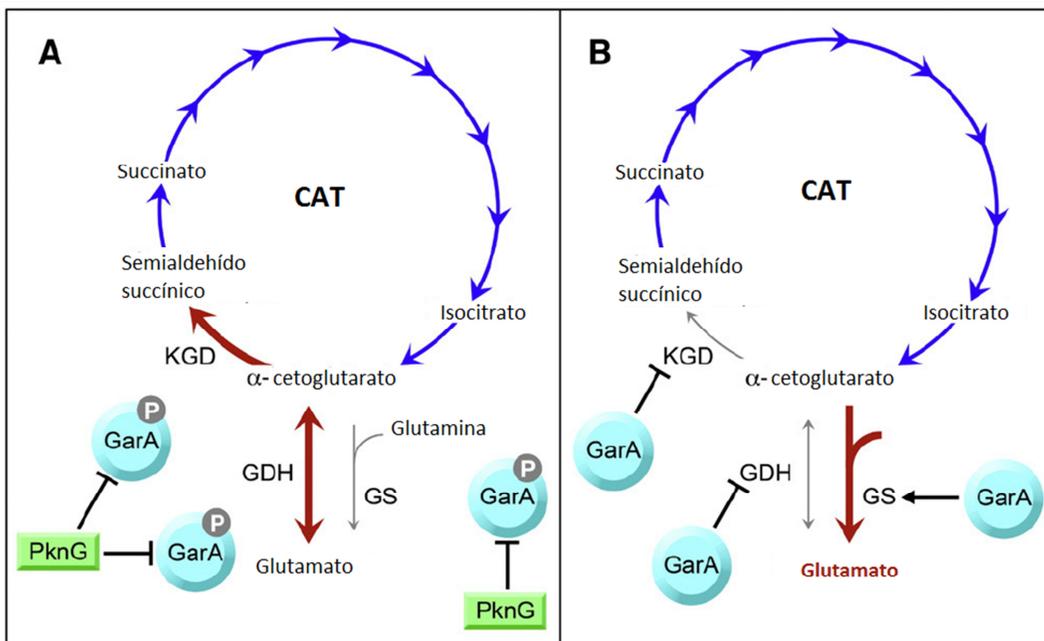


Figura 4. Mecanismo por el cual PknG regula el metabolismo del glutamato. La acción de GarA es inhibida por la fosforilación con PknG (A). En su forma desfosforilada, GarA modula las actividades de las enzimas KGD, GDH y GS (B). CAT; ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Extraído de¹⁹.

GarA funciona como inhibidor de las enzimas GDH y KGD, mientras que es un activador de la GS, favoreciendo así la síntesis de glutamato (figura 4B). La acción de PknG (o PknB) sobre GarA resulta en la inhibición de la síntesis de glutamato, por lo que GarA funcionaría como un interruptor en el metabolismo de la bacteria.

England y colaboradores ²⁴ estudiaron el efecto que tiene la fosforilación de GarA sobre sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, y observaron que tanto la fosforilación de la treonina 21 por PknG, como la de la treonina 22 por PknB inducen un autoreconocimiento de la fosfotreonina por parte del dominio FHA de GarA, lo cual implica que el brazo N-terminal que en principio presenta una gran movilidad, se pliegue sobre el FHA pasando así a tener un movimiento más restringido debido a las nuevas interacciones intramoleculares que se establecen (figura 5).

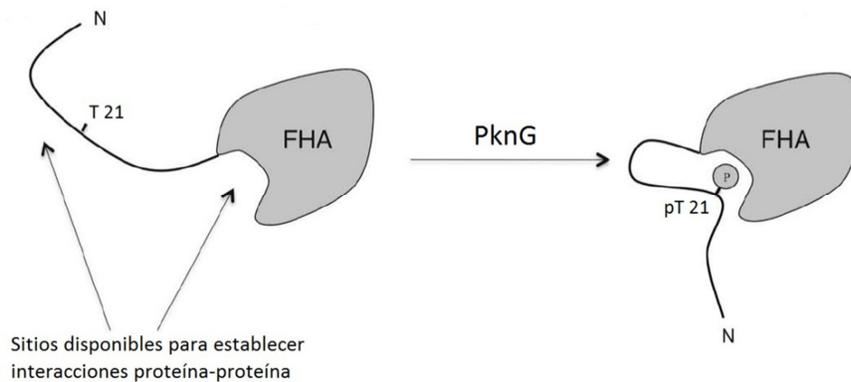


Figura 5. Modelo propuesto por England et al. GarA funciona como un interruptor que en su configuración desfosforilada puede interactuar con las enzimas que modula, mientras que la acción de PknG o PknB induce un cambio estructural que bloquea los sitios de interacción. Figura extraída de ²⁴.

Este cambio en su estructura conlleva a que cuando GarA se encuentra fosforilada tenga una mayor estabilidad térmica, y se dé una reducción en su volumen hidrodinámico, que pasa de 2.6 nm a 2.2 nm (figura 6). Con estos resultados proponen que en su configuración desfosforilada GarA puede ejercer su actividad como regulador metabólico, mientras que su fosforilación

bloquea su capacidad de interactuar con otras proteínas, inhibiendo así su acción moduladora.

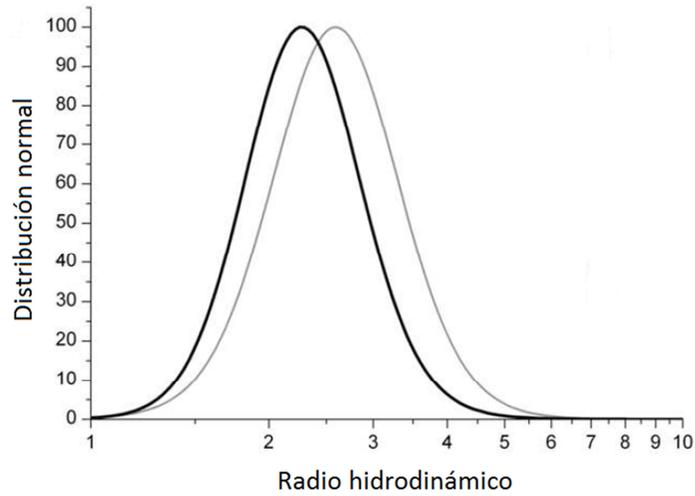


Figura 6. Resultado de experimento de dispersión de luz dinámica de GarA (línea gris) y GarA fosforilada (línea negra) realizado por England et al. Se observa que la fosforilación de la proteína tiene como consecuencia una disminución de su radio hidrodinámico. Para determinar el radio se considera que GarA tiene forma esférica. Extraído de ²⁴.

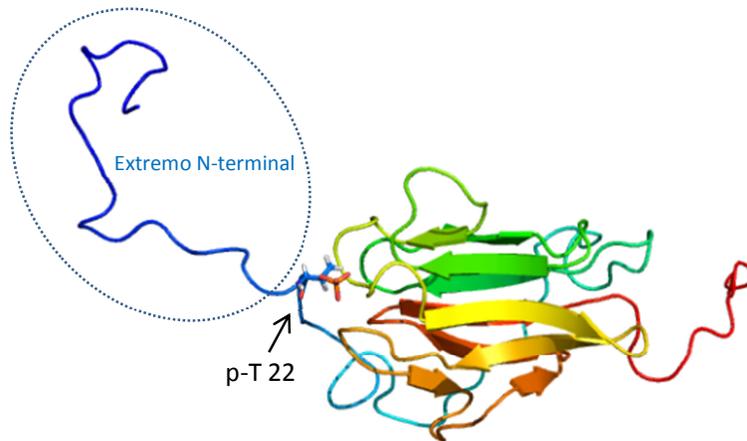


Figura 7. Representación en cintas de la estructura resuelta por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de GarA fosforilada. Se destaca en la estructura la fosfotreonina 22 interactuando con el dominio FHA. Extraído de ²².

Posteriormente, estas hipótesis fueron confirmadas por Nott y colaboradores ²² quienes resolvieron la estructura de GarA fosforilada en la treonina 22 por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (figura 7), donde se observa

claramente la unión de la fosfotreonina al dominio FHA. El brazo N-terminal es muy móvil, y su estructura no puede resolverse por RMN.

1.6.- Métodos para la medida de actividad quinasa

Debido a su rol en la regulación de una gran variedad de procesos celulares, las proteínas quinasas se han convertido en uno de los blancos principales para el diseño de nuevas drogas terapéuticas ²⁵. En los últimos años se han desarrollado distintas estrategias para medir cuantitativamente la fosforilación de proteínas por parte de enzimas quinasas. El ensayo tradicional fue desarrollado en la década del 70 ²⁶ y se basa en el uso de ATP radiactivo marcado en el fosfato γ con fósforo 32 (³²P). Si bien este método es práctico y resulta muy sensible, trabajar con sustancias radiactivas es una desventaja debido a todas las precauciones que se deben tener en cuenta al trabajar con radioisótopos. Por esta misma razón se han desarrollado una gran cantidad de métodos alternativos, la mayoría de ellos basados en el uso de fluorescencia como herramienta de medida. Por supuesto que cada metodología presenta ventajas y desventajas. Las principales desventajas de los métodos fluorimétricos existentes son: la utilización de anticuerpos específicos que pueden estar o no disponibles para los sustratos utilizados, la restricción del tamaño del péptido utilizado como sustrato, o la gran sensibilidad hacia compuestos que interfieren en la señal detectada ²⁵. Además todos los protocolos de estas técnicas determinan la velocidad inicial de reacción en medidas a punto único en el tiempo. Esto es una desventaja en comparación a los ensayos de medida continua. La cinética típica de reacciones catalizadas presenta una relación lineal de la aparición de producto (o desaparición de sustrato) en el tiempo a partir de la cual se determina la velocidad inicial de reacción, dándose posteriormente una desaceleración debida a que la desaparición de sustrato limita la reacción. En medidas de punto único se corre el riesgo de determinar la velocidad a partir de un punto que se encuentra por fuera de la linealidad. Por otra parte, la posibilidad de seguir la reacción en el tiempo permite saber si se dan comportamientos anormales, o saber si existe

algún tipo de interferencia en la señal detectada, permitiendo así un análisis más completo, que lleva a una mejor caracterización de la enzima evaluada²⁷. En este trabajo se propone desarrollar un método de medida de actividad quinasa continuo en el tiempo, a partir del cual se logre caracterizar cinéticamente a la proteína quinasa G de *M. tuberculosis*.

La primer estrategia propuesta para esto fue seguir la reacción de fosforilación de GarA por cambios en la fluorescencia del sustrato (GarA) relativo al producto (GarA fosforilada). La secuencia aminoacídica de GarA no presenta residuos de triptófano por lo que para abordar nuestros objetivos fue necesario derivatizar esta proteína utilizando fluoróforos exógenos. Se seleccionaron sondas fluorescentes muy sensibles a la polaridad del entorno, de manera de asociar la fosforilación de GarA con cambios espectrales de fluorescencia. Como segunda aproximación se evaluó si tras la fosforilación, GarA puede unir 1,8 ANS de forma diferente a la proteína sin fosforilar. Por último se realizó un ensayo enzimático acoplado en el que la formación de ADP como producto de la reacción de fosforilación se acopla a la oxidación de NADH por parte de una deshidrogenasa, permitiendo seguir los cursos temporales por fluorescencia.

II.-Objetivos

Objetivo general:

- Desarrollar un método continuo para medir la actividad quinasa de PknG, y determinar sus parámetros cinéticos.

Objetivos específicos:

- Estudiar cambios en la fluorescencia de GarA derivatizada con sondas fluorescentes con la fosforilación.
- Estudiar cambios en la anisotropía de fluorescencia de GarA con la fosforilación.
- Evaluar la unión de ANS a las conformaciones fosforilada y desfosforilada de GarA y su uso para seguir la actividad quinasa de PknG.
- Medir cursos temporales de fosforilación utilizando un ensayo enzimático acoplado.

III.- Materiales y métodos

3.1.- Transformación y expresión de GarA de *Mycobacterium tuberculosis*

El objetivo de esta etapa es expresar y purificar la proteína GarA de *Mycobacterium tuberculosis*. GarA es fosforilada *in vivo* por PknG y será utilizada como sustrato para los ensayos de actividad enzimática de esta última.

Debido al rol en la regulación del CAT de GarA, su sobreexpresión puede resultar tóxica para las bacterias, por lo cual el sistema de expresión utilizado fue la cepa de *E. coli* BL21-AI. Esta cepa bacteriana contiene una inserción cromosómica del gen que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control del operón *araBAD*, el cual puede ser regulado tanto de manera positiva (con L-arabinosa) como negativa (con glucosa). De esta manera se aumenta la rigurosidad de la represión del nivel basal de expresión cultivando las bacterias en un medio que contenga glucosa, induciendo la expresión en el momento deseado agregando L-arabinosa al medio de cultivo.

GarA se expresa como proteína de fusión a cola de seis histidinas, lo que permite su purificación por cromatografía de afinidad por metales (IMAC) en gradiente lineal de imidazol.

3.1.1.- Preparación de células quimiocompetentes

Se tomó con ansa una colonia de *E. coli* BL21-AI aislada en LB agar con tetraciclina 5 mg/mL, y se inoculó en un matraz con 50 mL de LB con tetraciclina 5 mg/mL. Se dejó incubando a 37 °C con agitación hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,4. El contenido del matraz se centrifugó durante 20 minutos a 5000 g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 25 mL de cloruro de calcio ($CaCl_2$) 50 mM. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones al paso previo y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el pellet en 20 mL de $CaCl_2$ y se centrifugó una vez más, resuspendiendo el pellet en 2 mL de $CaCl_2$. Las células se conservan a -80 °C.

3.1.2.- Transformación de células quimiocompetentes con pET 28a e inducción de expresión

La transformación se llevó a cabo mezclando 180 μ L de células BL21-AI quimiocompetentes con 2 μ L de plásmido pET 28a conteniendo el gen de GarA y su cola de seis histidinas. La mezcla se dejó 30 minutos en hielo e inmediatamente se colocó en un baño a 42 °C durante 1 minuto. Luego se agregó 800 μ L de LB y se puso a incubar durante 2 horas a 37 °C con agitación a 180 rpm.

A continuación se inoculó 1 mL de cultivo del paso anterior en medio LB conteniendo el antibiótico kanamicina 50 μ g/mL (el plásmido pET 28a le confiere resistencia a este antibiótico a las bacterias transformadas), tetraciclina 10 mg/mL y glucosa 1 g/L. Se dejó incubando toda la noche a 37 °C con agitación a 180 rpm. Al día siguiente se inocularon 10 mL del precultivo del paso anterior en dos matraces con 1,5 litros de LB cada uno, conteniendo kanamicina, tetraciclina y glucosa a las mismas concentraciones finales que el medio anterior. Estos cultivos se mantuvieron a 37 °C agitando a 220 rpm hasta llegar a $DO_{600} = 0,8-0,9$. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se indujo la expresión agregando L-arabinosa a concentración final 0,2% e IPTG a concentración final 1 mM. Los cultivos quedaron toda la noche a 20 °C agitándose a 180 rpm.

Al día siguiente se centrifugaron ambos cultivos a 5500 g a 4 °C durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los pellets con PBS pH= 7,3. Se obtuvieron 6,6 g y 8,9 g de pellet húmedo que se conservaron a -80 °C.

Dichos pellets (obtenidos luego de la inducción de la expresión y su posterior centrifugación) se descongelaron a 37 °C, fueron resuspendidos en el buffer IMAC (A) (NaH_2PO_4 50 mM; NaCl 0,5 M; imidazol 25 mM; glicerol 5%, pH 7,6), en una relación de 4 mL de buffer por gramo de pellet, y se agregó RNAsa a concentración final 10 μ g/mL, DNAsa a concentración final 10 μ g/mL, inhibidor de proteasas Roche y lisozima a concentración final 1 mg/mL.

Las células se lisaron por sonicación en ciclos ON = 30 segundos, OFF = 60

segundos con microtip a una amplitud del 40% en un sonicador OMNI Sonic Ruptor 250 hasta ver cambios en la consistencia indicando que se lisaron las células, y luego se centrifugó el lisado a 22000 g durante 1 hora. Se conservó el sobrenadante y se filtró con filtros de 0,22 μm .

3.1.3.- Purificación de GarA

Para comenzar con la purificación se realizó la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) con una resina de níquel, reteniendo a GarA en dos columnas Histrapp FF (GE) de 1 mL conectadas en serie, y luego eluyéndola en un gradiente lineal de imidazol, hasta una concentración final de imidazol de 400 mM. Para esto, primero se equilibró la columna con 10 volúmenes de buffer IMAC (A) utilizando una bomba peristáltica con un flujo de 1 mL/min. Una vez equilibrada, se cargó la columna pasando el lisado centrifugado y filtrado con bomba peristáltica a flujo 1mL/min en cámara fría, a 4 °C. La elución se colectó y se volvió a pasar por la columna. Luego se lavó con 20 volúmenes de columna con IMAC (A) y se conservó el eluido.

El gradiente de imidazol se llevó a cabo utilizando un HPLC, a un flujo de 0,5 mL/min en un gradiente lineal de 0% a 100% de buffer IMAC (B) (NaH_2PO_4 50 mM; NaCl 0,5 M; imidazol 400 mM; glicerol 5%, pH 7,6) en 80 minutos colectando fracciones de a 1 mL. El seguimiento de la cromatografía se hizo por detección de absorbancia a 280 nm. A partir del cromatograma obtenido se seleccionaron las fracciones ricas en proteína y se analizaron por electroforesis en gel desnaturizante en condiciones reductoras de poliacrilamida 15%, de manera de identificar fracciones que presenten bandas con el peso molecular correspondiente a GarA. Estas fracciones se juntaron en una membrana de diálisis con corte de 5 kDa, se agregó proteasa TEV (de sus siglas en inglés tobacco etch virus) a concentración final 1 mg/mL y ditiotreitól (DTT) a concentración final 1 mM y se dejó dializando toda la noche contra Tris 25 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5% y DTT 1 mM pH 7,6. En este paso, la proteasa TEV actúa sobre la proteína recombinante, escindiendo las colas de histidina, ya que las mismas presentan un sitio de corte para TEV a continuación de la cola de histidina.

El siguiente paso fue recuperar el dializado, y deshacerse de las colas de histidina y de la proteasa TEV. Para esto se pasó la muestra post-dializado por una columna de 2 mL de resina Ni-NTA agarosa, donde tanto las colas de histidina como la proteasa TEV quedaron retenidas (la proteasa TEV también tiene cola de histidinas). Por lo tanto, en este paso de purificación la proteína GarA sale en el eluido. Luego de esto se cuantificó proteínas por el método de Bradford y posteriormente se concentró la muestra en vivaspin 6 (MW= 5000 Da) centrifugando a 6000 rpm, 20 minutos a 8°C durante varios ciclos hasta alcanzar un volumen aproximado de 2,5 mL para dejarla pronta para el siguiente paso de la purificación.

El último paso de la purificación fue una cromatografía de exclusión molecular, realizada en una columna Superdex 200 16/60 prepgrade, donde se inyectaron los 2,5 mL de proteína, y se hizo eluir a un flujo de 1 mL/min con buffer Tris 25 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5% pH 7,6, colectando de a 1 mL. La detección fue por absorbancia a 280 nm.

De la misma manera que con la IMAC, a partir del cromatograma de la gel filtración se seleccionaron algunas de las fracciones colectadas y se realizó una SDS-PAGE 15% reductora. Se juntaron las fracciones entre la 98 y la 114. Esto se concentró con vivaspin 6 (MW= 5000 Da) centrifugando a 6000 rpm por 15 minutos a 8°C hasta un volumen final aproximado de 800 μ L. Se cuantificó proteínas obteniendo como resultado 14,2 mg/mL (aproximadamente 0,82 mM). Se guardaron las muestras en alícuotas de 50 μ L y se conservaron a -80°C.

3.1.4.- Identificación por MALDI-TOF

Para confirmar la identidad del producto proteico obtenido, se realizó una identificación por espectrometría de masas por digestión con tripsina utilizando el motor de búsqueda MASCOT. Para esto se trató una alícuota de 10 μ L de la proteína purificada con tripsina en relación 1:20 a 37 °C durante toda la noche. A continuación se desaló la muestra usando OMIX tips C18 activados con acetonitrilo 50 % y equilibrados con ácido trifluoroacético (TFA) 1%. Se cargaron 5 μ L de muestra en el tip y se removieron las sales lavando con TFA

1%. Luego la muestra se eluyó sobre el spot de la placa para la medida con ácido 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) prop-2-enoico (ácido sinapínico) como matriz. Tras la identificación de los péptidos mayoritarios se realizó MS/MS para confirmar la identidad proteica. El análisis MS fue realizado en el servicio del Instituto Pasteur de Montevideo.

3.2.- Ensayo de fosforilación por PknG

De modo complementario al experimento anterior, para confirmar que el producto obtenido es GarA se realizó un ensayo de fosforilación con PknG. Verificar que el producto es fosforilable por PknG sirve para relacionar esta “funcionalidad” de la proteína, con un correcto plegamiento.

Para esto fueron puestos a reaccionar PknG (3 μ M) y la proteína purificada (70 μ M) en presencia de ATP (0,1 mM) y $MnCl_2$ (2 mM) durante 40 minutos a 37 °C. También se realizó un control negativo, al cual no se le agregó la enzima quinasa. Los ensayos se realizaron en buffer Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0.

La fosforilación se visualizó por espectrometría de masas MALDI-TOF, como la aparición de un pico de aproximadamente 80 Da de diferencia respecto al del pico de la proteína sin fosforilar.

3.3.- Derivatización de proteínas

Se marcaron las proteínas GarA y lisozima con dansilo; además se marcó GarA con isotiocianato de fluoresceína.

3.3.1- Dansilación de lisozima

En esta etapa se realizaron ensayos de marcado de la proteína lisozima de huevo de gallina con cloruro de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo (cloruro de dansilo o DNSC), con el objetivo de poner a punto la reacción entre la sonda fluorescente y GarA.

Para trabajar con cloruro de dansilo hay que hacer reparo en ciertos detalles experimentales. Por ejemplo el buffer en el cual se va a encontrar la proteína al momento de la reacción, ya que el DNSC reacciona con aminas primarias y secundarias. Por eso la lisozima para estos experimentos se preparó en buffer Hepes 50 mM, pH 8,0 o Borato 50 mM, pH 9,0. También el solvente en el cual se prepara el DNSC es importante. El cloruro de dansilo es insoluble en agua, por lo cual se preparó en dimetilformamida (DMF) y en acetonitrilo.

En principio se llevó a cabo la reacción de dansilación según protocolos encontrados en la literatura ²⁸. Esto es, lisozima y DNSC a distintas concentraciones relativas en un volumen final de 1 mL reaccionando durante 2 horas en oscuridad y agitación leve, y finalizando la reacción agregando un exceso de Tris ($[Tris]_f = 50 \text{ mM}$) que reacciona con el DNSC remanente en la solución. Por último, se removió el dansil-Tris por gel filtración, usando una columna Sephadex G-25. Para esto se lavó la columna con 30 mL de Tris 50 mM pH 7,4, se sembró todo el volumen de dansil-lisozima, se lavó con 2 mL de Tris y se recolectaron fracciones de a 0,5 mL. En todos los experimentos se evaluó el rendimiento de reacción cuantificando proteína por el método de Bradford y cuantificando el DNS unido a proteína midiendo la absorbancia a 340 nm ($\epsilon^{\text{dansilo conjugado}}_{340} = 3370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ²⁸. El rendimiento se definió como el cociente $[DNS]/[lisozima]$. Este procedimiento se realizó para reacciones a distintas proporciones entre proteína y fluoróforo (1:1,1:2), en buffer Hepes 50 mM pH 8,0 o Borato 50 mM pH 9,0, y con DNSC diluido en acetonitrilo o DMF. En algunos experimentos se usaron métodos alternativos para remover la sonda remanente, como diálisis durante una noche contra el buffer de reacción de dansilación, o por ultrafiltración con Spin-X UF con corte de peso molecular de 5 kDa.

Las condiciones en las cuales se observaron los mejores rendimientos de dansilación fueron disolviendo el DNSC en acetonitrilo, con $[lisozima] = 300 \mu\text{M}$, $[DNSC] = 300 \mu\text{M}$, en buffer borato 50 mM pH 9,0, durante 2 horas en oscuridad. Luego se agregó buffer Tris a concentración final 50 mM pH 7,4, y se removió el dansil-Tris por gel filtración con columna Sephadex G-25. Por

último a las muestras se les realizaron espectros de absorbancia en cubetas de cuarzo de 1 mL en un espectrofotómetro Cary 50.

3.3.2.- Dansilación de GarA

Para la reacción de dansilación de GarA primero se le debió realizar un cambio de buffer a la proteína, ya que luego de la purificación se encuentra solubilizada en buffer Tris 25 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5% pH 7,6. El cambio de buffer se realizó por ultrafiltración con centricones Spin-X UF (Corning) de 500 μ L, con corte de peso molecular de 5 kDa. Se realizaron 5 centrifugaciones a 14.000 g durante 5 minutos, diluyendo la muestra retenida en el tubo concentrador en el buffer de reacción de dansilación (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0 o Borato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 9,0) y la muestra retenida en el tubo concentrador en el último paso se llevó a un volumen final de manera de que la concentración de proteína fuera 300 μ M. La dansilación se llevó a cabo con GarA 300 μ M, DNSC 300 μ M, 600 μ M o 2 mM, reaccionando durante 2 horas en oscuridad, y finalizando la reacción agregando un exceso de Tris ($[Tris]_f = 50$ mM) que reacciona con el DNSC remanente en la solución. A continuación el dansil-Tris se removió por ultrafiltración con centricones Spin-X UF de 500 μ L, con corte de peso molecular de 5 kDa diluyendo en buffer de reacción. A modo de control se preparó dansil-Tris con el mismo procedimiento experimental usado para dansilar proteína, y se disolvió DNSC en buffer borato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 9. A la proteína dansilada y a los controles se le realizaron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia. El rendimiento de reacción se calculó determinando la concentración de proteína por el método de Bradford y cuantificando el DNS en la muestra por absorbancia a 340 nm.

3.3.3- Derivatización de GarA con isotiocianato de fluoresceína

Para el marcado de GarA con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se llevó a cabo la reacción en buffer borato 50 mM, NaCl 150 mM a pH 9,0, con GarA 300 μ M (a la que previamente se le cambió el buffer en el que se encontraba luego de su purificación) y FITC 600 μ M durante 2 horas en oscuridad y agitación

leve. La reacción se finalizó agregando un exceso de Tris ($[Tris]_f = 50 \text{ mM}$). Por último la sonda remanente que reaccionó con el Tris fue removida por ultracentrifugación con centricones Spin-X UF de $500 \mu\text{L}$, con corte de peso molecular de 5 kDa diluyendo en buffer Hepes 50 mM , $\text{NaCl } 150 \text{ mM}$ a $\text{pH } 7,0$. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford, y la concentración de FITC unido a proteína se calculó a partir de la absorbancia a 494 nm ($\epsilon^{\text{FITC conjugada}}_{494} = 77000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.4.- Ensayo de fosforilación de GarA derivatizada por PknG

Para la fosforilación de GarA derivatizada con sonda fluorescente por PknG se incubaron GarA-fluoróforo $70 \mu\text{M}$, ATP $100 \mu\text{M}$, MnCl_2 2 mM , PknG $3,25 \mu\text{M}$ en buffer Hepes 50 mM , $\text{NaCl } 150 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,0$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 40 minutos. Tanto la derivatización, así como la fosforilación tras el marcado de GarA, se verificaron por espectroscopía de masa MALDI-TOF según el protocolo descrito anteriormente en el texto.

3.5.- Anisotropía de fluorescencia

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se realizaron con un fluorímetro Cary Eclipse en el Institut Pasteur de Montevideo. Para los experimentos con proteínas dansiladas se utilizaron las longitudes de onda $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$, ya que corresponden al máximo de excitación y máximo de emisión de fluorescencia del dansilo unido a proteínas. La temperatura se mantuvo controlada a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Previo a cada medida se determinó el factor G.

Determinación del volumen hidrodinámico de la lisozima- Para familiarizarse con la técnica, se determinó el volumen hidrodinámico de la proteína lisozima a partir de medidas de anisotropía de fluorescencia variando la viscosidad del medio según el protocolo de Luis González Flecha y Valeria Levi²⁹. Para esto se realizaron medidas puntuales de anisotropía de fluorescencia a una muestra de lisozima dansilada (dansil-lisozima) a concentración final $[\text{dansil-lisozima}]_f = 30 \mu\text{M}$ en concentraciones crecientes de glicerol a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Debido a que las concentraciones de proteína y buffer son muy bajas, la viscosidad de las

muestras puede ser calculada a partir de la concentración de glicerol. En la tabla 1 se muestran las concentraciones de glicerol de las muestras y sus respectivos valores de viscosidad ³⁰. La dansil-lisozima que se utilizó en este experimento en particular se obtuvo de una reacción en relaciones 1:1 entre enzima y fluoróforo, y la sonda remanente que no reaccionó se removió por diálisis. El rendimiento de reacción obtenido fue $[DNS]/[Lisozima] = 0.7$

Tabla 1. Preparación de las muestras

Número de muestra	Volumen inicial de glicerol 50% (μL)	% glicerol final en muestra	Volumen lisozima-DNS 300 μM (μL)	Volumen buffer Tris 50 mM pH 7.4 (μL)	η a 20 °C (mPa.s)
1	0	0	100	900	1,007
2	80	4	100	820	1,097272
3	160	8	100	740	1,215288
4	240	12	100	660	1,361048
5	320	16	100	580	1,534552
6	400	20	100	500	1,7358
7	480	24	100	420	1,964792
8	560	28	100	340	2,221528
9	640	32	100	260	2,506008
10	720	36	100	180	2,818232
11	800	40	100	100	3,1582

Se realizaron medidas por duplicado en cubeta de cuarzo de 1 mL. Una vez determinado el voltaje óptimo del fotomultiplicador (en este caso $V_{pmt} = 720$ V) se tomaron las medidas.

3.6.- Espectro de excitación de anisotropía de fluorescencia

Se obtuvieron los espectros de excitación anisotropía de fluorescencia para GarA-FITC fosforilada y sin fosforilar. Para esto se fijó un factor G de 1,67 determinado previamente por el equipo, y se fijó el voltaje del fotomultiplicador a 600 V.

Para el cálculo del valor de anisotropía el equipo detectó la fluorescencia emitida a 520 nm. El espectro se realizó excitando la muestra en el intervalo de longitudes de onda entre 450 nm y 500 nm, realizando medidas cada 5 nm.

3.7.- Experimentos de unión a ANS

Se evaluó la unión del 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS) a las conformaciones fosforilada y desfosforilada de GarA. GarA fosforilada (GarA-p) se obtuvo por el ensayo de fosforilación descrito anteriormente. En un primer experimento se realizaron los espectros de emisión de fluorescencia de las dos configuraciones de la proteína a concentraciones 10 μ M, en presencia de ANS 10 μ M. Las medidas se realizaron con un equipo Varioskan, utilizando una placa de fluorescencia de 384 pocillos de 120 μ L a 25 °C. La longitud de onda de excitación fue $\lambda_{ex} = 370$ nm, y se registró el espectro de emisión en el intervalo entre 400 nm y 700 nm.

3.8.- Cursos temporales de fosforilación

Emisión de fluorescencia- Con la muestra de dansil-GarA obtenida en las condiciones de mayor exceso de cloruro de dansilo se siguieron cursos temporales de fosforilación midiendo la emisión de fluorescencia a 510 nm, excitando la muestra a una longitud de onda de 340 nm. Este experimento se realiza en las mismas condiciones que el experimento de fosforilación detallado previamente salvo por $[dansil-GarA] = 10 \mu M$ y $[PknG] = 2 \mu M$.

Anisotropía de fluorescencia- Se siguieron cursos temporales en un ensayo de fosforilación de dansil-GarA por PknG midiendo la anisotropía de fluorescencia de la muestra en el tiempo. La reacción se llevó a cabo en buffer Hepes 50

mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 en una cubeta de 500 μ L a 37 $^{\circ}$ C. Las concentraciones finales de los reactivos se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de reactivos

Reactivo	Concentración final (μ M)
PknG	0; 0,3; 1,5; 3,0
ATP	100
MnCl₂	2000
Dansil-GarA	35

Cinéticas de fosforilación con unión a ANS- Se siguieron cursos temporales de fosforilación midiendo la intensidad de fluorescencia de ANS unido a la proteína (λ_{ex} = 370 nm, λ_{em} = 476 nm). Las medidas se realizaron con un equipo Varioskan, utilizando una placa de fluorescencia de 384 pocillos de 120 μ L a 37 $^{\circ}$ C. En los pocillos se mezclan los reactivos mostrados en la tabla 3, a excepción del ATP, que se agrega a la mezcla por último para disparar el comienzo de la reacción.

Tabla 3. Concentraciones de reactivos para ensayo de fosforilación con ANS

Reactivo	Concentración final (μ M)
PknG	0; 0,01; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0
ATP	100
MnCl₂	2000
ANS	10
GarA	10

Para estos experimentos se realizaron controles negativos en los cuales en uno no se adicionó ATP a la mezcla de reacción, y en un segundo control no se agregó el sustrato GarA.

Ensayo acoplado- En este ensayo se acopló la reacción de fosforilación de GarA por PknG a la actividad de las enzimas piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH), de manera de relacionar la formación del producto ADP en la primera reacción de fosforilación con el consumo de NADH por su oxidación por acción de la LDH.

Para ajustar el sistema enzimático acoplado de manera tal de que la reacción limitante sea la de fosforilación, en principio se midieron cursos temporales a concentraciones crecientes de PK/LDH. Los experimentos se realizaron en placa de fluorescencia de 384 pocillos de 120 μ L, con el lector de placas Varioskan a 25 °C en buffer Hepes 50 mM, 150 mM NaCl, KCl 10 mM, $MnCl_2$ 2 mM pH 7,0. En todas las corridas se trabajó con concentraciones finales de PknG 2,5 μ M, GarA 35 μ M, ATP 100 μ M, fosfoenolpiruvato (PEP) 0,4 mM, NADH 10 μ M. Las concentraciones de PK utilizadas fueron 0,0066 U/mL; 0,013 U/mL; 0,026 U/mL; 0,04 U/mL; 0,08 U/mL; 0,2 U/mL; 0,40 U/mL; 0,8 U/ y 1,6 U/mL. Las concentraciones de LDH fueron 0.005 U/mL; 0,01 U/mL; 0,02 U/mL; 0,03 U/mL; 0,06 U/mL; 0,15 U/mL; 0,3 U/mL; 0,6 U/mL y 1,2 U/mL. En el stock de enzimas utilizado, las enzimas LDH y PK están preparadas en una misma solución (1700 U/mL y 2250 U/mL respectivamente), por lo que se utiliza como referencia la concentración de LDH para reportar los resultados. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Para calcular la velocidad de reacción a partir de las pendientes obtenidas se realizó una curva de calibración de fluorescencia para distintas concentraciones de NADH.

Una vez puesto a punto el sistema se midieron los cursos temporales de fosforilación para concentraciones crecientes de GarA (tabla 4) en las condiciones mencionadas anteriormente a 25 °C.

Tabla 4. Concentraciones de reactivos para los cursos temporales del ensayo acoplado

Muestra	PEP (μM)	NADH (μM)	LDH (U/mL)	MnCl₂/KCl (mM)	PknG (μM)	GarA (μM)	ATP (μM)
1	400	100	0.15	10/2	5	0	100
2	400	100	0.15	10/2	5	2	100
3	400	100	0.15	10/2	5	5	100
4	400	100	0.15	10/2	5	10	100
5	400	100	0.15	10/2	5	20	100
6	400	100	0.15	10/2	0	5	100

IV.- Resultados y discusión

4.1.- Purificación de GarA

IMAC- Con los pellets bacterianos obtenidos luego de que las bacterias expresaran la proteína de interés, se realizó la resuspensión y sonicación como fue descrito en materiales y métodos. Con el extracto resultante de este proceso se realizó una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) con resina de níquel y se detectó la absorbancia a 280 nm de la muestra a la salida de la columna (figura 8). Se colectaron fracciones de 1 mL cada 2 minutos.

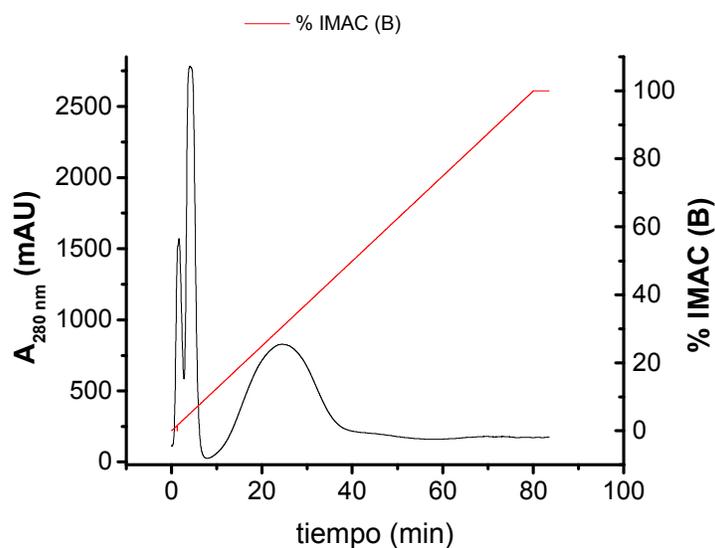


Figura 8. Purificación de GarA recombinante de *M. tuberculosis* por cromatografía de afinidad por metales en gradiente de imidazol. Cromatograma de elución de la IMAC por detección de absorbancia a 280 nm.

La línea roja corresponde al porcentaje de buffer IMAC (B). GarA eluye en el pico que comienza alrededor de los 10 minutos.

Se seleccionaron algunas de las fracciones pertenecientes a diferentes picos en el cromatograma obtenido, y se analizaron por electroforesis en gel desnaturalizante en condiciones reductoras de poliacrilamida 15% (figura 9) de manera de identificar en que pico estaría eluyendo GarA.

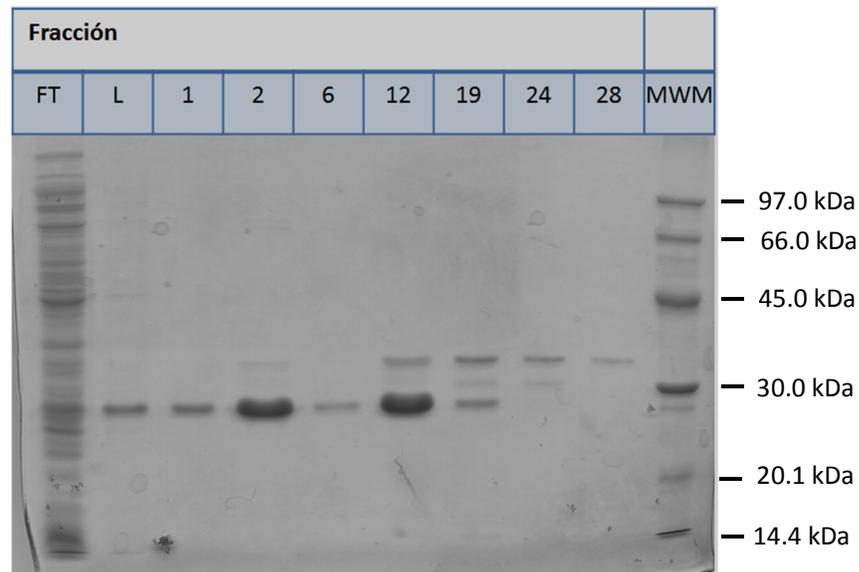


Figura 9. En el gel las muestras se sembraron en el siguiente orden: FT: flow through, fracción no unida. L: lavado. MWM: marcador de peso molecular; 1, 2, 6, 12, 19, 24 y 28: fracciones colectadas de la IMAC

En el gel de la electroforesis se visualiza que ya desde el lavado aparece una banda de peso molecular por debajo de 30 kDa, que podría corresponder a GarA (en este paso GarA todavía tiene la cola de histidinas que por su carga positiva reducen su movilidad). En la fracción 12, esta banda aparece con mayor intensidad, coincidiendo con el comienzo de un pico en el cromatograma, indicando que fue retenida por la columna de IMAC. Con esta información, se juntaron las fracciones 7 a 17, colectadas entre los 13 y 35 minutos y se dializaron con DTT y proteasa TEV 1 mg/mL contra Tris 25 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5% y DTT 1 mM pH 7.6.

Cromatografía de exclusión molecular- En el último paso de purificación se detectó la absorbancia a 280 nm de la muestra que pasó por la columna Superdex 200 16/60 prepgrade y se realizó el cromatograma de elución (figura 10). Se observaron dos picos, uno mayor a los 86 minutos, y uno menor a los 108 minutos. Las fracciones se colectaron de a 1 mL y se analizaron las fracciones correspondientes a los dos picos por SDS-PAGE 15 % en condiciones reductoras (figura 11).

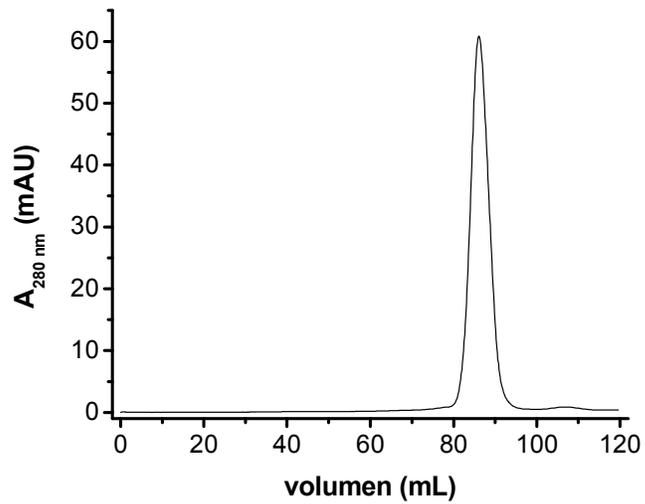


Figura 10. Cromatograma de elusión de la Gel filtración

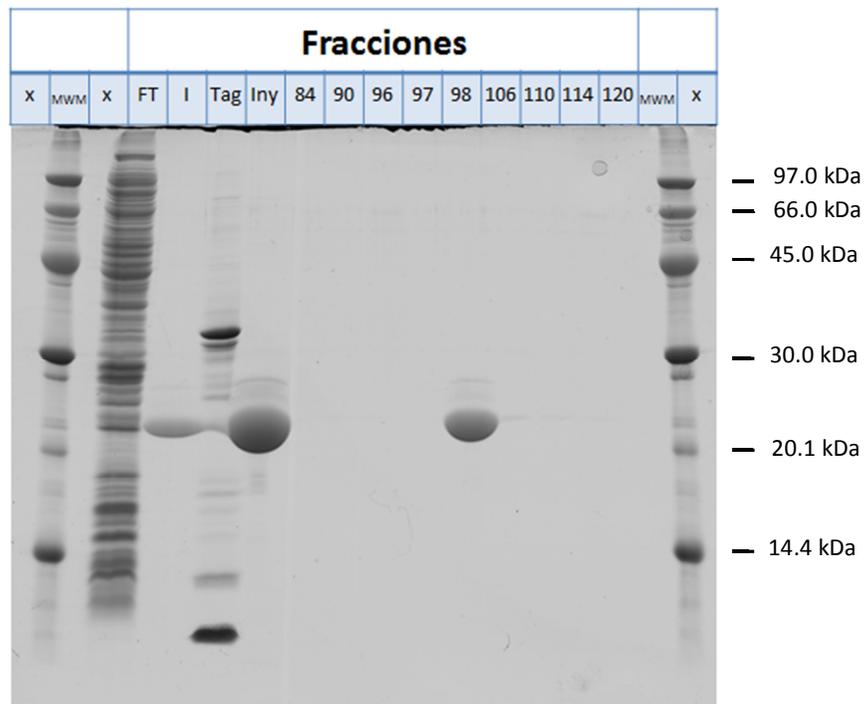


Figura 11. SDS-PAGE de las muestras de la gel filtración. x: carril vacío; MWM: marcador de peso molecular; FT: fracción no unida de la IMAC; I: fracción post-IMAC; Tag: colas de histidina y TEV; Iny: inyección gel filtración; 84, 90, 96, 97, 98, 106, 110, 114 y 120: fracciones colectadas en gel filtración.

En el gel se observa que recién en la fracción 98 aparece una banda con el peso molecular correspondiente a GarA, de manera que el pico más alto, comprendido aproximadamente entre los minutos 80 y 96, no contiene a la proteína de interés sino que ésta eluye en el pico entre los minutos 100 y 112. El valor bajo en la absorbancia se explica por el bajo coeficiente de absortividad molar de GarA a 280 nm ($\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) debido a la ausencia de triptófanos y la presencia de tan solo una tirosina en su secuencia. A partir de la información del gel y del cromatograma, se decidió colectar las fracciones entre los minutos 98 y 114 de elución, que se concentraron en vivaspin 6 (MW = 5000 Da) hasta un volumen final de 800 μL . Se estimó la concentración de GarA por el método de Bradford, obteniéndose una concentración final $[\text{GarA}] = 820 \mu\text{M}$.

4.2.- Espectrometría de masa MALDI-TOF

Para confirmar la identidad de la proteína recombinante purificada se realizaron experimentos de espectrometría de masa MALDI-TOF (figura 12A).

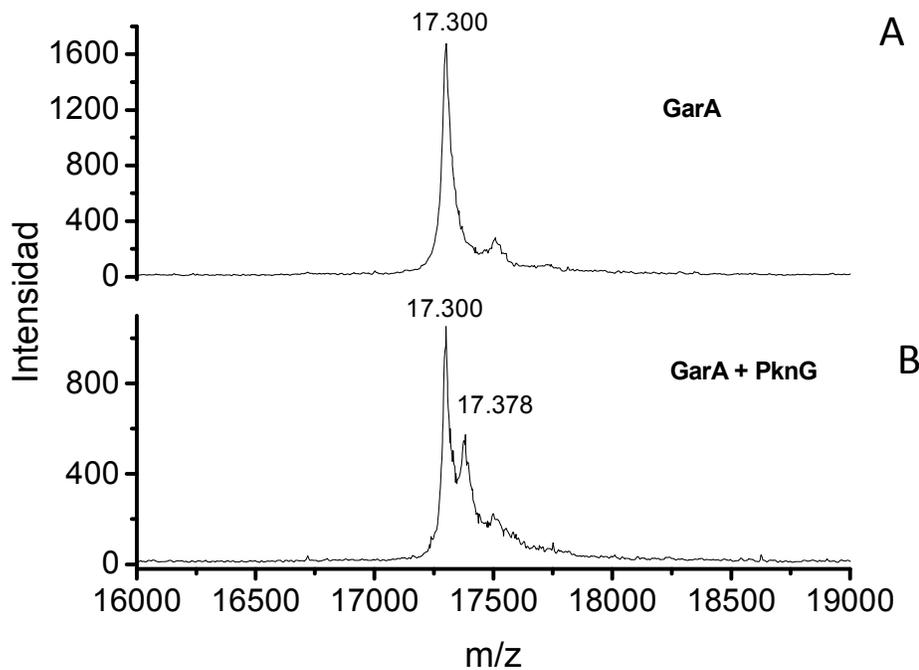


Figura 12. Espectrometría de masas MALDI-TOF de GarA recombinante pre (A) y post (B) tratamiento de fosforilación con PknG.

Tras el tratamiento de la proteína recombinante con PknG aparece un nuevo pico en el espectro con una relación m/z de 17.378 (figura 12B). Para una carga +1 este aumento en la masa de alrededor de 80 Da se explica por la adición de un grupo fosfato a la proteína. La proteína recombinante purificada es fosforilada por PknG, lo que confirma de manera funcional que se trata de GarA.

4.3.- Dansilación de lisozima

La reacción de dansilación para la lisozima de gallina se llevó a cabo en distintas condiciones como se especificó anteriormente en materiales y métodos. Entre las distintas estrategias para la remoción del dansil-Tris una vez finalizada la reacción, se encuentra la cromatografía de exclusión molecular usando una columna Sephadex G-25. En la figura 13 se muestra el cromatograma de la gel filtración. Las fracciones se colectaron de a 0,5 mL.

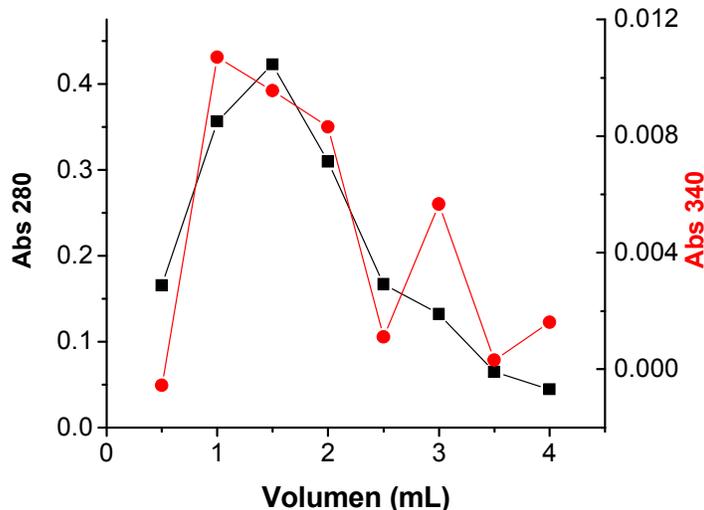


Figura 13. Espectro de absorción de lisozima-DNS después de gel filtración. Los números de las muestras corresponden al orden en que fueron colectadas

En este caso la reacción se llevó a cabo con lisozima 5 mM, DNSC 5 mM disuelto en DMF, en buffer borato 50 mM pH 9,0. En el cromatograma se

observa que junto con la proteína eluye DNS, lo cual es consistente con la unión covalente entre estas moléculas. A los 3 mL de elución aparece un nuevo pico en la absorbancia a 340 nm, que corresponde a la elución del dansil-Tris.

Habiendo visto que los rendimientos de marcado con DNSC disuelto en DMF no fueron muy buenos, se decidió evaluar el rendimiento de reacción cuando se disuelve el DNSC en acetonitrilo. Esta vez el marcado se realizó a concentraciones equimolares de proteína y DNSC (300 μM) en buffer Borato 50 mM pH 9,0. En este experimento el dansil-Tris se removió por gel filtración. El rendimiento de la reacción fue calculado como el cociente de las concentraciones de DNS y lisozima. En la figura 14 se muestran los espectros de absorbancia de la lisozima dansilada por ambos tratamientos.

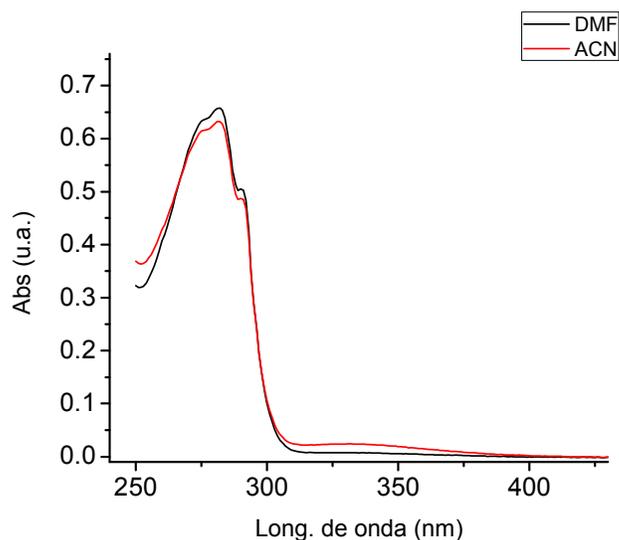


Figura 14. Espectro de absorbancia de lisozima-DNS usando DMF o acetonitrilo como solvente orgánico para el DNSC

Utilizando los coeficientes de absorción molar para el dansilo unido a proteínas a 340 nm ($\epsilon_{340} = 3370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ²⁸) y el de la lisozima a 280 nm ($\epsilon_{280} = 37.800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ³¹), se pueden calcular sus concentraciones a partir de las medidas de absorbancia correspondientes. Las concentraciones y los rendimientos de reacción que se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Rendimiento de reacción con DNSC en DMF o en acetonitrilo

	Abs ₂₈₀ nm	Abs ₃₄₀ nm	[DNS] (μ M)	[Lisozima] (μ M)	[DNS]/[Lisozima]
DMF	0,653	0,007	2,1	18,0	0,11
Acetonitrilo	0,628	0,0023	6,7	17,2	0,39

Se observó que el rendimiento de reacción de dansilación es mayor cuando se solubiliza el DNSC en acetonitrilo.

Espectros de excitación y emisión de fluorescencia- A la lisozima dansilada se le realizaron los espectros de emisión y excitación de fluorescencia (figura 15).

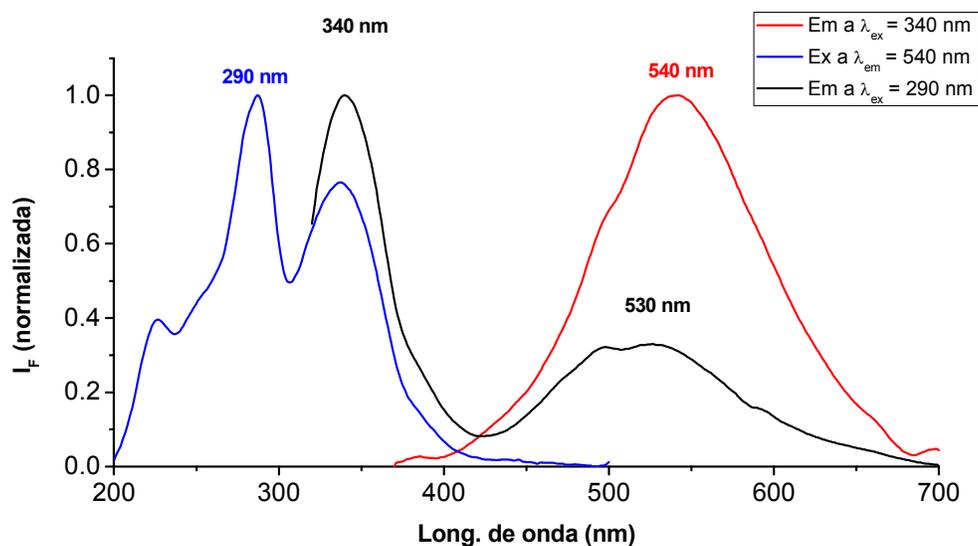


Figura 15. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia. Espectro de excitación de dansil-lisozima a $\lambda_{em} = 540$ nm (trazo azul), espectro de emisión de dansil-lisozima a $\lambda_{ex} = 340$ nm (trazo rojo) y espectro de emisión de dansil-lisozima a $\lambda_{ex} = 290$ nm (trazo negro).

El espectro de excitación de la dansil-lisozima presenta dos picos principales, uno a 290 nm y otro 340 nm (figura 15). El primero corresponde a la excitación de los residuos aromáticos de la proteína, mientras que el segundo corresponde a la excitación del dansilo unido a la proteína.

Cuando se realiza el espectro de emisión excitando la muestra de dansil-lisozima a $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm se identifica un único pico a 540 nm, que corresponde a la emisión del dansilo. La longitud de onda a la cual aparece el máximo de emisión nos da información sobre cuán expuesto al solvente se encuentra el fluoróforo, teniendo en cuenta que cuanto menos polar es el entorno del dansilo, el máximo presenta un mayor corrimiento hacia el azul. En este caso, se puede deducir que la sonda se encuentra levemente expuesta al solvente, ya que en seroalbúmina bovina dansilada se han registrado espectros con máximo de emisión a 500 nm, mientras que los espectros de dansil-aminoácidos libres en agua presentan un máximo de emisión a 580 nm³².

En la figura 15 también se muestra el espectro de emisión de la lisozima dansilada cuando se trabaja con luz de longitud de onda $\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm. La absorción de luz a esta longitud de onda es debida a los residuos de triptófano y tirosina de la lisozima, lo cual se refleja en la aparición de un pico a 340 nm en la emisión de fluorescencia. En este espectro también se observa un pico alrededor de los 530 nm, correspondiente a la emisión del dansilo. La aparición de este pico indica que hay transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET por su sigla en inglés), ya que hay una superposición entre la longitud de onda máxima de emisión de los triptófanos, y la longitud de onda de excitación del dansilo (340 nm). Este resultado confirma que la sonda fluorescente se encuentra unida covalentemente a la proteína, ya que para que haya FRET es necesaria la proximidad espacial entre los fluoróforos. Que no haya habido desactivación total de la emisión de los triptófanos se debe a que el marcaje con dansilo tuvo un rendimiento del 40%.

Determinación del volumen hidrodinámico de la lisozima por anisotropía de fluorescencia- La anisotropía de fluorescencia es un parámetro que mide el grado de despolarización de la luz emitida por un fluoróforo en solución. Para su determinación, se irradia la muestra de interés con luz polarizada en un plano, de manera que solo las moléculas que tengan un momento de absorción paralelo al eje de polarización del haz de luz incidente en ese momento logren absorber luz (fenómeno conocido como fotoselección²⁹). Durante el tiempo que transcurre entre la absorción de luz y la emisión de fluorescencia, las moléculas

pueden cambiar de orientación debido a la difusión rotacional de las mismas. La luz emitida no estará polarizada en el mismo plano que la luz incidente, por lo que se puede definir a la anisotropía como el grado de despolarización de la luz. Por lo tanto, el valor de anisotropía de una molécula fluorescente va a depender de la temperatura, las propiedades del solvente, el tiempo de vida media del fluoróforo, y del tamaño y forma de la molécula. Se determinaron las medidas de anisotropía de fluorescencia de las distintas muestras de dansil-lisozima en concentraciones crecientes de glicerol para estudiar la dependencia de este parámetro con la viscosidad (figura 16).

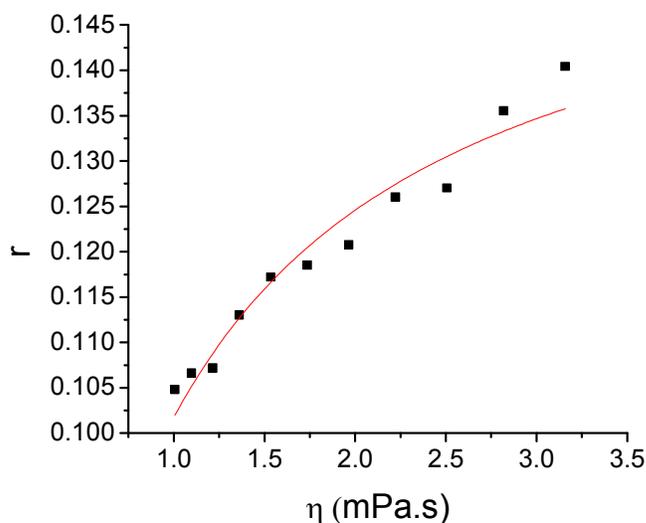


Figura 16. Dependencia de la anisotropía de dansil-lisozima con la viscosidad de la solución. La línea roja continua es la representación gráfica de la ecuación 1 cuyos parámetros se indican en el texto.

La anisotropía aumenta con el aumento de la viscosidad, y estos resultados pueden utilizarse para determinar el volumen hidrodinámico de la proteína utilizando la ecuación 1,

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau \cdot k \cdot T}{\eta \cdot V}} = \frac{\eta \cdot r_0}{\eta + c} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde r es el valor de anisotropía de fluorescencia, r_0 es la anisotropía en ausencia de difusión, τ es el tiempo de vida media del fluoróforo, k es la

constante de Boltzman, T es temperatura, η es viscosidad y V es volumen hidrodinámico ²⁹.

Los datos experimentales se ajustaron a esta función hiperbólica, y sus parámetros fueron $r_0 = 0,161$ y $c = 0,580$ mPa.s. Una vez determinados estos parámetros, se puede calcular el volumen hidrodinámico de la partícula en estudio ya que

$$V = \frac{\tau \cdot k \cdot T}{c} \quad \text{Ecuación 2}$$

El tiempo de vida media del dansilo unido a lisozima es $\tau = 6,2$ ns ²⁸, por lo que el volumen hidrodinámico calculado para la lisozima es $V = 43,3$ nm³. El valor reportado en la literatura es $V = 37$ nm³, muy similar al determinado en este trabajo, y por lo tanto validando nuestra aproximación experimental. Este resultado confirma además que el método de remoción del DNS que no reaccionó con la proteína es eficiente, ya que la presencia de fluoróforo libre hubiera interferido en las medidas de anisotropía.

4.4.- Derivatización de GarA

4.4.1.- Dansilación

En el primer experimento de marcado de GarA con dansilo, se evaluó el rendimiento de reacción a pH 8,0 y 9,0. A los productos de reacción se les realizó el espectro de emisión de fluorescencia excitando a $\lambda_{ex} = 340$ nm (figura 17). Las muestras de dansil-GarA se midieron a concentración final aproximadamente $[GarA] = 100$ μ M.

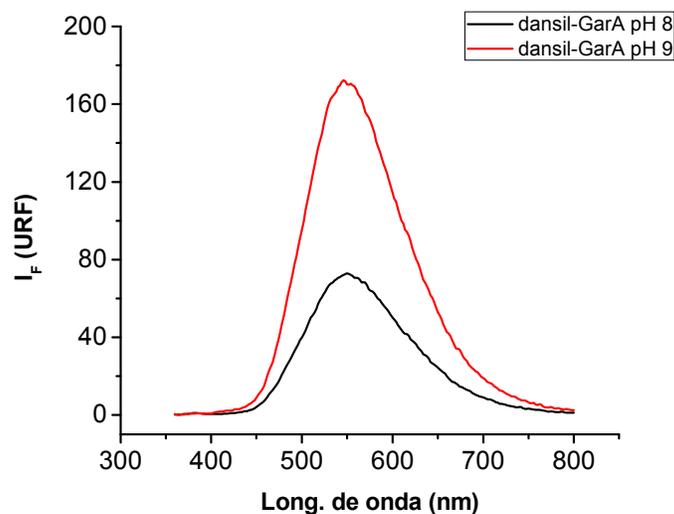


Figura 17. Espectro de emisión de fluorescencia de los productos de la reacción de dansilación a pH 8 y pH 9. $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$.

Cuando el dansilo se encuentra unido a GarA el máximo de emisión aparece alrededor de los 540 nm (figura 17), indicando que los dansilos unidos a GarA se encuentran en un entorno medianamente hidrofóbico, expuestos levemente al solvente, similar a lo observado en lisozima.

La diferencia en la intensidad de fluorescencia entre las proteínas marcadas a distintos pHs es esperable, ya que a pH 8,0, debido a su pK_a , el equilibrio ácido-base de los grupos amino de las lisinas de GarA va a estar desplazado hacia la forma protonada, y no van a ser reactivas al cloruro de dansilo, por lo que se espera que el único residuo capaz de ser dansilado sea el extremo amino terminal. En cambio a pH 9,0, los grupos aminos de las lisinas se encuentran como NH_2 , pudiendo reaccionar entonces y ser dansilados. Por lo tanto el aumento en la fluorescencia se debe a una mayor proporción de dansilo unido a GarA en la muestra marcada a pH 9,0. Esto se confirma cuando se evalúa el rendimiento de reacción. La concentración final de proteína luego del proceso de dansilación se determinó por el método de Bradford, usando como estándar para la curva de calibración lisozima de gallina, mientras que la concentración de dansilo se determinó por absorbancia a 340 nm. En la tabla 6 se muestran los valores del rendimiento de reacción.

Tabla 6. Rendimiento de reacción de dansilación de GarA a pH 8,0 y 9,0

Muestra	[GarA]	[DNS]	[DNS]/[GarA]
pH 8	476 μ M	200 μ M	0,42
pH 9	437 μ M	360 μ M	0,82

El aumento en la concentración de GarA con respecto a la concentración inicial que se puso a reaccionar se debe a que se concentró la misma en el proceso de ultrafiltración para la remoción del dansil-Tris.

Verificación de fosforilación por PknG- Para cumplir con el objetivo planteado utilizando la proteína GarA dansilada es importante comprobar que esta modificación no impide su fosforilación por la actividad de la proteína quinasa G. Para esto se sometió a GarA-DNS a condiciones de fosforilación y se analizó las muestras por espectrometría de masa MALDI-TOF (figura 18).

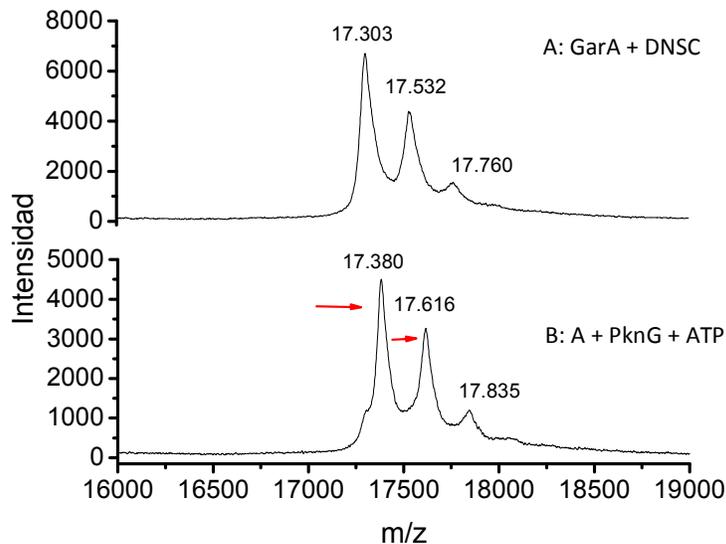


Figura 18. Espectrometría de masa MALDI-TOF de GarA-DNS (figura superior) y GarA-DNS luego del tratamiento de fosforilación (figura inferior). En los dos espectros se identifican picos correspondientes a GarA sin derivatizar, a la especie mono-dansilada, y a la especie di-dansilada.

En la proteína dansilada se identifican tres picos claros por MALDI-TOF (figura 18 A), que por su relación masa/carga corresponden a la proteína sin modificar, $m/z = 17303$ (masa molecular de GarA), la proteína mono-dansilada, $m/z = 17532$ (La masa molecular del DNS es 234 Da) y a la proteína di-dansilada, $m/z = 17.760$. Además de confirmar que hubo modificación covalente de la proteína, este espectro indica que hay más de una especie presente como producto de la reacción de dansilación. Por otra parte, en el espectro de la proteína modificada fosforilada (figura 18 B) los mismos picos presentan un desplazamiento hacia la derecha de alrededor de 80 Da, que corresponde a la adición de un grupo fosfato. Por lo tanto la modificación de GarA con dansilo no impide su fosforilación por parte de PknG. De esta manera se valida la aproximación experimental para cumplir con el objetivo propuesto con el uso de la sonda DNSC.

Emisión de fluorescencia y fosforilación- Para poder seguir la reacción de fosforilación en cursos temporales reales por fluorescencia, es necesario que exista una diferencia apreciable en la emisión de fluorescencia a alguna longitud de onda determinada entre las especies fosforilada y sin fosforilar. Por

lo tanto el siguiente experimento fue realizar sus espectros de emisión (figura 19).

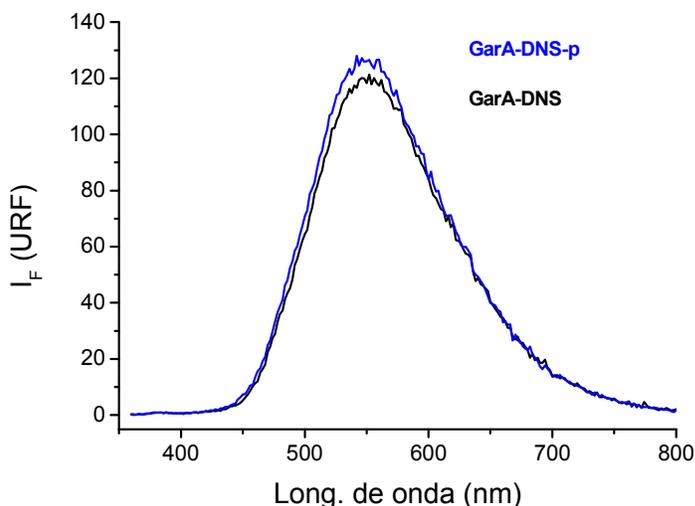


Figura 19. Espectro de emisión de fluorescencia de GarA dansilada fosforilada (trazo azul) y sin fosforilar (trazo negro). $\lambda_{ex} = 340$ nm.

Como se observa en la figura 19, no hubo una diferencia importante en los espectros de emisión, ni en la intensidad de fluorescencia, ni en la longitud de onda del máximo de emisión. Esto significa que la sonda fluorescente no censa un cambio en la polaridad de su entorno tras el cambio estructural de GarA debido a la fosforilación.

El hecho de no saber en qué residuo se está modificando la proteína, y de que posiblemente existan varias poblaciones distintas de GarA modificadas (adición de uno o más grupos dansilo y en residuos distintos) genera una variable que no puede ser controlada en estas condiciones. La inespecificidad del marcado es un problema que trabajando con la proteína nativa no puede ser resuelto.

Efecto de fosforilación en anisotropía de fluorescencia- Como segunda estrategia para lograr el objetivo propuesto, se realizaron medidas de anisotropía de fluorescencia. Se buscó ver diferencias en los valores de esta propiedad aditiva entre GarA no fosforilada que presenta el extremo amino-terminal flexible y muy móvil, y la forma fosforilada en la cual el FHA reconoce y une a la fosfotreonina, restringiendo así la movilidad del extremo N-terminal.

Como demostraron England y colaboradores ²⁴, el auto-reconocimiento y unión de la fosfotreonina 21 por parte del dominio FHA, conlleva a una disminución en el volumen hidrodinámico de GarA respecto a su forma no fosforilada, por lo cual era esperable observar una reducción en la anisotropía de fluorescencia (ecuación 1).

En primer lugar, se midió la anisotropía de fluorescencia de las muestras derivatizadas con dansilo, fosforiladas y sin fosforilar. Para la proteína sin fosforilar el valor obtenido fue $r = 0,0942 \pm 0,0003$, mientras que para la proteína fosforilada fue $r = 0,1026 \pm 0,0009$. Claramente este resultado no coincide con lo esperado, ya que la muestra que en teoría contiene una proteína con menor volumen hidrodinámico presenta un mayor valor de anisotropía. Sin embargo, existe una diferencia en los valores medidos, por lo cual se podría llegar a seguir el curso temporal de la reacción de fosforilación midiendo este parámetro.

El siguiente paso fue llevar a cabo la reacción de fosforilación en cubeta siguiendo el cambio de la anisotropía en el tiempo. Para esto se utilizó una muestra de GarA-DNS marcada a pH 9,0 en proporción proteína/dansilo 1:2, cuyo rendimiento de reacción fue 1,77.

Como se observa en la figura 20, los valores de anisotropía fluctúan considerablemente durante los 20 minutos registrados. Hay una clara incoherencia entre el error reportado en las medidas puntuales con respecto a los valores registrados de manera cinética. Mientras la medida puntual reporta un cifra con un error relativo porcentual de 0.6%, en las medidas cinéticas el valor promedio en el tiempo presenta una variación de 5%. La variación fue aún mayor entre experimentos independientes en distintos días. La alta variabilidad de los valores registrados impide hacer un seguimiento de la reacción de fosforilación. Además, los datos experimentales no presentan ninguna tendencia particular durante el curso de reacción.

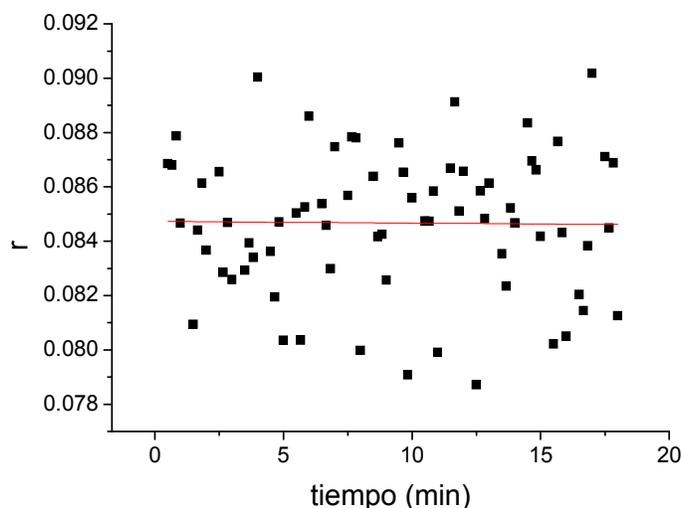


Figura 20. Curso temporal de reacción de fosforilación de GarA-DNS por PknG siguiendo la anisotropía de fluorescencia. $[GarA] = 70 \mu M$, $[PknG] = 3 \mu M$. $T = 37 \text{ }^\circ C$. El trazo rojo corresponde a la recta que mejor se ajusta a los valores experimentales.

Por los resultados obtenidos con lisozima, podemos descartar que haya DNS no unido que impida observar los cambios esperados. Una posible explicación para los resultados obtenidos, es que tal vez el cambio en volumen hidrodinámico de GarA tras la fosforilación sea muy pequeño como para ver cambios significativos en la anisotropía de fluorescencia. También hay que tener presente que la anisotropía depende del tiempo de vida media del fluoróforo. Una disminución en el tiempo de vida media del DNS debido a un cambio en la polaridad de su entorno, aumentaría el valor de anisotropía, compensando el cambio debido a la disminución del volumen hidrodinámico.

4.4.2.- Derivatización con isotiocianato de fluoresceína

En vistas de que la modificación de GarA con DNSC no funcionó para lograr desarrollar un método fluorescente de medida de actividad quinasa, se decidió intentar un abordaje similar pero con una sonda diferente. La sonda seleccionada fue el isotiocianato de fluoresceína (FITC), que como ventajas frente al DNSC presenta un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y además tiene un tiempo de vida media menor permitiendo una señal mayor en experimentos de anisotropía de fluorescencia. Básicamente, se realizaron los

mismos experimentos con GarA-FITC que con las muestras de GarA-DNS. Se obtuvieron resultados similares tanto con los espectros de emisión de fluorescencia (no hay cambios en los espectros de emisión de GarA-FITC fosforilada y sin fosforilar), como en los experimentos de anisotropía de fluorescencia (no se observa una tendencia clara de los valores de anisotropía en el tiempo que permitan seguir la reacción de fosforilación). Sí se observaron, como era de esperar, valores mayores de anisotropía de fluorescencia con esta sonda en comparación a la muestra marcada con DNSC (para GarA-FITC $r = 0.152$ y para GarA-FITC fosforilada $r = 0.176$).

4.5.- Cinéticas con unión a ANS

El espectro de emisión del ANS es sensible a la polaridad del solvente, siendo esencialmente no fluorescente en solución acuosa, pero tornándose altamente fluorescente en entornos no polares^{33; 34}. Esta sonda es utilizada ampliamente para estudiar su interacción con sitios de unión en macromoléculas. En este abordaje experimental, se quiso evaluar si el cambio estructural que sufre GarA tras su fosforilación genera alguna cavidad hidrofóbica que acomode al ANS, de manera de relacionar la fosforilación con un aumento en la intensidad de fluorescencia. Para comenzar, se realizaron los espectros de emisión de GarA nativa, y GarA tratada en condiciones de fosforilación (figura 21).

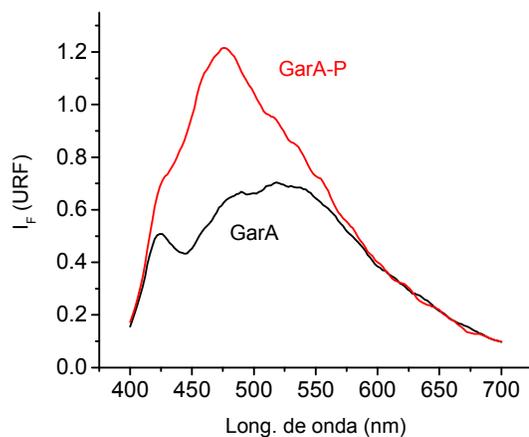


Figura 21. Espectro de emisión de fluorescencia de ANS con GarA nativa (línea negra) y GarA después de condiciones de fosforilación (línea roja). $\lambda_{ex} = 340$ nm.

Los espectros mostraron que tras el proceso de fosforilación hay un corrimiento hacia el azul del máximo de emisión (de 520 nm a 476 nm), acompañado de un aumento en el rendimiento cuántico. Esto indica que el ANS está interaccionando con alguna región hidrofóbica proteica.

A partir de estos resultados, se procedió a medir cursos temporales de la reacción de fosforilación siguiendo la emisión de fluorescencia a distintas concentraciones de PknG, y realizando también los correspondientes controles negativos (figuras 22 y 23).

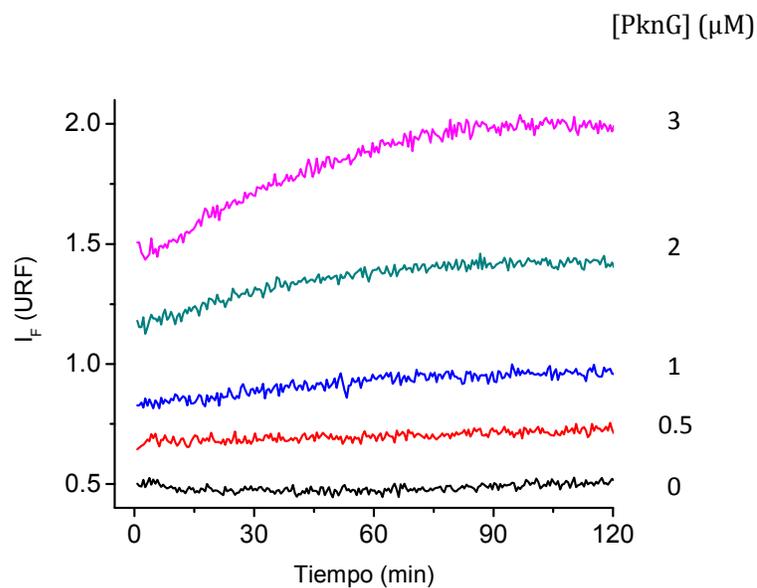


Figura 22. Cursos temporales de reacción de fosforilación de GarA a distintas concentraciones de PknG en presencia de ANS siguiendo la emisión de fluorescencia a $\lambda_{em} = 472 \text{ nm}$ con $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$. $[\text{GarA}] = 10 \mu\text{M}$, $[\text{ANS}] = 10 \mu\text{M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

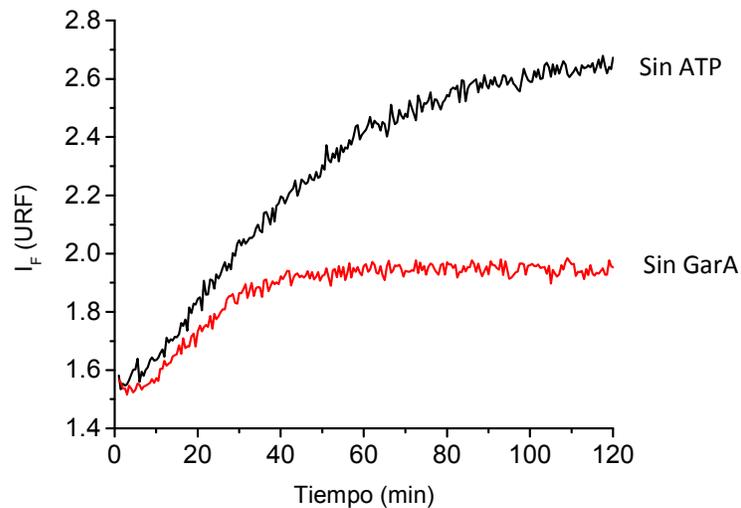


Figura 23. Curso temporal de reacción de fosforilación- Control sin ATP (trazo negro) y sin GarA (trazo rojo). Ambos experimentos se realizaron con $[PknG] = 3 \mu M$ en las mismas condiciones que los cursos temporales descritos anteriormente. $\lambda_{em} = 472 \text{ nm}$, $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$

El cambio en la intensidad de fluorescencia en los controles en los cuales no se agregó a la mezcla de reacción GarA o ATP, indica que la cinética observada no corresponde a la reacción de fosforilación. Hay que tener presente que PknG tiene actividad autocatalítica, por lo que una posibilidad podría ser que al autofosforilarse cambie su capacidad para unir ANS, llevando a un aumento en la intensidad de fluorescencia. Sin embargo en el control sin ATP también se ve una cinética similar, por lo que no es ninguna fosforilación lo que se está registrando.

En los ensayos en condición de fosforilación, se observa que la fluorescencia inicial de cada muestra aumenta a medida que aumenta la concentración de PknG. Si se grafican los valores de fluorescencia inicial en función de la concentración de quinasa (figura 24), se corrobora que existe una dependencia lineal entre estos parámetros.

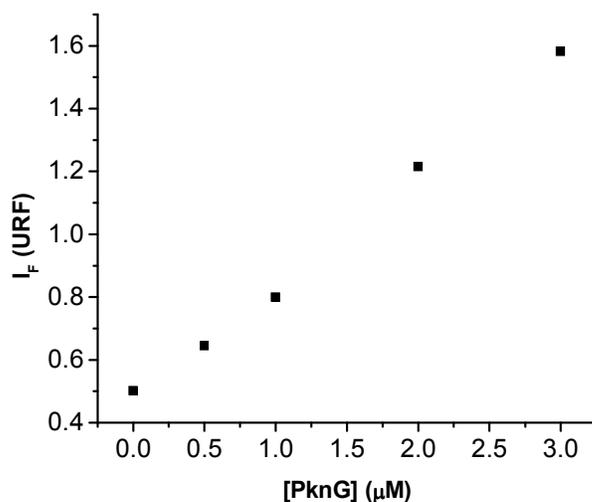


Figura 24. Dependencia de la intensidad de fluorescencia de ANS inicial de las muestras con la concentración de PknG. $\lambda_{em} = 472 \text{ nm}$, $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$

Por lo tanto la cinética observada corresponde a un aumento en la capacidad de PknG de unir ANS. Una posible explicación es que durante las corridas cinéticas la quinasa se agrega en solución, exponiendo sitios hidrofóbicos que unen ANS y aumentan su rendimiento cuántico de fluorescencia.

4.6.- Ensayo acoplado

Debido a que no se logró relacionar cambios en las propiedades fluorescentes de las sondas utilizadas por el cambio estructural de GarA con su fosforilación, se intentó medir la actividad quinasa con un abordaje más genérico, siguiendo la formación de ADP como producto de reacción de la fosforilación. En concreto, a la reacción de fosforilación de GarA se le acoplaron las actividades de las enzimas piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa (figura 25) ³⁵. En este sistema el ADP generado como producto de la reacción de fosforilación sirve de sustrato para la reacción catalizada por la piruvato quinasa. Esta enzima usa fosfoenolpiruvato y ADP para rendir piruvato y ATP. En este paso se regenera ATP que va a servir otra vez de sustrato de PknG. Por último, el piruvato es reducido por la lactato deshidrogenasa a expensas de NADH,

produciendo lactato y NAD. La reacción de oxidación de la molécula de NADH es muy conveniente para seguir cursos temporales tanto por absorbancia como por fluorescencia por las diferencias respecto su forma oxidada (NAD) en estas propiedades. El NADH presenta un máximo de absorción a 339 nm con un coeficiente de absorción molar de $\epsilon_{339} = 6.220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, y un máximo de emisión de fluorescencia a 460 nm. En cambio el NAD no absorbe ni emite fluorescencia a ninguna de esas longitudes de onda.

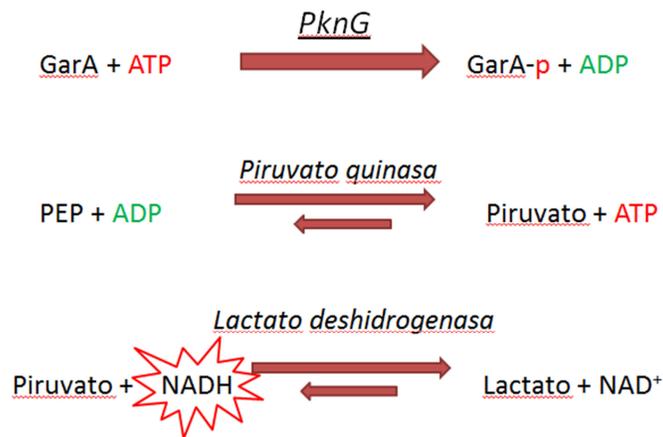


Figura 25. Reacciones presentes en el ensayo acoplado.

Determinación de concentración óptima de PK/LDH- Para que la velocidad del sistema dependa exclusivamente de la reacción de fosforilación es necesario que en el sistema enzimático las reacciones catalizadas por la PK y por la LDH no sean limitantes. Para asegurar tales condiciones, se midieron cursos temporales a diferentes concentraciones de PK y LDH. En todos los cursos temporales registrados se observaron cinéticas con dos etapas diferentes: una primera etapa rápida de corta duración (en los primeros 5 minutos de reacción) y una segunda etapa más lenta (figura 26). Se observó que para todas las medidas, la pendiente de la recta que mejor ajusta a los datos de los primeros 5 minutos se mantuvo constante, mientras que la segunda varió en función de la concentración de sustrato limitante. Suponemos que ese primer momento en la cinética se debe a la generación de ADP como producto de la autofosforilación de PknG. Por lo tanto a partir de las pendientes de los datos

registrados entre los minutos 5 y 20, y con la curva de calibración para NADH, se calcularon las velocidades iniciales para cada condición.

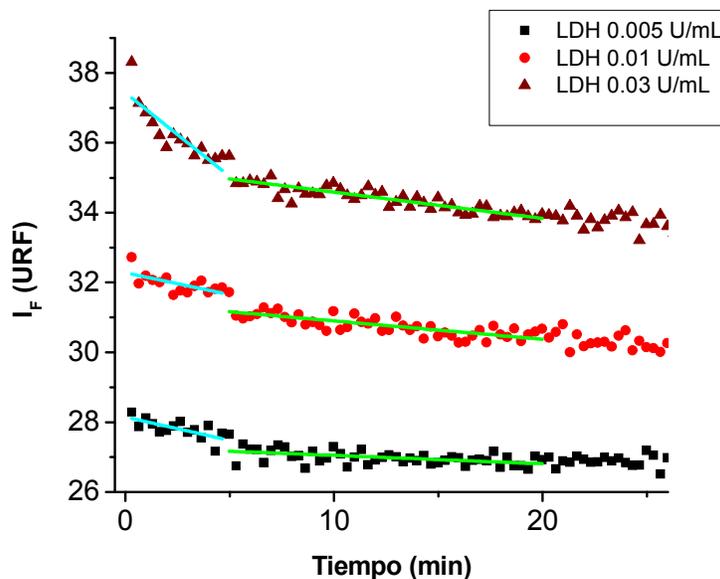


Figura 26. Algunos de los cursos temporales de reacción de fosforilación de GarA en ensayo acoplado a concentraciones crecientes de PK y LDH siguiendo la emisión de fluorescencia a $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ con $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$. $[\text{GarA}] = 35 \mu\text{M}$, $[\text{PknG}] = 2,5 \mu\text{M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

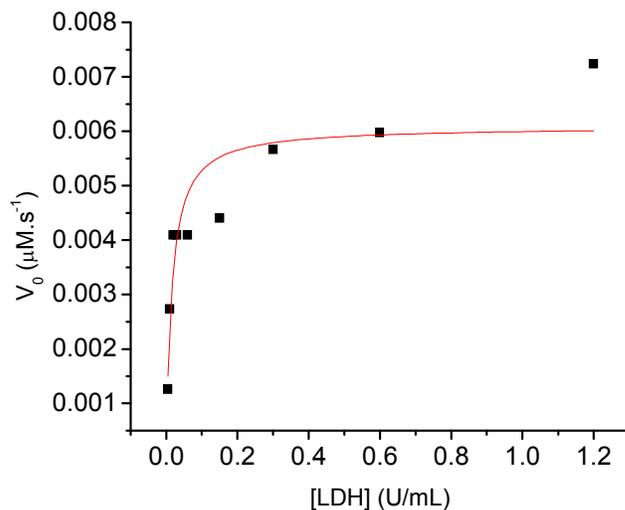


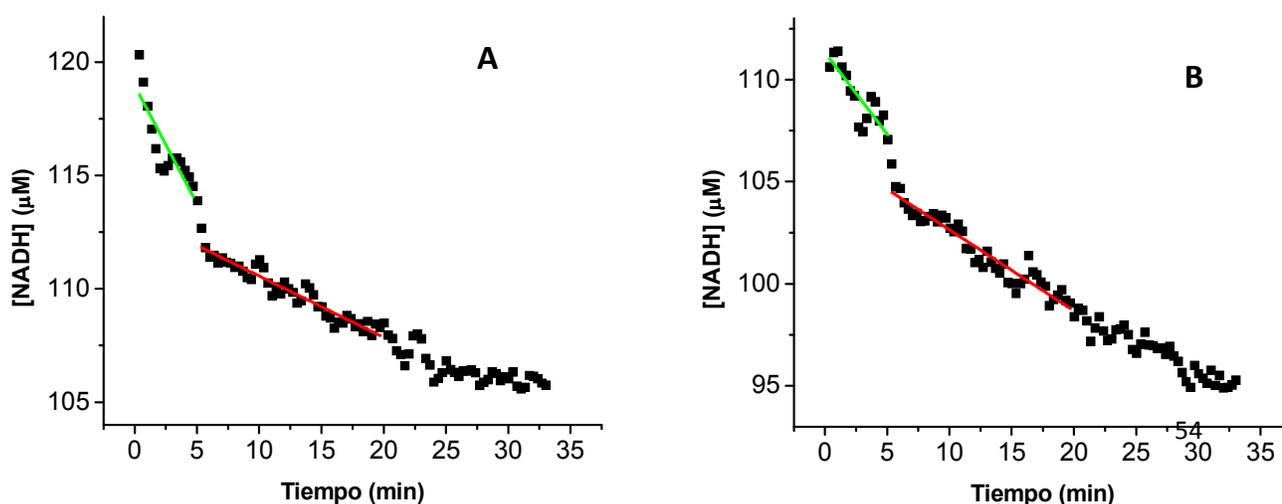
Figura 27. Curva de Michaelis-Menten de la oxidación de NADH a concentraciones crecientes de PK y LDH en el sistema acoplado. La curva roja representa la hipérbola que mejor se ajusta a los datos experimentales, cuyos parámetros se mencionan en el texto.

Una vez calculadas las velocidades se realizó un gráfico de Michaelis-Menten (figura 27), y los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 3)

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 3}$$

Los parámetros de la hipérbola que mejor ajustó a los datos experimentales fueron $V_{\max} = 0,006 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, y $K_m = 0,015 \text{ U/mL}$. Para asegurarse que el sistema PK/LDH funcione en forma saturada, en los siguientes experimentos se trabajó a concentración de LDH = 1.5 U/mL (cerca de 100 veces el valor de K_m).

Parámetros cinéticos de fosforilación- Se midieron los cursos temporales de fosforilación a concentraciones crecientes de GarA. Nuevamente se observan dos fases, la primera se atribuye a la reacción de autofosforilación de PknG, y la segunda a la fosforilación de GarA. Una vez determinadas las velocidades iniciales a partir de la segunda pendiente de los gráficos (de los datos entre los minutos 5 y 30, figura 28), se graficó la velocidad inicial en función de la concentración de GarA (figura 29), y se ajustaron los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten. Como controles se tomaron los registros de la reacción sin GarA, sin PknG, y solo de buffer. Para calcular las velocidades, se restaron las velocidades obtenidas en los controles sin PknG (la aparición de una pendiente correspondería a la hidrólisis espontánea de ATP), y del control sin GarA (El ADP generado por la autofosforilación de PknG contribuiría a las velocidades registradas). A partir de los parámetros de dicha hipérbola, se determinó $V_{\max} = 4.5 \times 10^{-8} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$ y $K_m = 1.8 \times 10^{-6} \text{ M}$. (tabla 7).



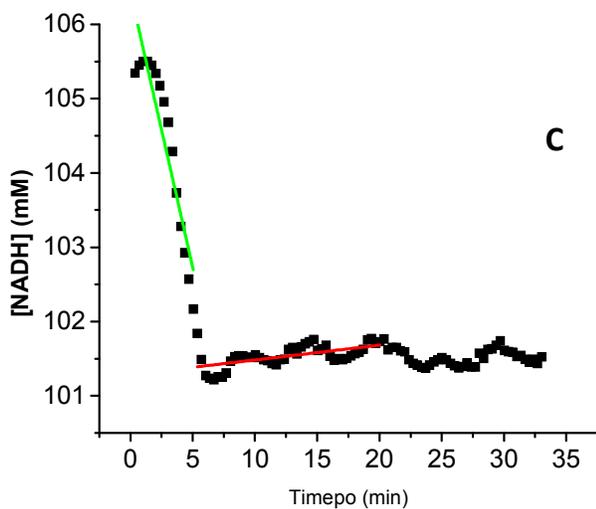


Figura 28. Ejemplos de cursos temporales de reacción de fosforilación de GarA por PknG. A) $[GarA] = 0.5 \mu M$; B) $[GarA] = 10 \mu M$. C) $[GarA] = 0 \mu M$. En los tres gráficos se observan en verde la recta que mejor ajusta a los datos experimentales de los primeros 5 minutos y en rojo la recta que mejor ajusta a los datos entre los minutos 5 y 30. $[PknG] = 2.5 \mu M$, $T = 25 \text{ }^\circ C$.

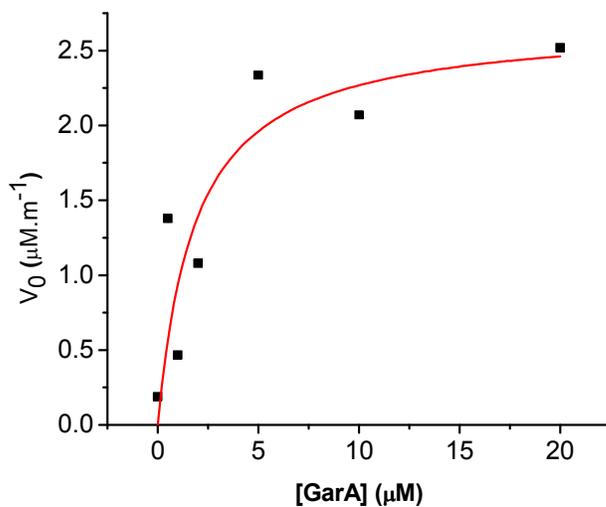


Figura 29. Curva de Michaelis-Menten de la oxidación de NADH a concentraciones crecientes GarA en el sistema acoplado. La curva roja representa la hipérbola que mejor se ajusta a los datos experimentales, cuyos parámetros se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de reacción de fosforilación de GarA por PknG

$V_{\text{máx}}$ (M.s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (M)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)	Referencia
4.5×10^{-8}	1.8×10^{-2}	1.9×10^{-6}	9.5×10^3	Este trabajo
	1.7×10^{-3}	2.1×10^{-6}	8.2×10^2	Tiwari <i>et al.</i> ¹⁶
	1.2×10^{-2}	nd	nd	Lisa <i>et al.</i> ³⁶

Los valores obtenidos se encuentran en el orden de los parámetros determinados por otros grupos por métodos no continuos^{16; 36} (tabla 7). Lisa y colaboradores³⁶ reportan una $k_{\text{cat}} = 1.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, valor muy similar al obtenido en este trabajo ($1.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). En cambio en el trabajo de Tiwari¹⁶ reportaron un valor de $k_{\text{cat}} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, que es un orden de magnitud menor. En cuanto a la K_m , con el ensayo acoplado se obtuvo el mismo valor que el único dato reportado previamente ($1.9 \times 10^{-6} \text{ M}$ en este trabajo, $2.1 \times 10^{-6} \text{ M}$ en¹⁶). La similitud de los datos obtenidos con los valores de la bibliografía valida nuestra metodología. Lo que llama la atención de estos parámetros es el bajo valor de recambio de la enzima, lo cual se refleja en que la velocidad máxima alcanzada en las condiciones evaluadas es realmente baja en comparación con las velocidades de catálisis enzimática promedio ($k_{\text{cat}} = 10 \text{ s}^{-1}$)³⁷. Sería interesante profundizar en el estudio del rol biológico de PknG, y de su mecanismo de acción para obtener conclusiones de por qué se trata de una enzima lenta (una molécula de PknG demora casi un minuto en fosforilar una molécula de GarA), aunque también podría deberse a que PknG no se encuentre plenamente activa en las condiciones evaluadas y que requiera la presencia de algún activador para alcanzar su máxima eficiencia catalítica.

Con este abordaje experimental se lograron determinar los parámetros cinéticos de PknG usando un método continuo fluorescente, sencillo, que utiliza un volumen de reacción final pequeño (100 μL), y que no implica los costos y las precauciones necesarias de las técnicas basadas en el uso de ATP radiactivo. La utilización de un sustrato fisiológico de la quinasa es una gran ventaja ya que es un componente importante para aproximarse a lo que ocurre

in vivo. Esta técnica podría ser utilizada como herramienta para continuar profundizando el estudio de PknG, pudiéndose evaluar su actividad en distintas condiciones de reacción, o en presencia de posibles moduladores de su actividad. Hay que tener en cuenta que la cantidad de componentes en el sistema es una de las desventajas de esta técnica. Para cada posible inhibidor deberían realizarse los controles correspondientes para confirmar que la inhibición no se da a nivel de las enzimas PK y LDH.

V.- Conclusiones

Los intentos por seguir los cursos temporales con GarA (sustrato *in vivo* de PknG) derivatizada con una sonda fluorescente no fueron exitosos. La ausencia de cambios en los espectros de emisión de fluorescencia de la forma fosforilada y sin fosforilar, indican que el pequeño cambio estructural de GarA no genera diferencias en la polaridad del entorno de la sonda fluorescente unida covalentemente.

Respecto a los experimentos de anisotropía de fluorescencia, en principio fue sorprendente haber obtenido un valor mayor de anisotropía para GarA fosforilada en comparación con GarA sin fosforilar. Como ya se discutió, esto puede deberse a múltiples causas. De todas formas no se observó ninguna tendencia en los datos experimentales que permitiera seguir el curso de reacción.

En los experimentos con ANS en la mezcla de reacción, la cinética observada no correspondió a la de la fosforilación catalizada por PknG, sino que posiblemente se trate de la agregación de la quinasa, la cual lleva a la exposición de regiones hidrofóbicas que unen ANS.

Finalmente se logró medir la actividad quinasa utilizando el ensayo acoplado reportado previamente en la literatura ³⁵, en el que se puede medir la generación de ADP como producto de la actividad quinasa indirectamente por la oxidación del NADH. A partir de este método se determinaron los parámetros $k_{cat} = 1.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $K_m = 1.9 \times 10^{-6} \text{ M}$.

VI.- Perspectivas

Para continuar este trabajo, se podría intentar la estrategia de ver cambios en la emisión de fluorescencia de GarA fosforilada y sin fosforilar por un abordaje experimental distinto al llevado a cabo en este trabajo. La limitación más importante de nuestra estrategia es la inespecificidad en cuanto a qué residuos son modificados en GarA por la sonda fluorescente. Para resolver este problema, se podría tomar ventaja del hecho de que GarA no posee ningún triptófano en su secuencia primaria, y por mutagénesis dirigida mutar algún residuo conveniente que logre percibir este cambio de polaridad en su entorno por un triptófano. Los criterios para elegir qué aminoácido mutar serían que el mismo se encuentre en una región cercana al brazo N-terminal o a la treonina 21, de manera que exista un cambio en la polaridad de su entorno tras la fosforilación, y que además no sea un aminoácido clave en la interacción con la quinasa. Los residuos tirosina 120, fenilalanina 29, lisina 141, y fenilalanina 142 (figura 30) cumplen con estos criterios, por lo que serían candidatos a ser mutados.

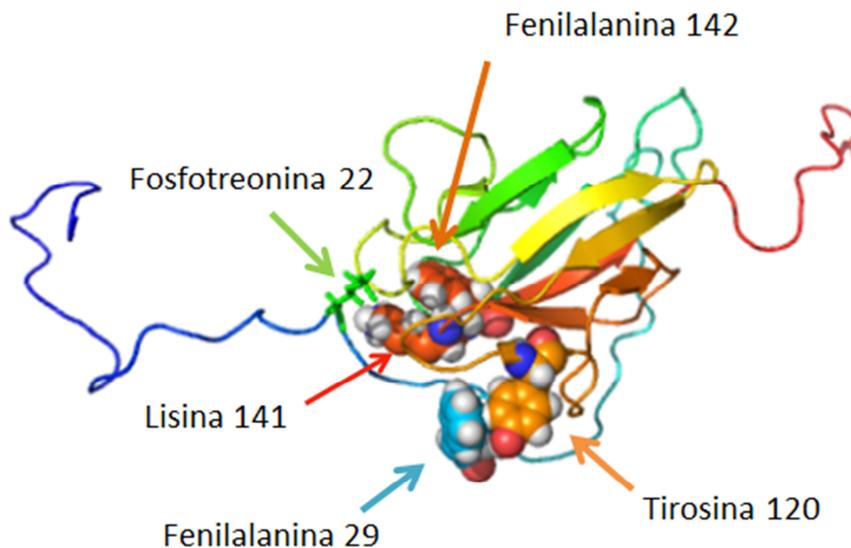


Figura 30. Estructura de GarA indicando aminoácidos candidatos a mutar por triptófanos.

VII.- Bibliografía

1. (2013). WHO Global Tuberculosis Report 2013. WHO.
2. Harper, C. (2007). Tuberculosis, a neglected opportunity? *Nat Med* **13**, 309-12.
3. Dorman, S. E. & Chaisson, R. E. (2007). From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med* **13**, 295-8.
4. Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G. & Pieters, J. (2004). Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* **304**, 1800-4.
5. Sturgill-Koszycki, S., Schaible, U. E. & Russell, D. G. (1996). Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J* **15**, 6960-8.
6. Hanks, S. K. & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**, 576-96.
7. Wurgler-Murphy, S. M., King, D. M. & Kennelly, P. J. (2004). The Phosphorylation Site Database: A guide to the serine-, threonine-, and/or tyrosine-phosphorylated proteins in prokaryotic organisms. *Proteomics* **4**, 1562-70.
8. Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Grana, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., Andre-Leroux, G., England, P., Takiff, H., Cervenansky, C., Cole, S. T. & Alzari, P. M. (2008). Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 193-202.
9. Av-Gay, Y. & Everett, M. (2000). The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol* **8**, 238-44.
10. Greenstein, A. E., Grundner, C., Echols, N., Gay, L. M., Lombana, T. N., Miecskowski, C. A., Pullen, K. E., Sung, P. Y. & Alber, T. (2005). Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in Mycobacterium tuberculosis. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 167-81.
11. Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-14.
12. Alber, T. (2009). Signaling mechanisms of the Mycobacterium tuberculosis receptor Ser/Thr protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 650-7.
13. Jayachandran, R., Scherr, N. & Pieters, J. (2012). Elimination of intracellularly residing Mycobacterium tuberculosis through targeting of host and bacterial signaling mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**, 1007-22.
14. O'Hare, H. M., Duran, R., Cervenansky, C., Bellinzoni, M., Wehenkel, A. M., Pritsch, O., Obal, G., Baumgartner, J., Vialaret, J., Johnsson, K. & Alzari, P. M. (2008). Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol Microbiol* **70**, 1408-23.
15. Scherr, N., Honnappa, S., Kunz, G., Mueller, P., Jayachandran, R., Winkler, F., Pieters, J. & Steinmetz, M. O. (2007). Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12151-6.
16. Tiwari, D., Singh, R. K., Goswami, K., Verma, S. K., Prakash, B. & Nandicoori, V. K. (2009). Key residues in Mycobacterium tuberculosis protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host. *J Biol Chem* **284**, 27467-79.
17. Gil, M., Grana, M., Schopfer, F. J., Wagner, T., Denicola, A., Freeman, B. A., Alzari, P. M., Batthyany, C. & Duran, R. (2013). Inhibition of Mycobacterium tuberculosis PknG by non-catalytic rubredoxin domain specific modification: reaction of an electrophilic nitro-fatty acid with the Fe-S center. *Free Radic Biol Med* **65**, 150-61.

18. Blatch, G. L. & Lasse, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-9.
19. Chao, J., Wong, D., Zheng, X., Poirier, V., Bach, H., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. (2010). Protein kinase and phosphatase signaling in Mycobacterium tuberculosis physiology and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 620-7.
20. Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S. T., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Cervenansky, C. & Alzari, P. M. (2005). Proteomic identification of M. tuberculosis protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J Mol Biol* **350**, 953-63.
21. Wolff, K. A., Nguyen, H. T., Cartabuke, R. H., Singh, A., Ogwang, S. & Nguyen, L. (2009). Protein kinase G is required for intrinsic antibiotic resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3515-9.
22. Nott, T. J., Kelly, G., Stach, L., Li, J., Westcott, S., Patel, D., Hunt, D. M., Howell, S., Buxton, R. S., O'Hare, H. M. & Smerdon, S. J. (2009). An intramolecular switch regulates phospho-independent FHA domain interactions in Mycobacterium tuberculosis. *Sci Signal* **2**, ra12.
23. Durocher, D. & Jackson, S. P. (2002). The FHA domain. *FEBS Lett* **513**, 58-66.
24. England, P., Wehenkel, A., Martins, S., Hoos, S., Andre-Leroux, G., Villarino, A. & Alzari, P. M. (2009). The FHA-containing protein GarA acts as a phosphorylation-dependent molecular switch in mycobacterial signaling. *FEBS Lett* **583**, 301-7.
25. von Ahsen, O. & Bomer, U. (2005). High-throughput screening for kinase inhibitors. *Chembiochem* **6**, 481-90.
26. Witt, J. J. & Roskoski, R., Jr. (1975). Rapid protein kinase assay using phosphocellulose paper absorption. *Anal Biochem* **66**, 253-8.
27. Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science* **1**, 41-55.
28. Rawitch, A. B. (1972). The rotational diffusion of bovine -lactalbumin: a comparison with egg white lysozyme. *Arch Biochem Biophys* **151**, 22-7.
29. Gonzalez, F. L. & Levi, A. (2003). Determination of the Molecular Size of BSA by Fluorescence Anisotropy. *Biochemistry and molecular biology education* **31**, 319-322.
30. Lide, D. (2005). *CRC, Handbook of Chemistry and Physics*. 85 edit.
31. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-23.
32. Chen, R. F. (1968). Fluorescent protein--dye conjugates. I. Heterogeneity of sites on serum albumin labeled by dansyl chloride. *Arch Biochem Biophys* **128**, 163-75.
33. Möller, M. (2002). Study of Protein-Ligand Binding by Fluorescence. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **30**, 309-312.
34. Weber, G. & Young, L. B. (1964). Fragmentation of Bovine Serum Albumin by Pepsin. I. The Origin of the Acid Expansion of the Albumin Molecule. *J Biol Chem* **239**, 1415-23.
35. Blondin, C., Serina, L., Wiesmuller, L., Gilles, A. M. & Barzu, O. (1994). Improved spectrophotometric assay of nucleoside monophosphate kinase activity using the pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupling system. *Anal Biochem* **220**, 219-21.
36. Lisa, N. (2015). Molecular basis of the activity and the regulation of the eukaryotic-like S/T protein kinase PknG from Mycobacterium tuberculosis. *Structure* **In press**.
37. Bar-Even, A., Noor, E., Savir, Y., Liebermeister, W., Davidi, D., Tawfik, D. S. & Milo, R. (2011). The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry* **50**, 4402-10.