



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios funcionales y estructurales en quinasas dependientes de ADP relacionadas con el metabolismo de glucosa en *Archaea*

Alejandra Margarita Herrera Morandé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAD DE FARMACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Estudios funcionales y
estructurales en quinasas
dependientes de ADP relacionadas
con el metabolismo de glucosa en
Archaea.

Tesis presentada por

ALEJANDRA MARGARITA HERRERA MORANDÉ

Barcelona 2015

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

Programa de Doctorado en Biotecnología

Estudios funcionales y estructurales en quinasas
dependientes de ADP relacionadas con el metabolismo
de glucosa en *Archaea*.

Tesis presentada por Alejandra Margarita Herrera Morandé para optar al
grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de:

Dra. M^a. Cristina Vega Fernández

Dra. Victoria Guixé Leguía



Tutora

Dra. Josefa Badia Palacin

“A mis padres y Guadalupe”

.

“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas”

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

Hoy, que me encuentro cercana a concluir esta etapa en mi vida, y que me ha permitido comenzar a formarme como científico, no puedo dejar de agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron y me permitieron llegar hasta aquí.

En primer lugar doy los más sinceros agradecimientos a mis directoras de tesis:

***Cristina**, quién depositó su confianza en mí, casi a ciegas y me invito a ser parte de su laboratorio en el Centro de Investigaciones Biológicas en Madrid, que hace casi cinco años atrás comenzaba a montar junto a Fran. Agradezco su apoyo y ayuda en los momentos complejos que ocurrieron mientras permanecí en Madrid, así como también, la convicción con la que dirigió este trabajo de tesis. A **Fran** le agradezco todo el conocimiento que generosamente me entregó, la paciencia y tiempo que tuvo para las múltiples dudas que aparecían mientras comenzaba a desarrollar la tesis.*

***Victoria Guixé**, la Profe, quien me abrió las puertas de su laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Chile, y me recibió con la mejor disposición para seguir trabajando en mi tesis. Agradezco infinitamente su preocupación y ayuda, en el plano científico y personal, sus acertados y sabios consejos, por las sugerencias para mejorar mi trabajo la tesis y apoyarme en la solución de cada inconveniente que surgía en el transcurso de la misma.*

*A mi tutora **Josefa Badia**, Pepita, quién no titubeó para acceder a mi petición de ser la tutora de esta memoria. Gracias por tu preocupación aquí en España y cuando partí a Chile a seguir esta travesía. Agradezco toda la ayuda que me brindaste en cada momento que lo necesite.*

*También, un especial agradecimiento a todos los compañeros con los que compartí en esta etapa, tanto en Chile como en España, y que con algunos hoy somos grandes amigos. A mi amiga **Fabi**, quien hizo de mi estadía en Madrid mejor de lo que ya era, con quien viví muchas alegrías y algunas penas. A mi gran amigo **Andrés**, que me propuso trabajar en esto de las quinzas de ADP, quién me recibió y me ayudó a incorporarme al Laboratorio en Chile., A mis queridos **Diego, Víctor y Ricardo (Mora)**, compañeros con quienes trabajamos a la par para conseguir que nuestros proyectos de tesis llegaran a puerto. Gracias por su paciencia, ayuda que siempre me dieron con la mejor de las disposición, y que hoy son grandes amigos que siempre me han apoyado en los momentos de cansancio y agobio cuando las cosas no funcionaban como se habían planeado, con los que esas largas conversaciones de lo social, de la política, de la vida y otras hierbas terminaban en De Niro's Bar.*

*No puedo dejar de mencionar a **Pablo, Cesar, Felipe Merino, Ricardo Cabrera, Rodrigo, Coté y Matías**, quiénes siempre han estado con la mejor disposición para ayudarme en lo que fuera. A mi queridísimo amigo **Cristián**, que me facilitó viniste a facilitarme mucho las*

*intensas sesiones de purificación de proteínas, y a mi **Nieves** que me recibiste con mucho cariño, muchas gracias por tu preocupación. Perdón si se me quedan algunos nombres en el tintero, pero son muchos con los que he tenido la oportunidad de compartir y han aportado para que estos últimos cuatro años hayan sido de muy buenos momentos y anécdotas.*

*A mis amigas de la vida **Kari, Andre, Angie, Cony, Coka, Clau, Feña, Lore y Moni**, que siempre estuvieron pendientes como iban las cosas con la tesis que siempre han hecho que la vida sea más alegre y entretenida.*

*A **mis padres** debo agradecer la mujer que he llegado a ser, que me enseñaron que la única manera de hacer las cosas es haciéndolas bien, sino, mejor que no se hagan. Gracias por enseñarme el valor del respeto, la humildad y por ser mis cables a tierra y, principalmente agradezco el apoyo que incondicionalmente me han brindado en todos mis proyectos, que a veces funcionan y otras no, pero como dice mi madre “así es la vida”. Gracias por su contención cuando no podía más, por sus abrazos que son la mejor inyección de energía que puedo tener. Los amo y los admiro con todo mí ser y, sin duda alguna, llegar hasta aquí no hubiese sido posible sin ustedes.*

*A mis queridísimos hermanos, **Natita, Joaquinito y Negro (Alberto)**, aunque estamos un poco dispersos en la vida, siempre hemos sido cómplices en todas nuestras historias y proyectos. Gracias por el apoyo y ánimo para continuar en mis locuras, los quiero infinitamente. A **Guadalupe**, la niña de mis ojos, la que me motiva a seguir en avanzando en la vida, y la que más se interesa por mi trabajo. Te adoro más allá de todo.*

*A mi **Lolita** le agradezco todo el apoyo y cariño que me dio cuando vivimos juntas en Madrid, eres una gran amiga y como mi mamá en España. A mi gran familia le agradezco su preocupación apoyo y compañía que siempre me han hecho sentir. A mi **Rosarito** que siempre estaba pendiente de mí, viejita tus plegarias parece que han servido.*

Gracias a todos y por todo, han significado mucho para conseguir este logro.

Gràcies a tots i per tot.

RESUMEN

Existen diversas vías conocidas utilizadas para producir piruvato a partir de la entrada de azúcar, que se acompaña por la síntesis de ATP y la producción de energía reductora. Entre ellas, se pueden mencionar las vías de Entner-Doudoroff o Embden-Meyerhof también conocida como glucólisis, que se encuentra bien conservada en los tres dominios de la vida. Sin embargo, en algunos organismos *Archaeas*, la vía glicolítica presenta algunas modificaciones entre las que destaca las enzimas quinasas que fosforilan glucosa y fructosa 6-fosfato utilizando ADP, en vez de ATP, como dador de grupo fosforilo. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia riboquinasa, puntualmente a la familia de quinasas dependientes de ADP, y están conformadas por un dominio menor y un dominio mayor el cual presenta un plegamiento tipo riboquinasa, común a todos los miembros de la superfamilia riboquinasa. La mayoría de estas quinasas han sido descritas en arqueas hipertermófilas como *T. litoralis*, y metanogénicas bifuncionales, con actividad glucoquinasa y fosfofructoquinasa, de *M. jannaschii* o *M. maripaludis*, aunque también se han encontrado en organismo eucarióticos como humano y ratones.

Actualmente existen pocos trabajos sobre quinasas dependientes de ADP que aborden la relación entre su función y estructura, o cómo la actividad de estas enzimas es regulada. En base a lo anterior, en este trabajo de tesis se propuso estudiar la enzima glucoquinasa de *Thermococcus litoralis* como modelo de una quinasa hipertermófila dependiente de ADP y determinar los determinantes estructurales en el mecanismo cinético y la especificidad por el nucleótido de adenina. Por lo tanto, se planteó como objetivo determinar la estructura de la glucoquinasa de *TIGK* en ausencia de sus ligandos (apo) y en complejo con glucosa y ADP (*TIGK*·ADP β S·Glc), para luego relacionarlos con el mecanismo de la enzima y conocer los residuos que participan en la unión de sus sustratos.

Los resultados demostraron que la enzima *TIGK* experimenta cambios en su conformación como consecuencia de la unión de sus ligandos. Hecho que fue comprobado a partir de las estructuras de las proteínas en su forma apo (2.0 Å de resolución) y en complejo ternario (2.5 Å de resolución), obtenidas a través

cristalografía de rayos-X, donde se distinguió que la proteína en su forma apo presenta una mayor distancia entre sus dominios (conformación abierta), mientras que en la estructura en complejo ternario esta distancia se reduce mostrando una estructura cerrada. Estos resultados se correlacionan con el mecanismo cinético de la enzima, que se estableció mediante estudios de cinética enzimática, y correspondió a un mecanismo ordenado en secuencia, donde la unión del primer sustrato, el complejo MgADP, gatilla el primer cambio en la conformación de la enzima *T/GK* seguido por la unión de glucosa provocando el cierre total de los dominios de la enzima. Además se determinó cómo la enzima coordina las interacciones entre los dominios menor y mayor para estabilizar la conformación cerrada y promover el paso a la conformación abierta.

Para evaluar la especificidad por el nucleótido, se generó una enzima que presentaba un cambio en su topología en la región β -meandro, que constituye casi por completo el sitio de unión del nucleótido y difiere entre las quinasas dependientes de ATP, de las dependientes de ADP. Para este objetivo se generó una versión permutante de la *T/GK* (*perGK*) que imita la topología de la región β -meandro de las quinasas dependientes de ATP. Los resultados del estudio de esta proteína *perGK* demostraron que la permutación no es suficiente para el cambio en la especificidad del nucleótido, lo que se confirmó midiendo la actividad de la enzima en presencia de ambos nucleótidos, ADP y ATP. Asimismo, los estudios cinéticos indicaron que el mecanismo de *perGK* es ordenado en secuencia, no obstante, el orden de unión de los sustratos varió, respecto a lo que observado para la enzima *T/GK*. Estos cambios fueron avalados en las estructuras cristalinas de la proteína *perGK* en su forma apo en conformación abierta (2.14 Å) en complejo con glucosa (1.95 Å) y el complejo ternario (2.44 Å), generadas por cristalografía de rayos-X. A partir de estas estructuras, se infiere que la enzima *perGK* sufre un cambio en su conformación luego que se une glucosa, no así con la unión de MgADP, en claro contraste con *T/GK*. Estos resultados indican que este cambio en la topología, posiblemente, haya sido uno de los cambios estructurales que experimentaron estas enzimas, de la superfamilia de riboquinasas, a lo largo de su historia evolutiva para transformarse a quinasas dependientes de ADP.

A la fecha, la enzima dependiente de ADP de *M. jannaschii* (*MjPfk/GK*), que posee las dos actividades fosfofructoquinasa y glucoquinasa en la misma cadena polipeptídica, es la única enzima caracterizada de este tipo del orden de las *Methanococcales*, por lo que se desconoce si este carácter dual de la enzima bifuncional es un rasgo particular de *MjPfk/GK*, o si es una característica común de los miembros de este orden.

En este estudio se determinó que el mecanismo cinético de la enzima *MjPfk/GK* es en secuencia para ambas reacciones, y que esta enzima solo tiene la capacidad de fosforilar glucosa y fructosa-6-fosfato, siendo por tanto muy específica de la vía glicolítica. Por otra parte, se confirmó que la enzima fosfofructoquinasa del mesófilo *M. maripaludis* presenta actividad glucoquinasa además de actividad fosfofructoquinasa lo que indica que este rasgo bifuncional es común a otros miembros del orden *Methanococcales*, y que quizá se trate de un rasgo compartido en muchas enzimas homologas. Finalmente, se dilucidó que la actividad glucoquinasa en ambas enzimas bifuncionales se ve afectada por las concentración libre de Mg^{2+} y por el producto de la reacción AMP, lo que nos lleva a pensar que estos metabolitos pueden ser claves para promover la vía glicolítica actuando como un sensor de la disponibilidad de energía celular aportada por ADP o ATP.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	i
INDICE DE CONTENIDO	v
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE TABLAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Archaea	3
Superfamilia riboquinasa.....	6
Familia de quinasa de azúcares dependientes de ADP	9
CAPITULO 1: Estudio estructural de la proteína <i>TIGK</i> en su forma Apo y en complejo con Mg·ADPβS·D-Glucosa.	15
I. INTRODUCCIÓN.....	19
II. HIPÓTESIS.	25
III. OBJETIVOS	25
III. I. Objetivos generales	25
III.II. Objetivos específicos	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
IV. I. Material	29
IV. I. 1. Material biológico	29
IV. I. 2. Enzimas.....	29
IV. I. 3. Medios de cultivo	29
IV. I. 4. Reactivos y materiales químicos	30
IV. II. Metodología.....	30
IV. II. 1. Crecimiento de células E.coli BL21 (DE3) pLysS-pET17b-glkA para la purificación de la proteína recombinante glucoquinasa de <i>T. litoralis</i>	30
IV. II. 2. Purificación de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i>	31
IV. II. 3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.....	32
IV. II. 4. Determinación de la actividad enzimática.....	32

IV. II. 5. Preparación de la muestra de proteínas para los ensayos de cristalización	33
IV. II. 6. Determinación de la concentración de proteínas	33
IV.II.7. Cristalización, colección de datos y resolución de la estructura de la enzima <i>TIGK</i> en su forma Apo y en complejo con ADP-Mg-Glucosa	34
IV.II.7.1. Ensayos de cristalización.....	34
IV. II. 7.2. Crioprotección.....	35
IV. II. 7.3. Recogida y procesamiento de datos de difracción	36
IV.II. 7.4. Resolución y refinamiento de estructura.....	37
V. RESULTADOS.....	43
V. I. Purificación de la enzima <i>TIGK</i>.....	43
V. II. Determinación de la estructura de <i>TIGK</i> en su forma apo y en complejo con sus ligandos.....	44
V. III. Descripción del sitio de unión de ADP y D-glucosa en la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i>.....	48
V. IV. Mecanismo cinético de la glucoquinasa <i>TIGK</i>.....	51
VI. DISCUSIÓN	59
CAPITULO 2: Determinación de la especificidad por nucleótido de la proteína mutante perGK.....	63
I. INTRODUCCIÓN.....	67
II. HIPÓTESIS	73
III. OBJETIVOS.....	73
III.I. Objetivo general.....	73
III.II. Objetivos específicos	73
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	77
IV.I. Material	77
IV. I. 1. Material biológico	77
IV. I. 2. Enzimas.....	77
IV. I. 3. Sistema de purificación de PCR y DNA plasmidial	78
IV. I. 4. Medios de cultivo	78
IV. I. 5. Materiales químicos y reactivos.....	78
IV. II. Metodología.....	78
IV. II. 1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	78

IV. II. 2. Crecimiento de las células de <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS-pET17b-perGK para la purificación de la proteína glucoquinasa mutada (perGK) de <i>T. litoralis</i>	79
IV. II. 3. Purificación de la proteína mutada de glucoquinasa perGK.....	79
IV. II. 4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.....	80
IV. II. 5. Preparación de la muestra de proteína perGK para ensayos cristalográficos	80
IV. II. 6. Determinación de la concentración de proteínas	80
IV. II. 7. Cristalización, colección y estadística de los datos de la difracción de rayos-X de la enzima perGK en su forma Apo y en complejo con ADP-Mg-Glucosa	81
IV. II. 7. 1. Ensayos de cristalización.....	81
IV. II. 7. 2. Crioprotección.....	81
IV. II. 7. 3. Colección y procesamiento de los datos de difracción.....	81
IV. II. 7. 4. Resolución y refinamiento de estructura perGK.....	82
IV. II. 8. Determinación de la actividad enzimática.....	82
IV. II. 9. Determinación de constantes cinéticas, K_M y k_{cat}	84
IV. II. 10. Determinación del mecanismo cinético.	84
IV. II. 11. Determinación de la concentración de los sustratos.	87
IV. II. 12. Validación del mecanismo cinético mediante ajustes globales	87
RESULTADOS.....	91
V.I. Purificación de la enzima perGK	91
V. II. Determinación del uso de ATP o ADP de la proteína perGK	92
V.III. Mecanismo cinético	93
V. III. 1. Estudios cinéticos en velocidad inicial	93
V. III. 2. Ensayos de inhibición por producto.....	95
V.III. 3. Inhibición por análogos de sustratos	100
V. III.4 Ajuste de los datos de las determinaciones cinéticas.....	105
V. III. 5. Validación del mecanismo cinético mediante ajustes globales	117
V. IV. Determinación de la estructura de la enzima permutante perGK en su forma Apo, en complejo con D-glucosa y en complejo ternario perGK-D-glucosa-ADPβS.....	121
V. V. Descripción del sitio de unión de los ligandos D- glucosa y ADP β S.....	127
V. V. 1. Sitio de unión de MgADP	127
V. V. 2. Sitio de unión de D- glucosa	129
VI. DISCUSIÓN	133
CAPITULO 3: Regulación de la actividad enzimática en enzimas bifuncionales fosfofructoquinasa /glucoquinasa dependientes de ADP del orden <i>Methanococcales</i>.	139
I. INTRODUCCIÓN.....	143

II. HIPÓTESIS	149
III. OBJETIVOS	149
III.I. Objetivos generales	149
III.II. Objetivos específicos.	149
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	153
IV.I. Material	153
IV. I.1 Material biológico	153
IV. I. 2. Enzimas	153
IV. I. 3 Sistema de purificación de PCR y DNA plasmídico	154
IV. I. 4. Medios de cultivo	154
IV. I. 5. Materiales químicos y reactivos.....	154
IV. II. Metodología	154
IV. II. 1. Síntesis, expresión y purificación de proteínas <i>MmPfk/GK</i> y <i>MjPfk/GK</i>	154
IV. II. 2. Cuantificación de proteínas.....	155
IV. II. 3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.....	155
VI. II. 4. Determinación de la actividad enzimática.....	155
VI.II. 5. Determinación de parámetros cinéticos: k_{cat} , K_m y V_{max}	157
V. RESULTADOS	161
V.I.1. Purificación de la enzima bifuncional <i>MjPfk/GK</i> y <i>MmPfk/GK</i>	161
V. II. Determinación de mecanismo cinético de <i>MjPfk/GK</i>.	162
V. III. Especificidad por sustrato azúcar.	168
V. IV. Determinación de la actividad bifuncional y parámetros cinéticos aparentes (K_M y k_{cat}) de fosfofructoquinasa de <i>M. maripaludis</i> (<i>MmPfk/GK</i>)	169
V. V. Estudios de regulación por Mg^{2+} y AMP en <i>MjPfk/GK</i> y <i>MmPfk/GK</i>.....	172
VI. DISCUSIÓN	177
CONCLUSIONES GENERALES.	185
REFERENCIAS	189
ANEXOS	199
PUBLICACIONES	199

CONGRESOS.....	200
FUENTES DE FINANCIAMIENTO.....	201

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de representación filogenética de los tres dominios de la vida.....	4
Figura 2. Representación de las tres familias de quinasas de la superfamilia Riboquinasa.....	8
Figura 1.1. Dominios en la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i>	18
Figura 1.2. Esquema de las reacciones acopladas para determinar la actividad glucoquinasa	27
Figura 1.3. Representación del método de difusión de vapor para la cristalización de proteínas	28
Figura 1.4. Esquema que muestra las variantes para la técnica de cristalización por difusión de vapor	29
Figura 1.5. Análisis de SDS-PAGE para las diferentes etapas de purificación de la enzima <i>TIGK</i>	35
Figura 1.6. Cristales del complejo ternario de la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i>	37
Figura 1.7. Estructura de la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i> en su forma apo y en complejo ternario (<i>TIGK</i> ·MgADPβS·D-glucosa).....	40
Figura 1.8. <i>TIGK</i> en contacto con sus ligandos.....	41
Figura 1.9. Grupo de interacciones entre el dominio menor y mayor de <i>TIGK</i> que se establecen en las transiciones conformacionales desde la forma abierta a cerrada	43
Figura 1.10. Análisis cinético del estado estacionario de la reacciones bisustrato.	44

Figura 1.11. Estudios de velocidad inicial para los sustratos MgADP y glucosa.....	45
Figura 1.12. Patrones de inhibición por producto para <i>TIGK</i>	47
Figura 2.1. Diagrama de la composición la sábana β central del plegamiento tipo riboquinasa.....	57
Figura 2.2. . Esquema de la región β -meandro de <i>TIGK</i> y riboquinasa de <i>E.coli</i>	59
Figura 2.3. Ensayo acoplado utilizado para medir la actividad de perGK de <i>T. litoralis</i> en presencia de ATP.....	69
Figura 2.4. Ensayo acoplado utilizado para medir la actividad de perGK de <i>T. litoralis</i> catalizando la reacción reversa.....	70
Figura 2.5. SDS-PAGE para los diferentes pasos de purificación de la enzima permutante <i>TIGK</i>	75
Figura 2.6. Determinación de la actividad glucoquinasa en presencia de ATP y ADP.....	76
Figura 2.7. Curvas de saturación para glucosa y MgADP.	78
Figura 2.8. Estudios de velocidad inicial para los sustratos glucosa y complejo MgADP.....	79
Figura 2.9. Estudios de inhibición del producto MgAMP.....	82
Figura 2.10. Estudio de inhibición por el producto glucosa sobre glucosa-6-fosfato.....	84
Figura 2.11. Estudios de inhibición de punto muerto con el análogo de sustrato 1, 5-anhidroglucitol en presencia de los sustratos MgADP y glucosa.....	86

Figura 2.12. Estudios de inhibición de punto muerto con el análogo de sustrato MgATP en presencia de los sustratos MgADP y glucosa.....	88
Figura 2.13 Gráficas secundarias para la determinación de los parámetros cinéticos asumiendo un mecanismo cinético secuencial ordenado.....	91
Figura 2.14. Gráficas secundarias para la determinación del efecto del producto glucosa sobre los parámetros cinéticos para de glucosa 6-fosfato.....	95
Figura 2.15. Gráficas secundaria para la determinación del efecto del producto MgAMP sobre los parámetros cinéticos de los sustratos glucosa y MgADP.....	96
Figura 2.16. Gráficas secundarias para determinar el efecto de los análogos de sustrato 1,5 anhidro D-glucitol sobre os parámetros de los sustratos glucosa y MgADP.....	99
Figura 2.17. Gráficas secundarias para determinar el efecto de los análogos de sustrato MgATP ⁻² sobre los parámetros de los sustratos glucosa y MgADP.....	100
Esquema 2.1. Mecanismo de reacción secuencial ordenado Bi-Bi...	105
Figura 2.18. Cristal de proteínas perGK en complejo con D-glucosa.....	105
Figura 2.19. Estructuras tridimensionales de la proteína perGK de <i>T. litoralis</i> obtenidas en diferentes condiciones	109
Figura 2.20. Superposición de las estructuras tridimensionales de la proteína perGK obtenida en distintas condiciones.....	110

Figura 2.21. Diagrama de la topología de la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i> y su versión permutada.....	111
Figura 2.22. Residuos que conforman el bolsillo de unión del nucleótido.....	113
Figura 2.23. Residuos que forman el sitio de unión a glucosa.....	114
Figura 2.24. Representación de los elementos secundarios involucrados en la unión del nucleótido.....	118
Figura 3.1. Árbol filogenético de la rama de <i>Methanococcales</i> para la familia de quinasas de azúcar dependientes de ADP.....	125
Figura 3.2. Ensayo acoplado utilizado para medir la actividad fosfofructoquinasa de la enzima <i>MjPfk/GK</i> y <i>MmPfk/GK</i>	132
Figura 3.3. SDS-PAGE para las diferentes fracciones eluidas de la proteína <i>MjPfk/GK</i> y <i>MmPfk/GK</i>	135
Figura 3.4. Estudios de velocidad inicial de los sustratos glucosa y MgADP en la actividad glucoquinasas catalizada por <i>MjPfk/GK</i>	137
Figura 3.5. Estudios de velocidad inicial de los sustratos fructosa 6-fosfato y MgADP en la actividad fosfofructoquinasa.....	139
Figura 3.6. Gráficas secundarias construidas para la determinación de los parámetros cinéticos asumiendo un mecanismo cinético secuencial ordenado	141
Figura 3.7. Determinación de la actividad quinasa dependiente de ADP utilizando diferentes azúcares como aceptor de fosforilo	142
Figura 3.8. Curva de saturación para los sustratos glucosa Fructosa 6-P y MgADP para las actividades glucoquinasa (GK) y fosfofructoquinasa (PFK).....	144

Figura 3.9. Efecto de AMP sobre la actividad glucoquinasa (GK) en enzimas bifuncionales del orden *Methanococcales*.....147

Figura 3.10. Representación del sitio de unión de AMP en *M. jannaschii* y *M. maripaludis*.....153

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Estadística de los datos cristalográficos y de refinamiento.....	38
Tabla 1.2. Patrones de inhibición.....	46
Tabla 2.1. Patrones de inhibición para enzimas Bi-sustrato y representaciones de Cleland para determinar mecanismos cinéticos.....	72
Tabla 2.2. Parámetros cinéticos de la reacción para MgADP y glucosa para la reacción catalizada por la enzima perGK de <i>T. litoralis</i>	91
Tabla 2.3. Resumen de parámetros cinéticos para los sustratos glucosa y MgADP, para la reacción catalizada por la enzima <i>TIGK</i> permutante.....	93
Tabla 2.4. Resumen de parámetros cinéticos obtenidos a partir de los ensayos de inhibición por producto.....	97
Tabla 2.5. Resumen de parámetros cinéticos obtenidos a partir de los ensayos de inhibición por análogo de sustrato	101
Tabla 2.6. Colección de datos y estadística de refinamiento.....	107
Tabla 3.1. Resumen de parámetros cinéticos para los sustratos glucosa, fructosa 6-fosfato y MgADP, para las reacciones catalizadas por la enzima <i>MjPfk/GK</i>	141
Tabla 3.2. Resumen de los parámetros cinéticos para los sustratos glucosa, fructosa 6-fosfato y MgADP de las reacciones catalizadas por <i>MmPfk/GK</i>	145
Tabla 3.3. Efecto del catión divalente Mg ⁺² sobre la actividad glucoquinasa para las enzimas bifuncionales <i>MjPfk/GK</i> y <i>MmPfk/GK</i>	146

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina 5-difosfato
ADP β S	adenosina 5'- β -tio-difosfato
ADP-Glc	Adenosina difosfato-glucosa.
AMP	Adenosina 5-monofosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
EA	Complejo enzima-sustrato A
EB	Complejo enzima sustrato B
EAB	Complejo tenario enzima sustrato A y sustrato B
EP	Complejo producto P
EPQ	Complejo enzima producto P y producto Q
EQ	Complejo enzima producto Q
ES	Complejo enzima sustrato
ESI	Complejo enzima inhibidor
G6P	Glucosa 6 fosfato
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
Glc	Glucosa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Embden-Meyerhof
F6P	Fructosa-6-fosfato
GK	Glucoquinasa
HEPES	Acido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetanosulfónico
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

KDa	kilo Dalton
K_i	Constante de Inhibición
k_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{cat}/K_M	Constante de eficiencia catalítica o de especificidad
LB	Luria-Bertani
<i>MjPfk/GK</i>	Fosfofructoquinasa/glucoquinasa de <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
<i>MmPfk/GK</i>	Fosfofructoquinasa/glucoquinasa de <i>Methanococcus maripaludis</i>
NAD ⁺	Forma oxidada de Nicotinamida dinucleotido
NADH	Forma reducida de Nicotinamida dinucleotido
PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida
Pb	Pares de base
PEG	Polietilenglicol
PFK	Fosfofructoquinasa
PIPES	Ácido piperazina-N, N'-bis (2-etanosulfónico)
<i>PhPFK</i>	Fosfofructoquinasa de <i>Pyrococcus horikoshii</i>
SAXS	Dispersión de rayos-X a bajo ángulo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tampón Tris-Ácido acético-EDTA
TEMED	N'-tetrametiletilenamina
TEV	Proteasa del virus del tabaco
<i>TIGK</i>	Glucoquinasa de <i>Thermococcus litoralis</i>
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Archaea

Hace más de tres décadas, 1977, Carl Woese y George Fox realizaron análisis filogenéticos basados en la caracterización de secuencias de la subunidad pequeña del ARN ribosomal en organismos procariontes que compartían características comunes con representantes del dominio de las bacterias, pero que habitaban en ambientes extremos, principalmente a altas temperaturas¹. A partir de las observaciones de este estudio se señaló que los organismos procariotas podían clasificarse en dos grupos. Uno de ellos contenía las bacterias típicas, denominadas como eubacterias, mientras que el segundo grupo contenía organismos mayormente metanogénicos el cual fue denominado como arqueobacterias. En la década de los 90' Woese y colaboradores, establecieron a las **Archaea** como el tercer dominio de la vida junto con los dominios *Eucarya* y *Bacteria*, resultando una nueva rama al árbol filogénico de la vida en la tierra² (**Figura 1**).

Dentro del dominio de las *Archaea* se encuentran dos phylas principales: *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*³ que incluyen la mayoría de las arqueas. Sin embargo existen otros cuatro grupos filogenético conocido como a *Nanoarchaeota*, *Korarchaeota*, *Thaumarchaeota* y recientemente se ha propuesto un nuevo phyla *Aigarchaeota*⁴. En el phylum *Euryarchaeota* encontramos organismos metanogénicos y halófilos extremos y algunas especies termo-ácida, termófilos e hipertermófilo con diversa fisiología². En cambio el phylum *Crenarchaeota* contiene solo especies hipertermófilas. *Nanoarchaeota* comprende dos especies, *Nanoarchaeum equitans*, la cual puede crecer en co-cultivo con el organismo *Crenarchaeota* *Innococcus hospitalis* y *NstI* el cual probablemente es hospedero de *Sulfolobales*. En tanto, los organismos del phylum *Korarchaeota* presentan organismos hipertermófilos no cultivables, mientras que en el phylum *Thaumarchaeota* se han descrito dos representantes los que se caracterizan por ser quimilitoautotrofos. No obstante sigue en discusión si, el phylum *Aigarchaeota* corresponde a un linaje del phylum, *Thaumarchaeal*, o si es un nuevo phylum dado que solo se ha identificado un miembro denominado HWCG1⁵.

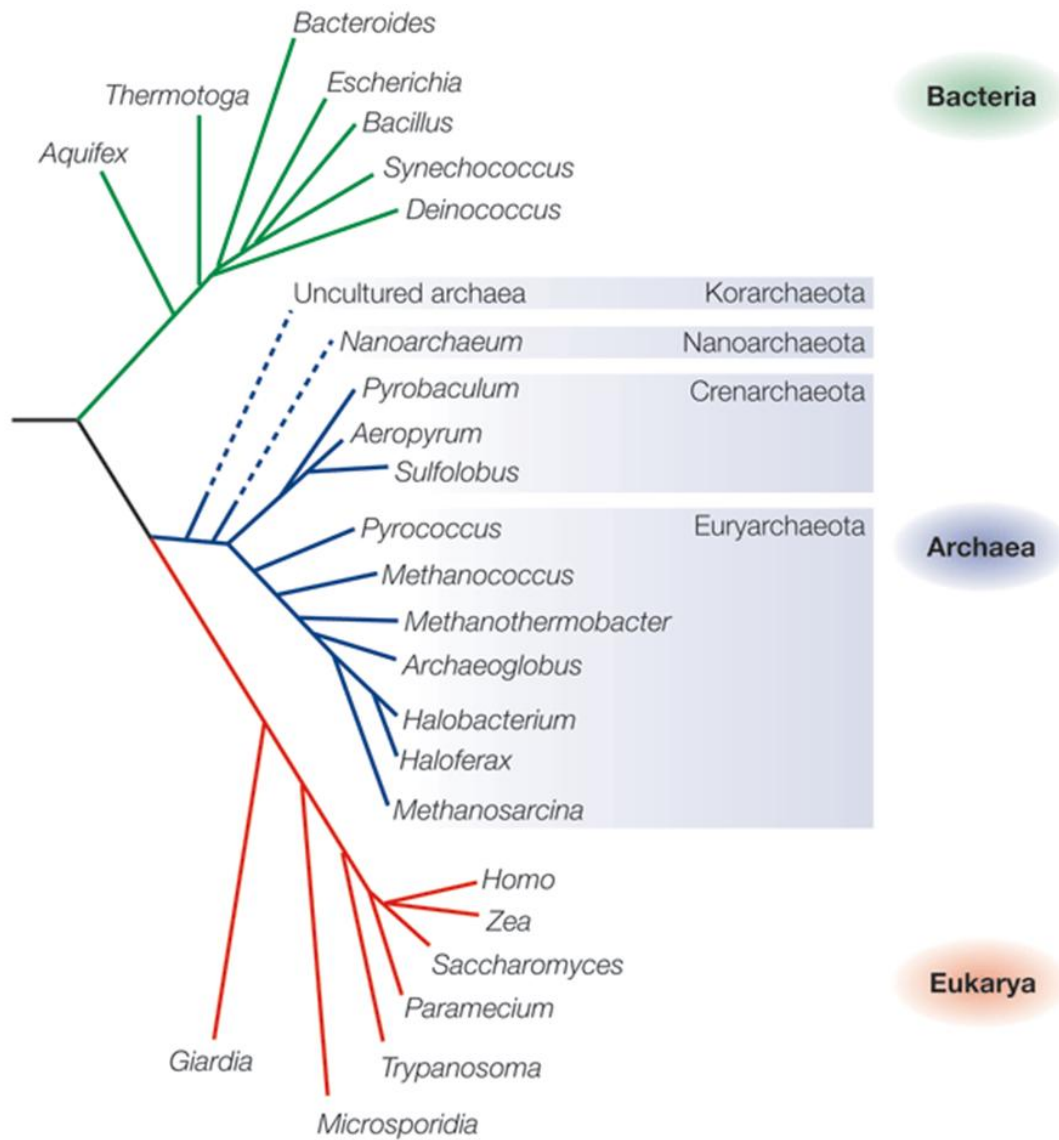


Figura 1. Esquema de representación filogenética de los tres dominios de la vida. El dominio de las Bacteria se muestra en verde, mientras que el dominio de las Archaea en azul y en rojo se muestran los representantes del dominio Eukarya³.

Los organismos del dominio *Archaea* se relacionaron con hábitats bastantes hostiles como salares, suelos ácidos, volcanes, geiseres, glaciares, entre otros. Con el transcurso del tiempo y el interés que generó el estudio de los representantes perteneciente a este dominio, se demostró que muchos organismos son capaces de habitar en todo tipo de ambiente, considerando a estos organismos como los más ampliamente distribuidos en la tierra conocidos hasta ahora. Esta característica despertó mucho interés en científicos debido al gran potencial biotecnológico⁶. Por lo tanto, al estudiar diferentes aspectos relacionados al metabolismo de estos

organismos, tal como proteínas, enzimas o metabolitos, pueden servir como herramienta para entender cómo son las rutas metabólicas, las estrategias que se emplean para llevar a cabo sus funciones, o comprender qué características estructurales de estas enzimas que les han permitido hasta el día de hoy llevar a cabo sus funciones bajo condiciones extremas.

En el dominio *Archaea* se encuentran grupos heterogéneos de microorganismos, que comparten características generales que consisten principalmente en la presencia de membranas lipídicas que contienen cadenas laterales isoprenoides con enlaces éter, en contraste con los enlaces ésteres presentes en los demás sistemas biológicos; además carecen de ácido murámico (peptidoglicano) como constituyente de la pared celular⁷. Respecto al metabolismo, las *Archaea* carecen de diversas vías metabólicas clásicas conocidas en *Bacteria* y *Eucarya*, aunque se hallan vías metabólicas propias de este dominio como, por ejemplo, vías metabólicas para la formación de metano, así como también presentan vías metabólicas clásicas modificadas, especialmente en las vías del metabolismo de hidratos de carbono. A pesar de estas diferencias con los otros dominios de la vida, las *Archaea* exhiben características que también están presentes en el dominio de las *Bacteria*, tales como, la carencia de organelos y su similitud en el tamaño y morfología. Por otra parte, la estructura del ADN se asemeja a la de las bacterias ya que ambos presentan ADN cromosómico circular pequeño con un único origen de replicación⁸ y, también se observan ADN plasmidial y elementos regulatorios como operones. Sin embargo, la mayor parte del mecanismo involucrado en el procesamiento de la información genética, tal como la replicación, transcripción, traducción y reparación, es más semejante a los de eucariotas^{9,3}. Estos antecedentes llevaron a Margulis en 1996 a proponer la hipótesis que propone que los organismos del dominio de las *Eucarya* son el resultado de la interacción endosimbiótica entre *Bacteria* y *Archaea*¹⁰.

En los tres dominios de la vida, la fuente de carbono más comúnmente utilizada por organismos heterótrofos son los azúcares. Hay varias vías conocidas que degradan azúcares como glucosa o galactosa para producir piruvato. La más universal es la vía de Embden-Meyerhof (EM) o glucólisis¹¹, aunque unos pocos microorganismos pueden utilizar la vía Entner-Doudoroff (ED)¹².

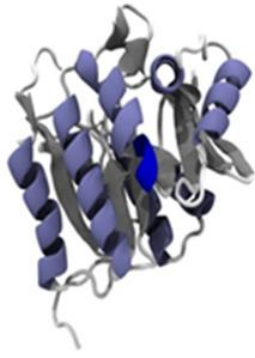
El metabolismo central de los organismos del dominio *Archaea* exhibe cierta complejidad debido a la modificación de las vías metabólicas clásicas de *Bacteria* y *Eucarya*. Estudios bioquímicos comparativos sobre el metabolismo de carbohidratos en *Archaea* reveló que los organismos de este dominio utilizan versiones modificadas de las rutas responsables de la degradación de hidratos de carbono tanto en la vía de ED, así como también en la glicólisis. Por ejemplo, miembros del género *Thermoproteus*, *Thermoplasma* y *Sulfolobus* utilizan una versión modificada de la vía de ED para la degradación de glucosa, donde la fosforilación del azúcar se realiza a nivel de los metabolitos 2-ceto-3-deoxigluconato o glicerato, mientras que en algunos miembros del phylum *Euryarchaeota*, como *Pirococcus furiosus*, se observan modificaciones significativas en la vía glicolítica, en que solo cuatro de las diez enzimas que oxidan glucosa a piruvato, y que están en *Bacteria* y *Eucarya*, se encuentran conservadas. En organismos *Euryarchaeota* las reacciones redox de la vía de EM son llevadas a cabo por enzimas que contienen ferredoxina, donde la transferencia de electrones y la producción de H₂ están acopladas a la translocación de protones a través de la membrana, mediante la enzima hidrogenasa, generando una fuerza electrón motriz que permite a la enzima ATP sintasa, sintetizar ATP, a partir de ADP y fosfato inorgánico¹³. Por otra parte, *Euryarchaeota* del orden *Methanococcales*, *Thermococcales* y *Pirococcales* presentan modificaciones interesantes en la vía EM que se relacionan con la fosforilación de glucosa y fructosa 6-fosfato (F6P), reacciones que son llevadas a cabo por quinasas que usan ADP en vez de ATP como dador del grupo fosforilo^{11, 14}.

Superfamilia riboquinasa

Desde el punto de vista metabólico, la fosforilación de azúcares se reconoce como un paso clave en las principales vías metabólicas. Las enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosforilo a un azúcar aceptor son conocidas como quinasas de azúcar; éstas han sido clasificadas de acuerdo a criterios estructurales y motivos de secuencia conservados y se dividen en tres familias conocidas como, familia hexoquinasas, galactoquinasa y riboquinasa¹⁵. En un inicio, la clasificación de los miembros de la familia riboquinasa se realizaba según el grado de relación evolutiva observado en el análisis de secuencia, puesto que, pese a que había una baja identidad

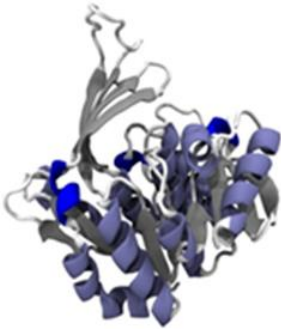
de secuencia era posible encontrar regiones conservadas comunes a todos los representantes de la familia¹⁶, la que se componía de un número pequeño de enzimas tales como: 6-fosfofructoquinasa de *E. coli*, 1-fosfofructoquinasa, tagatosa 6-fosfato quinasa, e inosina quinasa¹⁶. Sin embargo, a finales de la década de los 90' Sigrell y colaboradores determinó la estructura cristalográfica de la enzima riboquinasa de *E.coli*¹⁷, lo que permitió clasificar a las enzimas de la familia riboquinasa desde un punto de vista estructural, de esta manera se fueron incluyendo muchas otras quinasa, tales como adenosina quinasa¹⁸, 2-ceto-3-deoxigluconato quinasa¹⁹ 2-dehidro-3-deoxiglucoquinasa, 4-metil-5- β -hidroxietiltiazol quinasa²⁰ glucoquinasa dependiente de ADP²¹. Debido a la diversidad de representantes de la familia riboquinasa ésta fue renombrada como superfamilia riboquinasa, donde sus miembros se clasificaron según el tipo de aceptor (azúcar o vitaminas) y dador del grupo fosforilo (ADP o ATP) y desde el punto de vista estructural según la presencia/ausencia de dominio menor²².

Las enzimas que pertenecen a esta superfamilia se encuentran distribuidas en distintas vías metabólicas, tales como glicólisis, vía de las pentosas fosfatos, síntesis de vitamina y nucleótidos, etc. Los miembros de esta superfamilia comparten dos características en común, unas de ellas es la catálisis de la transferencia del grupo fosforilo hasta una molécula aceptor. Otra característica tiene relación con su arquitectura, ya que todos presentan un plegamiento tipo riboquinasa, el cual es conformado por un plegamiento tipo sándwich $\alpha/\beta/\alpha$, donde una sábana β central es rodeada por ocho α -hélice por un lado, mientras que el otro lado está rodeado por cinco α -hélice. Además, la sábana β central puede ser dividida por un sector con plegamiento tipo Rossmann y otro sector con un plegamiento tipo β -meandro²³.



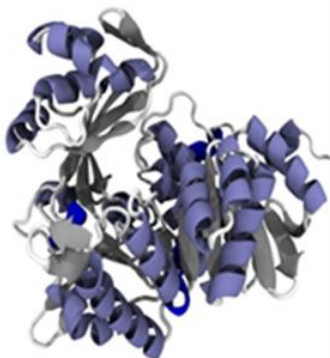
Quinasa de vitaminas y coenzimas dependiente de ATP

- Piridoxal quinasa
- Fosfometilpirimidina quinasa
- Hidroxiethyliazol quinasa



Quinasa de azúcar dependiente de ATP (PfkB)

- Fructosa 6-fosfato quinasa
- Tagatosa 6-fosfato quinasa
- Fructosa 1-fosfato quinasa
- Nucleósido quinasa
- Adenosina quinasa
- Riboquinasa
- Fructosa 6- fosfato quinasa
- 2-ceto-3-deoxigluconato quinasa
- Aminoimidazolribósido quinasa



Quinasa de azúcar dependiente de ADP (PfkC)

- Glucoquinasa
- Fructosa 6-fosfato quinasa

Figura 2. Representación de los tres miembros principales de la superfamilia Riboquinasa. Quinasas de vitaminas se representan con la estructura de piridoxal quinasa (PDBID: 2DDM) de *E. coli*, quinasas de azúcar dependiente de ATP se representa con la estructura de riboquinasa de *E. coli* (PDBID: 1RKD), finalmente como exponente de las rama de quinasas dependiente de ADP se muestra la glucoquinasa de *T. litoralis* (PDBID: 1GC5)²⁴.

Al cotejar los diagramas de topología disponibles de las estructuras de las superfamilia, encontramos que existen tres familias que se clasifican por variaciones en su topología²⁵ (Figura 2). Una de las familias contiene a las enzimas que catalizan la transferencia de grupo fosfato de una molécula de ATP a una molécula de piridoxal o derivado de pirimidina, es conocida como **quinasas de vitamina**, donde la topología de esta familia presenta solo el dominio mayor. Por otra parte, las quinasas que fosforilan distintos azúcares usando ATP, como donador de grupo fosforilo, son clasificadas en la

familia de **quinasas de azúcares dependientes de ATP**. Los miembros de esta familia presentan un dominio mayor, compuesto por el plegamiento tipo riboquinasa, y un dominio menor formado por una sábana β de cuatro a cinco hebras, que se encuentra anclado a la región Rossmann del dominio mayor. Este dominio menor generalmente es usado como plataforma para la dimerización¹⁷, sin embargo, algunas de estas enzimas son monómeros y en este caso el centro hidrofóbico del dominio menor presenta algunas inserciones de α hélice²¹. Finalmente, el grupo de enzimas que utilizan ADP como dador del grupo fosforilo a glucosa y F6P, pertenecen a la familia **quinasas de azúcares dependientes de ADP** y se caracterizan por exhibir un dominio mayor como en se observa en quinasas dependientes de ATP, pero el dominio menor siempre presenta un centro hidrofóbico con inserciones de α hélice. Entre ambos dominios encontramos el sitio activo y se propone que el dominio menor actúa como cubierta del sitio activo^{21,26-28}. Además de la presencia o ausencia del dominio menor, otra diferencia importante que existe entre los miembros de la superfamilia es la topología de la región β -meandro. De hecho solo las proteínas dependientes de ATP tienen un motivo β -meandro real, en cambio, en las quinasas dependientes de ADP, las conexiones entre las estructuras secundarias difieren con respecto a las quinasas dependientes de ATP, y si consideramos que esta región constituye casi por completo el sitio de unión del nucleótido, se puede inferir que este reordenamiento, que involucra una permutación cíclica, podría estar relacionado con la especificidad por el nucleótido²⁴.

Familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP

Las quinasas que utilizan ADP como dador de grupo fosforilo solo han sido descritas en *Eucarya* y *Archaea*, principalmente en organismos *Euryarchaeota* del orden de los *Thermococcales* y *Methanococcales*, mientras que en eucariotas se han identificado homólogos de esta enzima en genomas de *Mus musculus* y *Homo sapiens*. Pese a que aún no está clara la relevancia fisiológica de estas quinasas dependientes de ADP en eucariotas, se ha sugerido que podrían ser utilizadas en condiciones de baja concentración de ATP^{29,30}. Por otra parte, en células de la línea hematopoyética en humanos, se ha observado la expresión de una glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK), la cual estaría involucrada en el proceso de activación de este tipo celular,

que implica la diferenciación y la división celular, lo que requiere una alta y rápida demanda de ATP. Además, se indicó que la activación de células T estaría inducida por la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales y por la consecuente expresión de NF- κ B, eventos que son causados por la activación de ADPGK³¹.

Entre los miembros de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP encontramos enzimas con actividad glucoquinasa y fosfofructoquinasa. Es interesante mencionar que solo en el grupo de *Euryarchaeotas* encontramos proteínas con actividad fosfofructoquinasa, mientras que en *Archaeas* metanogénicas como *Methanococcus jannaschii* y *Methanococcus maripaludis* se encuentran quinasas dependientes de ADP con ambas actividades, glucoquinasa y fosfofructoquinasa³².

Cabe destacar que en esta familia de quinasas es posible encontrar enzimas con diversas estructuras. Las quinasas bifuncionales de *Methanococcus jannaschii*²⁶, *Methanococcus maripaludis*³³ y la glucoquinasa de *Thermococcus litoralis*^{21,34} se presentan como monómeros, mientras que la glucoquinasa de *Pirococcus furiosus* y la fosfofructoquinasa de *Thermococcus litoralis* se encuentran en forma de dímero^{35,36}, en tanto que la fosfofructoquinasa de *Pyrococcus furiosus* y *Thermococcus zilligii* se presenta en forma tetramérica^{29,37}

Estudios estructurales de las enzimas de la familia de quinasas dependiente de ADP, en presencia y ausencia de sus ligandos, sugieren que la unión de sustratos induce cambios conformacionales entre los dominios luego de la unión de sus ligandos. En ausencia de ligandos la enzima se encuentra en una conformación abierta que permitiría la entrada de los ligandos, mientras que en la conformación cerrada la enzima estaría atrapando al sustrato para facilitar su unión y la catálisis^{17,18,38}. También se sugiere que el acercamiento entre los dominios puede estar relacionado con el mecanismo catalítico y la protección frente al ataque del solvente del estado de transición. En el caso de fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *E. coli*, que corresponde a una quinasas dependiente de ATP, que sigue a un mecanismo secuencial ordenado³⁹, se observa que la unión del primer sustrato, F6P, provoca un cambio en su conformación, que favorece la afinidad por Mg-ATP⁴⁰ lo que tendría como consecuencia proteger al nucleótido de ATP de la hidrólisis.

Las estructuras tridimensionales de las glucoquinasa ADP dependientes (*Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus furiosus* y *Thermococcus litoralis*) muestran una relación entre la entrada de los sustratos y la disposición del dominio menor. Si se contrasta la estructura cristalográfica de *P. horikoshii* (PhGk), en ausencia de sus ligandos²⁷ y la estructura de *P. furiosus* (PFGk) en complejo con un análogo de ADP y glucosa se observa un acercamiento entre los dominios inducido por la unión de los sustratos⁴¹. Por otra parte, en la estructura cristalina de la glucoquinasa de *T. litoralis* (TIGK) en complejo con ADP, también es posible ver un acercamiento entre los dominios menor y mayor²¹, respecto a lo visto en la enzima de *P. horikoshii*, aunque este cambio en la distancia de cierre de los dominios no es tan notorio como lo observado en la enzima de *P. furiosus*. Este cambio sugiere que TIGK se encontraría en una conformación semi-cerrada, por lo que se propone que la unión de ADP no gatilla el cierre total de los dominios, sino que sería la unión de ambos sustratos lo que gatilla este cierre. Aunque no se ha determinado el mecanismo cinético de la TIGK, ni el de otra enzima de la familia dependiente de ADP, la información disponible en la literatura relacionada con los cambios conformacionales de los homólogos de esta familia de las riboquinasa permite plantear que el mecanismo de los miembros de la familia quinasa dependientes de ADP, sería del tipo secuencial ordenado, donde primero entraría ADP y luego glucosa, lo que conlleva un cambio de la conformación abierta a semi-cerrada y finalmente cerrada. Para dilucidar qué relación existe entre los cambios conformacionales que experimenta la enzima TIGK durante la unión de sus sustratos sería necesario determinar el mecanismo cinético y compararlo con las estructuras tridimensionales en ausencia y en complejo con sus sustratos.

Estudios del genoma en la *Archaea* metanogénicas (*M. jannaschii*), realizados por Verhees en 2001, revelaron la presencia de varios genes que codifican para las enzimas de la vía glicolítica. Sin embargo, en este estudio se indicó la ausencia del gen que codifica para la enzima fosfofructoquinasa (PFK) clásica³². Por otra parte, se observó la existencia de un gen ortólogo (*pfkC*) de la enzima PFK dependiente de ADP de *P. furiosus*, lo que permitió demostrar la existencia de la enzima fosfofructoquinasa ADP dependiente (*MjPfk/GK*) indicando que en las *Archaeas* metanogénicas también la degradación de glucosas ocurre a través de la vía glicolítica modificada. Por otra parte,

Sakuraba en 2002 planteó que un evento de duplicación génica ancestral podría haber llevado a la enzima *MjPfk/GK* a presentar un comportamiento dual, es decir, catalizar la primera reacción de la glicólisis, así como también la tercera, donde la fosforilación de glucosa y F6P es llevada a cabo usando ADP, en vez de ATP como dador de grupo fosforilo y por una única quinasa ⁴².

Asimismo, en ese trabajo también se realizaron estudios de inhibición por los sustratos azúcares, glucosa y F6P, donde se determinó que estos se unen en el mismo sitio ⁴². Para estudiar en detalle los determinantes estructurales relacionados con la especificidad por el azúcar y los cambios conformacionales que provoca su unión, Merino y Guixé en 2008 generaron dos modelos por homología de la enzima *MjPfk/GK* de *M. jannaschii*, uno en conformación abierta (ausencia de ligando) y otro en conformación cerrada (presencia de ligando). Este análisis mostró que para la especificidad por F6P es preciso tener residuos capaces de estabilizar la carga negativa del grupo fosfato tales como asparragina y glutamina, mientras que la presencia de la cadena lateral de un ácido glutámico y la preferencia por un residuo de histidina, sobre un residuo de aparragina o glutamina, son elementos claves en el sitio activo para la especificidad por glucosa²². Para confirmar estos resultados es necesario realizar estudios estructurales y funcionales de la enzima bifuncional. También, se ha observado que tanto para glucoquinasas como para fosfofructoquinasas, los residuos involucrados en la unión del azúcar están altamente conservados, por lo tanto, la especificidad por una de las azúcares, glucosa y fructosa 6-fosfato, estaría relacionada con unos pocos residuos. Recientemente, se demostró en enzimas PFKs de *P. horikoshii*, *P. furiosus* y *T. litoralis*, que unos de los determinantes de su especificidad es la presencia de dos residuos con carga positiva (Lys y Arg) que establecen un puente salino con el grupo fosfato del F6P ²⁸. Esto sugiere que en esta familia el sitio de unión del azúcar tiene una fuerte plasticidad para acomodar tanto el sustrato piranósico como furanosico, pero que aún sigue siendo específico para discriminar entre ambos. La conservación de estos motivos en todas las enzimas de la superfamilia riboquinasa indica que el mecanismo catalítico, así como algunos rasgos regulatorios se han conservados durante la evolución.

Por otra parte, análisis basados en estructuras tridimensionales y secuencias de las proteínas de la superfamilia riboquinasa revelaron que todos sus miembros, exhiben un plegamiento tipo riboquinasa, además de presentar motivos de secuencia conservados. Uno de estos motivos es el GXGD, en el cual es posible encontrar un residuo de ácido aspártico que se ha propuesto como la base catalítica. Por otra parte, los residuos de ácido glutámico y de asparragina aparecen conservados en el motivo denominado NXXE que se presenta en todas las ADPGK²², y que está relacionado con la unión y regulación de la actividad por un metal divalente⁴³.

Las quinasas de la familia dependientes de ADP fueron descritas, desde el punto de vista catalítico, como enzimas no reguladas, en comparación con las quinasas dependientes de ATP, Sin embargo, Merino y colaboradores en 2012, mostraron que algunos metales divalentes producían inhibición en las quinasas dependientes de ADP⁴³.

En esta tesis se propuso evaluar la relación que existe entre el funcionamiento de enzimas de *Archaea* dependientes de ADP, pertenecientes a la superfamilia riboquinasa, y los cambios conformacionales, a nivel estructural, que éstas experimentan, utilizando como herramienta de estudio la cristalografía de difracción de rayos-X.

Por otra parte, y como se mencionó anteriormente, la topología de las quinasas dependientes de ATP presenta una región β -meandro, que constituye el sitio de unión del nucleótido de adenina; sin embargo, esta región en las quinasas dependiente de ADP, presentan un reordenamiento en las estructuras secundarias, por lo que se planteó comprender si el reordenamiento en elementos de estructuras secundaria, que se piensa como una permutación en la región β -meandro, que conforma casi por completo el sitio de unión del nucleótido, es lo que determina la especificidad de este sustrato entre las quinasas dependientes ATP y las dependientes de ADP. Para llevar a cabo este propósito se realizaran estudios de cinética enzimática y cristalografía de difracción de rayos-X. Finalmente, en este trabajo de investigación se evaluó, el carácter bifuncional y el efecto que tiene Mg^{2+} libre y el producto de la reacción AMP sobre las enzimas *M. jannaschii* y *M. maripaludis* perteneciente al género de *Methanococcales*.

CAPITULO 1

Estudio estructural de la proteína TLGK en su forma Apo y en complejo con Mg·ADPβS·D-Glucosa.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La enzima glucoquinasa del organismo hipertermófilo *Thermococcus litoralis* (TIGK) cataliza el primer paso de la vía modificada de Embden-Meyerhof, fosforilación de glucosa para formar glucosa-6-fosfato (glucosa-6-P). A diferencia de la mayoría de glucoquinasas estudiadas, cuyo dador de grupos fosforilo son nucleótidos trifosforilados, la glucoquinasa de *T. litoralis* emplea ADP. Puesto que estas enzimas fueron descubiertas en organismos de *Archaea* hipertermófilas, en la literatura se argumentó que la dependencia por ADP se debía a las altas temperaturas de crecimiento del organismo, ya que la molécula de ADP es más termoestable que el ATP. Sin embargo, ambos nucleótidos presentan una energía libre (ΔG°) de hidrólisis similar, por lo que este argumento no es correcto. Por otra parte, si consideramos que el metabolismo es un proceso que está lejano al equilibrio, el cambio de energía libre en la transferencia del grupo fosforilo depende de la concentración de los metabolitos aceptores de fosforilo. Además, varias enzimas dependientes de ATP se encuentran en organismos hipertermófilos mientras que varias enzimas dependientes de ADP se encuentran en organismos mesófilos, y tomando en cuenta que la vida media del ATP a altas temperaturas es mayor que otros intermediarios metabólicos de la vía Embden-Meyerhof, no se puede atribuir el uso ADP a una forma de adaptación de organismos *Archaeas* a condiciones de alta temperatura²².

Pese a que las quinasas dependientes de ADP no muestran similitud de secuencia respecto a las quinasas dependientes de ATP de la superfamilia riboquinasa conocidas al día de hoy, sin embargo, estructuralmente todos los miembros de la superfamilia riboquinasa comparten el plegamiento tipo Rossmann, que consiste en un motivo estructural formado por una sábana β central rodeada por ambos lados por α -hélices, lo que también se conoce como plegamiento del tipo sándwich $\alpha/\beta/\alpha$. Las quinasas dependientes de ADP se caracterizan por la presencia de un dominio menor constituido por la inserción de elementos de estructura secundaria, correspondiente a una hoja β compuesta por cinco hebras β y algunas inserciones de α -hélices, que comienza siempre con una hebra β a continuación de la hebra N-terminal de la sábana β central. Este dominio menor podría estar actuando como una cubierta del sitio activo con el objetivo de proteger los sustratos de la hidrólisis. El dominio menor se ha propuesto como un marcador filogenético para la evolución de la superfamilia riboquinasa²⁵.

La primera estructura tridimensional de una quinasa dependiente de ADP correspondió a la glucoquinasa de *T. litoralis* y se determinó por difracción de rayos-X en presencia de ADP²¹, lo que permitió clasificarla como miembro de la superfamilia riboquinasa. Además, teniendo en cuenta las modificaciones estructurales que presenta y su relación filogenética con otras enzimas de la superfamilia riboquinasa, fue clasificada en el clado de la familia de las quinazas dependientes de ADP. La enzima *TIGK* es un monómero de 467 aminoácidos, que se disponen para formar una proteína globular de dos dominios, los que de acuerdo a su tamaño se han denominado como dominio mayor y dominio menor. Estos dominios se encuentran comunicados por elementos que se ubican en ambos dominios, es decir, que cada uno de estos dominios está formado por segmentos no consecutivos de la secuencia primaria de la proteína. A este tipo de topología se le ha denominado reentrante, en la que la secuencia lineal pasa de un dominio a otro en varias ocasiones. También entre los dominios menor y mayor es posible encontrar una hendidura en donde se localiza el sitio activo de la enzima (**Figura 1.1**).

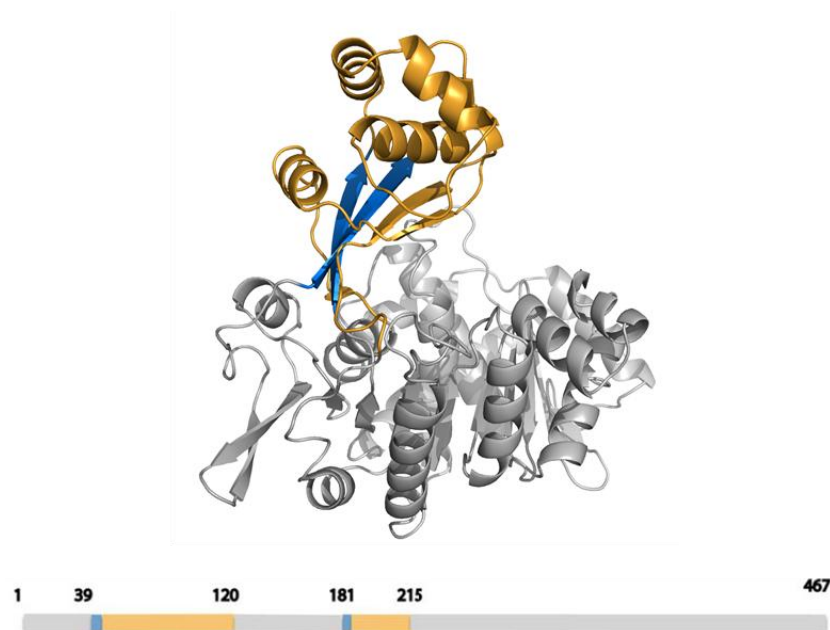


Figura 1.1. Dominios en la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*. En la estructura es posible distinguir dos dominios, uno de ellos corresponde al dominio mayor, representado en color gris, en tanto que el dominio menor se ubica sobre el dominio mayor, coloreado en amarillo. La bisagra que comunica ambos dominios se representa en color azul (PDBID: 4B8R). En la parte inferior de la estructura se representa la posición de los dominios en la secuencia primaria de la proteína de *T. litoralis*.

Estudios estructurales en glucoquinasas dependientes de ADP en presencia y en ausencia de sustratos (glucoquinasa de *Pirococcus furiosus*, *Pirococcus horikoshii* y *T. litoralis*) han

sugerido que existe una estrecha relación entre la entrada de sus sustratos y la disposición de los dominios mayor y menor. Comparando la estructura cristalina de la enzima glucoquinasa de *P. horikoshii* (*PhGk*), resuelta a 2 Å en ausencia de sus ligandos²⁷, con la estructura tridimensional de la proteína homóloga, glucoquinasa de *T. litoralis* (*TIGK*) en complejo con ADP²¹, es posible observar un desplazamiento de los dominios cercano a los 5Å (conformación cerrada), lo que sugiere que la enzima presenta cambios conformacionales durante la catálisis. Por otra parte, si se compara la estructura de la enzima glucoquinasa de *P. furiosus* (*PfGK*) en complejo con el análogo de ADP y glucosa⁴¹ con la enzima *PhGK* es posible observar un acercamiento considerable de los dominios mayor y menor provocando el cierre del sitio activo, lo que indica que la enzima *TIGK* se encontraría en una conformaciones intermedia entre la conformación abierta (en ausencia de sustrato) y la conformación cerrada (en complejo con ADP-Metal y glucosa), esta conformación es definida como conformación semi-cerrada. Esta serie de antecedentes nos sugieren que la unión de ligandos a la proteína gatilla una serie de cambios conformacionales que facilitarían la catálisis. Aunque no ha sido determinado el mecanismo cinético de ninguna de las quinasas de azúcares dependientes de ADP descritas hasta ahora. Sin embargo, desde la literatura disponible y desde los arreglos conformacionales de las proteínas homólogas, es posible inferir que podrían tratarse de un mecanismo secuencial ordenado, donde en primer lugar ingresaría el MgADP y luego glucosa cerrando el sitio activo. Sin embargo, el mecanismo cinético descrito para otras enzimas de la superfamilia riboquinasa (riboquinasa de *E.coli* y adenosina quinasa humana) correspondería a un mecanismos en secuencia al azar^{17,18}. Recientemente, estudios de cinética enzimática y de dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) indican que la enzima *TIGK* sufre cambios conformacionales que le permiten transitar desde una conformación abierta, en ausencia de ligandos, a una semi-cerrada cuando está unida al nucleótido ADP y finalmente a una conformación cerrada luego que ambos sustratos, glucosa y ADP, están unidos en el sitio activo³⁴. Para confirmar que la unión de los sustratos causa tales cambios conformacionales, y comprender las bases estructurales que permiten dichos cambios observados en solución, es que en este capítulo se propone la determinación, a través la técnica de difracción de rayos-X, de las estructuras cristalinas de la glucoquinasa *T. litoralis* en su forma apo, y en complejo ternario, con los sustratos glucosa y un análogo no hidrolizable de ADP (ADPβS) para poder obtener información estructural relevante de los cambios que gatilla la unión de los sustratos y su correlación con la catálisis.

II. y III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS.

La proteína glucoquinasa dependiente de ADP de T. litoralis, presenta un mecanismo cinético en secuencia ordenado que comienza con la unión de MgADP y continua con la unión de glucosa, lo que provoca que la enzima TIGK transite por distintos estadios conformacionales que van desde una conformación abierta, luego una semi-cerrada y finalmente una cerrada.

III. OBJETIVOS

III. I. Objetivos generales

- Establecer las bases estructurales de la catálisis de la enzima TIGK.
- Determinar los cambios conformacionales inducidos por la unión de sus ligandos y su correlación con el mecanismo cinético de la enzima TIGK

III.II. Objetivos específicos

- Determinar la estructura tridimensional de la enzima TIGK, en ausencia y en presencia de glucosa y ADP, mediante cristalografía de difracción de rayos-X.
- Determinar el mecanismo cinético de la enzima TIGK a través de experimentos de velocidad inicial e inhibición por producto.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. I. Material

IV. I. 1. Material biológico

Para este trabajo experimental se empleó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) *plus* (Novagen), disponibles en el cepario del laboratorio. Las células fueron crecidas rutinariamente en medio LB en agitación a 37°C.

El gen de la enzima *TIGK* (EMBL-BANK E14589.1), fue proporcionado por el Dr. Takayoshi Wakagi, investigador del Biotechnology Department, University of Tokio, Japón.

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) fue transformada con el vector de expresión pET17b Novagen para la proteína *TIGK*. Este plásmido contiene un gen *lac* que codifica para la proteína represora *lac*, un promotor T7 que es específico sólo a RNA polimerasa T7, un operador *lac* que puede bloquear la transcripción, una región de clonamiento múltiple para diferentes enzimas de restricción, un gen de resistencia a ampicilina, y un origen de replicación de *E. coli* en este trabajo con el que se transformaron las cepas BL21 (DE3) *plus* y BL21 (DE3) de *E. coli*. Las cepas bacterianas que se emplearon para llevar a cabo el trabajo experimental fueron *E. coli* BL21 (DE3) *plus* y BL21 (DE3) disponibles en el cepario del laboratorio. Las células crecieron de forma rutinaria a 37°C en medio LB suplementado con antibiótico.

IV. I. 2. Enzimas

Para los ensayos de actividad enzimática se utilizaron las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (G6PDH), quinasa pirúvica (PK) de músculo de conejo y deshidrogenasa láctica de músculo de conejo (LDH), las que fueron obtenidas de Sigma Chem. Co. (MO, E.E.U.U).

IV. I. 3. Medios de cultivo

En este trabajo se utilizaron varios medios de cultivos. Rutinariamente se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB), el que estaba constituido por: extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1% y triptona 1%, ajustado a pH 7 con NaOH.

Para el crecimiento de las células en medio sólido se empleó medio LB-agar, el que estaba formado por: agar 1,5%, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1% y triptona 1%, ajustado a pH 7 con NaOH.

Los medios de cultivos se suplementaron con antibióticos para la selección de las células transformantes; se usaron los antibióticos ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y cloranfenicol ($35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

IV. I. 4. Reactivos y materiales químicos

Acrilamida, azul de bromofenol, bisacrilamida, glicina, y N'-tetrametiletlenamina (TEMED) y el estándar de peso molecular de amplio rango para geles de electroforesis de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se obtuvo de BIO-RAD (CA, E.E.U.U).

Etanol, metanol, cloruro de sodio, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), agar-agar, D (+)-glucosa, peptona de carne, extracto de levadura, monohidratada, dodecil sulfato de sodio (SDS), β -mercaptoetanol, trihidroximetil-aminometano (TRIS), cloruro de potasio y glicerol se obtuvieron de Merck & Co., Inc. (Alemania).

Adenosina-5'- difosfato (ADP) sal disódica, agarosa, azida de sodio, azul de Coomassie, cloruro de magnesio, nicotinamida adenina dinucleotido (NAD^+), N-(2-hidroxietil) piperazina-N'ácido 2-etanosulfónico (HEPES), adenosina 5'- β -tio-difosfato ($\text{ADP}\beta\text{S}$) sal de litio, se obtuvieron de Sigma Chem. Co., (MO. E.E.U.U).

Isopropil- β -D-tiogalctopiranosido (IPTG) y los antibióticos 6-d- α -aminofenilacetoamido-penicilinato de sodio (ampicilina) y clorocetina (cloranfenicol) fueron obtenidos de USBiological (MA, E.E.U.U).

IV. II. Metodología

IV. II. 1. Crecimiento de células *E.coli* BL21 (DE3) pLysS-pET17b-glkA para la purificación de la proteína recombinante glucoquinasa de *T. litoralis*

El gen de la enzima glucoquinasa de *T. litoralis* (EMBL-BANK E14589.1) fue, previamente, clonado en el vector de expresión pET17b y luego transformado en cepa de expresión de *E.coli* BL21 (DE3) *plus*. A continuación las células fueron crecidas en medio LB suplementado

con los antibióticos ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y cloranfenicol ($35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), luego que la suspensión celular alcanzara una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,6 se indujo la expresión de la proteína con 1mM IPTG.

La purificación se realizó según lo descrito por Ito y col. (2001)²¹. Básicamente se emplearon los mismos pasos de purificación, excepto por algunos cambios, detallados a continuación.

IV. II. 2. Purificación de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*.

Las células *E. coli* BL21 (DE3) *plus* fueron inducidas con IPTG 1mM por 4 horas, a 37°C y crecidas en un litro de cultivo LB suplementado con los antibióticos adecuados. Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en amortiguador A (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, MgCl_2 5mM) para posteriormente romperlas por sonicación, siguiendo un protocolo de 30 ciclos, constituidos por 30 segundo de pulso seguido por 30 segundo de descanso, procedimiento realizado en hielo. La suspensión fue centrifugada a 14.000 g a 4°C por 20 minutos, para separar las proteínas solubles de los componentes insolubles de la suspensión. La fracción soluble fue sometida a un golpe térmico a 90°C por 30 minutos y centrifugada nuevamente a 14.000 g por 20 minutos para separar las proteínas desplegadas de las que aún se mantenían solubles. A continuación se realizó la precipitación de las proteínas con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% durante 30 minutos empleando el mismo amortiguador y luego se centrifugó a 14.000 g a 4°C. El sobrenadante se aplicó en una resina de fenilsefarosa, HitrapTM Fenil HP (GE healthcare) de 5x1 mL, equilibrada previamente con amortiguador B (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, MgCl_2 5 mM) y suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60%. La resina con la proteína en su interior fue lavada con 5 volúmenes de amortiguador B para luego iniciar la elución de la proteína mediante un gradiente lineal de 100 mL, comenzando con 100% amortiguador B para terminar con 100% de amortiguador A. Las fracciones que contenían la enzima fueron seleccionadas usando el ensayo de actividad enzimática para la reacción de fosforilación de glucosa.

La proteína eluida fue preparada para el siguiente paso cromatográfico. Debido a la alta concentración de sulfato de amonio fue necesario dializarla contra el amortiguador A, este procedimiento se realizó dos veces usando 1 L de diálisis cada vez, para asegurar el cambio total del amortiguador.

El siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio aniónico, HiTrapQ™HP (GE Healthcare) de 5x1 mL, pre-equilibrada con amortiguador A. Luego de pasar la proteína, la resina fue lavada con 5 volúmenes de columna y la proteína eluida con un gradiente lineal de 0 a 100% de amortiguador C (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, MgCl₂ 5mM y KCl 1M).

Ambos pasos cromatográficos fueron realizados a temperatura ambiente y las fracciones que contenían la enzima fueron seleccionadas midiendo la actividad glucoquinasa.

Para determinar el grado de pureza de las fracciones seleccionadas, éstas se sometieron a un análisis electroforético en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE). Las fracciones con un 95 % de homogeneidad fueron reunidas, y almacenadas a 4°C. Antes de cada experimento el amortiguador fue sustituido por el amortiguador HEPES25 mM pH 7,8, mediante diálisis

IV. II. 3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes

Se utilizaron geles de acrilamida/bisacrilamida al 12 %, siguiendo la técnica descrita por Laemmli en 1970⁴⁴. El gel concentrador contenía 0,4 M de Tris-HCl pH 6,8, 6% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,1% de SDS, 0,1% de persulfato de amonio (PSA) Y 20 µL de TEMED. Las muestras se re-suspendieron en una solución que contenía Tris-HCl pH 7.6, 60 mM, SDS al 10%, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.02%, y fueron calentadas a 100°C por 5 minutos, las que luego se cargaron en paralelo con un estándar de masa molecular de amplio rango (Sigma Chem. Co). Para la migración de las muestras cargadas se aplicó un campo eléctrico a voltaje constante de 120 voltios. La proteína se visualizó por tinción con azul de Coomassie y se destiñó con una solución al 10 % de ácido acético.

IV. II. 4. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática se realizó a través de mediciones de velocidad inicial, para lo cual la reacción catalizada por la enzima TIGK fue acoplada a la reacción catalizada por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (G6PDH) que usa como sustrato la glucosa-6P y NAD⁺. En esta reacción el NAD⁺ es reducido, por lo que las medidas pueden ser registradas por seguimiento del aumento de la absorbancia a 340 nm. Las determinaciones fueron realizadas a 40°C, temperatura a la cual

la enzima auxiliar permanece activa y la enzima *T. litoralis* está lo suficientemente activa¹¹. Todas las determinaciones se realizaron utilizando el espectrofotómetro-UV HP845, con porta-celda termo-estabilizado a 40°C. El cálculo de las velocidades iniciales de la reacción glucoquinasa fueron obtenidas estimando la pendiente de la curva de progreso, usando el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm cuyo valor corresponde a 6,22 mM⁻¹·cm⁻¹⁴⁵. La velocidad se expresó como µmoles de producto formado (glucosa 6-P) por miligramo de enzima por unidad de tiempo.

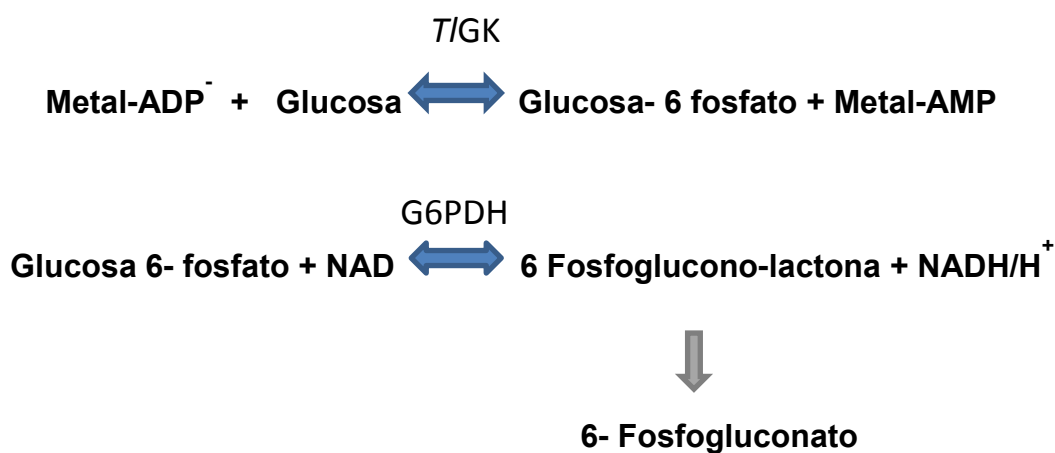


Figura 1.2. Esquema de las reacciones acopladas para determinar actividad glucoquinasa.

IV. II. 5. Preparación de la muestra de proteínas para los ensayos de cristalización

La muestra se concentró utilizando unidades de filtrado Amicon® Ultra-15 con membrana de corte 10 kDa, a 5.000 x g y a 4°C hasta una concentración de 15 mg·mL⁻¹.

IV. II. 6. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteína se estimó utilizando dos estrategias espectrofotométricas. Empleando la técnica de Bradford⁴⁶ o midiendo el total de cromóforos presentes en la proteína que absorben a 280 nm y calculando la concentración de la proteína usando el coeficiente de extinción teórico 50310 M⁻¹·cm⁻¹ ó 0,939 mg⁻¹·mL⁻¹·cm⁻¹ (ExPaSy Proteomics Server, <http://www.expasy.org>).

IV.II.7. Cristalización, colección de datos y resolución de la estructura de la enzima *TIGK* en su forma Apo y en complejo con ADP-Mg-Glucosa

IV.II.7.1. Ensayos de cristalización

Los ensayos de cristalización se hicieron mediante la técnica de difusión vapor, que es una de las técnicas más empleadas al momento de cristalizar macromoléculas. Se fundamenta en el principio físico-químico que sucede en una gota que contiene la muestra a cristalizar y una solución reservorio que contiene el agente precipitante que absorbe el agua de la gota de cristalización. La deshidratación de la gota produce un incremento en la concentración de la muestra a cristalizar y el equilibrio finalmente se alcanza cuando las concentraciones de precipitante del reservorio y la gota se igualan⁴⁷ (**Figura 1.3**).

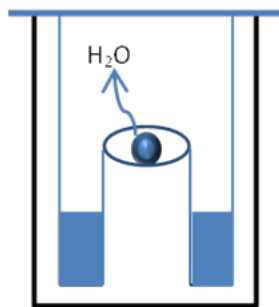


Figura 1.3. Representación del método de difusión de vapor para la cristalización de proteínas. En la medida que la gota tiende a alcanzar el equilibrio ésta pierde el agua progresivamente, y a su vez aumenta la concentración de precipitante y de la muestra a cristalizar, favoreciendo la cristalización de la proteína.

De acuerdo a la disposición de colocar la gota en la placa de cristalización la técnica de difusión de vapor presenta dos variantes, una conocida como gota colgante, que consiste en colocar la gota en un cubre objeto previamente tratado para evitar que la gota se extienda (e.g., los cubreobjetos se siliconizan) que servirá como tapa sobre el reservorio (**Figura 1.4 A**). Como el sistema debe permanecer sellado, para que no exista intercambio de aire, los bordes del reservorio se recubren con algún material sellante como grasa de vacío, oleos de silicona comercial, etc. La otra variante de la técnica de difusión de vapor se denomina gota sentada en donde el reservorio dispone de un pocillo donde es depositada la gota y el reservorio es sellado con cinta adhesivo transparente, que no interfiera con la visualización de la gota al microscopio (**Figura 1.4 B**).

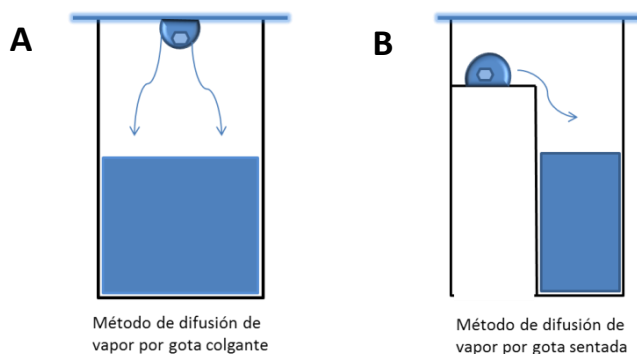


Figura 1.4. Esquema que muestra las variantes de la técnica de cristalización por difusión de vapor. A. Representación de la técnica de cristalización por gota colgante. **B.** Representa la variante de la técnica de cristalización por gota sentada.

La búsqueda de las condiciones de cristalización se generó en base a la condición descrita por Ito y col. en 2001²¹. Todos los ensayos de cristalización fueron realizados manualmente según el método de difusión de vapor en gota sentada a 20°C, donde se mezcló 1 μ L de proteína concentrada a 15 mg /mL con 1 μ L de la condición de cristalización; el volumen de reservorio fue de 75 μ M y corresponde a la condición de cristalización. Es importante mencionar que las placas de cristalización utilizadas constan de 48 pocillos, que fueron adquiridas de la casa comercial Hampton Research.

La condición de cristalización de la proteína en ausencia de ligando fue 14 % polietilenglicol (PEG) 6000, 0,2M LiSO₄, 0.1 M citrato de sodio pH 3,6 y 5mM ditioneitol (DTT).

Los cristales de proteína en complejo con ADP β S-Mg y D-glucosa fueron obtenidos en presencia de amortiguador 1.5 M citrato de Sodio pH 5,2, 5mM DTT, 5mM MgCl₂, 6mM ADP β S y 30mM D-glucosa.

IV. II. 7.2. Crioprotección

Al ser expuestos a los rayos-X los cristales de proteína son dañados a causa de la radiación, la que afecta la estructura del cristal debido a la fotoionización de los átomos del cristal (daño primario), y al daño secundario debido a la difusión de los radicales libres a lo largo del cristal, causando la pérdida de la resolución y la calidad de los datos de difracción. Tales efectos pueden ser reducidos considerablemente a bajas temperaturas gracias a la disminución de la velocidad de difusión de los radicales, lo que alarga la vida útil del cristal y por ende aumenta el tiempo de exposición⁴⁸. Durante el proceso de congelación se debe

evitar la formación de micro cristales de hielo, que afectan al orden interno del cristal y con ello al patrón de difracción de la proteína. Debido a este motivo es que usualmente antes de congelar el cristal, éste es sumergido en una solución crio-protectora que en este caso consistió en una solución al 20% (v/v) glicerol estéril.

Una vez crio-protegido el cristal, este es sacado de la gota con un lazo de nylon cuya medida debe ser lo más cercana al tamaño del cristal, para minimizar el volumen de solución y la dispersión de rayos-X de la solución. Finalmente, el lazo con el cristal es congelado rápidamente en nitrógeno líquido y almacenado a la temperatura del nitrógeno líquido.

IV. II. 7.3. Recogida y procesamiento de datos de difracción

La recolección de datos de la difracción de rayos-X fue llevada a cabo en las diferentes líneas de macromoléculas ID14-4 e ID23-2 de las instalaciones Europea de radiación sincrotrón (ERSF), Grenoble, Francia. Las líneas utilizadas constan de tres sectores; en uno de estos se ubican los elementos relacionados con el sistema óptico, a continuación se localiza el difractómetro y finalmente se encuentra la sala de control, donde se operan, a través de un sistema computacional, los diferentes instrumentos.

Los cristales fueron colocados en el goniómetro del difractómetro, el que permite la rotación perpendicular del cristal respecto a la dirección del haz de rayos-X incidente (Φ), la rotación se realiza a intervalos de 1° y la difracción de los haces de rayos-X son detectados por el detector CDD. Para la *TIGK* en su forma apo se utilizó la línea de luz ID23-2, mientras que para la enzima en complejo con los ligandos la línea de luz ID14-4.

El primer paso de la recogida de información de las imágenes de difracción es el indexado, que tiene como objetivo calcular parámetros que den cuenta de la orientación del cristal y de acuerdo a su orientación establecer los posibles grupos espaciales, celda unitaria y asignar correctamente los índices de Miller (h, k, l), que identifican los planos paralelos que pueden definirse en el cristal. A continuación se procede a la integración de los datos de los índices de Miller, donde es posible calcular la intensidad de las reflexiones observadas. Estos procedimientos fueron realizados mediante el uso del programa XDS⁴⁹.

Luego que los datos obtenidos de las imágenes de difracción son indexados e integrados éstos deben ser escalados debido a la variación que presenta la intensidad del haz de luz de rayos-X, el tiempo de exposición o el daño por radiación en el proceso de colección de datos.

Por este motivo, los datos son corregidos y puestos en la misma escala aplicando un factor de escala entre reflexiones colectadas en diferentes imágenes. Para este propósito se utilizó el programa SCALA⁵⁰ que se encuentra incluido en un paquete de programas CCP4⁵¹.

IV.II. 7.4. Resolución y refinamiento de estructura

Una vez procesados los datos se puede resolver la estructura. Esto consiste en determinar la densidad electrónica (espacio real) a partir de los datos de intensidades de difracción (espacio recíproco) obtenidas experimentalmente. Al determinar esta función de densidad electrónica se puede conocer la posición de los átomos de la molécula, en este caso de la proteína. La transformación entre la difracción y la densidad electrónica es posible gracias a la transformada de Fourier:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \cdot \sum_k \cdot \sum_l \cdot |F_{hkl}| \cos 2\pi [hx + ky + lz - \varphi(h, k, l)]$$

Donde:

x, y, z: son las coordenadas de cualquier punto en el espacio.

V: corresponde al volumen de la celda unitaria,

h, k, l: índices de Miller.

$|F_{hkl}|$: modulo de factor de estructura, representan las amplitudes de los haces difractados

$\varphi(h, k, l)$: fases correspondientes a cada punto en el espacio.

Para obtener el mapa de densidad electrónica se deben determinar las fases de las ondas que forman cada mancha de difracción. Sin embargo, la información de las fases $\varphi(h, k, l)$ no se puede determinar directamente de la densidad electrónica, lo que se conoce como problema de las fases y para solucionarlo existen diferentes métodos como por ejemplo, reemplazo molecular (MR), reemplazo molecular isomórficos múltiple (MIR), difracción anómala simple (SAD), difracción anómala múltiple (MAD)⁵².

Las estructuras tridimensionales de la proteína TIGK en su forma apo, y en complejo con sus sustratos MgADP y glucosa fueron resueltas por el método de reemplazo molecular

utilizando como modelo la estructura de *T/GK* en complejo con MgADP (código PDB: 1CG5) resuelta por Ito en 2001²¹.

El método de reemplazo molecular es el método de resolución del problema de fases más común. Este método fue descrito por Rossmann en 1961⁵³, y se basa en la utilización de una estructura conocida como modelo para estimar las fases iniciales de la proteína desconocida cuya estructura se quiere determinar. Mientras mayor sea la similitud de secuencia entre la estructura de la proteína modelo, y la estructura que se quiere resolver, mayor será la posibilidad de conseguir determinar la estructura de la molécula en cuestión. Para elegir el modelo para la resolución de la estructura de la proteína es recomendable tener como parámetro la similitud de secuencia sobre el 30%. Luego de elegido el modelo se determinan las funciones de rotación y traslación. Estas funciones permiten definir la orientación y posición del modelo respecto a la estructura que se quiere resolver. Finalmente se calcula el mapa de densidad electrónica a partir de las intensidades experimentales y de las fases que proporciona el modelo.

Una vez resuelto el mapa de densidad electrónica se observarán zonas del mapa con densidad electrónica positiva sobre las cuales se acoplará el esqueleto polipeptídico. Este paso se realiza mediante programas computacionales que permiten trazar, de forma manual, las cadenas de carbonos alfa como también las cadenas laterales, acomodándose a la señal que muestra el mapa de densidad electrónica.

El modelo estructural construido desde el mapa de densidad electrónica es sometido a procesos de refinamiento, cuyo objetivo es ajustar el modelo estructural lo mejor posible a los parámetros estructurales, coordenadas atómicas(x, y, z) y un factor de temperatura B, para que de esta manera se alcance la mayor concordancia entre el modelo y los datos de difracción observados.

El ajuste entre el modelo y los parámetros estructurales está dado por la siguiente función.

$$\phi = \sum_{hkl} w_{hkl} (|F_{obs}| - |F_{calc}|)_{hkl}^2$$

Donde, w_{hkl} es un parámetro que escala las reflexiones medidas en diferentes imágenes o diferentes tiempos.

Cabe destacar que es necesario reducir la posibilidad de ajuste de los parámetros estructurales. Para ello se deben imponer limitaciones geométricas que tienen relación con la estereoquímica de los aminoácidos, tales como los ángulos de enlace, la distancia de enlace, unión química de los enlaces que está dada por la secuencia de aminoácidos de la proteína, etc. Estas constricciones permiten disminuir los grados de libertad del sistema durante el refinamiento y alcanzar la convergencia del mismo.

Además, en el proceso de refinamiento se toman en cuenta dos indicadores que aseguran la convergencia del proceso. Estos factores corresponden a R y R_{free} . El factor R se define desde los módulos de los factores de estructura experimental y es calculado a partir la siguiente función:

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

Este factor se relaciona con la calidad del ajuste; mientras menor sea el factor R mejor será el ajuste del modelo a los datos experimentales.

Por otra parte, el factor R_{free} mide el grado en que el modelo atómico construido y predice las amplitudes observadas al ser calculado. Esta medición es más objetiva ya que solo se toma en cuenta un pequeño porcentaje del total de reflexiones, que son excluidas del refinamiento, lo que permite que el valor de este parámetro no se vea sesgado por el modelo ni por el refinamiento.

Finalmente, el modelo estructural debe ser validado analizando los parámetros geométricos más importantes que son las distancias y los ángulos de enlace, la ausencia de choques entre cadenas y parámetros térmicos razonables, conformación de los posibles rotámeros y los diagramas de Ramachandran⁵⁴. Los diagramas de Ramachandran son una representación de los ángulos diedros de los planos amidas alrededor de los enlaces, N-C α , denominado phi (φ) y C α -C llamado psi (ψ), para cada aminoácido de la proteína.

El programa computacional utilizado para tratar el problema de las fases y obtener el mapa de densidad electrónica fue PHASER 2.5⁵⁵. Las estructuras de ambas formas de la enzima fueron construidas iterativamente utilizando el programa Coot⁵⁶ y refinado con REFMAC5⁵⁷. La geometría y estereoquímica de ambas estructuras fueron validadas mediante el programa MolProbity⁵⁸. Todas las figuras fueron preparadas con Visual Molecular Dynamics⁵⁹.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

V. I. Purificación de la enzima *TIGK*

La proteína se purificó siguiendo la estrategia descrita en la sección de métodos experimentales. Para este objetivo fue necesario realizar dos pasos cromatográficos, el primero consistió en una cromatografía interacción hidrofóbica seguida por una cromatografía de intercambio aniónico. La proteína fue detectada midiendo la actividad enzimática a las fracciones eluidas de las distintas cromatografías. Para determinar el grado de pureza de las proteínas se realizó un análisis de SDS-PAGE (**Figura 1.5**) donde se observó la proteína *TIGK* en la última etapa de purificación correspondiente a la cromatografía de intercambio aniónico. La proteína migró cercana a los 51 KDa y la homogeneidad de éste resultado superior al 95%.

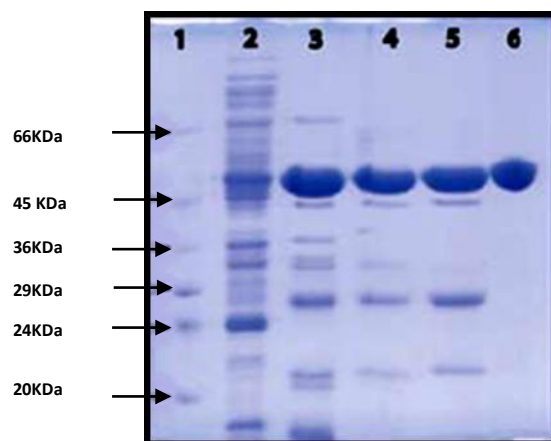


Figura 1.5 Análisis de SDS-PAGE para las diferentes etapas de purificación de la enzima *TIGK*. Carril 1 corresponde al estándar de masa molecular, carril 2 extracto crudo, carril 3 las proteínas que quedan en la fracción soluble luego de someter al extracto crudo a un golpe térmico, carril 4 precipitación con sulfato de amonio de la fracción soluble del paso anterior, carril 5 corresponde a la cromatografía hidrofóbica, y carril 6 cromatografía de intercambio aniónico.

V. II. Determinación de la estructura de *TIGK* en su forma apo y en complejo con sus ligandos

Para comprender las bases estructurales de la catálisis de la enzima glucoquinasa de *T. litoralis* se propuso obtener las estructuras cristalinas de alta resolución para diferentes condiciones, en ausencia de ligandos (apoenzima), y en presencia de D-glucosa y el análogo de ADP no hidrolizable, ADP β S, (complejo ternario) (**Figura 1. 6**).

Los datos recolectados a partir de la difracción de rayos-X, para ambas estructuras cristalinas, muestran que los vectores que definen la celda unitaria **a** y **b** son iguales mientras, que el vector **c** difiere de los otros dos. Por otra parte, los ángulos α y β son idénticos, con un valor a 90° , en cambio, el ángulo γ tiene un valor correspondiente a 120° , lo que da cuenta que el grupo espacial de la celda unitaria corresponde a $P3_2,2_1$, lo que indica que la geometría de la celda unitaria corresponde a la forma trigonal planar.

Las estructuras en forma apo y en complejo ternario, fueron obtenidas por reemplazo molecular y resueltas a 2.05 Å y 2.58Å, respectivamente.

El mapa de densidad electrónica de la estructura de la enzima en forma apo así como también en complejo ternario, presentó notables diferencias respecto al modelo de *TIGK* utilizado (PDB 1CG5), lo que es consistente debido al movimiento entre los dominios producto de la unión de los sustratos en el sitio activo. Los datos colectados de la difracción de rayos-X y las estadísticas del refinamiento de ambas estructuras se encuentran resumidos en la **Tabla 1**.



Figura 1.6. Cristales del complejo ternario de la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*. La imagen del inserto corresponde a la gota en donde fueron crecidos los cristales.

Tabla 1.1. Estadísticas de los datos cristalográficos y de refinamiento.

	Apo-T/GK	Holo-T/GK (MgADPβS·D-glucosa)
Colección de datos		
Longitud de onda (Å)	0.8726	0.9794
Grupo espacial	P3 ₂ 21	P3 ₂ 21
Dimensión de la celda unitaria		
a, b, c (Å)	109.1, 109.1, 129.6	106.5, 106.5, 130.1
α, β, γ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120
Rango de resolución (Å)	40.0-2.05 (2.10-2.05)	35.0-2.58 (2.65-2.58)
R _{merge}	0.089 (0.564)	0,093 (0,672)
I/σ(I)	19.4 (3.7)	18,3 (3.5)
Reflexiones totales	687,053 (72,183)	234,319 (33,911)
Reflexiones únicas	56,090 (7710)	27,361 (1992)
Complejidad (%)	94,7 (99.2)	99.9 (100)
Multiplicidad	9.4 (12.2)	7,4 (7.4)
Refinamiento		
R _{meas}		
Reflexiones usadas(para R-free)	559,358 (3529)	25,931(1402)
R-work	0.17	0.17
R-free	0.21	0.22
No. átomos		
Proteína	3854	3810
Ligandos		23
D-glucosa		13
Agua	293	163
Desviación R.M.S.		
Longitud de enlace (Å)	0.023	0.009
Ángulos de enlace (°)	2.058	1.360
Gráficas de Ramachandran		
Ramachandran favorables (%)	457 (98.3%)	450 (97.0%)
Ramachandran permitidas (%)	7(1.5%)	11(2.6%)
Ramachandran desfavorables (%)	1(0.2%)	2(0,4%)
B-factor promedio (Å²)		
Proteína	34.6	50.5
AMP		50.2
D-glucosa		49.9
Agua	44.8	47.6

En ambas estructuras (apo y complejo ternario) se observan dos dominios, uno mayor, cuya arquitectura muestra el plegamiento tipo Rossmann ($\alpha/\beta/\alpha$) descrito anteriormente, y que caracteriza a los miembros pertenecientes a la superfamilia riboquinasa.

Por otra parte, el sitio activo se encuentra localizado en una hendidura formada por los dos dominios, tal como fue descrito previamente para los otros miembros de la familia de quinasa dependientes de ADP. La intersección de los dominios está formada por cuatro hebras del dominio menor con tres α -hélices correspondiente al dominio mayor (**Figura 1.7 A y B**). Cabe destacar que en el extremo más alejado del bolsillo, donde se aloja el sitio activo, existe una base física para la comunicación entre los dos dominio mediada por la unión de los ligandos.

Al comparar ambas estructuras cristalinas observamos diferencias en la disposición espacial de los dominios; en la apo-enzima el centro de masa de los dominios menor y mayor están separados por 29.4 Å, calculados utilizando el programa VMD. Sin embargo, en la estructura cristalina de la enzima unida a MgADP β S y glucosa los dominios se acercan, exhibiendo una separación de los centros de masa de 26.5 Å y una rotación relativa 11.8°, respecto a la estructura de la apo-enzima, lo que corresponde a la conformación cerrada, la que atrapa a los sustrato en un complejo del ternario. Los cambios conformacionales que se producen después de la unión secuencial de los sustratos se pueden explicar básicamente por una rotación facilitada por los residuos situados en la región donde se conectan ambos dominios (**Figura1.7.C**).

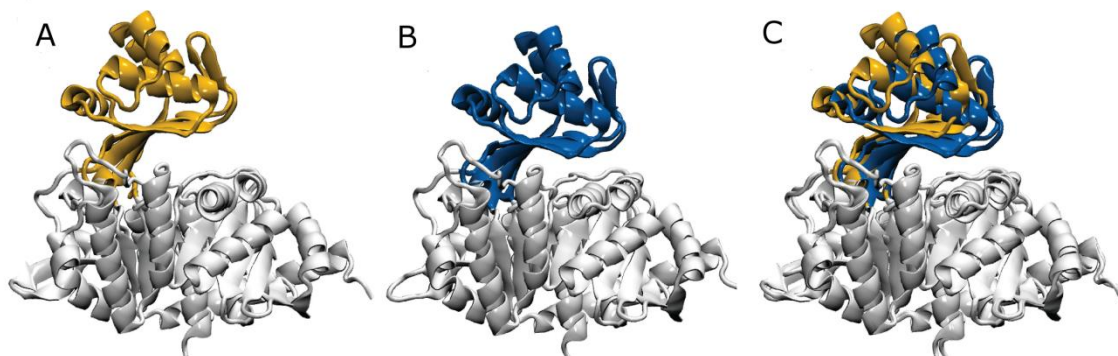


Figura 1.7. Estructura de la glucoquinasa de *T. litoralis* en su forma apo y en complejo ternario (TIGK·MgADP β S·D-glucosa). En A se muestra la representación de la enzima TIGK en ausencia de ligandos. En blanco se muestra el dominio mayor y en amarillo se muestra el dominio menor. B corresponde a la representación de la enzima glucoquinasa en presencia de MgADP β S y D-glucosa. El dominio menor se representa en blanco y en azul el dominio menor. En C se presenta una superposición de ambas estructuras.

V. III. Descripción del sitio de unión de ADP y D-glucosa en la glucoquinasa de *T. litoralis*

La unión de ADP se ve favorecida por la formación de dos enlaces de hidrógeno entre los residuos Val440 y Thr353 con el grupo NH⁶ y 2'OH del nucleótido de adenina, respectivamente. Las cadenas laterales de los residuos Asn305 e His352 son las encargadas de estabilizar parte del grupo fosfato del nucleótido; Asn305 ofrece dos enlaces de hidrogeno con uno de los átomos de oxígeno del grupo fosfato- α , mientras que His353 acepta un enlace de hidrógeno con el grupo 3'OH de la ribosa del nucleótido (**Figura 1.8 A**). También, hay cinco moléculas de agua involucradas en la estabilización del ADP, una de estas moléculas de agua forma un enlace con N³ de la adenina, otras dos moléculas de agua establecen enlaces de hidrógeno en las posiciones 2' y 3' de la ribosa, mientras que las otras dos aguas se enlazan a los oxígenos del grupo fosfato- α . La posición del fosfato- β no se logró distinguir en el mapa de densidad electrónica de la estructura del complejo ternario. Cabe destacar que las interacciones que se presentan entre el bolsillo de unión a sustrato se mantienen respecto a las descritas por Ito en 2001 (*TIGK*·MgADP)²¹. Luego de la unión de MgADP el cambio más significativo ocurre en la vecindad de la base del nucleótido, donde la orientación de la cadena lateral de Tyr354 se invierte hacia el anillo de adenina, la que se estabiliza por una interacción de tipo π - π apiladas con Arg202, de esta manera el anillo de adenina es fijado y posicionado en el sitio activo.

El sitio de unión a D-glucosa es similar al encontrado en la estructura de la proteína homóloga, la GK de *P. furiosus*⁴¹. La cadena lateral de Asp42, Glu96, His184 y Asp451 son los principales residuos involucrados en la estabilización de la glucosa en el sitio activo. Asp42, Glu96 e His184 forman una extensa red de enlaces de hidrógeno con los grupos OH'1, OH'2, OH'3 y OH'4 de glucosa, además de dos asparraginas (Asn209 y Asn240) que apoyan la formación de un total de seis enlaces de hidrógenos con la glucosa. Adicionalmente, cuatro moléculas de agua interactúan con la molécula de azúcar en las posiciones 1', 2' y 6' (**Figura 1.8. B**). También se observa que el residuo Asp451 se encuentra a sólo 2,5Å del grupo OH'6 de glucosa. Este residuo está presentes en varias estructuras de los miembros de la superfamilia riboquinasa, y experimentos de mutación puntual indican que este residuo sea probablemente la base catalítica en la reacción de transferencia del grupo fosforilo^{21,25,27,41} (**Figura 1.8. C**).

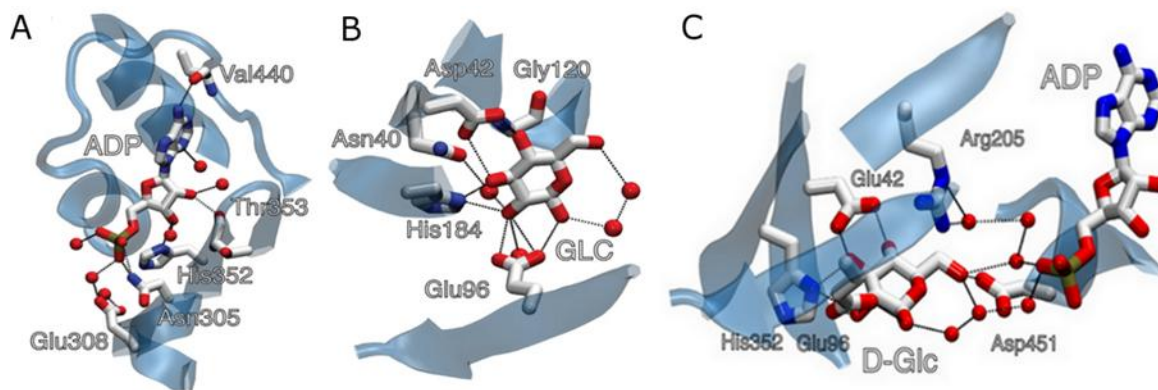


Figura 1.8. TIGK en contacto con sus ligandos. En **A** Se muestran los residuos que unen al nucleótido ADP en la estructura del complejo ternario, **B** vista del bolsillo de unión de D-glucosa en el sitio activo, **C** se representa el sitio de unión de los sustratos D-glucosa y ADP en la estructura del complejo ternario. Los átomos de nitrógeno se muestran en azul, en rojo los átomos de oxígeno, en blanco se representan los átomos de carbono y en anaranjado los átomos de fósforo.

Una revisión en detalle de la estructura del complejo TIGK D-glucosa MgADP β S reveló la presencia de cinco grupos de interacciones que se formaban entre residuos del dominio menor y mayor que podrían estar mediando la transición desde un estado conformacional abierto a uno cerrado. De estas cinco interacciones tres son del tipo atractiva y están gobernadas por enlaces de hidrógeno, una cuarta interacción es atractiva del tipo catión- π y una quinta interacción es de carácter repulsivo, la que podría favorecer la apertura de los dominios (**Figura 1.9**).

En el primer grupo la comunicación entre los dominios se logra mediante la interacción de los residuos Tyr446 con Glu188 y Val447 (**Figura 1.9 Grupo 1**), mientras que los residuos que conforman el grupo 2 contribuyen a la estabilización del cambio conformacional inducido por ADP. En la conformación abierta, Arg202 del dominio mayor esta sobre la hendidura donde se ubica el sitio activo y la cadena lateral de Tyr354 se orienta afuera de la hendidura del sitio activo. En contraste con lo visto, en la estructura del complejo ternario, Arg202 y Tyr354 forman una interacción del tipo π -catión (**Figura 1.9 Grupo 2**).

En el tercer grupo es posible observar residuos genera una red de interacciones, después que se une MgADP, a través de la formación de enlaces de hidrógeno, donde Arg117, del dominio menor, interactúa con los residuos Gly386 y Ser445 del dominio mayor y con Glu115 del dominio menor. Por otra parte, Lys382, perteneciente al dominio mayor, forma de tres enlaces de hidrogeno con los residuos Gly386, Ser445 y Val447 los cuales podrían

afectar la posición y la distribución de carga de Lys382. Cabe mencionar, sí se considera la carga, la distancia y el microambiente que rodean a las cadenas laterales de Arg117 y Lys382, la naturaleza de la carga neta de esta interacción sea probablemente atractiva (**Figura 1.9. Grupo 3**).

En el cuarto grupo, Arg191 del dominio menor interacciona con Ala441 y Ser442 del dominio mayor a través de enlaces de hidrógeno (**Figura 1.9 Grupo 4**). La única interacción del tipo repulsiva es la que se describe en el grupo 5, donde participa Lys76 y Lys246; en la estructura apo Glu100 neutraliza la carga de Lys76, pero en el complejo ternario esta interacción se pierde y Lys74 se aproxima a Lys246 pese a que la asociación sea desfavorable (**Figura 1.9 Grupo 5**).

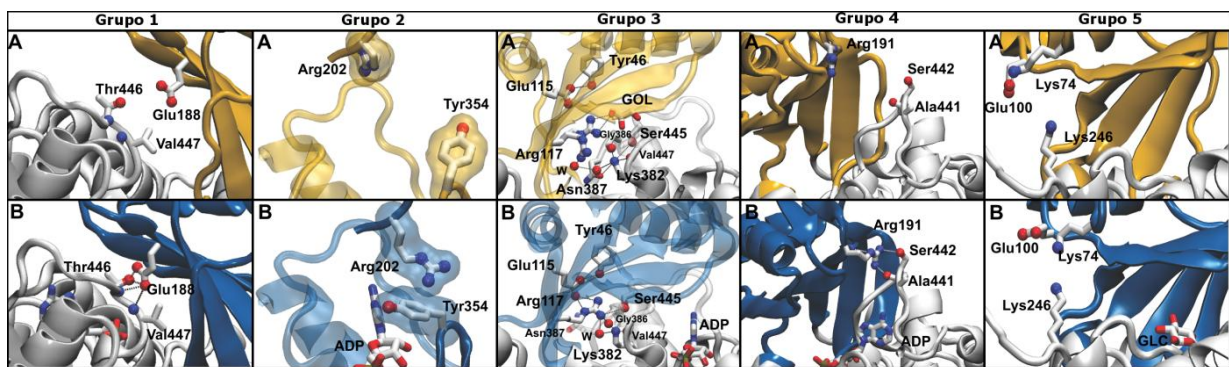


Figura 1.9. Grupo de interacciones entre el dominio menor y mayor de TIGK que se establecen en las transiciones conformacionales desde la forma abierta a cerrada. A. Estructura de la enzima en su forma apo, **B.** Estructura del complejo TIGK·MgADP6S·D-glucosa. El dominio menor se representa en amarillo para la forma apo y para el complejo ternario en azul con el fin de comprender mejor lo propuesto para los cinco grupos de interacciones. Los átomos de las cadenas laterales de los residuos que forman enlaces de H se representan en esferas. El nucleótido se señala como ADP, mientras que la molécula de glicerol se denomina como GOL y agua como W.

V. IV. Mecanismo cinético de la glucoquinasa TIGK

Para comprender si los cambios conformacionales observados en las estructuras se relacionan con los cambios conformacionales gatillados por la unión de ligando se realizaron estudios del mecanismo cinético de la enzima TIGK.

La reacción catalizada por la enzima involucra la entrada de dos sustratos, MgADP y glucosa, y la salida de dos productos, glucosa-6-P y MgAMP, lo que constituye un mecanismo de tipo Bi-Bi. Este tipo de reacciones implica la transferencia de un grupo funcional o átomo de un sustrato a otro. Dichas reacciones pueden suceder por una o diferentes vías. En algunos casos los dos sustratos se unen a la enzima formando un complejo ternario, este tipo de mecanismo es conocido como secuencial (**Figura 1.10 A**), el que puede ser al azar o en un orden específico. Otras reacciones enzimáticas transcurren sin la formación de un complejo ternario, debido a que el primer sustrato que se une es transformado a producto y se disocia antes de que se una el segundo sustrato, este tipo de mecanismos es conocido como mecanismo ping-pong (**Figura 1.10.B**)

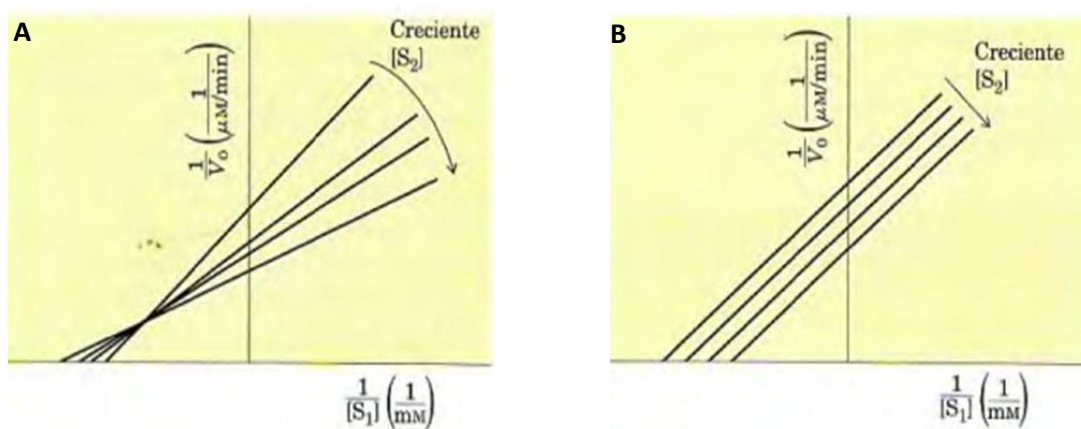


Figura 1.10. Análisis cinético del estado estacionario de la reacciones sustrato. Gráficas de dobles recíprocos donde se varía la concentración de sustrato 1, mientras que se mantiene fijó la concentración de sustrato 2. A. patrón de líneas intersectantes se indica la formación de complejo ternario, infiriendo un mecanismo secuencial. B. patrón de líneas paralelas indica que la reacción sucede por un mecanismo ping-pong sin la formación de un complejo ternario⁶⁰.

Para discriminar qué tipo de mecanismo cinético sigue la enzima TIGK, se llevaron a cabo estudios cinéticos de velocidad inicial de estado estacionario, a diferentes concentraciones de uno de los sustratos (D-glucosa y MgADP) y manteniendo uno u otro sustrato como co sustrato a concentración fija.

Los resultados de dichos estudios fueron proporcionados gracias a la colaboración con el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, dirigido por la Dra. Victoria Guixé. Este estudio consistió en determinar la cinética en velocidad inicial además de realizar estudios cinéticos de inhibición por los productos de la reacción, para dilucidar el orden de entrada de los sustratos y la liberación de los productos.

Los resultados mostraron que el comportamiento de la enzima es del tipo hiperbólico lo que hace posible ajustar los datos al modelo propuesto por Michaelis–Menten. Las curvas de saturación para el sustrato MgADP, a las diferentes concentraciones de glucosa, indican que sólo existe una modificación en la velocidad máxima (V_{max}), la cual incrementa a medida que aumenta la concentración de glucosa, sin que ocurran cambios significativos en la K_M (**Figura 1.11. A**). El mismo comportamiento se observó para el caso de la glucosa, donde el aumento de la concentración del co-sustrato MgADP, conllevó a un aumento de la V_{max} de la reacción, pero no así de la K_M para glucosa (**Figura 1.11.B**). Los ajustes a una concentración infinita de glucosa realizados para ambos sustratos entregaron valores de V_{max} muy similares, $59,4 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para glucosa y para MgADP fue $62,2 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Cuando los datos de las curvas de saturación para ambos sustratos fueron analizados usando gráficas de dobles recíprocos se observó que la intersección de las líneas es característica de un mecanismo en secuencia, donde se debe formar un complejo ternario antes de la liberación de los productos (**Figura 1.11. C y D**).

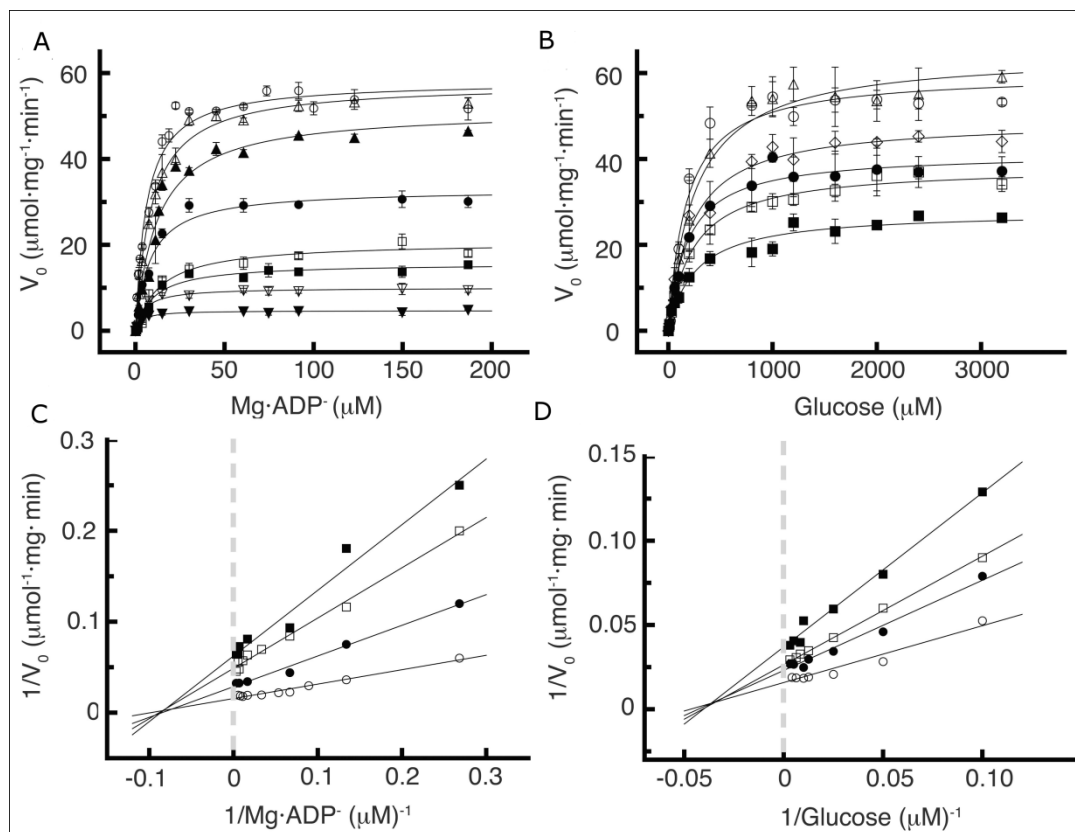


Figura 1.11. Estudios de velocidad inicial para los sustratos MgADP y glucosa. A curvas de saturación para MgADP a diferentes concentraciones de glucosa. **B** curvas de saturación de glucosa a diferentes concentraciones de MgADP. Los símbolos en A corresponden a las siguientes concentraciones fijas de $30 \mu\text{M}$ (\blacktriangledown), $50 \mu\text{M}$ (∇), $100 \mu\text{M}$ (\blacksquare), $150 \mu\text{M}$ (\square), $200 \mu\text{M}$ (\bullet), $250 \mu\text{M}$ (\blacktriangle), 500 (\triangle) and $1000 \mu\text{M}$ (\circ) de glucosa. Los símbolos en B corresponden a las concentraciones fijas de $10 \mu\text{M}$ (\blacksquare), $30 \mu\text{M}$ (\square), $50 \mu\text{M}$ (\bullet), $100 \mu\text{M}$ (\diamond), $300 \mu\text{M}$ (\triangle) and $1000 \mu\text{M}$ (\circ) de MgADP. **C** y **D**, corresponde a gráficas de dobles recíprocos de los mismos datos presentados en la figuras A y B respectivamente. Las mediciones se llevaron a cabo a 40°C .

Para distinguir si el mecanismo de la enzima *TIGK* corresponde a un mecanismo secuencial ordenado y determinar dicho orden, se llevaron a cabo ensayos de inhibición por producto, lo que resultan ser una forma muy útil para determinar mecanismos cinéticos y orden de unión de sustrato, dado que el tipo de inhibición que presentan los productos con respecto a los sustratos indica la formas de la enzima con la que interactúan. Los resultados de los experimentos de velocidad a diferentes concentraciones del producto inhibidor fueron analizados mediante gráficas de dobles recíprocos, dado que los distintos tipos de inhibición (competitivo, mixto y acompetitivo), presentan patrones de líneas rectas característicos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Patrones de inhibición (gráficas de dobles recíprocos.)

Tipo de inhibición	Patrón de líneas rectas	Gráfica de dobles recíprocos
COMPETITIVO	Líneas que intersectan el eje de ordenadas (1/V)	
MIXTO	Líneas que cruzan el segundo cuadrante a izquierda del eje de ordenadas	
ACOMPETITIVO	Líneas paralelas	

Estos resultados indicaron que el producto MgAMP se comporta como un inhibidor competitivo del sustrato MgADP, y como un inhibidor mixto para el sustrato D-glucosa; el otro producto, glucosa-6-P, mostró una inhibición mixta respecto a MgADP y D-glucosa. Estos patrones de inhibición son consistente con un mecanismo en secuencia del tipo ordenado, donde MgADP es el primer sustrato que se une al sitio catalítico y MgAMP es el último producto en ser liberado (**Figura 1.12**). Los resultados obtenidos de los estudios cinéticos coinciden plenamente con la ruta que propone la formación obligada de un complejo ternario lo que apoya firmemente un mecanismo en secuencia ordenado.

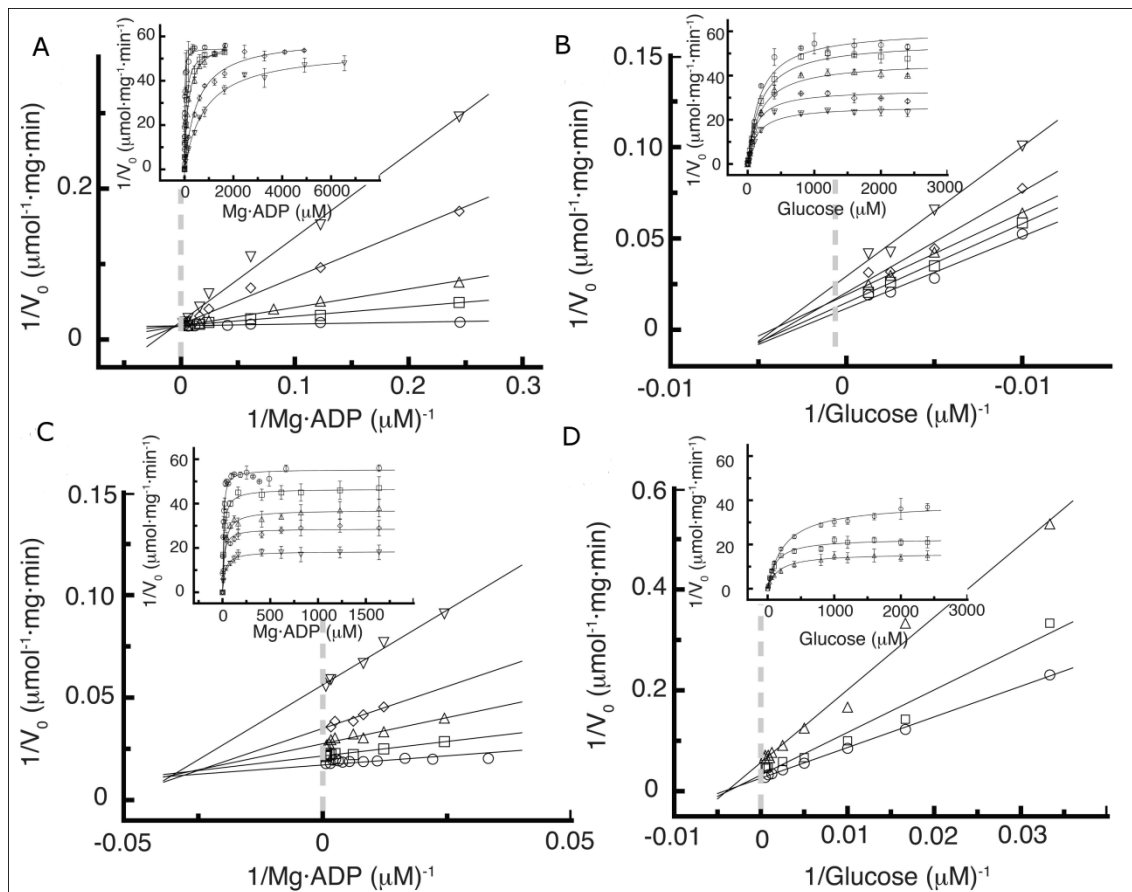


Figura 1.12. Patrones de inhibición por producto para TIGK. **A** inhibición por MgAMP a concentraciones variables del sustrato MgADP. Las mediciones fueron ensayadas a concentraciones fijas de MgAMP: 100 μM (\square), 200 μM (\triangle), 600 μM (\diamond) y 1000 μM (∇). **B** inhibición por MgAMP a concentraciones variables del sustrato glucosa. Las mediciones fueron ensayadas a concentraciones fijas de MgAMP: 435 μM (\square), 858 μM (\triangle), 1738 μM (\diamond) y 3657 μM (∇). Las curvas control, para ambos sustratos, fueron realizadas en ausencia del producto MgAMP (\circ). **C** inhibición por glucosa-6-P a concentraciones de MgADP variable. Las mediciones fueron ensayadas a concentraciones fijas de glucosa 6 fosfato: 100 μM (\square), 500 μM (\triangle), 1000 μM (\diamond) and 2000 μM (∇). **D** inhibición por producto a concentraciones variable de glucosa. Los ensayos fueron llevados a cabo a concentraciones fijas de glucosa-6-P 500 μM (\square) y 2000 μM (\triangle). Para ambos sustratos se realizaron curvas control en ausencia de producto glucosa 6 fosfato (\circ).

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

Actualmente, comprender el mecanismo molecular por el cual las macromoléculas reconocen y responden a la unión de moléculas pequeñas o ligandos es un gran reto para la biología estructural.

En este trabajo, se integraron estudios de cristalografía de rayos-X con las propiedades cinéticas de la *TIGK* dependiente de ADP, para obtener una nueva perspectiva sobre los cambios conformacionales que sufre la enzima y como éstos se relacionan con la dinámica catalítica de la enzima, lo que resulta muy relevante para otras quinasas hipertermófilas dependientes de ADP.

Los resultados obtenidos respaldan la idea planteada en la hipótesis que la enzima *TIGK* presenta flexibilidad conformacional y es sensible a los eventos de unión específica de los sustratos MgADP y D-glucosa. Cuando la enzima está en el estado apo, vale decir, libre de sustratos en el sitio activo, el dominio menor y mayor se encuentran distantes uno del otro lo que impide distinguir la formación de interacciones entre residuos de cada dominio. En contraste, para que el complejo ternario tenga un empaquetamiento correcto es necesario un arreglo de sus dominios, lo que se consigue con movimientos de torsión y cierre, lo que conduce a una conformación cerrada y adecuada para la catálisis.

La comparación de los datos obtenidos desde las estructuras cristalinas con los datos de los modelos *ab initio* de la enzima *TIGK*, obtenidos desde los experimentos de SAXS reportados en el trabajo realizado por Rivas y colaboradores en el año 2013³⁴, sugieren que los cambios conformacionales que sufre la proteína durante la catálisis son más drásticos en solución que en estado cristalino. Para la proteína en ausencia de ligandos o forma apo se observa que la apertura entre los dominios es mayor que la observada en el cristal, mientras que los datos de SAXS para el caso de la proteína en complejo con sus ligandos sugiere una conformación más compacta que lo observado en la estructura cristalina.

Tomando en cuenta los datos de distancia entre los dominios de las estructuras cristalinas reportados por Rivas y cols.³⁴ se demuestra que la proteína experimenta una serie de cambios conformacionales a medida que se unen sus ligandos. De hecho la diferencia entre la conformación apo y la proteína en complejo con ADP es de 1 Å, mientras que esta diferencia se acentúa a 5 Å cuando las distancias son calculados usando los datos obtenidos desde los experimentos de SAXS y ajustando las gráficas de distribución de distancias. Esta

situación muestra que existiría un mayor grado de libertad conformacional de la enzima en solución comparada con su estado cristalino. No obstante, lo más destacable desde el punto de vista estructural es el cambio conformacional secuencial gatillado con la unión de ADP seguida de la unión de D-glucosa al sitio activo de la enzima, lo cual concuerda con lo determinado para el mecanismo cinético de *TIGK*.

Otro hecho destacable en este estudio es cómo la enzima coordina interacciones entre los dominios mayor y menor para lograr la conformación cerrada a través de una serie de grupos de residuos específicos.

Dentro de estos grupos de residuos que presentan interacciones, no covalentes que comunican a ambos dominios se observó que ciertos grupos se encuentran conservados en otras enzimas homólogas. Análisis de conservación de los residuos que componen estos grupos, realizado por Rivas y col en 2013³⁴, indican que el primer grupo de interacciones, del tipo atractivas, se encuentran conservadas en toda la familia de las quinasas dependientes de ADP, lo que hace pensar que esta red de interacciones ha sido conservada durante la evolución en enzimas dependientes de ADP de *Archaea* tanto termófilas como mesófilas, así como también en las glucoquinasas dependientes de ADP pertenecientes al dominio *Eucarya*.

En el caso del segundo grupo que describe una interacción del tipo catión- π formada por los residuos Arg202 y Tyr354 que estaría estabilizando la conformación cerrada de la enzima, ésta no es distintiva de la enzima *TIGK*, sino que también se ve conservada en las enzimas glucoquinasas dependiente de ADP del grupo de las *Thermococcales* hipertermófilas. Sin embargo, en las glucoquinasas mesófilas esta interacción no ésta conservada.

Este tipo de interacciones fueron estudiadas por Minoux y Chipot⁶¹ usando dinámica molecular para 1718 proteínas y sus resultados mostraron que los sistemas de interacción π , como catión- π e interacciones π -apiladas (π - π stacking), usualmente se presentan entre los residuos de arginina y tirosina. Además, las distancias promedio observadas en estos sistemas de interacción π , calculadas *in silico* (3,6 Å), son concordante con lo visto desde el cristal del complejo ternario de *TIGK* (3,4 Å). Por otra parte, Gromiha en el año 2002⁶² sugirió que las proteínas termófilas prefieren emplear residuos aromáticos de tirosina para formar las interacciones- π , en vez de usar residuos de fenilalanina o triptófano.

Actualmente, se ha visto que las interacciones del tipo catión- π son de gran relevancia en sistemas biológicos, tal como en las estructuras de proteínas, así como también en catálisis y en la síntesis orgánicas. Evidencias de estas interacciones han sido descritas en el trabajo de Pecsí del año 2010⁶³, donde se muestra que la interacción π - π apilada en la enzima dUTP fosfatasa de *Mycobacterium tuberculosis*, que cataliza la hidrólisis de grupo fosfato α del nucleótido de uracilo, es relevante en la catálisis, ya que la eliminación de esta interacción disminuye la eficiencia catalítica. En este mismo trabajo, se plantea la posibilidad de que este fenómeno reportado es un componente común en la catálisis enzimática de hidrólisis de éster fosfato, ya que este tipo de interacciones aromáticas están presentes en diversas enzimas que hidrolizan grupos fosfatos de nucleótidos (por ejemplo, la mayoría de las familias de ATPasas⁶⁴). Otros ejemplos que muestran la relevancia biológica y el papel que presentan este tipo de interacciones del tipo π - π apiladas, es el descrito para las interfaces de interacciones proteína-proteína o como una estrategia que facilita la estabilización de estructuras de proteínas sicrofílicas y termófilas^{62,65,66}.

Por otra parte, el tercer grupo de interacciones del tipo atractivas aparecen conservadas en las glucoquinasas y fosfofructoquinasas termófilas dependientes de ADP. Lo mismo sucede en el caso de las interacciones descritas como repulsivas y formada por los residuos Arg117 y Lys382, donde las interacciones se conservan en las proteínas termófilas pero no en los miembros mesófilos. En cambio, las interacciones también del tipo repulsivas formadas por los residuos de lisina 76 y 246 no están conservados en ninguna enzima homóloga de la familia, es decir es exclusiva de la T/GK. Un análisis de predicción teórica de estados de protonación de las Lys 76 y 246, realizado con el servidor PDB2PQR implementado para el cálculo de interacciones electrostáticas, indicó que ambos residuos estarán cargados positivamente al pH al cual sucede la catálisis, lo que provoca la repulsión de estos residuos facilitando la apertura de los dominios. Este tipo de interacciones fueron estudiadas en detalle por Vondrásek y cols. en 2009⁶⁷, quienes utilizando aproximaciones *in silico*, analizaron los pares iónicos Arg-Arg y Lys-Lys. Los resultados obtenidos se compararon con los análisis de bases de datos estructurales, los que indicaron que hay un fuerte efecto repulsivo entre los grupos aminos de las lisinas, el que se debe a la carga del ion amonio y su geometría casi esférica, la cual favorece el potencial coulombico repulsivo.

En síntesis, en este trabajo se propone que la estabilización de la conformación cerrada podría estar mediada por una serie de interacciones entre los dominios menor y mayor en

que cuatro de estas interacciones corresponden a interacciones del tipo atractiva, una del tipo catión- π y tres enlaces de hidrógeno. Un grupo de esta serie de interacciones corresponde a interacciones repulsivas lo que estaría facilitando la apertura de los dominios, conduciendo a la liberación de los productos. Por lo tanto, seis enlaces de hidrógenos y una interacción de cargas permiten el cierre de los dominios, mientras una interacción repulsiva permite llevar a la proteína *T/GK* a la conformación abierta. Un ejemplo de este tipo de estrategia catalítica se observa en la enzima fosfoglicerato quinasa en que la unión del sustrato gatilla el cierre de sus dominios, el cual se estabiliza gracias a una red de enlaces de hidrógenos, los que a su vez permiten la exposición de un parche hidrofóbico que gatilla la apertura de sus dominios^{68,69}.

En este estudio fue posible determinar los cambios conformacionales que experimenta la proteína hipertermófila glucoquinasa dependiente de ADP en estado cristalino y correlacionarlo con su mecanismo cinético. Asimismo, se demostró que hay grupos de interacciones que estarían involucrados en la estabilización de la conformación cerrada y otro que favorecería la apertura de dominios, para volver a la conformación abierta.

CAPITULO 2

Determinación de la
especificidad por nucleótido de
la proteína mutante perGK

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

En cierto grupo de *Archaeas*, el flujo glicolítico sucede a través una versión modificada de la vía Embden-Meyerhof, donde los pasos claves de fosforilación de glucosa y fructosa-6-fosfato, son llevados a cabo por quinasas, donde el nucleótido dador del grupo fosforilo es el ADP en vez del ATP⁷⁰.

Cabe destacar, desde el punto de vista estructural, los miembros que pertenecen a esta superfamilia tienen en común un dominio mayor que presenta un plegamiento tipo riboquinasa, que consiste en una estructura tipo sándwich $\alpha/\beta/\alpha$, donde una sábana β central se divide en una región que presenta un motivo tipo Rossmann y una región con un motivo estructural denominado β meandro²³.

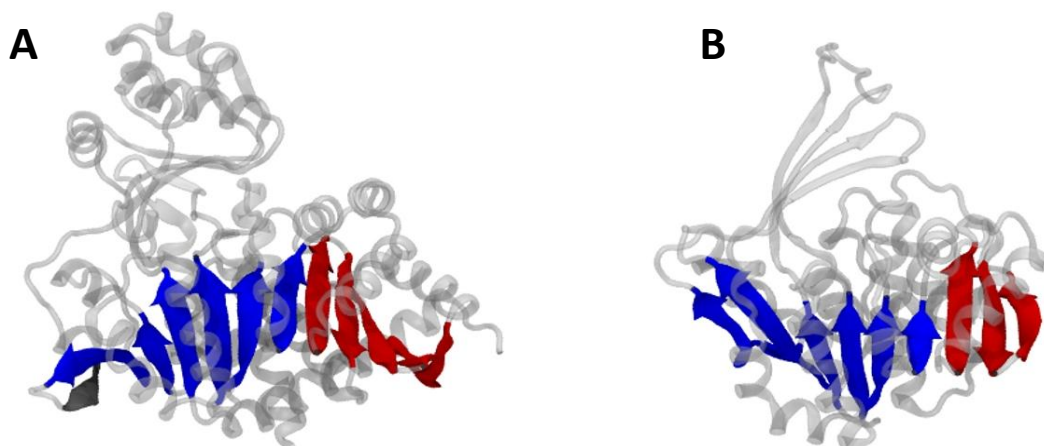


Figura 2.1. Diagrama de la composición la sábana β central del plegamiento tipo riboquinasa. En azul se muestra el motivo Rossmann y en rojo se muestra el motivo β meandro de la proteína glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* (A) y de la proteína riboquinasa de *E. coli* (B).

Los diagramas de topología de las estructuras disponibles de miembros de la superfamilia riboquinasa muestran que existen tres tipos de topología²⁵. Las quinasas dependientes de ADP se caracterizan por la relación que existe entre el uso de nucleótido y la presencia de hebras- β no consecutivas en el extremo C- terminal. Además, estas quinasas presentan un dominio menor constituido por inserciones de estructura secundaria que comienzan con una hebra- β a continuación de la hebra N- terminal de la sábana β central. Lo mismo se observa en las quinasas dependientes de ATP, excepto que en este grupo de quinasas la presencia de hebras- β es consecutiva. Estudios de secuencia muestran que las glucoquinasa y fosfofructoquinasa dependientes de ADP son homólogas entre ellas. Sin embargo, cuando

se comparan con quinasas dependientes de ATP, como por ejemplo fosfofructoquinasa-2 de *E.coli*, adenosina quinasa, riboquinasas, entre otras, la identidad de secuencia no es significativa, aunque estructuralmente ambas familias, dependientes de ATP, como las dependientes de ADP, presentan un dominio menor. La presencia de un dominio menor se relaciona con la unión del aceptor del grupo fosforilo, y también participa como interface para la dimerización de quinasas de azúcar dependientes de ATP¹⁷. Finalmente, existe un grupo de quinasas que no presenta dominio menor y contiene hebras- β consecutivas en el extremo C-terminal del dominio mayor.

Zhang en año 2004 propuso la hipótesis que sugería que los miembros pertenecientes a la familia riboquinasa tenía un ancestro en común que con el paso de la evolución fue progresando su complejidad estructural, desde lo más simple a lo más complejo, llegando a ser una proteína monomérica más compleja con un número de aminoácidos mayor que el que tenía la forma ancestral, y con un dominio menor que forma parte del sitio activo de la proteína y estructuralmente más complejo. Por lo que se postula que las proteínas quinasas dependientes de ADP serían los miembros más recientes de esta superfamilia²⁵.

Además de la presencia o ausencia de un dominio menor, otra diferencia estructural que se puede encontrar entre las quinasas de azúcar dependientes ATP y las de ADP es en la región β -meandro. Las proteínas dependientes de ATP contienen en la región C-terminal un motivo β -meandro real mientras que en las quinasas dependientes de ADP este motivo de estructura secundaria difiere significativamente en las conexiones del motivo β -meandro (**Figura 2.2**). Dicho reordenamiento de la topología en la región β -meandro puede ser visto como una permutación circular. Una permutación circular ocurre cuando se unen covalentemente los extremos amino y carboxilo a través de un enlace peptídico, seguido por la escisión de un enlace peptídico preexistente, para generar extremos nuevos en un sitio distinto dentro de la secuencia de proteína, reorganizando de esta manera el orden de la cadena polipeptídica⁷¹.

La región β -meandro constituye casi por completo el sitio de unión a nucleótido y es la principal diferencia estructural entre las quinasas de azúcares dependientes de ATP y las de ADP, por lo que se cree que este reordenamiento podría ser el responsable de la especificidad por el nucleótido.

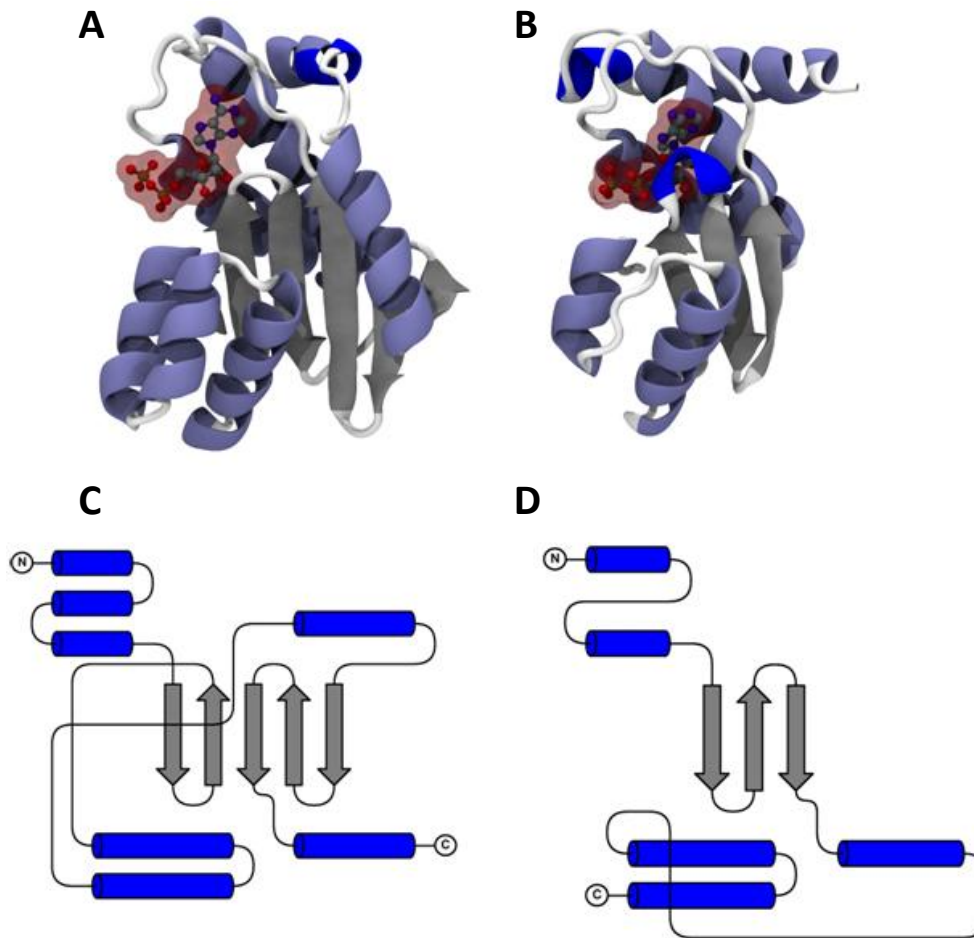


Figura 2.2. Esquema de la región β -meandro de TIGK y riboquinasa de *E.coli*. Sitio de unión a nucleótido de la proteína glucoquinasa dependiente de a ADP de *T. litoralis*(A) y riboquinasa de *E.coli* (B). (C) corresponde al diagramas topológico de la región β -meandro de la enzimas glucoquinasa de *T. litoralis* desde el residuo 302 hasta el extremo C-terminal, mientras que en (D) se presenta el diagrama topológico de la riboquinasa de *E.coli* desde el residuo 187, lo que corresponde a la región β -meandro.

En este trabajo se planteó estudiar el efecto de la permutación circular en la región C-terminal, usando como modelo la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*, sobre la especificidad por el nucleótido, el mecanismo cinético y la estructura de la proteína permutante. Para ello se realizaron estudios estructurales a través de cristalografía de difracción de rayos-X y cinéticos para determinar el orden de entrada de sustratos y salida de productos para luego comparar estos resultados con los obtenidos para la enzima silvestre. Cabe destacar, que aunque este objetivo no fue propuesto al comenzar este proyecto de tesis, gracias a la colaboración y co-tutoría de la Dra. Victoria Guixé se planteó estudiar la importancia de la permutación circular en la región C-terminal en la especificidad de TIGK por el nucleótido de adenina.

II. y III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS

El reordenamiento en la topología de la región β -meandro determina la especificidad por el nucleótido en la glucoquinasa dependiente de ADP de T. litoralis.

III. OBJETIVOS

III.I. Objetivo general

- Determinar el efecto de la permutación circular en la región C-terminal sobre la especificidad por nucleótidos de adenina en la *T/GK*

III.II. Objetivos específicos

- Determinar la especificidad de la perGK por ADP o ATP, mediante estudios de actividad enzimática.
- Determinar el mecanismo cinético mediante estudios de velocidad inicial, inhibición por producto y por inhibidores de punto muerto
- Determinar el efecto de la permutación sobre la estructura de la *T/GK* en su forma apo y en presencia de sus ligandos a través de cristalografía y difracción Rayos-X

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.I. Material

IV. I. 1. Material biológico

Para este estudio, el gen mutante de la proteína glucoquinasas dependiente de ADP permutante (perGK) de *Thermococcus litoralis* fue obtenido mediante síntesis *de Novo*, a cargo de la empresa Gen script, y enviado al laboratorio en el vector pUC57. El uso de codones fue optimizado para la expresión en *E. coli*.

El gen de la proteína permutada fue clonado en el vector de expresión pET17b. Este plásmido contiene un gen *lac* que codifica para la proteína represora lac, un promotor T7 que es específico sólo a RNA polimerasa T7, un operador *lac* que puede bloquear la transcripción, una región de clonamiento múltiple para diferentes enzimas de restricción, un gen de resistencia a ampicilina, y un origen de replicación de *E. coli* en este trabajo con el que se transformaron las cepas BL21 (DE3) plus y BL21 (DE3) de *E. coli*. Las cepas bacterianas que se emplearon para llevar a cabo el trabajo experimental fueron *E. coli* BL21 (DE3) plus y BL21 (DE3) disponibles en el cepario del laboratorio. Las células crecieron de forma rutinaria a 37°C en medio LB suplementado con antibiótico.

IV. I. 2. Enzimas

Para los ensayos de actividad enzimática se usaron las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (G6PDH), quinasa pirúvica (PK) y deshidrogenasa láctica (LDH), ambas provenientes de músculo de conejo, las que fueron obtenidas de Sigma Chem. Co. (MO, E.E.U.U).

Para el trabajo de biología molecular se emplearon las enzimas de restricción FastDigest® *BamHI* y *NdeI* las que fueron obtenidas desde Fermentas, ThermoScientific (MA, E.E.U.U).

La enzima DNA polimerasa super mix platinum high fidelity, se obtuvo de Invitrogen (CA, E.E.U.U), mientras que la enzima DNA ligasa se obtuvo de New EnglandBioLabs®inc. (NEB).

IV. I. 3. Sistema de purificación de PCR y DNA plasmidial

El producto de PCR fue purificado desde geles de agarosa, empleando el sistema de purificación Ultraclean 15, MO BIO (CA, E.E.U.U). El DNA plasmidial fue purificado utilizando el sistema plasmid mini kit II, EZNA, OMEGA Bio-tek (E.E.U.U).

IV. I. 4. Medios de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Luria- Bertani (LB), el cual se constituye por el extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1% y triptona 1%, ajustado a pH 7 con NaOH.

Para el crecimiento de las células en medio sólido se empleó el medio LB-agar, el que está formado por agar 1,5%, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1% y triptona 1%, ajustado a pH 7 con NaOH.

Los medios de cultivos se suplementaron con antibióticos para la selección de las células transformantes, para lo cual se usaron los antibióticos ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y cloranfenicol ($35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

IV. I. 5. Materiales químicos y reactivos

Los reactivos empleados en este trabajo son los que se mencionan en el capítulo 1 (apartado de material y métodos), sin embargo, se incluyen el marcador de tamaño molecular de DNA MassRulerTM, DNA LadderMix , fosfoenolpiruvato, adenosina 5´trifosfato (ATP), adenosina 5´monofosfato (AMP), glucosa-6-P y 1,5 anhidro glucitol.

IV. II. Metodología

IV. II. 1. Transformación de células de *E. coli*

El gen de la proteína mutada perGK fue generado por síntesis *de Novo* (GenScript) y clonado en el vector pUC57. Posteriormente, el gen fue subclonado en el vector de expresión pET17b.

Las células quimiocompetentes *E.coli* BL21 (DE3) plus, fueron preparadas mediante el método de cloruro de calcio según lo indicado por Sambrook en 2001⁷². Más adelante, dichas células fueron transferidas de manera estéril a los tubos de microcentrifuga que contenían el plásmido a transformar, mientras que los tubos se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Luego las células con el plásmido fueron sometidas a un golpe térmico a

42°C por 45 segundos y a continuación fueron trasladados por 5 minutos al hielo. Finalmente se adicionaron 800 µL de medio LB y se incubó a 37°C por una hora con agitación. Más tarde, la suspensión celular fue centrifugada a 2.000 g por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 100µL de medio LB fresco para resuspender las células. La suspensión celular fue aplicada en placas con LB-agar suplementado con los marcadores de selección, ampicilina y cloranfenicol. Finalmente las placas se dejaron incubando a 37°C por 16 horas.

IV. II. 2. Crecimiento de las células de *E.coli* BL21 (DE3) pLysS-pET17b-perGK para la purificación de la proteína glucoquinasa mutada (perGK) de *T. litoralis*

Para obtener células en fase exponencial se tomó una colonia de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) plus, transformada con el vector pET17b que contiene la proteína glucoquinasa mutada perGK, y se inocularon 50 mL de medio LB, suplementado con los antibióticos ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (35 µg/mL), el que fue incubado a 37°C por 16 horas. Posteriormente, la suspensión celular se inoculó al 5% en un litro de LB adicionando los antibióticos correspondientes, e incubándola a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD_{600nm} 0,8, para luego inducir la expresión de la proteína perGK con IPTG a una concentración final de 0,2 mM. La incubación continuó por 16 horas a 37°C con agitación y finalmente las bacterias inducidas fueron colectadas por centrifugación a 5.000 xg durante 20 minutos.

IV. II. 3. Purificación de la proteína mutada de glucoquinasa perGK

Las células colectadas proveniente de un litro de cultivo (aproximadamente 4 g de peso húmedo), se resuspendieron en amortiguador de lisis constituido por Tris-HCl 50 mM pH 7,8, MgCl₂ 5mM, NaCl 100mM y 1 mM PMSF. La suspensión fue sometida a un proceso de sonicación y posterior centrifugado para separar la fracción soluble de la fracción insoluble. La fracción soluble fue sometida a un golpe térmico a 90°C por 30 minutos y centrifugada nuevamente. La purificación fue realizada por cromatografía de intercambio aniónico usando la columna Hi-Trap QTM HP (GE Healthcare), la que fue equilibrada y lavada, con el amortiguador A. Luego que el extracto celular que contiene la proteína de interés fue agregado a la columna, la proteína se eluyó mediante un gradiente lineal de 0 a 100% amortiguador B constituido por Tris-HCl 50 mM pH 7,8, MgCl₂ 5 mM y NaCl 1M. Las fracciones que contenían la enzima fueron seleccionadas usando el ensayo de actividad enzimática para la reacción de fosforilación de glucosa, mientras que la proteína eluida fue

dializada contra el amortiguador C (HEPES pH 7,8 50mM y NaCl 100mM) y concentrada para posteriormente realizar el segundo paso de purificación. Dicho paso consistió en una cromatografía de exclusión molecular en la resina Superdex75 HR 10/300GL (GE Healthcare), la cual fue pre-equilibrada con el amortiguador C, el que se usó para eluir la proteína perGK. Para detectar las fracciones que contienen proteínas se midió la actividad y la absorbancia a 280 nm. Ambos procesos cromatográficos fueron realizados a temperatura ambiente y las fracciones que contenían la enzima fueron seleccionadas midiendo la actividad enzimática mencionada anteriormente. Las fracciones seleccionadas fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para determinar su grado de pureza. Las fracciones con un 95% de homogeneidad fueron reunidas, concentradas y almacenadas a 4°C con glicerol al 20%.

IV. II. 4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes

Para determinar el grado de pureza de la proteína de las fracciones seleccionadas, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes, mediante el protocolo que se menciona en la sección Materiales y Métodos en el capítulo 1.

IV. II. 5. Preparación de la muestra de proteína perGK para ensayos cristalográficos

La muestra se concentró utilizando unidades de filtrado Amicon® Ultra-15 con membrana de corte 3kDa, a 5.000 g y a 4°C hasta una concentración de 10 mg·mL⁻¹.

IV. II. 6. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada del mismo modo que fue explicado en el Capítulo 1 en la sección Material y Métodos.

IV. II. 7. Cristalización, colección y estadística de los datos de la difracción de rayos-X de la enzima perGK en su forma Apo y en complejo con ADP-Mg-Glucosa

IV. II. 7. 1. Ensayos de cristalización

Para determinar las condiciones de cristalización óptimas de la perGK en forma apo, en presencia de glucosa (Glc) y en presencia de MgADP β S·Glc se utilizaron cribados sistemáticos de condiciones basados en las condiciones obtenidas para la enzima *T/GK* silvestre así como kits comerciales de desde Hampton Research y Molecular Dimensions. Los ensayos de cristalización fueron llevados a cabo utilizando la técnica de difusión de vapor por gota sentada a 20°C en placas de 48 pocillos MRC (Molecular Dimensions), mezclando 2 μ L de perGK (10 mg/mL) y 1 μ L de cada condición sobre un volumen de reservorio de 70 μ L. Los cristales de perGK obtenidos en ausencia de ligando son: 0.2 M citrato de litio, 23% (w/v) PEG 3350; mientras que para los cristales de la proteína en complejo con Glc fue: 0.2 M sulfato de litio, 20% (w/v) PEG 3350, 30 mM Glc; y en complejo ternario, es decir, en presencia de Glc y ADP β S fue: 0.2 M sulfato de litio, 20% (w/v) PEG 3350, 30 mM Glc y 5 mM MgADP β S.

IV. II. 7. 2. Crioprotección

La protección de los cristales es fundamental para conseguir una buena resolución y calidad de los datos de difracción. Para este objetivo se utilizó como solución de crioprotección la misma condición de cristalización suplementada con 20% (v/v) de glicerol estéril. A continuación los cristales fueron recogidos desde la gota con un lazo de nylon, cuyo tamaño es similar al cristal, y finalmente los cristales fueron congelados por inmersión en nitrógeno líquido y almacenados a la temperatura del correspondiente al nitrógeno líquido.

IV. II. 7. 3. Colección y procesamiento de los datos de difracción

La colección de datos de difracción de rayos-X se realizó en las líneas PROXIMA 1 (Apo) y PROXIMA2A (Glc y MgADP·Glc) en el sincrotrón SOLEIL, París, Francia. Para la obtención de los datos cristalográficos se procedió de la misma manera que fueron recogidos los datos de la proteína *T/GK*, explicitado en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1. El indexado fue realizado utilizando el programa XDS⁴⁹. A continuación, los datos indexados fueron escalados mediante el uso del programa Aimless⁵⁰, que se encuentra incluido en un paquete de programas CCP4⁵¹.

IV. II. 7. 4. Resolución y refinamiento de estructura perGK

Luego de procesar los datos, se resolvió la estructura tridimensional de la proteína perGK en ausencia de sus sustratos, en presencia de glucosa y en complejo con glucosa y ADP β S, a través del método de reemplazo molecular utilizado como modelo la estructura de glucoquinasa de *T. litoralis*. Una vez resuelto el problema de las fases y descifrado el mapa de densidad electrónica de las estructuras mediante el programa PHASER 2,5⁵⁵, se procedió a la modelización de la estructura de perGK, especialmente de la secuencia permutada (³⁶¹GGGRQLAFVPTKIVASPKSTVIGIGDTISSSAFVSEFGGGG⁴⁰⁴), utilizando el programa Coot⁵⁶. Ciclos de modelización manual y de refinamiento con el programa Phenix.refine⁷³ se realizaron de forma iterativa para conseguir obtener una estructura progresivamente mejor. Finalmente, la geometría y la estequiometría de las estructuras se validaron con el programa MolProbity⁷⁴. Las figuras fueron preparadas con el programa Visual Molecular Dynamics (VMD)⁵⁹.

IV. II. 8. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad de la enzima perGK en presencia de ADP fue realizada midiendo velocidad inicial, tal como se explica en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1. La determinación de la actividad de la enzima perGK en presencia de ATP se realizó mediante la cuantificación del ADP, acoplando la reacción a la oxidación de NADH, catalizada por enzima piruvato quinasa cataliza la reacción de formación de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato y ADP, mientras que la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reacción de formación de lactato a partir de piruvato, según el esquema indicado en la **Figura 2.3**. En este proceso, el NADH⁺ es oxidado a NAD⁺, lo que permite seguir la velocidad de la reacción monitoreando la disminución de la absorbancia de NADH a 340nm. Las determinaciones fueron realizadas a 40°C utilizando el espectrofotómetro-UV HP 8453, con porta-celda termo-estabilizado a la temperatura mencionada anteriormente. El cálculo de las velocidades de la reacción glucoquinasa fueron obtenidas estimando la pendiente de la curva de progreso, usando el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm cuyo valor corresponde a 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹⁴⁵. La velocidad se expresó como unidades de enzima por miligramo, donde una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima perGK capaz de fosforilar 1 μ mol de sustrato en 1 minuto, bajo las condiciones experimentales previamente comentadas.

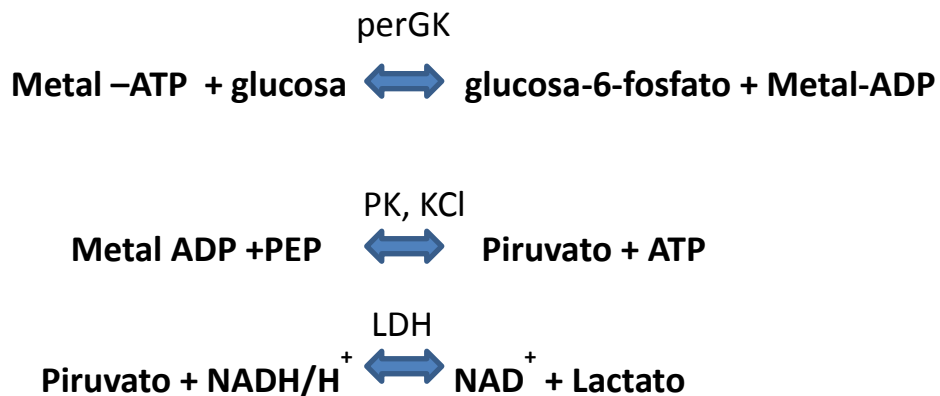


Figura 2.3. Ensayo acoplado utilizado para medir la actividad de perGK de *T. litoralis* en presencia de ATP.

Habitualmente la determinación de la actividad de la enzima en presencia de glucosa-6-P, se realiza a través de la cuantificación de la desaparición del sustrato ADP, utilizando ensayos discontinuos que permiten cuantificar el ADP que queda sin reaccionar. En este trabajo no fue posible cuantificar ADP, por lo que la estrategia para determinar el efecto de glucosa-6-P sobre la actividad de la enzima consistió en determinar la actividad de la enzima perGK en la dirección contraria (reacción reversa), es decir, hacia la formación de glucosa y ADP. Para llevar a cabo estos ensayos fue necesario acoplar la reacción catalizada por la enzima perGK, a la reacción que permite cuantificar, de manera indirecta, la formación de ADP, a través de las enzimas auxiliares piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) cuantificando los moles de NADH oxidados por medio del coeficiente de extinción molar teórico del NADH a 340nm ($6.22\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)⁴⁵ (Figura 2.4).

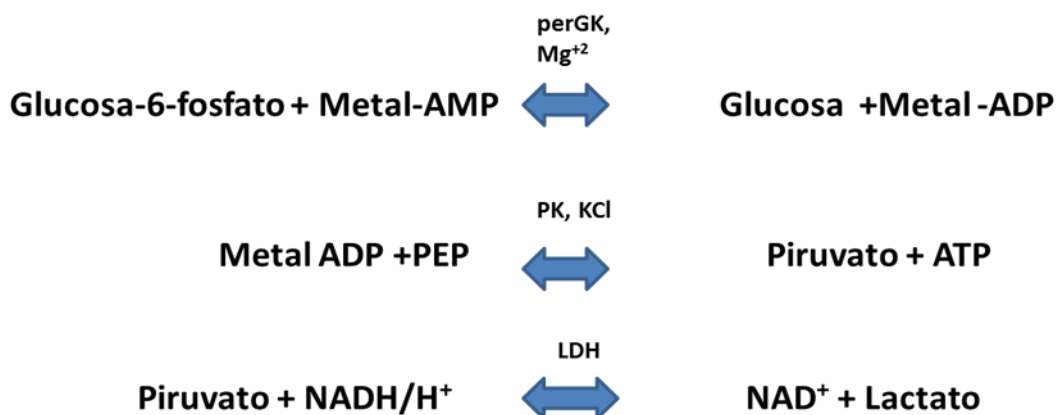


Figura 2.4. Ensayo acoplado utilizado para medir la actividad de perGK de *T. litoralis* catalizando la reacción reversa.

IV. II. 9. Determinación de constantes cinéticas, K_M y k_{cat} .

Las constantes cinéticas, constantes de Michaelis (K_M) y constantes catalíticas (k_{cat}), fueron calculadas ajustando los datos de velocidad inicial de manera independiente para cada uno de los sustratos. La estrategia usada para este propósito consistió en variar uno de los sustratos manteniendo constante la concentración del co-sustrato. Los datos se ajustaron al modelo hiperbólico de Michaelis-Menten⁷⁵.

$$v = \frac{v_{max} \cdot S}{K_M + S}$$

Ecuación 2.1

Las gráficas se construyeron utilizando el programa computacional GraphPadPrism versión 5.0.

IV II. 10. Determinación del mecanismo cinético.

Para el tratar los datos respecto a los modelos cinéticos se usó la nomenclatura propuesta por Cleland en el año 1970⁷⁶. Esta nomenclatura indica que en una reacción del tipo Bi-Bi (dos sustratos y dos productos) A y B representan al primer y segundo sustrato, respectivamente, mientras que P y Q representan al primer y último producto liberado desde la enzima, respectivamente. Las constantes K_A , K_B , K_P y K_Q representan las constantes de Michaelis para A, B, P y Q, respectivamente. Finalmente, K_{iA} representan las constantes de inhibición o disociación para el sustrato A.

Para determinar el mecanismo cinético se utilizaron los protocolos clásicos de velocidad inicial. Una de las estrategias consistió en diferenciar entre un mecanismo secuencial, que involucra la formación de un complejo ternario entre la enzima y los dos sustratos (EAB), o un mecanismo ping-pong, que después de la unión del primer sustrato se libera uno de los productos. Para esto fue necesario realizar medidas de velocidad inicial para el sustrato MgADP a diferentes concentraciones fijas del co-sustrato glucosa. De la misma forma, pero en sentido inverso, se realizaron las mediciones de velocidad inicial para glucosa a diferentes concentraciones de MgADP. Luego de construir los dos grupos de curvas se estableció el tipo de mecanismo cinético.

Para establecer el orden de entrada de los sustratos se procedió a realizar ensayos de inhibición por producto de la reacción reversa de la enzima *perGK*, de esta forma se estimaron las constantes aparentes de MgAMP y glucosa-6-P a diferentes concentraciones de ambos productos correspondiente a glucosa y MgADP^{34,39,75,77}.

Otra estrategia para determinar el orden de entrada de los sustratos fue mediante inhibición por análogos de punto muerto, que corresponde a un compuesto que reacciona con una o más formas de la enzima y produce un complejo que no participa en la reacción, actuando como inhibidor de la reacción⁷⁵. Para este objetivo se realizaron ensayos de inhibición utilizando los análogos de punto muerto MgATP y 1,5-anhidroglucitol, para los sustratos MgADP y glucosa, respectivamente.

Para discriminar el mecanismo cinético y los tipos de inhibición que ejercen los productos y los análogos de punto muerto sobre la enzima *TIGK*, se construyeron gráficos de doble recíprocos construidas con de los datos experimentales. De acuerdo a los que muestran patrones de líneas rectas es posible determinar el tipo de mecanismo, por otra parte, los ensayos de inhibición presentan patrones de líneas rectas que son característicos con el tipo de inhibición que presenta la enzima. Por otra parte los tipos de inhibición se pueden deducir el orden de entrada de los sustratos y de la liberación de los productos, dado que las moléculas inhibitoras se unirán a formas específicas de la enzima.

Tabla 2.1. Patrones de inhibición para enzimas Bi-sustrato y representaciones de Cleland⁷⁸ para determinar mecanismos cinéticos.

Mecanismo cinético	Sustrato variable	Producto	Tipo de inhibición
Secuencial Ordenado Bi-Bi	A	Q	Competitivo
	B	Q	Mixto
	A	P	Acompetitivo
	B	P	Mixto
Secuencial ordenado Bi-Bi			
Secuencial al azar Bi-Bi	A	Q	Mixto
	B	Q	Mixto
	A	P	Mixto
	B	P	Mixto
Secuencial al Azar Bi Bi			
Ping pong	A	Q	Mixto
	B	Q	Competitivo
	A	P	Competitivo
	B	P	Mixto
Ping-pong			

IV. II. 11. Determinación de la concentración de los sustratos.

La concentración de ADP fue determinada a través de dos metodologías, una consistió en la cuantificación espectrofotométrica, empleando el coeficiente de extinción molar a 260 nm de $15,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ⁷⁹, mientras que la otra metodología fue la titulación del ADP usando la misma reacción catalizada por la enzima *T/GK*, acoplada a la reacción catalizada por la enzima auxiliar glucosa-6-Pdeshidrogenasa. La titulación del ADP consiste en cuantificar los moles de ADP a partir de la medida de los moles de NAD^+ producidos. Siguiendo esta última estrategia, también se estimó la concentración de glucosa. En cambio para determinar la concentración de glucosa-6-P se empleó la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, cuantificando los moles de glucosa-6P a través de la cuantificación de los moles de NAD^+ reducidos a NADH^+ . Para el AMP se empleó el coeficiente de extinción molar de adenina, como fue utilizado para la cuantificación de ADP⁷⁹.

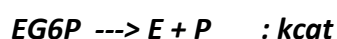
IV. II. 12. Validación del mecanismo cinético mediante ajustes globales

Para confirmar el mecanismo cinético obtenido, se realizaron ajustes estadísticos globales de los datos obtenidos a diferentes concentraciones de sustratos, inhibidores y enzima; para llevar a cabo este objetivo se utilizó el programa *DynaFit* (versión 4.05.129)⁸⁰.

Para la determinación del orden de entrada de los sustratos a la enzima se realizaron estudios de inhibición por producto midiendo la reacción reversa. Para ambos productos, MgADP y glucosa, se compararon los modelos de inhibición competitiva, no competitiva, acompetitiva y mixta.

Para todos los casos se asumió un equilibrio rápido en los procesos de asociación entre las diferentes formas de la enzima y los sustratos.

Cada mecanismo de reacción fue descrito a través de una simbología simple como se muestra en el siguiente ejemplo para un modelo de inhibición mixta.



Donde $KmG6P$, $KiGLC$ y $KmGLC$ son los formatos que utiliza el programa *DynaFit* para las constantes de disociación, además se debe escribir la palabra *dissoc* para indicarle al

programa que son constantes de disociación, mientras, que el paso de formación del producto es asociado a una constante de velocidad para un proceso de primer orden denominada k_{cat} .

El programa *DynaFit* deriva la ecuación de velocidad inicial correspondiente mediante el método de los mínimos cuadrados y así encontrar los valores de constantes cinéticas a partir de los datos experimentales.

V. RESULTADOS

RESULTADOS

V.I. Purificación de la enzima perGK

La proteína glucoquinasa perGK fue purificada siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Se realizaron dos pasos cromatográficos, uno de estos pasos consistió en una cromatografía de intercambio aniónico y un segundo paso que fue una cromatografía de exclusión molecular. La proteína fue detectada midiendo la actividad enzimática a las fracciones eluidas de las cromatografías mencionadas anteriormente. El grado de pureza fue determinado mediante el análisis de SDS-PAGE (**Figura 2.5**), donde se observa que en el último paso cromatográfico la proteína resultante migra a los 51 kDa y es homogénea sobre un 98%.

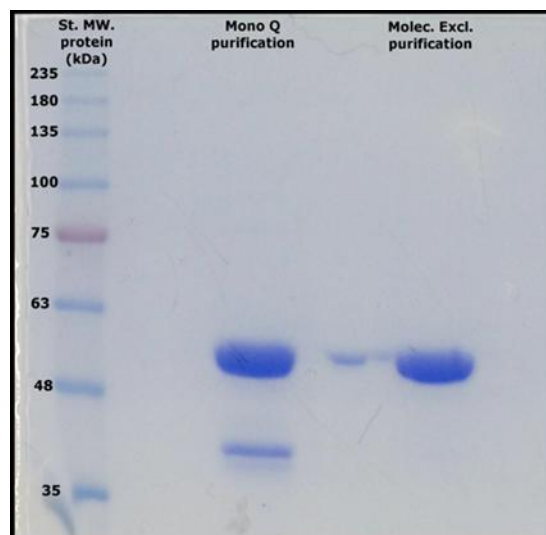


Figura 2.5. SDS-PAGE para los diferentes pasos de purificación de la enzima permutante TIGK. De izquierda a derecha se muestra en el primer carril el estándar de peso molecular de proteínas, en los siguientes carriles se presenta los resultados de la purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico y por exclusión por tamaño, respectivamente.

V. II. Determinación del uso de ATP o ADP de la proteína perGK

Para dilucidar si el cambio en la topología de la enzima glucoquinasa afecta el uso del nucleótido de adenina se determinó la actividad, utilizando ADP y ATP como dador del grupo fosforilo, a una concentración de 10 mM. Los resultados mostraron que la actividad, cuando se utilizó ATP como donador de grupo fosforilo no era significativa respecto al control, $0,65 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ y $0,6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectivamente. En cambio, cuando se utilizó 10 mM ADP, como dador de grupo fosforilo, se observó que la enzima presenta actividad específica de $22 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (**Figura 2.6**). El control consistió en medir la actividad en ausencia de glucosa.

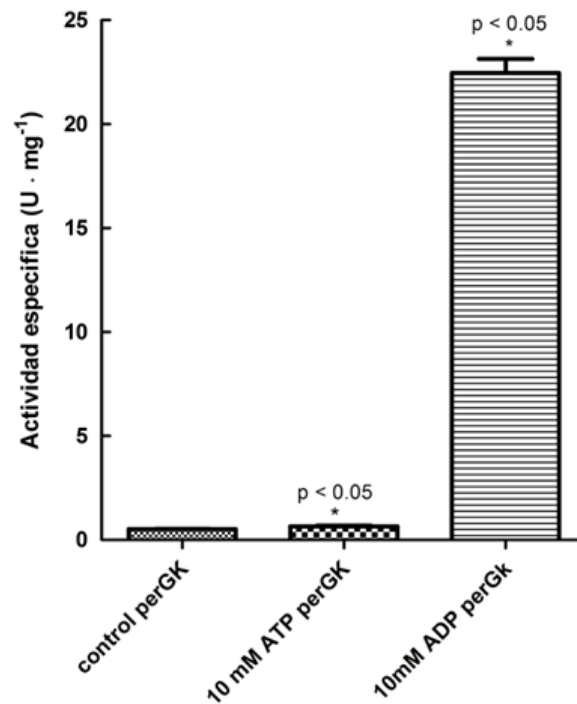


Figura 2.6. Determinación de la actividad glucoquinasa en presencia de ATP y ADP. Para determinar si la actividad con ATP es significativa respecto al control se realizó el test ANOVA.

V.III. Mecanismo cinético

V. III. 1. Estudios cinéticos en velocidad inicial

La enzima glucoquinasa permutada de *T. litoralis* cataliza la reacción de fosforilación de glucosa, que involucra la entrada de los sustratos glucosa y MgADP, y la salida de los productos MgAMP y glucosa-6-P el que corresponde a un mecanismo Bi-Bi.

Con el propósito de obtener información acerca del tipo de mecanismo que presenta esta enzima y las constantes cinéticas para ambos sustratos de la reacción, se realizaron estudios de velocidad inicial.

Cuando se analizó el comportamiento del sustrato MgADP, éste mostró un comportamiento de tipo hiperbólico para todas las condiciones cinéticas exploradas, utilizando diferentes concentraciones del co-sustrato glucosa, lo que facilitó la aplicación de los protocolos habituales para determinar el mecanismo cinético (**Figura 2.7**). Por otra parte, al examinar el comportamiento de glucosa, se observó también una conducta hiperbólica. Sin embargo, cuando se exploraron concentraciones mayores a 1,5 mM del sustrato glucosa, independiente de la concentración de co-sustrato MgADP, se observó una leve disminución en la velocidad de la reacción, lo que implicaría un efecto inhibitorio por la presencia de altas concentraciones de sustrato glucosa (**Figura 2.7A**). Luego de ajustar los datos a un modelo de inhibición por sustrato se obtuvo la K_i para glucosa la que tiene un valor 9.5 ± 2.1 mM. Debido al efecto inhibitorio de glucosa, se consideraron concentraciones menores a 1.5 mM de glucosa para realizar los ensayos de velocidad inicial (**Figura 2.7 B**).

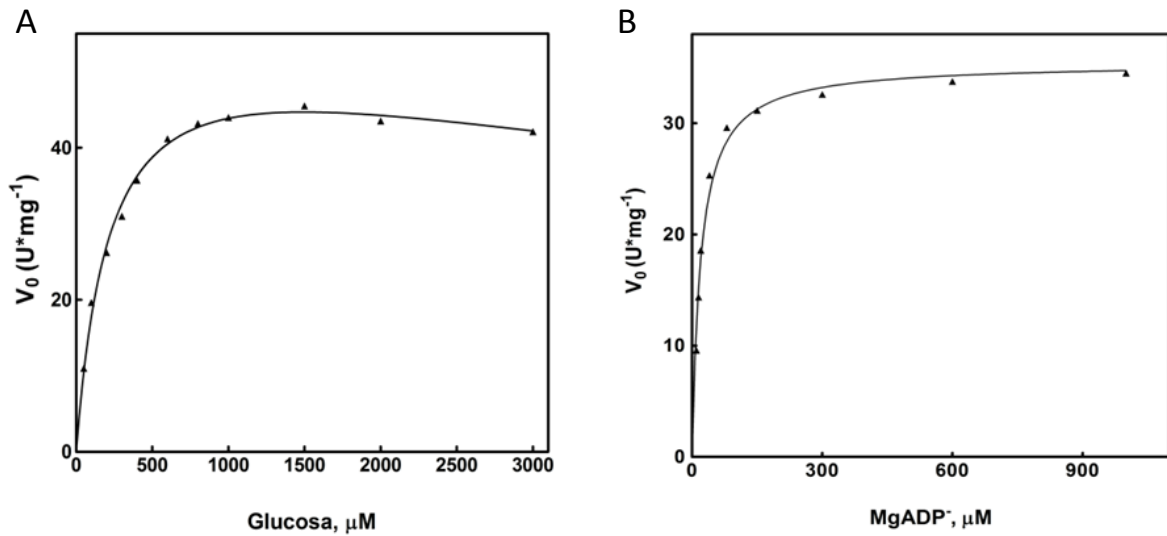


Figura 2.7. Curvas de saturación para glucosa y MgADP. **A.** Curva de saturación para glucosa a una concentración fija de MgADP de $300 \mu M$. **B.** Curva de saturación para MgADP a una concentración fija de glucosa de $1500 \mu M$. En A los datos experimentales fueron ajustados empleando un modelo que consideraba la inhibición por sustrato, mientras que en B los datos experimentales fueron ajustados al modelo hiperbólico.

Los datos de los estudios de velocidad inicial fueron ajustados al modelo hiperbólico de Michaelis–Menten. Para ambos casos se observa que un aumento en la concentración del co-sustrato modifica la V_{max} de la reacción catalizada por la enzima perGK, lo mismo sucede con los valores de la constante de afinidad (K_M) de sustrato por la enzima aunque el aumento es discreto (**Figura 2.8 A y B**). Al realizar las gráficas de Lineweaver-Burk ($1/v$ en función de $1/S$) o de dobles recíprocos, muestran curvas intersectantes cuando glucosa es el sustrato variable (**Figura 2.8 C**). El mismo comportamiento se observa cuando MgADP es el sustrato variable (**Figura 2.8 D**). Este comportamiento revela que el mecanismo cinético de la enzima es en secuencia, lo que implica la formación de un complejo ternario antes de la liberación de los productos, descartando que el mecanismo cinético sea del tipo ping-pong. En este último caso las curvas de dobles recíprocos son paralelas.

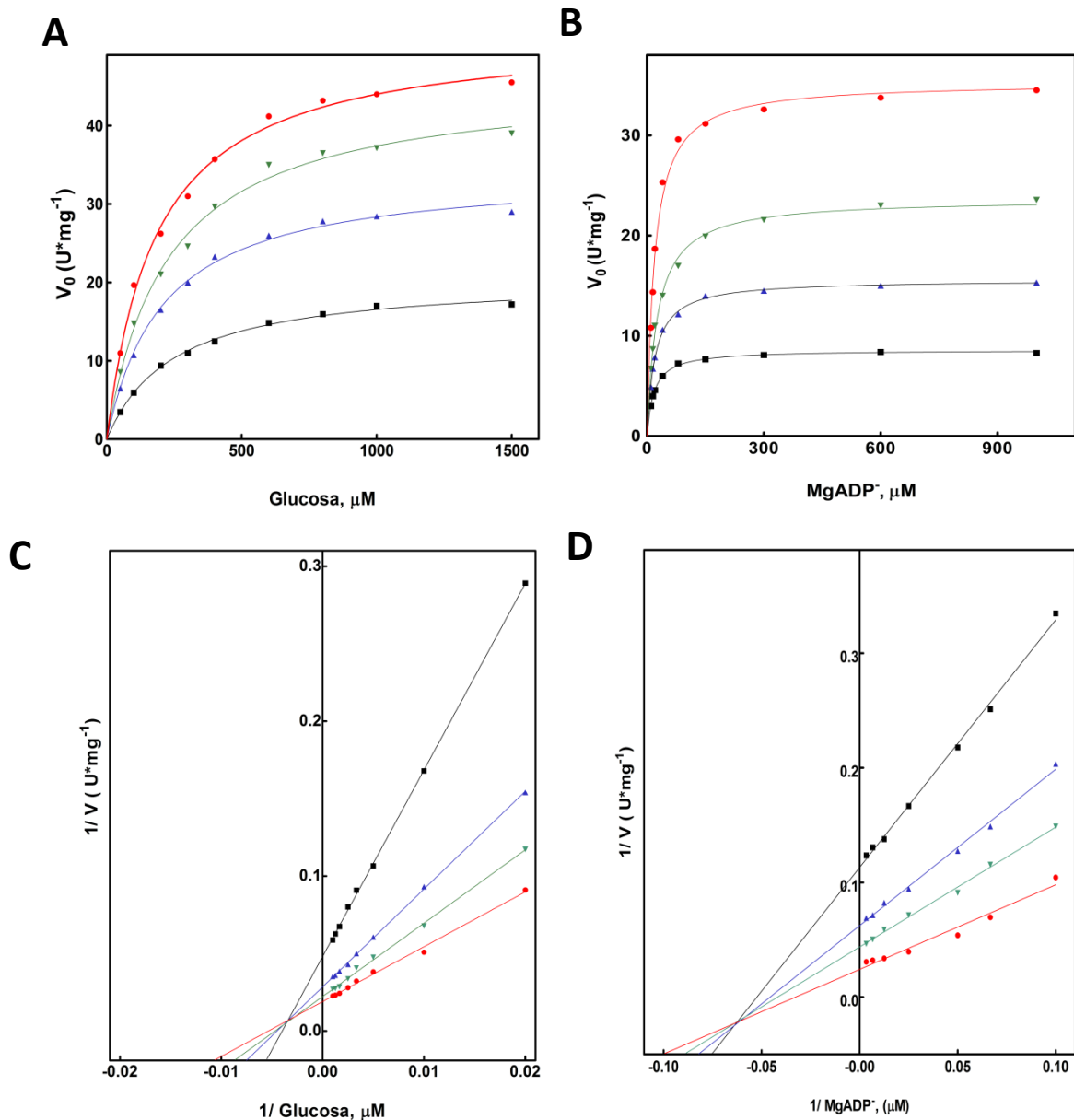


Figura 2.8 .Estudios de velocidad inicial para los sustratos glucosa y complejo MgADP. A. Curvas de saturación de glucosa a diferentes concentraciones de MgADP; las concentraciones de MgADP exploradas corresponden a: 60 μ M (●), 120 μ M (▼), 150 μ M (▲), 300 μ M (■). **B** curvas de saturación de MgADP a diferentes concentraciones de glucosa. Las concentraciones de co sustrato glucosa utilizadas corresponden a: 100 μ M (●), 200 μ M (▼), 400 μ M (▲), 1500 μ M (■). **C y D** representan las gráficas de dobles recíprocos de los mismos datos presentados en las Figura A y B.

V. III. 2. Ensayos de inhibición por producto

Con el objetivo de dilucidar entre las diferentes posibilidades que existen para un mecanismo en secuencia, es decir, un mecanismo al azar, el cual no presenta un orden predeterminado de la entrada de sus sustratos, o un mecanismo ordenado donde el orden

de entrada de los sustratos es obligado, se usó la estrategia de la inhibición por producto. Los productos son, sin lugar a dudas, los inhibidores clásicos para cualquier reacción catalizada por una enzima y por lo tanto, son muy importantes para determinar el mecanismo cinético de una enzima. Los productos son los sustratos de la reacción reversa, por lo que se espera la formación de complejos entre la enzima y los productos, lo que lleva a una forma no catalítica lo que provoca la inhibición de la reacción, donde la naturaleza de la inhibición dependerá del sustrato, que es variado, y del producto que ha sido utilizado como inhibidor. De esta manera, estudiando el tipo de inhibición que presentan los distintos productos respecto a los sustratos podemos determinar la manera en que los sustratos y productos interactúan con las distintas formas de enzima. En el caso del mecanismo Bi-Bi al azar, la inhibición de los productos con respecto a los sustratos es de tipo competitiva, debido a que tanto los sustratos A y B, como los productos P y Q, pueden unirse a la forma libre de la enzima, E. En cambio, en un mecanismo Bi-Bi ordenado, solo el sustrato A y el producto Q se unen a la forma de enzima libre E. Por otra parte, el sustrato B se une al complejo binario EA y el producto P se une a la forma de enzima EQ. Así, de las cuatro combinaciones posibles de inhibición, Q sobre A, Q sobre B, P sobre A y P sobre B, sólo la combinación que involucra al producto Q sobre el sustrato A, presentará una inhibición de tipo competitiva, mientras que las otras tres combinaciones presentaran una inhibición de tipo no competitiva debido a que, se unen a distintas formas de enzima. Se estudió la inhibición del producto MgAMP con respecto a ambos sustratos de la reacción directa, glucosa y MgADP (**Figura 2.8**).

Los experimentos para determinar el efecto inhibitorio de MgAMP con respecto a MgADP se realizaron ensayando tres concentraciones diferentes de MgAMP, 100 μM , 200 μM y 600 μM , además de una condición control en ausencia del inhibidor (**Figura 2.9 A**). El co-sustrato glucosa, en estos ensayos, se mantuvo constante a una concentración de 1000 μM , que corresponde a 3 veces K_M , encontrándose a condiciones saturante, pero lejano a la concentración donde comienza el fenómeno de inhibición. Asimismo, para determinar el efecto de MgAMP sobre glucosa se realizaron ensayos a tres concentraciones diferentes de MgAMP que corresponden a las concentraciones: 500 μM , 1000 μM y 2000 μM , además de la condición control en ausencia de MgAMP (**Figura 2.9 C**). La concentración del co-sustrato utilizada en todos los ensayos correspondió a la concentración K_M de MgADP, 200 μM con el propósito de mantener la conexión entre sustrato y producto.

Los datos obtenidos de los ensayos de velocidad inicial fueron ajustados al modelo hiperbólico propuesto por Michaelis-Menten (mencionado en la sección Metodología). Además, se construyeron gráficas de dobles recíprocos, para evaluar las pendientes e intersecciones y así inferir el tipo de inhibición, junto con obtener el valor de las expresiones de velocidad máxima y de las constantes Michaelis (K_M) para ambos sustratos.

La estimación de los parámetros cinéticos aparentes obtenidos por medio de los ajustes al modelo hiperbólico, al igual que las gráficas de dobles recíprocos, muestran que el producto MgAMP provoca una disminución en el valor de V_{max} de la reacción para ambos sustratos, MgADP y glucosa, a medida que se incrementa la concentración del producto MgAMP, en cambio el valor de las constantes de afinidad (K_M) incrementan con el aumento de la concentración MgAMP (**Figura 2.9 A, B, C, D**). También es posible observar que el patrón de las curvas, construidas en las gráficas de dobles recíprocos, se intersectan sobre el eje de las abscisa ($1/[S]$) y a la izquierda del eje de la ordenadas ($1/v$), lo que sugiere que el producto MgAMP presenta un comportamiento de un inhibidor mixto, lo que es consistente con lo observado en los parámetros cinéticos.

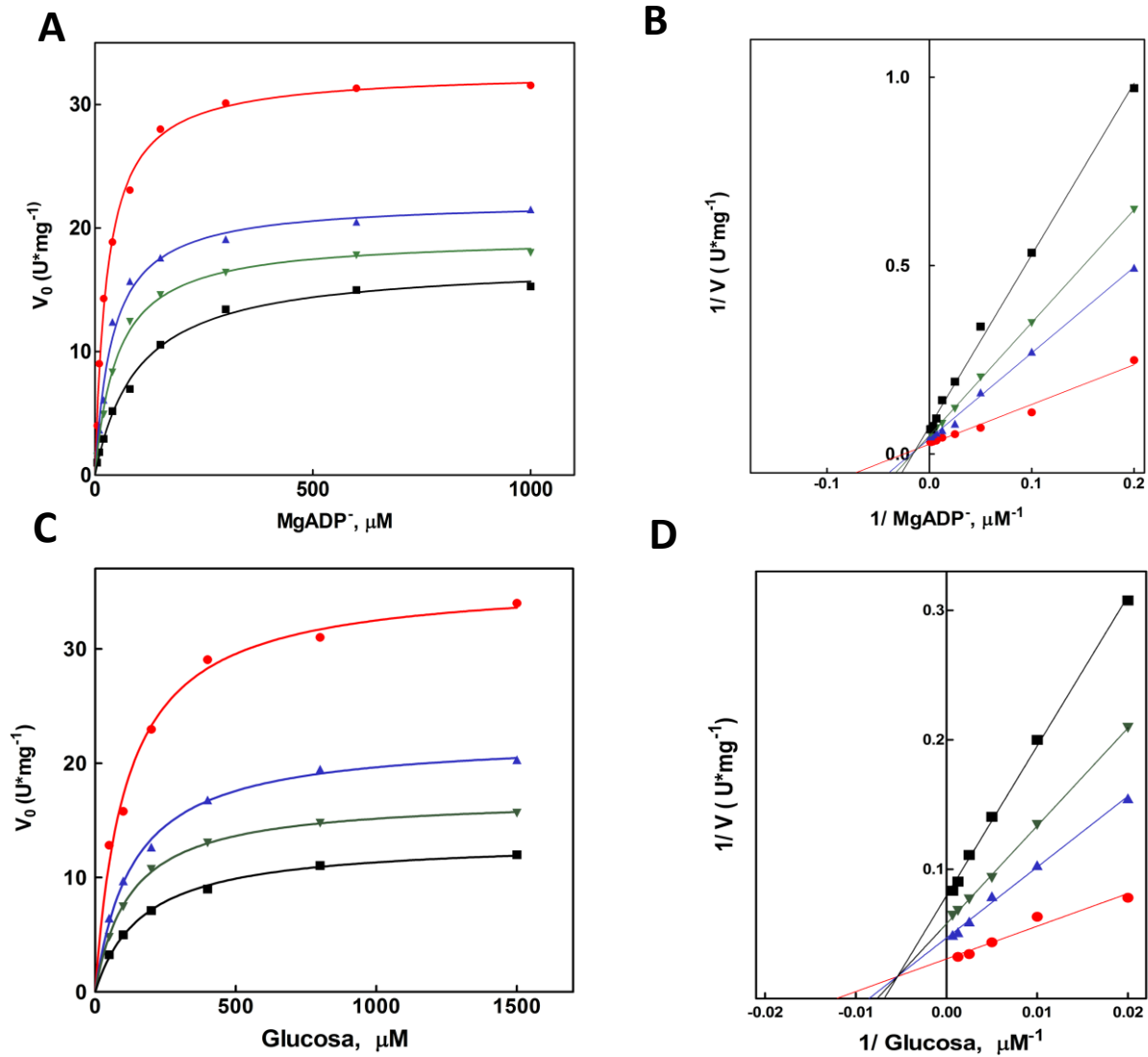


Figura 2.9. Estudios de inhibición del producto MgAMP. A, curvas de saturación para el sustrato MgADP^- en presencia de MgAMP, a concentración fija de glucosa $1000 \mu\text{M}$ y a diferentes concentraciones de MgAMP, $0 \mu\text{M}$ (●), $100 \mu\text{M}$ (▲), $200 \mu\text{M}$ (▼) y $600 \mu\text{M}$ (■). B, gráficas de dobles recíprocos de las curvas de saturación en presencia del inhibidor MgAMP. C, curvas de saturación para el sustrato glucosa en presencia de MgAMP a concentraciones fijas de MgADP^- . Las concentraciones de MgAMP a las que fueron realizadas las curvas de saturación corresponden a $0 \mu\text{M}$ (●), $500 \mu\text{M}$ (▲), $1000 \mu\text{M}$ (▼) y $2000 \mu\text{M}$ (■). D, gráficas de dobles recíprocos de las curvas de saturación para el sustrato en presencia de MgAMP.

Para entender el comportamiento inhibitorio del producto glucosa-6-fosfato se realizaron ensayos de inhibición por producto de la reacción reversa, debido a que no se pudo realizar la cuantificación de la desaparición de ADP mediante ensayos discontinuos. En este caso, el estudio del efecto de glucosa-6-P sobre la actividad de la enzima consistió en determinar la actividad de la enzima perGK en la dirección contraria (reacción reversa) es decir hacia la formación de glucosa y MgADP.

Los experimentos desarrollados para determinar la inhibición de glucosa con respecto a glucosa-6-P se realizaron a distintas concentraciones de glucosa correspondiente a 40 μM , 60 μM y 100 μM , además se ensayó una condición control es en ausencia del inhibidor. La concentración del co-sustrato MgAMP fue a 1000 μM lo que corresponde a siete veces K_M .

Para la inhibición de glucosa con respecto a glucosa-6-P, los ajustes hiperbólicos de los datos obtenidos de las curvas de saturación, muestran que el producto glucosa no afecta a la V_{max} , sin embargo, el valor de la constante de Michaelis (K_M) aumenta a medida que se incrementa la concentración de glucosa, lo que implica una disminución en la afinidad de la enzima por glucosa-6-P (**Figura 2.10 A**); estos cambios también se observan en las gráficas de dobles recíprocos, las que muestran que las pendientes se intersectan en el mismo punto en el eje de la ordenada. En cambio, las pendientes se intersectan en diferentes punto el eje de las abscisa lo que indica una variación en la afinidad por el sustrato glucosa 6-P (**Figura 2.10 B**). A partir de estos ensayos se observa que el efecto inhibitorio de glucosa sobre la enzima perGK es de tipo competitivo, lo que significa que glucosa y glucosa-6-P, compiten por la misma forma de enzima correspondiente a la enzima libre (E).

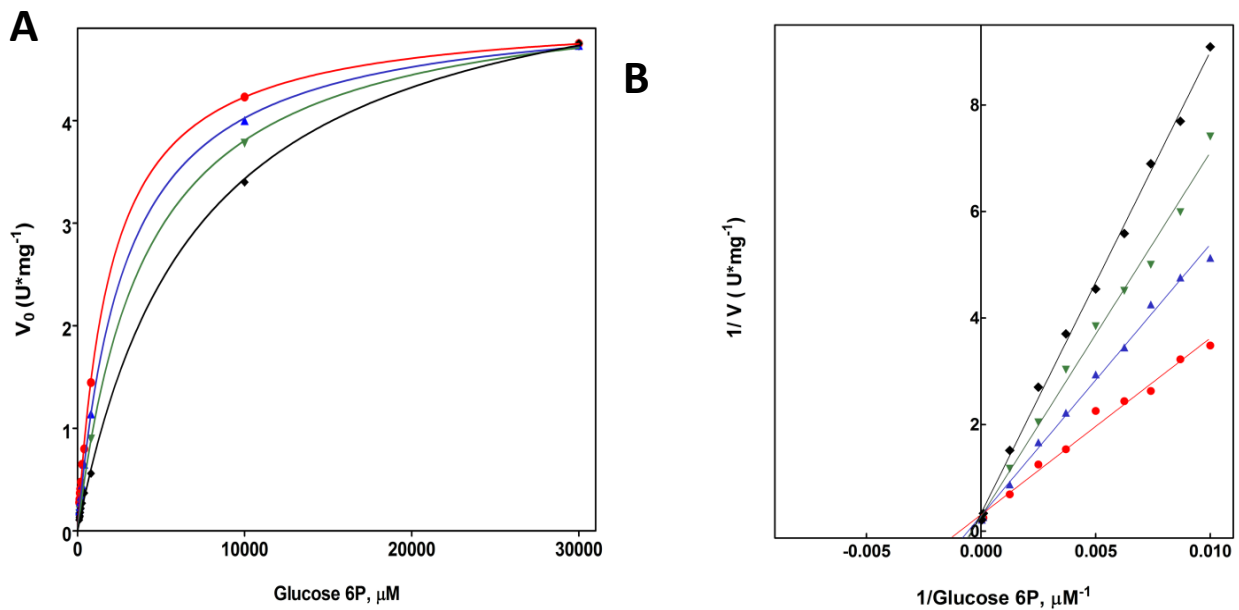


Figura 2.10. Estudio de inhibición por el producto glucosa sobre glucosa-6-P. A curva de saturación para el sustrato glucosa 6 P a concentraciones fijas de MgAMP 1000 μM a diferentes concentraciones de glucosa 0 μM (●), 40 μM (▲), 60 μM (▼) y 100 μM (■). B, gráficas de dobles recíprocos de las curvas de saturación en presencia de glucosa.

V.III. 3. Inhibición por análogos de sustratos

Con el objetivo de confirmar que el mecanismo cinético de la enzima perGK es ordenado en secuencia, se realizaron ensayos de inhibición por análogos de punto muerto. Un análogo de punto muerto es un compuesto que reacciona con una o más formas de la enzima, provocando la formación de un complejo con la enzima que no puede participar en la reacción.

Los ensayos de inhibición por análogos de punto muerto fueron llevados a cabo utilizando el compuesto 1,5-anhidroglucitol como análogo del sustrato glucosa, mientras que para el sustrato MgADP se usó como análogo Mg ATP.

En los experimentos realizados para determinar el efecto del análogo de glucosa 1,5-anhidroglucitol con respecto a glucosa, se utilizaron distintas concentraciones correspondientes a 1000 μM , 3000 μM y 6000 μM del análogo de punto muerto, además de la condición control que corresponde al ensayo en ausencia del análogo. Cabe destacar que los ensayos fueron realizados a una concentración constante del co-sustrato MgADP, la cual

se mantuvo fija a una concentración de 1000 μM correspondiente a condiciones saturantes. De la misma manera se procedió con los experimentos que tienen como objetivo determinar el efecto de 1,5-anhidroglucitol sobre MgADP, las condiciones revisadas corresponden a las mismas que se ensayaron para el caso de glucosa. La concentración de co-sustrato glucosa se mantuvo constante a 1000 μM , la cual corresponde a una concentración saturante, pero lejana a la cual la enzima experimenta inhibición por sustrato.

Para los experimentos en que se utilizó 1,5-anhidroglucitol cuando el sustrato variable era glucosa, se observa, desde los ajustes hiperbólicos, que la V_{max} no sufre variaciones cuando se aumenta la concentración del análogo de sustrato. En cambio el valor de K_M se ve afectado, de forma proporcional, con el aumento en la concentración de 1,5-anhidroglucitol (**Figura 2.11 A**). Los patrones de las rectas, observadas en las gráficas de dobles recíprocos, muestran que estas intersectan en el mismo punto del eje de las ordenadas (**Figura 2.11 C**). Estos resultados indican que el análogo de sustrato ejerce una inhibición competitiva respecto a glucosa, lo que significa que 1,5-anhidroglucitol y glucosa se unen a la misma forma de enzima correspondiente a la enzima libre, interfiriendo la unión de glucosa.

Los datos de las curvas de saturación de los ensayos que permiten determinar el efecto del análogo de sustrato 1,5-anhidroglucitol sobre la enzima, cuando varía la concentración del sustrato MgADP, fueron ajustados al modelo hiperbólico, donde es posible observar que los parámetros cinéticos aparentes varían de acuerdo aumenta la concentración del inhibidor (**Figura 2.11 B**). La V_{max} disminuye a medida que incrementa la concentración del análogo de sustrato, en cambio la K_M aumenta su valor con el aumento de la concentración del análogo de sustrato 1,5-anhidroglucitol. Los mismos cambios son observados en las gráficas de dobles recíprocos que las rectas intersectan en el eje de las abscisa ($1/[S]$) y a la izquierda del eje de las ordenadas ($1/v$), en un mismo punto sobre (**Figura 2.11 D**) Estos resultados muestran que el comportamiento del análogo 1,5-anhidroglucitol es consistente al de un inhibidor de tipo mixto con respecto a MgADP que implica que el análogo se une a la forma de enzima en complejo con glucosa provocando la obstrucción en la unión del sustrato MgADP y la formación de producto.

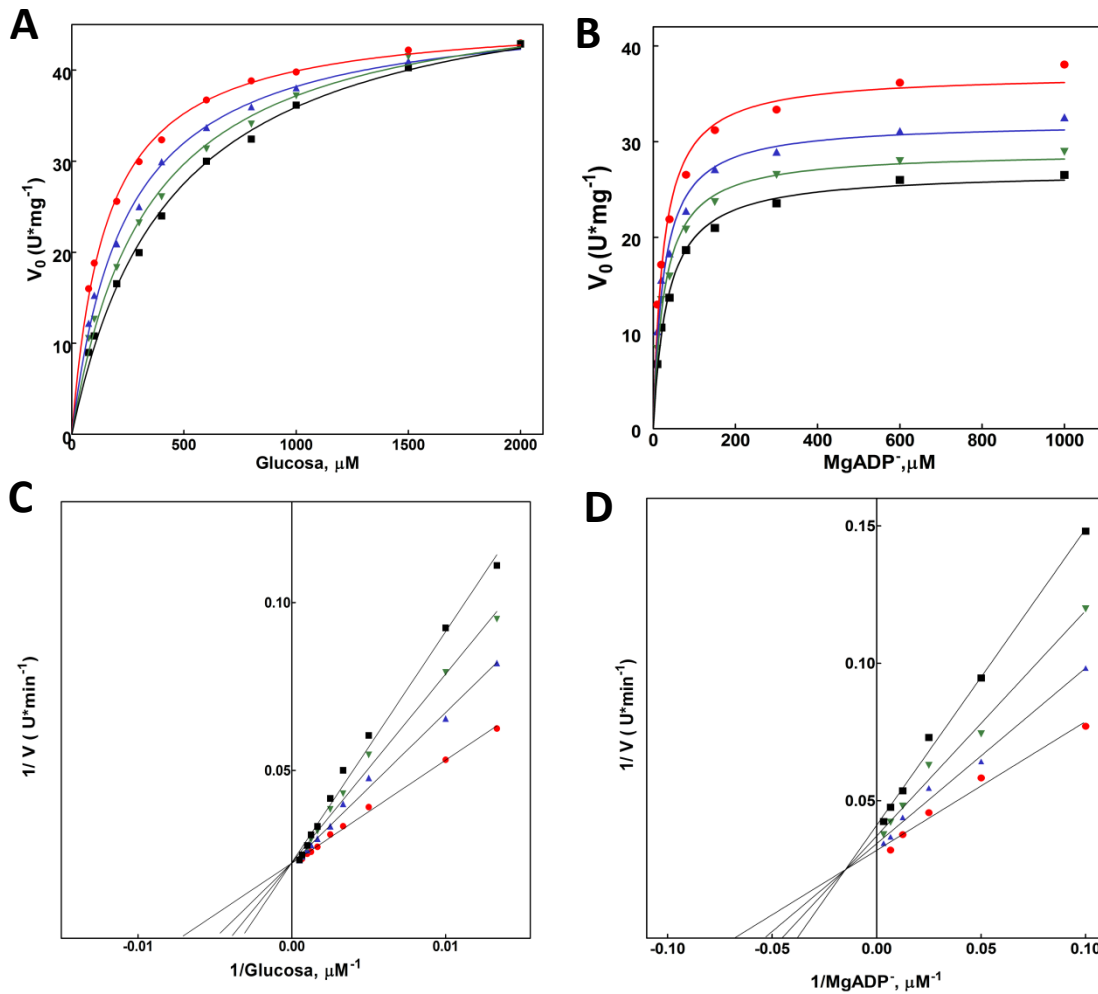


Figura 2.11. Estudios de inhibición de punto muerto con el análogo de sustrato 1,5-anhidroglucitol en presencia de los sustratos MgADP y glucosa. A, curvas de saturación para de glucosa a diferentes condiciones correspondiente a 0 μM (●), 1000 μM (▲), 3000 μM (▼) y 6000 μM (■) de 1,5-anhidroglucitol. La concentración del co sustrato MgADP se mantuvo a 1000 μM. **B,** curvas de saturación para MgADP determinadas a distintas condiciones de 0 μM (●), 1000 μM (▲), 3000 μM (▼) y 6000 μM (■) de anhidro glucitol. **C y D** corresponde a las gráficas de los dobles recíprocos para los sustratos glucosa y Mg ADP respectivamente.

Los estudios llevados a cabo para determinar el efecto de MgATP sobre MgADP, a una concentración fija del co-sustrato glucosa, consistieron en ensayar distintas condiciones las que correspondieron a las concentraciones 1000 μM y 5000 μM de MgATP, junto con una situación control que consistió en la ausencia del análogo de sustrato. Los resultados alcanzados en estos experimentos fueron ajustados al modelo hiperbólico. Los ajustes muestran que la V_{max} no se altera con la presencia del análogo de sustrato MgATP, en cambio el valor de la constante de afinidad K_M incrementa con el aumento de MgATP (**Figura 2.12 B**), además, en las gráficas de los dobles recíprocos es posible corroborar este mismo cambio, debido a que el patrón de las rectas, provenientes de estos ensayos, intersectan en el mismo punto en el eje de las ordenadas, lo que implica que el efecto de MgATP sobre la actividad de la enzima consiste en la inhibición de tipo competitiva (**Figura 2.12.D**), lo que significa que el análogo de sustrato compite por el mismo sitio de unión del sustrato MgADP, lo que se traduce en la interferencia en la formación de los productos de la reacción.

Junto con determinar el tipo de inhibición que ejerce el análogo MgATP respecto a MgADP, también se determinó el efecto de diferentes concentraciones del inhibidor de punto muerto MgATP con respecto a glucosa, a concentración fija del co-sustrato MgADP. Los ensayos realizados a distintas concentraciones de análogo de sustrato correspondiente a 1000 μM , 3000 μM y 6000 μM de MgATP, además de la condición control que corresponde a la ausencia de MgATP. Los datos obtenidos en estos ensayos se ajustaron al modelo hiperbólico, también, se realizaron gráficas de los dobles recíprocos con el fin de comprender el efecto que ejerce el análogo MgATP sobre la actividad de la enzima. Los ajustes dan cuenta que ambos parámetros cinéticos se ven afectados a medida que se aumenta la concentración de MgATP (**Figura 2.12 A**), disminuyendo el valor de la V_{max} como también de la constante de afinidad K_M , por otra parte, de los resultados se realizaron gráficas de dobles recíprocos que indican que el comportamiento inhibitorio de MgATP es de tipo acompetitiva (**Figura 2.12 C**), dado que el patrón de las rectas observadas es paralelo entre ellas, lo que implica que el análogo de sustrato se une a la enzima luego que se une el primer sustrato, en este caso glucosa, formando un complejo catalíticamente inactivo.

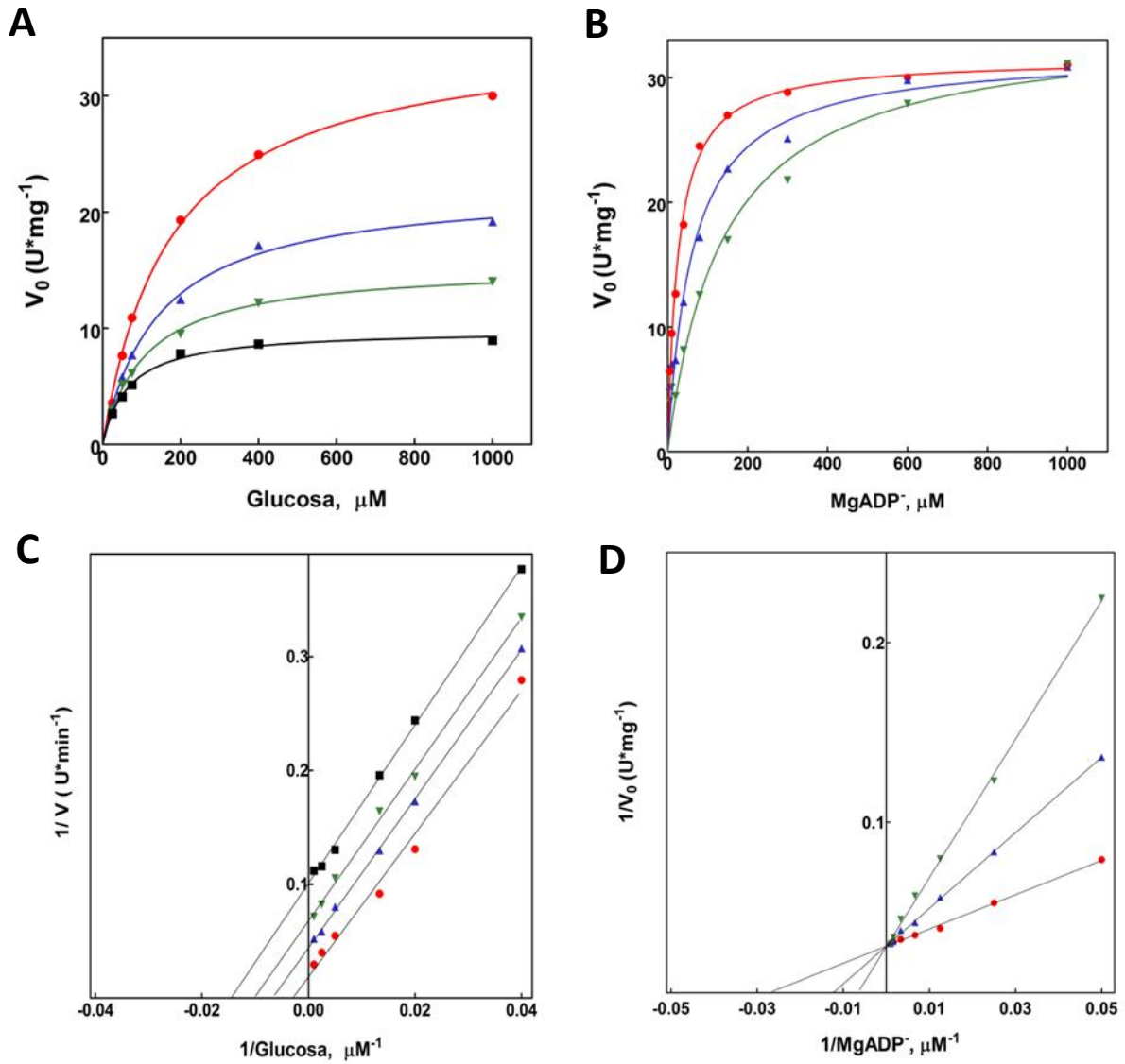


Figura 2.12. Estudios de inhibición de punto muerto con el análogo de sustrato MgATP en presencia de los sustratos MgADP y glucosa. A, curvas de saturación para de glucosa a diferentes condiciones correspondiente a 0 μM (●), 1000 μM (▲), 3000 μM (▼) y 6000 μM (■) de MgATP. La concentración del co-sustrato MgADP se mantuvo a 2000 μM. **B,** curvas de saturación para MgADP determinadas a distintas condiciones de 0 μM (●), 1000 μM (▲) y 5000 μM (▼) de MgATP-2. **C y D** corresponde a las gráficas de los dobles recíprocos para los sustratos glucosa y Mg ADP respectivamente.

V. III.4 Ajuste de los datos de las determinaciones cinéticas.

Considerando que los resultados de los ensayos de velocidad inicial, se puede inferir que el mecanismo cinético de la enzima permutada es un mecanismo en secuencia, los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de velocidad inicial para un mecanismo en secuencia al azar u ordenado en régimen estacionario⁷⁵.

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_B + K_A \cdot B + K_B \cdot A + A \cdot B}$$

Ecuación 2.2

Donde V_{max} corresponde a la velocidad máxima de la reacción, **A** y **B** representan las concentraciones de los sustratos **A** y **B**, K_{ia} la constante de disociación para el complejo enzima-A, K_A y K_B corresponden a las constantes de Michaelis para los sustratos **A** y **B**, respectivamente. También se puede usar la expresión recíproca de la **ecuación 2.2**, para representar el comportamiento de la enzima perGK y determinar los parámetros cinéticos aparentes. Bajo el modelo en secuencia, la expresión recíproca de velocidad para el sustrato **A** queda de la siguiente forma⁷⁵:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_B}{B}\right) + \frac{K_A}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B}\right) \cdot \frac{1}{A}$$

Ecuación 2.3

Para el caso del sustrato **B**, la expresión de doble recíproco de la ecuación de velocidad de la reacción para el sustrato **B** queda de la siguiente manera⁷⁵:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A}\right) + \frac{K_B}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \cdot \frac{1}{B}$$

Ecuación 2.4

A partir de los ensayos de velocidad inicial realizados para los sustratos glucosa y MgADP (**Figuras 2.8 A y B**) fue posible construir las gráficas de dobles recíprocos que fueron usadas para determinar los parámetros cinéticos bajo el modelo secuencial (**Figura 2.8 C y D**). Desde las intersecciones de cada una de las curvas de dobles recíprocos para glucosa como

también para MgADP, se construyeron gráficas secundarias, las que se relacionan con el cambio en la interacción respecto al co-sustrato, y así obtener los parámetros cinéticos. Desde estas nuevas gráficas presentadas en las **Figuras 2.8 C y D**, fue posible calcular el valor de velocidad máxima de la reacción de fosforilación de glucosa, además de las constantes de Michaelis verdaderas para los sustratos **A** y **B**, denominadas K_A y K_B , respectivamente. En la expresión de velocidad, para los experimentos de saturación de los sustrato **A** y **B** (**Ecuaciones 2.3 y 2.4**), las intersecciones están representadas por las **Ecuaciones 2.5 y 2.6**⁷⁵.

$$n = \frac{1}{V} + \left(\frac{K_A}{V}\right) \cdot \frac{1}{A}$$

Ecuación 2.5

$$n = \frac{1}{V} + \left(\frac{K_B}{V}\right) \cdot \frac{1}{B}$$

Ecuación 2.6

A partir de las **Ecuaciones 2.5 y 2.6**, podemos calcular la constante de Michaelis del complejo EA, denominada K_A , desde los ensayos de saturación de B a concentraciones fijas de **A**, obteniendo un valor de 203 μM , mientras que la constante K_B calculada desde los ensayos de saturación de **A**, a concentraciones fijas de **B** da un valor 91 μM ,

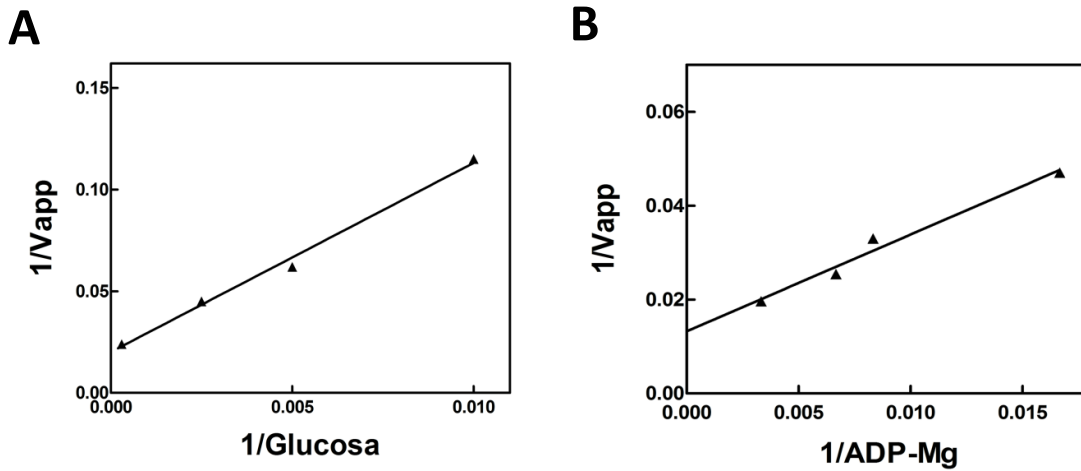


Figura 2.13. Gráficas secundarias para la determinación de los parámetros cinéticos asumiendo un mecanismo cinético secuencial ordenado. **A**, representa la relación entre la intersección y el co-sustrato glucosa, para los ensayos de saturación de MgADP (Figura 2.8 D) **B**, representa la relación entre la intersección y el co-sustrato MgADP, para las curvas de saturación de glucosa de la Figura 2.8 C.

En la **Tabla 2.2** se resumen los valores para las diferentes constantes cinéticas calculadas tomando en cuenta los sustrato variable MgADP y glucosa, además de la velocidad máxima de la reacción, estimados por medio del ajuste al modelo de cinético secuencial ordenado presentado en la **Ecuación 2.2.**, y de la misma manera fue calculado el valor de K_{ia}

Tabla 2.2. Valores Constantes cinéticas de la reacción para MgADP y glucosa y velocidad para la reacción catalizada por la enzima perGK de *T. litoralis*.

	Ajuste con MgADP variable	Ajuste con glucosa variable
K_A (μM)	62	344
K_B (μM)	42	140
K_{iA} (μM)	215	330
Velocidad ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	63	70

Los parámetros cinéticos K_M , V_{max} , k_{cat} , y eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) fueron obtenidos a partir de los ajustes de las curvas al modelo cinético secuencial para ambos sustratos MgADP y glucosa (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Resumen de parámetros cinéticos para los sustratos glucosa y MgADP, para la reacción catalizada por la enzima glucoquinasa permutante

	K_M (μM)	V_{max} ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Glucosa	203	67	56	$2,8 \times 10^5$
MgADP	91	67	56	$6,1 \times 10^6$

Para la mejor interpretación de los resultados de inhibición por producto y poder sugerir el orden de entrada de los sustratos, además de determinar las constantes de inhibición para los productos K_{iq} y K_{ip} (**Tabla 2.3**), los datos de los ensayos de inhibición fueron ajustados a un modelo que considera la presencia de los productos **P** y **Q** para un mecanismo de dos sustratos con entrada secuencial ordenada. La ecuación de velocidad para la inhibición del producto **Q** sobre el sustrato **A**⁷⁵, a concentraciones constantes del co-sustrato **B** corresponde a:

$$V_0 = \frac{A \cdot V_{max}}{K_A \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_a \cdot B}\right) + A \cdot \left(1 + \frac{K_B}{B}\right)}$$

Ecuación 2.7

Donde V_{max} , es la velocidad máxima de la reacción, **A** corresponde a la concentración del sustrato **A**, el que para estos ensayos es variable, **B** es la concentración del sustrato **B**, que se mantiene constante en estos ensayos. Por otra parte, K_A corresponde a la constante de afinidad para el sustrato **A**, K_B es la constante de la afinidad para **B**, **Q** corresponde a la concentración de **Q** y K_{iq} es la constante de disociación del producto **Q**.

Cuando el sustrato variable es **B**, a concentraciones constantes de co-sustrato de **A**, la expresión de velocidad para la inhibición del producto **Q** es la siguiente⁷⁵:

$$v_0 = \frac{B \cdot V_{max}}{K_B \cdot \left[1 + \frac{K_{ia}}{A} \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}} \right) \right] + B \cdot \left[1 + \frac{K_A}{A} \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}} \right) \right]}$$

Ecuación 2.8

Al igual que para la **Ecuación 2.7**, V_{max} corresponde a la velocidad máxima de la reacción, **B** es la concentración del sustrato B, variables en estos ensayos, **A** corresponde a la concentración constante del sustrato **A**. **Q** es la concentración del producto **Q**, K_A es la constante de afinidad para el sustrato **A**, K_B la constante de afinidad para el sustrato **B** y K_{iq} la constante de disociación del producto **Q**.

A partir de ambas ecuaciones de velocidad se puede determinar la K_{iq} , lo que se puede llevar a cabo por medio de la evaluación de las pendientes e intersecciones de las gráficas de doble recíproco. En el caso de la inhibición de **Q** sobre el sustrato **A**, la expresión de velocidad es la siguiente:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_A}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B} \right) \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}} \right) \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \cdot \left(\frac{K_B}{B} \right)$$

Ecuación 2.9

Para el sustrato B, la ecuación de velocidad es la siguiente forma:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_B}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} \right) \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq} \cdot \left(1 + \frac{A}{K_{ia}} \right)} \right) \cdot \frac{1}{B} + \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A} \right) \cdot \left(1 + \frac{Q}{K_{iq} \cdot \left(1 + \frac{A}{K_{ia}} \right)} \right)$$

Ecuación 2.10

De las **Ecuaciones 2.9 y 2.10** ⁷⁵ se puede observar que producto **Q** afecta la afinidad del sustrato **A**, provocando una inhibición de tipo competitiva de **Q** con respecto al sustrato **A**. En cambio para el caso de **B**, las expresiones de velocidad (**Ecuaciones 2.8 y 2.10**) indican que **Q** actúa como inhibidor mixto, afectando la afinidad y disminuyendo la velocidad de la reacción.

El producto **P**, el primero en ser liberado presentando una inhibición de tipo mixto tanto para **A** como para **B**, ya que **P** se une a una forma de enzima distinta a como lo hacen los sustratos **A** y **B**. La expresión de velocidad para la inhibición de **P** sobre **A**, corresponde a:

$$v_0 = \frac{A \cdot V_{max}}{K_A \left[1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B} \left(1 + \frac{K_Q \cdot P}{K_{iq} \cdot K_P} \right) \right] + A \cdot \left[1 + \frac{K_B}{B} \left(1 + \frac{K_Q \cdot P}{K_{iq} \cdot K_P} \right) + \frac{P}{K_{ip}} \right]}$$

Ecuación 2.11

La expresión de velocidad para el sustrato **B** en presencia del producto **P** es la siguiente:

$$v_0 = \frac{B \cdot V_{max}}{K_B \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} \right) \cdot \left(1 + \frac{K_Q \cdot P}{K_{iq} \cdot K_P} \right) + B \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A} + \frac{P}{K_{ip}} \right)}$$

Ecuación 2.12

Ambas expresiones de velocidad, **Ecuaciones 2.11 y 2.12**⁷⁵, pueden ser formuladas a través de sus respectivos recíprocos.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_A}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B} \right) \cdot \left[1 + \frac{P}{K_P \cdot \frac{K_{iq}}{K_Q} \cdot \left(1 + \frac{K_A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_B} \right)} \right] \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_B}{B} \right) \cdot \left[1 + \frac{P}{\frac{\left(1 + \frac{K_B}{B} \right)}{K_{ip} \cdot \left(\frac{K_Q \cdot K_B}{K_P \cdot K_{iq}} \right)} \cdot B} \right]$$

Ecuación 2.13

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_B}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} \right) \cdot \left[1 + \frac{P}{K_P \cdot \frac{K_{iq}}{K_Q}} \right] \cdot \frac{1}{B} + \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A} \right) \cdot \left[1 + \frac{P}{K_{ip} \cdot \left(1 + \frac{K_A}{A} \right)} \right]$$

Ecuación 2.14

Para ambos casos, el producto **P** presenta un comportamiento de un inhibidor de tipo mixto, con respecto a los sustratos **A** y **B**, lo que se ve reflejado en una disminución en la velocidad máxima y en un aumento de la constante de Michaelis⁷⁵.

Considerando los resultados evaluados mediante las gráficas de dobles recíprocos obtenidos a partir de los ensayos de inhibición por producto, ha sido posible sugerir la identidad de las especies A, B, P y Q. Gracias a la información obtenida de los ajustes realizados para la determinación de las constantes cinéticas, se infirió que la especie A correspondería al

sustrato glucosa, debido al efecto inhibitorio de tipo competitivo respecto a glucosa-6-P (**Figura 2.10 A y B**), visto desde la reacción reversa. Por otra parte, la especie B podría corresponder al complejo MgADP, dado que el patrón de inhibición observado para el producto MgAMP, resultó ser de tipo mixto, lo que nos da indicios que este sustrato se estaría uniendo luego que se une la especie A (glucosa). El producto P correspondería a MgAMP ya que la inhibición que presenta sobre ambos sustratos es de tipo mixta (**Figura 2.9 A B, C y D**), mientras que Q correspondería al producto glucosa 6-P ya que el tipo de inhibición que ejerce glucosa sobre glucosa-6-P resulto ser competitiva.

A partir de las gráficas de dobles recíprocos, que representan el efecto del producto glucosa sobre glucosa-6-P (**Figura 2.10 B**), se construyeron gráficas secundarias para las diferentes pendientes e intersecciones, y usando la expresión de velocidad presentada en la **Ecuación 2.9** fue posible calcular el valor de las constantes de inhibición del producto glucosa (K_{iq}) (**Figura 2.14 A y B**).

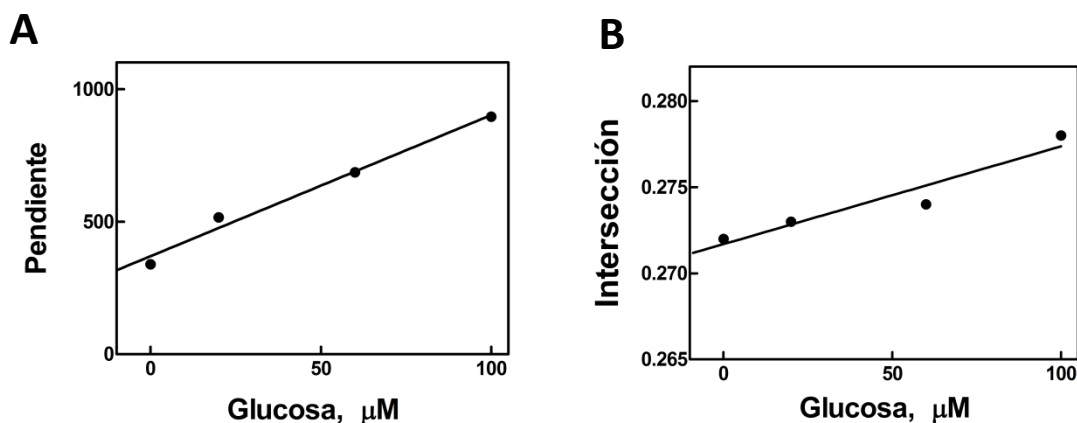


Figura 2.14. Gráficas secundarias para la determinación del efecto del producto glucosa sobre los parámetros cinéticos para glucosa-6P. A. Relación entre la pendiente y el producto glucosa B. Relación entre la intersección el producto glucosa para los ensayos de saturación de glucosa-6-P, para los ensayos de saturación de glucosa-6-P representados en la Figura 2.10B.

Para analizar los cambios de las pendientes e intersecciones provocados por el producto MgAMP, se generaron gráficas secundarias, que se ajustaron a las **Ecuaciones 2.12 y 2.13**, para poder determinar las constante de inhibición del producto P para las cinéticas de los sustratos A y B (K_{ip}) (**Figura 2.15 A y B**).

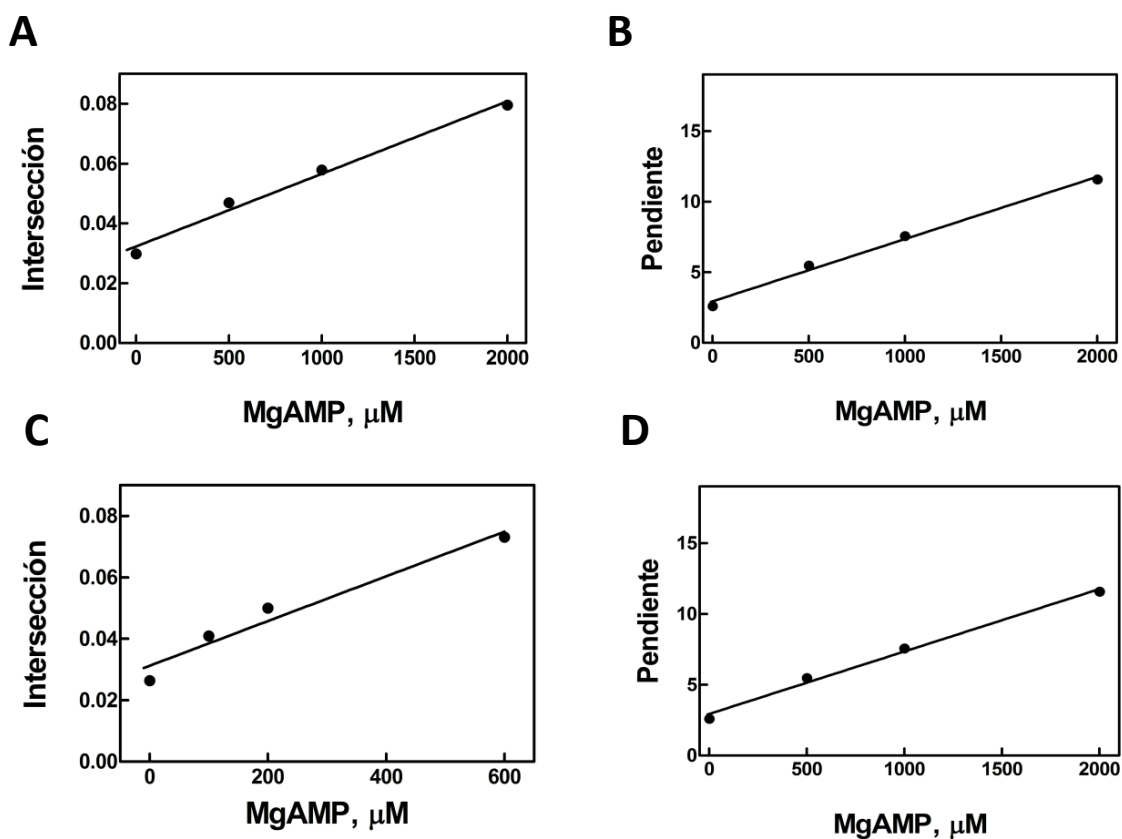


Figura 2.15. Gráficas secundarias para la determinación del efecto del producto MgAMP sobre los parámetros cinéticos de los sustratos glucosa y MgADP. A y B presentan la relación entre la intersección y la pendiente con el producto MgAMP, respectivamente, para los ensayos de saturación de glucosa de la Figura 2.9 C y D. C y D presenta la relación que existe entre la intersección y la pendiente, con el producto MgAMP, respectivamente, para los ensayos de saturación de MgADP de la Figura 2.9 A y B.

Tabla 2.4. Resumen de parámetros cinéticos obtenidos a partir de los ensayos de inhibición por producto.

Inhibidor	Sustrato variable	Inhibición	$K_{iq}(\mu\text{M})$	$K_{ip}(\mu\text{M})$
Glucosa	Glucosa 6 P	Competitiva	70	
MgAMP	Glucosa	Mixta		1.332
MgAMP	MgADP	Mixta		318

Para interpretar correctamente los resultados de los ensayo de inhibición por análogos de punto muerto, y poder establecer el orden de entrada de sustrato y salida de los productos de la reacción catalizada por la enzima perGK, junto con las constantes de inhibición, K_I y K_x para los análogos de sustrato, los datos se ajustaron al modelo Bi-Bi en secuencia ordenado.

La ecuación de velocidad en forma de dobles recíprocos para la inhibición por el análogo de sustrato I , que se une a la forma de enzima libre, se expresa de la siguiente forma:

Cuando varía la concentración de sustrato A, a concentraciones constantes de co-sustrato de B corresponde a:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_A}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B} \right) \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{B} \right)$$

Ecuación 2. 15

Para la situación en que la concentración sustrato B varía, y el co-sustrato A se mantiene a concentraciones constantes, la expresión del recíproco de velocidad para la inhibición por análogo de sustrato I , corresponde a:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_B}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} + \frac{K_{ia} \cdot I}{K_I \cdot A} \right) \cdot \frac{1}{B} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_A}{A} + \frac{K_A \cdot I}{K_I \cdot A} \right)$$

Ecuación 2.16

De la ecuación de velocidad (**Ecuación 2.15**)⁷⁵ para el inhibidor de punto muerto I , se puede inferir que este análogo de sustrato afecta la afinidad de la enzima por el sustrato A, no así la velocidad máxima de la reacción. Estos efectos son característicos de la inhibición competitiva. Por otra parte, la expresión de velocidad para el sustrato B (**Ecuación 2.16**)⁷⁵ indica que el inhibidor de punto muerto I afecta la afinidad de la enzima por el sustrato B y la velocidad de la reacción.

En el caso del inhibidor de punto muerto X que se une a las forma de enzima EA, las expresiones de velocidad se describen en las siguientes ecuaciones.

Si varía la concentración del sustrato A y se mantiene constante la concentración del co-sustrato B la expresión de velocidad corresponde a:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_A}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_{ia} \cdot K_B}{K_A \cdot B}\right) \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{B} + \frac{K_B \cdot X}{K_X \cdot B}\right)$$

Ecuación 2.17

En cambio, si se varía la concentración de B y la concentración del co-sustrato A es constante, la ecuación de velocidad corresponde a:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_B}{V_{max}} + \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} + \frac{X}{K_X}\right) \cdot \frac{1}{B} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_A}{A}\right)$$

Ecuación 2.18

Las ecuaciones de velocidad que describen el efecto de inhibidor de punto muerto X , que se une a la forma de enzima EA, cuando el sustrato A varía, indican que X actúa como inhibidor de tipo acompetitivo, afectando la afinidad de la enzima por el sustrato y disminuyendo la velocidad de la reacción. En cambio cuando se varía la concentración de B, el efecto que ejerce el inhibidor X es una inhibición de tipo competitiva, afectando sólo la afinidad del sustrato por la enzima.

De las representaciones de dobles recíprocos, que muestran el efecto que tienen los análogos de sustrato 1,5-anhidroglucitol y MgATP sobre los sustratos MgADP y glucosa, se construyeron gráficas secundarias (**Figura 2.16 y 2.17**) de las pendientes y de las intersecciones. Utilizando la expresión de velocidades presentadas en las **ecuaciones 2.17 y 2.18**⁷⁵, fue posible calcular el valor de las constantes de disociación de los inhibidores punto muerto.

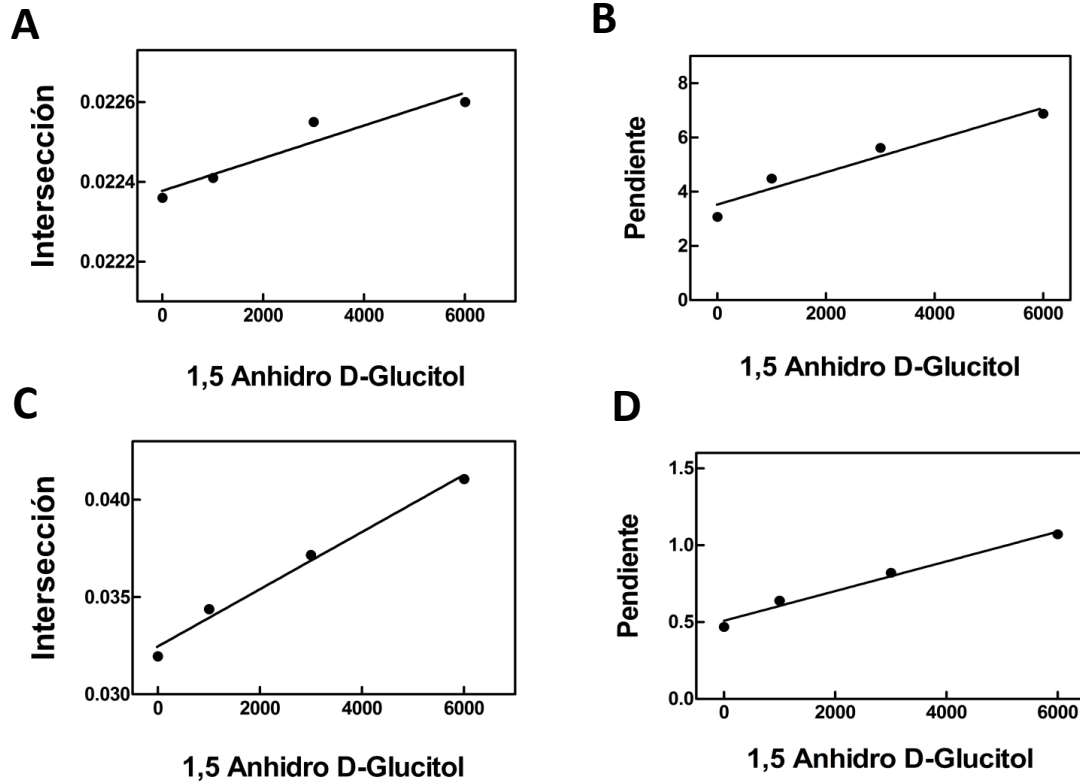


Figura 2.16. Gráficas secundarias para determinar el efecto de los análogos de sustrato 1,5-anhidroglucitol sobre los parámetros de los sustratos glucosa y MgADP. En **A** y **B**, se muestra la relación entre la intersección, como también la pendiente, con el análogo de sustrato 1,5 anhidro D-glucitol, respectivamente, para los ensayos de saturación de glucosa mostrados en la Figura 2.14 A y C. En **C** y **D** se presenta la relación tanto de la intersección como de la pendiente con le análogo de sustrato 1,5-anhidroglucitol, respectivamente, para los ensayos de saturación de MgADP, mostrados en las Figuras 2.14 B y D.

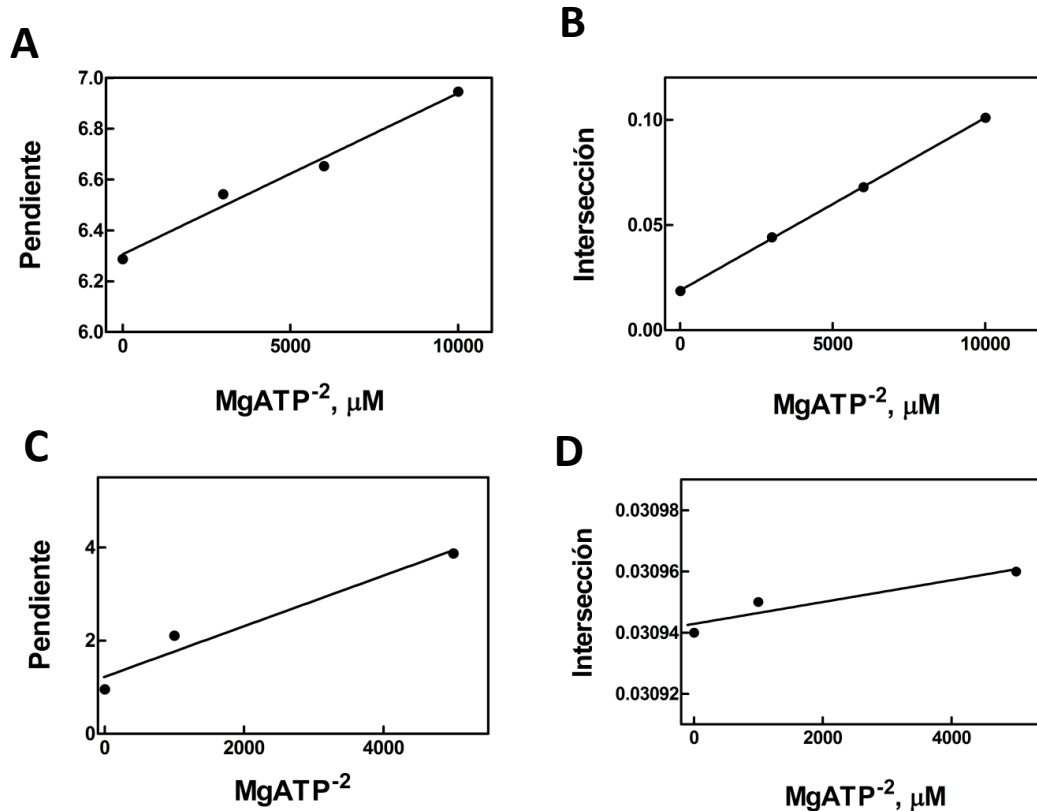


Figura 2.17. Gráficas secundarias calculadas para determinar el efecto de los análogos de sustrato MgATP sobre os parámetros de los sustratos glucosa y MgADP. En A y B, se muestra la relación entre la pendiente y la intersección, con el análogo de sustrato MgATP, respectivamente, para los ensayos de saturación de glucosa mostrados en la Figura 2.14 A y C. En C y D se presenta la relación tanto de la pendiente como de la intersección con le análogo de sustrato MgATP, respectivamente, para los ensayos de saturación de MgADP, mostrados en las Figuras 2.14 B y D.

Al comparar los patrones de rectas obtenidas a partir de las gráficas de los dobles recíprocos de los ensayos de inhibición de punto muerto cuando se utiliza 1,5-anhidroglucitol como análogo de sustrato respecto a glucosa, con lo descrito en la literatura⁷⁵, se observa que el patrón de las curvas se relaciona con una inhibición de tipo competitiva. Estos resultados indican que glucosa y el análogo 1,5-anhidroglucitol se une al mismo sitio en la enzima perGK. Por otra parte cuando se varía MgADP, la inhibición que ejerce 1,5-anhidroglucitol es de tipo mixta.

Estos resultados indican que glucosa debería ser el primer sustrato en unirse a la enzima perGK, ya que el sustrato como el inhibidor glucosa 6-P como el análogo de punto muerto para glucosa muestran un comportamiento inhibitorio de tipo competitivo respecto glucosa. En cambio, MgADP, se une a la forma de enzima EA luego que la enzima unió a glucosa.

Estos resultados se confirman al realizar los ensayos de inhibidor de punto muerto, donde fue utilizado como análogo de sustrato de MgADP, MgATP. Los datos obtenidos indican que MgATP, se une a la forma de enzima E-glucosa, ya que los patrones de inhibición indican que MgATP actúa como inhibidor acompetitivo respecto a glucosa, es decir, MgATP no se une a la misma forma de enzima que glucosa. Mientras que para el caso de MgADP, MgATP actúa como inhibidor de tipo competitivo, lo que significa que se estaría uniendo a la misma forma de enzima que lo hace el sustrato Mg ADP.

Tabla 2.5. Resumen de parámetros cinéticos obtenidos a partir de los ensayos de inhibición por análogo de sustrato.

Inhibidor	Sustrato variable	Inhibición	K_i (μM)	K_x (μM)
1,5-Anhidroglucitol	Glucosa	Competitiva	5934	-
1,5-Anhidroglucitol	MgADP	Mixta	1307	-
MgATP	Glucosa	Acompetitiva	-	289
MgATP	MgADP	Competitiva	-	1696

V. III. 5. Validación del mecanismo cinético mediante ajustes globales

Con la intención de validar el mecanismo cinético de la enzima permutada, obtenido mediante el análisis visual de gráficos de dobles recíprocos, los datos experimentales de velocidad fueron sometidos a ajustes globales mediante el programa computacional *DynaFit* (versión 4.05.129).

Los estudios de inhibición por producto, como también por análogos de punto muerto, las que fueron ajustados a los modelos de inhibición competitiva, acompetitiva y mixta. Para todos los modelos se estableció un equilibrio rápido en los procesos de asociación entre las diferentes formas de la enzima y los sustratos.

Los ajustes globales realizados para los ensayos de inhibición por producto concuerdan con lo observado en los gráficos de doble recíproco. En el caso de la inhibición de MgAMP en relación a glucosa como sustrato, el modelo al que mejor se ajustan los datos fue una inhibición mixta, lo que se relaciona con el patrón de líneas que se intersectan en la izquierda del eje de las ordenadas en el gráfico de doble recíproco (**Figura 2.9 B**) Al igual que en lo que sucede con glucosa, los datos de inhibición de MgAMP sobre ADP como sustrato, se ajustaron al modelo de inhibición mixta lo que concuerda con el gráfico de doble recíproco con un patrón de líneas que se intersectan a la izquierda del eje Y (**Figura 2.9 D**)

El resultado obtenido de los ajustes globales realizados para la inhibición de glucosa sobre glucosa 6-P (**Figura 2.10**) mostró un mejor ajuste al modelo de inhibición competitiva, además los parámetros cinéticos calculados desde el ajuste global ($K_{iGLC} = 53 \mu\text{M}$) son similares a los obtenidos por regresión lineal de los gráficos secundarios ($K_{iGLC} = 70 \mu\text{M}$) (**Tabla 2.4**).

Por otra parte, los análisis de ajustes globales, para la inhibición por análogos de punto muerto para glucosa y MgADP, muestran que el análogo de glucosa, 1,5-anhidroglucitol (1,5 ANG) presenta una inhibición competitiva respecto a glucosa (**Figura 2.11 C**), con un valor para la constante de inhibición de ($K_{i1,5ANG} = 5.7 \text{ mM}$) el cual es equivalente al obtenido de los gráficos lineales secundarios ($K_{i1,5ANG} = 5.9 \text{ mM}$). La inhibición del análogo 1,5-anhidroglucitol en relación con el sustrato MgADP se ajusta globalmente a un modelo del tipo mixto, con una $K_{i1,5ANG}$ en presencia de MgADP de 4.9 mM similar a la obtenida desde los gráficos lineales secundarios ($K_{i1,5ANG} = 1.3 \text{ mM}$). (**Figura 2.16 y Tabla 2.5**)

Para los ajustes globales de los datos de inhibición por el análogo de punto muerto de MgADP, MgATP, indican que el modelo de inhibición al que mejor se ajustan los datos es del tipo competitivo corroborando la elección del análogo de punto muerto (**Figura 2.12 D**). Por otra parte, se observó que la constante K_{iATP} que resulta del ajuste global se asemeja a lo calculado desde los gráficos lineales secundarios, $K_{iATP} = 1.9 \text{ mM}$ y $K_{iATP} = 1.7 \text{ mM}$, respectivamente (**Figura 2.17 y Tabla 2.5**).

La inhibición de MgATP sobre glucosa, indica que los datos se ajustan a dos modelos de inhibición, mixto y acompetitivo. No obstante, tomando en cuenta la diferencia de los criterios de información de Akaike, corregidos para ambos modelos de inhibición, es de 4 (ΔAICc), lo que da un mejor soporte estadístico al modelo acompetitivo, por lo anterior se

escogió el modelo de inhibición acompetitivo, que además está de acuerdo a lo observado en los gráficos de doble recíproco (**Figura 2.12 C**).

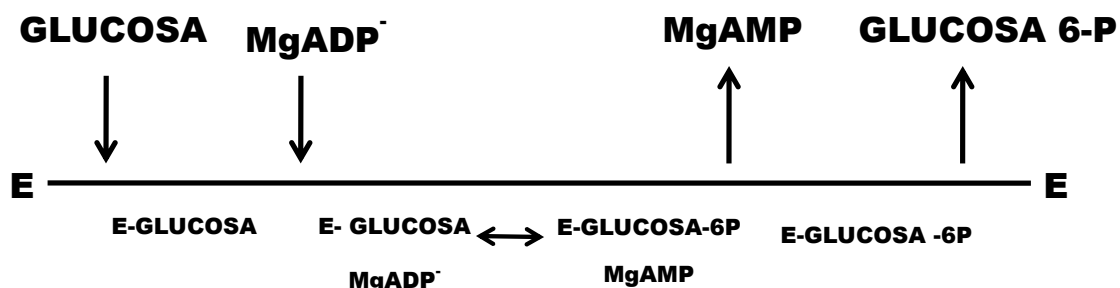
Recopilando toda la información obtenidos desde los gráficos de doble recíprocos y de los ajustes globales, ha sido posible determinar el mecanismo de la enzima perGK. Los datos ajustados y graficados por dobles recíprocos muestra que los patrones de curvas intersectantes observadas para ambos sustratos, indican la formación de un complejo ternario, lo que implica que la enzima perGK corresponde a un mecanismo secuencial ordenado o al azar. Asimismo, para establecer si el mecanismo es ordenado o al azar y el orden de entrada de los sustratos y salida de los productos; para el primer caso se realizaron ensayos de inhibición por producto y por análogos de punto muerto. En el caso de las inhibiciones por producto, las representaciones de dobles recíprocos muestran que glucosa respecto a glucosa-6-P actúa como inhibidor competitivo de la reacción reversa, considerando que la enzima perGK tiene la capacidad de catalizar la reacción en ambas direcciones, se puede interpretar que glucosa-6-P actúa como inhibidor competitivo respecto a glucosa. Por otra parte, los ensayos de inhibición por producto MgAMP, respecto a ambos sustratos, indican que éste actúa como inhibidor de tipo mixto. Si bien estos resultados de inhibición por producto dan indicio que el mecanismo de la enzima perGK, correspondería a un mecanismo de tipo secuencial ordenado, no es posible aseverar esta situación por la falta de las inhibiciones de glucosa-6P respecto a MgADP por limitaciones experimentales. Para verificar el mecanismo y el orden con el que se unen los sustratos y se liberan los productos de la enzima perGK, se realizaron experimentos de inhibición por análogos de punto muerto utilizando 1,5 anhidroglucitol y MgATP para glucosa y MgADP respectivamente. Las gráficas de los dobles recíprocos muestran que 1,5 anhidroglucitol es inhibidor competitivo de glucosa y no es sustrato de la enzima, indicando que es un análogo de punto muerto, en cambio 1,5 anhidroglucitol actúa como inhibidor de tipo mixto respecto a MgADP, mostrando que el azúcar sería el primer sustrato en unirse a la enzima libre. Por otro lado, el inhibidor MgATP ejerce una inhibición del tipo competitiva en relación al sustrato MgADP y este análogo tampoco es sustrato de la enzima, en cambio la inhibición que ejerce MgATP respecto a glucosa es de tipo acompetitiva, indicando que el inhibidor se une a la forma de enzima E-glucosa comprobando que el nucleótido es el segundo sustrato en unirse a la enzima.

Estos resultados fueron validados al someter los datos experimentales a ajustes globales de los modelos de inhibición competitiva, acompetitiva y mixta, a través del uso del programa computacional *DynaFit*. Dichos ajustes fueron coincidentes con los patrones de inhibición observados en las gráficas de los dobles recíprocos de las inhibiciones.

Mediante el análisis de ajustes globales con *DynaFit* es posible realizar una comparación entre los mecanismos: secuencial al azar, secuencial ordenado y ping pong, bajo la simplificación que la reacción sucede a través de un equilibrio rápido. Aunque la cantidad de información, que se obtiene desde las distintas curvas de saturación respecto a las distintas concentraciones de co-sustrato ensayadas en este estudio es reducida, es posible tener un ajuste para los distintos mecanismos anteriormente mencionados.

El resultado que entregó el ajuste global, muestra que el mecanismo al que mejor se ajustan los datos de velocidad de la enzima perGK corresponde a un mecanismo secuencial al azar. Sin embargo, al analizar los parámetros cinéticos obtenidos para este mecanismo se observa que la unión de ADP como primer sustrato se ve altamente desfavorecido por la baja afinidad a la enzima libre a este sustrato ($K_M = 18 \text{ mM}$), respecto a la afinidad de la enzima libre por glucosa ($K_m=91 \text{ }\mu\text{M}$), lo que indica que si bien existe una posibilidad de que la enzima funcione con un mecanismo al azar, en condiciones fisiológicas de sustratos la enzima utilizaría un mecanismo secuencial ordenado.

Con estos resultados podemos afirmar que el mecanismo de la enzima perGK de *T. litoralis* corresponde a un mecanismo en secuencia ordenado, donde el primer sustrato que se une a la enzima es glucosa seguido por la unión de MgADP, para que posterior a la catálisis, se libere MgAMP y finalmente el producto glucosa 6-fosfato tal como se representa en el **Esquema 2.1**.



Esquema 2.1. Mecanismo de reacción secuencial ordenado Bi-Bi, para la reacción de fosforilación de glucosa catalizada por la enzima perGK. E representa a la enzima libre, las flechas indican la entrada de los sustratos y la salida de los productos.

V. IV. Determinación de la estructura de la enzima permutante perGK en su forma Apo, en complejo con D-glucosa y en complejo ternario perGK-D-glucosa-ADPβS.

Con el objetivo de revisar las bases estructurales que estarían determinando la especificidad por el nucleótido se generaron las estructuras cristalinas de resolución atómica de la proteína perGK, en tres condiciones distintas, en ausencia de sus ligandos (Apoenzima), como también, en presencia de su ligando D-glucosa, y en complejo ternario con D-glucosa y el análogo de ADP, ADPβS.

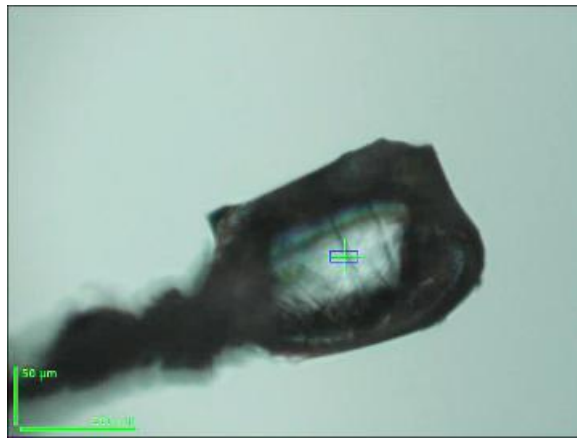


Figura 2.18. Cristal de proteínas perGK en complejo con D-glucosa.

Los cristales de proteína difractados por rayos-X, nos entregaron una serie de datos que nos informan acerca de la forma de la disposición de la proteína en el cristal. Los tres cristales pertenecieron al mismo grupo espacial ($P2_12_12_1$) y fueron isomórficos entre sí. La estructura en ausencia de ligandos (apoenzima) fue obtenida a una resolución de 2.14 Å, mientras que con el ligando D-glucosa la resolución de la estructura fue de 1.95 Å, y finalmente la proteína en complejo con D-glucosa y ADPβS fue obtenida a una resolución correspondiente a 2.44 Å. Todas las estructuras expuestas en este estudio fueron obtenidas por reemplazo molecular utilizando como modelo las estructuras de la proteína TIGK en su forma apo y en complejo con glucosa ADPβS cuyos códigos PDB corresponden a 4B8S y 4B8R³⁴, respectivamente, las que fueron obtenidas en este trabajo de tesis.

El mapa de densidad electrónica de la estructura de la proteína en su forma apo presenta diferencias con los mapas de densidad electrónica de la estructura de la proteína con D-glucosa y en complejo ternario, lo que se explica por los movimientos de los dominios mayor

y menor. La colección de datos de la difracción de rayos-X y la estadística de refinamiento de las tres estructuras de la proteína perGK se resumen en la **Tabla 2.6**.

Tabla 2.6. Colección de datos de difracción de rayos-X y estadística de refinamiento.

	perGK-Apo	perGK-D-glucosa	perGK-glucosa –ADPβS
Colección de datos			
Longitud de onda (Å)	0.9801	0.9801	0.9801
Grupo espacial	$P2_1 2_1 2_1$	$P2_1 2_1 2_1$	$P2_1 2_1 2_1$
Dimensión de la celda Unitaria			
a, b, c (Å)	95.2, 99.2, 113.4	96.6, 97.6, 113.6	96.3, 97.8, 113.5
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Rango de resolución (Å) (resolución de la última capa)	48.73-2.148 (2.225 -2.148)	49.12-1.915 (1.983 -1.915)	58.73-2.441 (2.529-2.441)
R_{merge}	0.05256 (0.9049)	0.0775 (0.7406)	0.07656 (0.7402)
R_{meas}	0.05949	0.08268	0.08367
I/σ(I)	13.91 (1.59)	15.81 (2.45)	14.56 (2.35)
Reflexiones totales	259,092 (24,480)	696,629 (60,020)	252,658 (24,959)
Reflexiones únicas	58,599 (5621)	82,820 (7807)	40,469 (3974)
Complejidad (%)	98.94 (95.68)	99.47 (95.20)	99.89 (99.90)
Multiplicidad	4.4 (4.4)	8.4 (7.7)	6.2 (6.3)
B Wilson	46.99	28.87	49.71
Refinamiento			
Reflexiones usadas para R-free	8%	8%	8%
R-work	0.1824 (0.3302)	0.1599 (0.2371)	0.1678 (0.2526)
R-free	0.2338 (0.3916)	0.1968 (0.2872)	0.2282 (0.3430)

No. Átomos			
Átomos distintos de hidrogeno.	7483	8017	7482
Macromoléculas	7217	7272	7249
Ligandos		72	138
Agua	189	673	95
Residuos de proteínas	902	902	903
Desviación R.M.S			
Longitud de enlace (Å)	0.008	0.010	0.008
Ángulos de enlace (°)	1.04	1.15	1.14
Gráficas de Ramachandran			
Ramachandran favorables (%)	96.8	98	97
Ramachandran permitidas (%)	3.2	2	3
Ramachandran desfavorables (%)	0	0	0
B-factor promedio (Å²)	67.60	39.60	56.40
Macromoléculas	67.50	39.20	56.00
Ligandos	93.00	51.10	80.90
Solvente	58.60	43.20	51.90

En las tres estructuras cristalinas de la enzima perGK de *T. litoralis* (**Figura 2.18**) es posible observar el dominio mayor y el dominio menor. En el dominio mayor es posible observar el plegamiento tipo riboquinasa ($\alpha/\beta/\alpha$), donde se distinguen diez hebras β rodeada por doce α -hélice y tres hélices 3_{10} , mientras que el dominio menor está conformado por cinco hebras- β y cuatro α -hélices. Por otra parte, entre ambos dominios es posible distinguir una

hendidura donde se encuentra ubicado el sitio activo de la enzima perGK, lo cual ha sido reportado para otros representantes de la familia quinasa dependientes de ADP. La unión de los dominios menor y mayor está formada por cuatro hebras- β pertenecientes al dominio menor y tres α -hélices del dominio mayor.

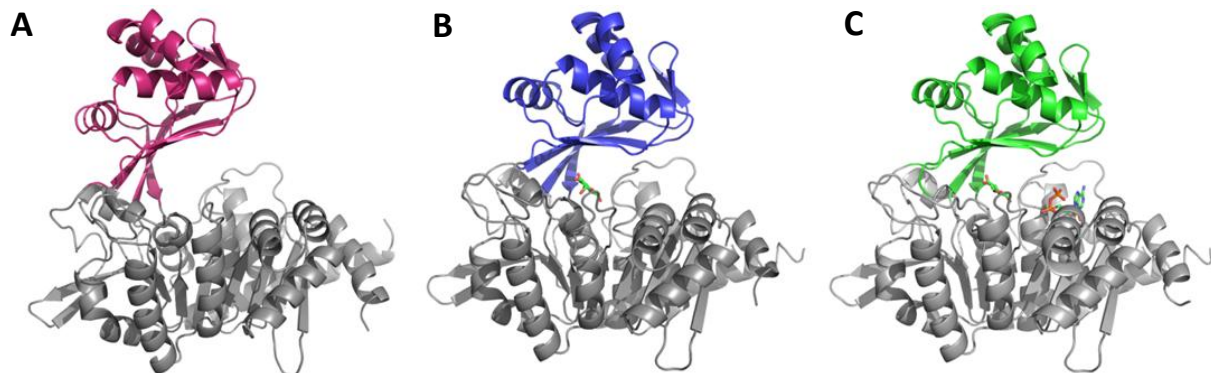


Figura 2.19. Estructuras tridimensionales de la proteína perGK de *T. litoralis* obtenidas en diferentes condiciones. En **A** muestra la proteína perGK en su condición apo (sin ligando), donde es posible observar que la distancia entre los dominios es mayor respecto a las otras estructuras. El dominio menor está representado con el color magenta. **B** se presenta la estructura de la proteína perGK en presencia del ligando D-glucosa, la cual muestra que sus dominios se encuentran más cercanos respecto a la estructura Apo. El dominio menor es representado en color azul y la molécula de D-glucosa es representado con el formato de varillas, donde los átomos de carbono son coloreados de verde, mientras que los átomos de oxígeno se muestran en color rojo. **C** corresponde a la proteína en complejo con sus ligandos D-glucosa y el análogo de sustrato ADP_{BS}, al igual que en la estructura con D-glucosa, los dominios menor y mayor se presentan a una distancia menor, respecto a lo observado en la estructura en su forma apo. El dominio menor es exhibido en color verde, mientras que las estructura de las moléculas de ligando se representa en forma de varillas cuyos átomos de carbono se colorean de verde, los átomos de oxígeno en rojo, los átomos de nitrógeno en azul, y los de fósforo en anaranjado.

Al superponer las estructuras de la proteína perGK en las diferentes condiciones en la que fueron cristalizadas (**Figura 2.19**), es posible observar diferencias espaciales en la posición del dominio menor respecto al dominio mayor. Este cambio es provocado por el cierre de los dominios luego de la unión de su ligando D-glucosa. Sin embargo, el cambio más notorio sucede en el dominio menor, donde arreglos conformacionales generados por la unión de glucosa provocan que el dominio menor se acerque al dominio mayor, en cambio en el dominio mayor se observa un movimiento de rotación y contracción respecto a la estructura apo. Mediciones del centro de masas del dominio menor y mayor indican que, en la

estructura en ausencia de ligandos, la distancia de separación entre ambos dominios en de 30.08 Å, mientras que en la estructuras en complejo con D-glucosa y en complejo ternario, esta distancia disminuye a 26.4 Å. Por otra parte, se realizaron cálculos de los radios de giro (Rg) de las estructuras cristalinas mediante el uso del programa Crysol⁸¹, el cual evalúa la dispersión de macromoléculas en solución a partir de su estructura atómica resuelta, las que se ajustan a las curvas de dispersión obtenidas por SAXS. Los valores de Rg resultante del análisis muestran que la enzima en su forma apo, presenta un valor 24.12 Å, el que experimenta cambios en su empaquetamiento una vez que se une glucosa, variando su Rg a 22.95 Å, sin embargo, este valor se mantiene en la estructura del complejo ternario de la enzima perGK. Estos resultados sugieren que la unión de glucosa genera cambios conformacionales en la proteína, sin embargo la unión del nucleótido de adenina no provoca cambios posteriores en la conformación de la proteína perGK.

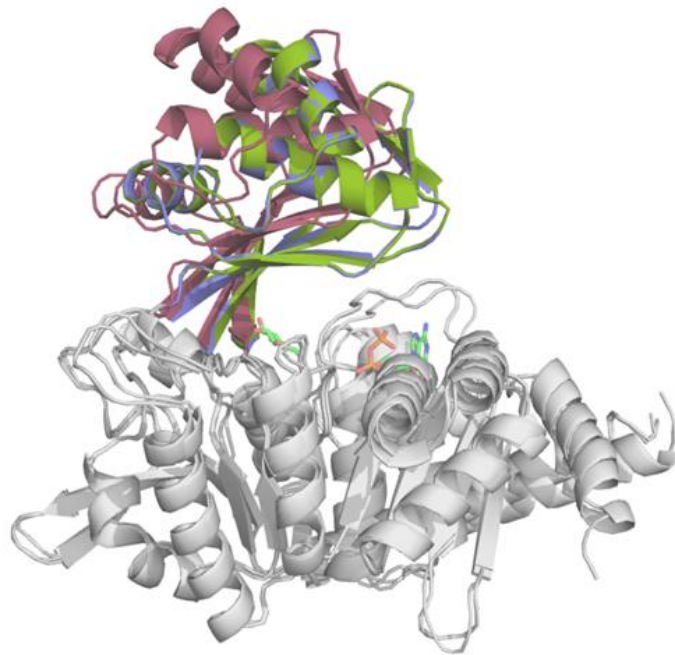


Figura 2.20. Superposición de las estructuras tridimensionales de la proteína perGK obtenida en distintas condiciones. En gris se muestra el dominio mayor. El dominio menor de la proteína perGK en su forma Apo se exhibe en magenta. El dominio menor de la estructura en complejo con D-glucosa se representa en color azul, mientras que la estructura en complejo ternario se muestra en verde. Las moléculas de ligando se representa en forma de varillas cuyos átomos de carbono se colorean de verde, los átomos de oxígeno en rojo, los átomos de nitrógeno en azul, y los de fosforo en anaranjado.

Gracias a la obtención de la estructura tridimensional de la enzima permutante es posible observar los cambios en la región β -meandro en la enzima glucoquinasa de *T. litoralis*. Estos cambios suceden específicamente entre los elementos secundarios que conectan las hebras β_{16} y β_{17} , mientras que en la enzima permutante el cambio genera una nueva conexión entre las hebras β_{14} y β_{17} . Otro cambio que se generó a través de la permutación es en los elementos secundarios que enlazan a la hebra β_{14} con la hélice α_{15} en TIGK que, en cambio, en la proteína permutada esta conexión está dada entre las hélices α_{15} y α_{17} .

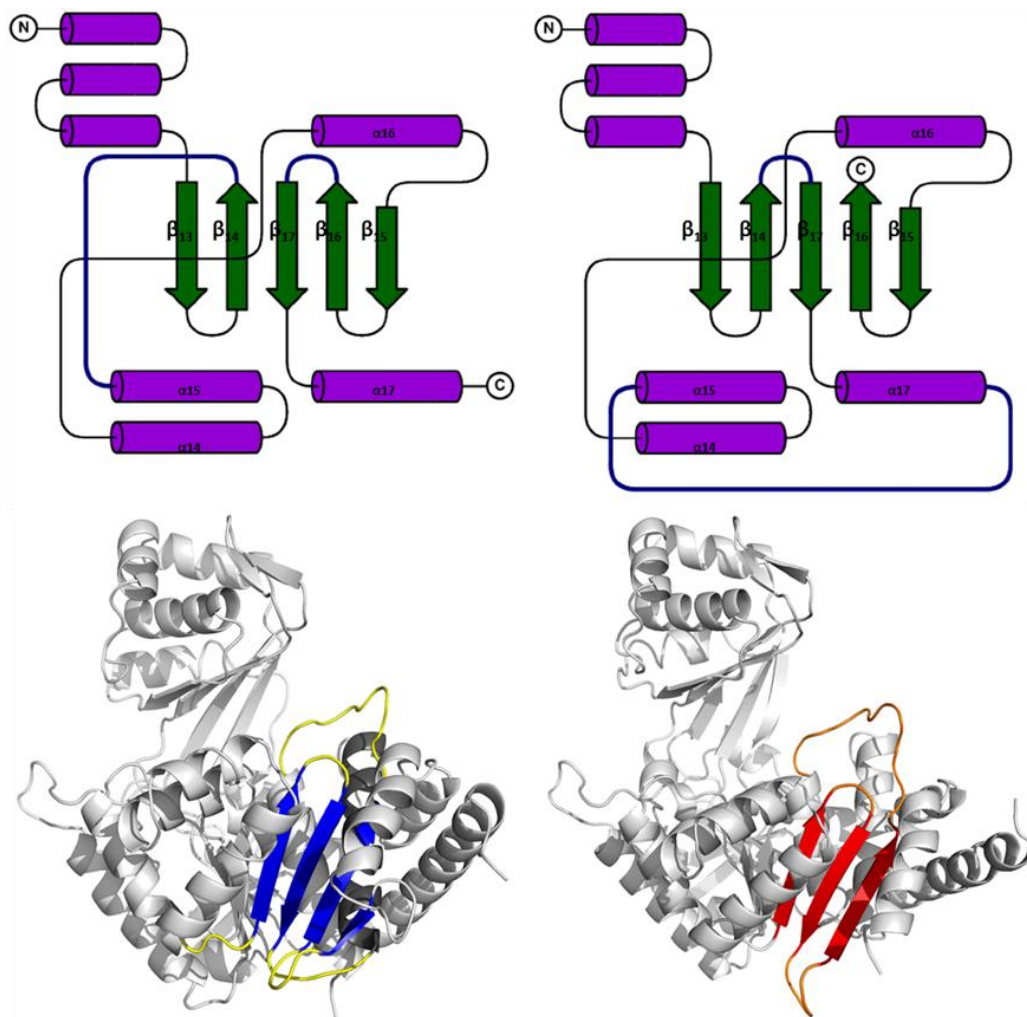


Figura 2.21. Diagrama de la topología de la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* y su versión permutante. A Diagrama de la topología de la de la proteína TIGK entre el residuo 302 al final de la proteína en el extremo carboxilo terminal. **B** corresponde a la topología de la construcción de la proteína perGK, desde el residuo 302 hasta el extremo carboxilo terminal en el residuo 457. Las conexiones que fueron cambiadas para generar una nueva topología son representadas en azul. En C se muestra la localización de la región β meandro en la estructura de la proteína TIGK, mientras que en D se muestra la región β meandro de la proteína glucoquinasa permutada.

V. V. Descripción del sitio de unión de los ligandos D- glucosa y ADPβS

V. V. 1. Sitio de unión de MgADP

La unión del sustrato MgADP esta mediado por interacciones que se generan con diferentes residuos que conforma un bolsillo apolar, el cual se localiza principalmente en la región β-meandro del dominio mayor de la proteína. En esta región, los residuos que reconocen a la adenosina se encuentran situados en el lazo mayor ubicado entre la hélice α17 la hebra β17, mientras que los residuos encargados del reconocimiento del grupo fosfato se encuentran ubicados entre en un lazo menor, el cual está flanqueado por las hebras β13 y β17.

Los residuos que participan en esta unión corresponden a Asn305 e His352, que estabilizan los grupos fosfatos del nucleótido, donde la cadena lateral de Asn305 entrega dos enlaces de hidrógeno con el grupo OH de los fosfato α y β del nucleótido de adenina. Por otra parte, His352 acepta un enlace de hidrógeno con el grupo OH del fosfato α del ADP, además His352 establece un puente de hidrogeno con el H2' de la ribosa. No obstante, una molécula de agua genera un enlace con el O2' del grupo fosfato α del nucleótido, la que a su vez interacciona con la cadena lateral de Glu308. Por otra parte, el H3' de ribosa establece un puente de hidrogeno con el grupo carbonilo de Thr353, mientras que en la porción de la base nitrogenada del ADP, es posible distinguir la formación de tres puentes de hidrogeno, uno de ellos se establece entre el N3 con una molécula de agua, la que a su vez interacciona con el grupo OH de Tyr357, mientras que, con Val376 forma dos enlaces por interacción del grupo NH6 y N1 del anillo de adenina, con el grupo carbonilo y con el grupo NH del residuo de valina.

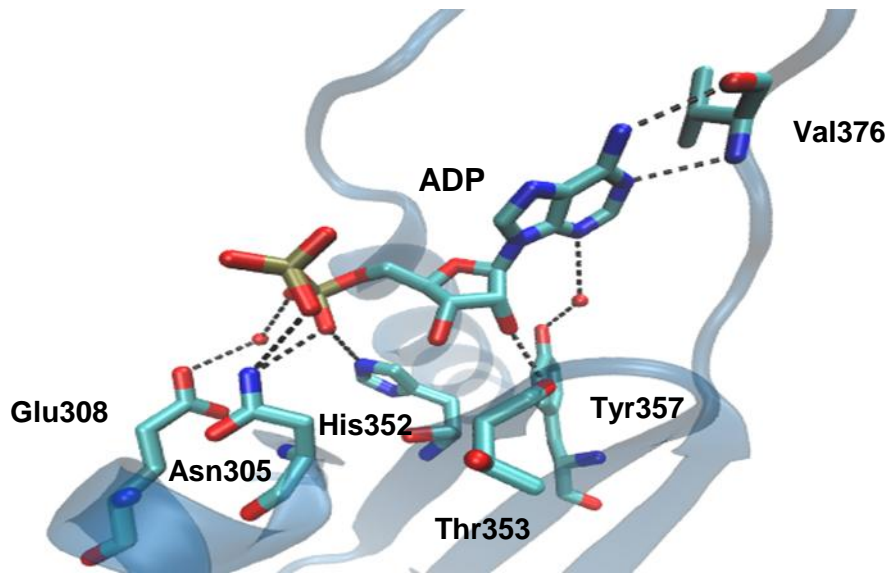


Figura 2.22. Residuos que conforman el bolsillo de unión del nucleótido. En la representación se muestran los residuos que unen al sustrato MgADP a través de una serie de enlaces de hidrógeno en distintas partes del nucleótido. Los residuos están representados en forma de varillas, donde los átomos de carbono se colorean en celeste, oxígeno en color rojo, nitrógenos en color azul y los átomos de fósforo en amarillo. En forma de cintas se muestra la estructura secundaria que forman parte los residuos que unen MgADP.

V. V. 2. Sitio de unión de D- glucosa

La unión de D-glucosa en el sitio activo de la enzima perGK está propiciada por la interacción con las cadenas laterales de los residuos Asp42, Glu96, Gly120, His184 y Asp387, que en su mayoría se encuentran ubicados en el dominio menor de la proteína. El residuo Asp42 establece dos enlaces de hidrógeno con los 3'OH y 4'OH del azúcar, de la misma manera Glu96 acepta dos enlaces de hidrógeno con los hidroxilos 1'OH y 2'OH de glucosa. Por otra parte, His184 ofrece dos puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos 2'OH y 3'OH, mientras que los residuos Asn205 y Asp387, que están relacionados en el mecanismo catalítico de la enzima, se ubican apuntando los extremos de sus cadenas laterales al grupo 6'OH de glucosa. Todos estos residuos forman una red de puentes de hidrógeno alrededor del anillo pirano del azúcar, permitiendo la sujeción de glucosa. Además, es posible observar dos moléculas de agua que se encuentran formando interacciones con el azúcar, el grupo 6'OH establece un enlace de hidrógeno con una moléculas de agua, donde mientras que una segunda molécula de agua forma otro puente de hidrógeno con el grupo NH de Glu96.

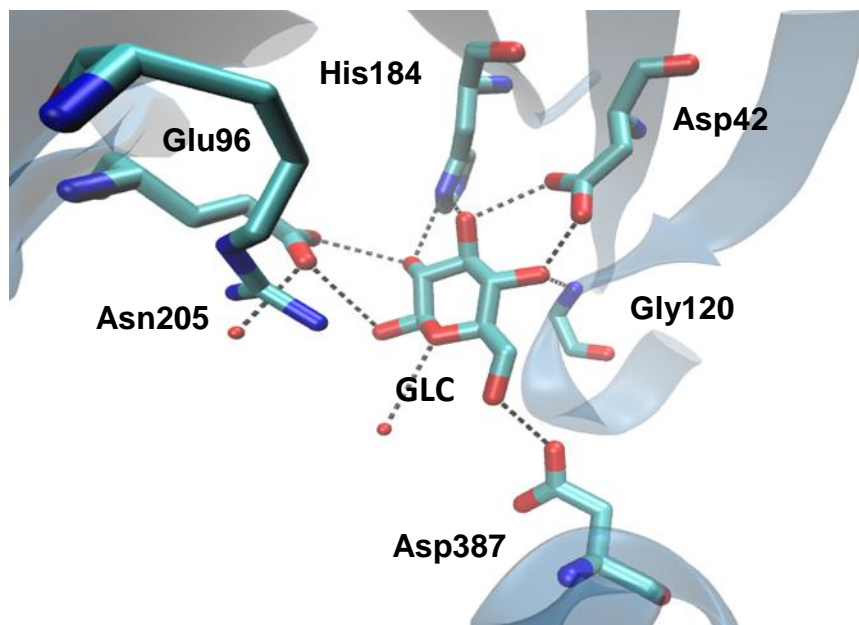


Figura 2.23. Residuos que forman el sitio de unión a glucosa. En la representación se muestra la red de enlaces de hidrógeno los ubicados en el dominio menor. Los residuos están representados en forma de varillas, donde los átomos de carbono se colorean en celeste, oxígeno en color rojo, nitrógenos en color azul y los átomos de fósforo en amarillo. En forma de cintas se muestra la estructura secundaria que forman parte los residuos que unen glucosa.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se propuso estudiar el efecto que provoca el cambio topológico en la región β -meandro sobre la especificidad del nucleótido de adenina. Esta región forma gran parte del sitio de unión al nucleótido y es una de las diferencias más notable entre la familia de quinasas dependientes de ADP respecto a las quinasas dependientes de ATP. Para estudiar dicho efecto se utilizó como modelo la proteína glucoquinasa dependiente de ADP de la Archaea *Thermococcus litoralis*, en donde se realizaron cambios en su topología en el extremo C-terminal, mediante permutación circular, con la finalidad de obtener un motivo β -meandro, que se presenta en las quinasas dependientes de ATP, y como consecuencia una proteína glucoquinasa permutada.

Luego de purificar a homogeneidad la proteína glucoquinasa permutada, se examinó el efecto del cambio topológico sobre la función catalítica de la enzima, por lo que se determinó la actividad glucoquinasa de la enzima perGK con ambos nucleótidos de adenina, ADP y ATP, con el propósito de evaluar la discriminación en el uso de éstos por parte de la proteína permutada. Sólo se observó actividad en presencia de 10 mM ADP, aunque fue menor que la obtenida para T/GK, 22 U*min⁻¹ y 43 U*min⁻¹, respectivamente. En contraste, cuando se utilizó ATP como dador de grupo fosfato, la enzima perGK no presentó actividad respecto a lo observado en el control en ausencia de glucosa.

Estos resultados indican que un cambio en el ordenamiento de la topología en el sitio de unión al nucleótido, en este caso a través de una permutación, no es suficiente para generar un cambio en la especificidad por éste. Posiblemente sea necesario realizar cambios puntuales a nivel de algunos aminoácidos que conforman el sitio de unión del nucleótido en la disposición de los elementos de estructura secundaria de modo asemejar esta disposición a lo que observa en los miembros pertenecientes a la familia de las enzima quinasa dependientes de ATP.

Con la finalidad de inspeccionar si el cambio en la topología alteraba otras propiedades catalíticas determinamos el mecanismo cinético de la enzima. Para ello se realizaron estudios de velocidad inicial, junto con ensayos de inhibición por productos e inhibiciones de punto muerto por análogos de sustratos, para de esta manera obtener información acerca del tipo de mecanismo, el valor de sus parámetros cinéticos, y si éstos se relacionan con el

mecanismo que exhibe la enzima glucoquinasa nativa. Los resultados de los ensayos cinéticos indican que el mecanismo de la enzima glucoquinasa permutante es en secuencia del tipo ordenado tal como se representa en el Esquema 2.1, donde la reacción de fosforilación de glucosa se inicia con la unión de glucosa al sitio, para luego dar paso a la entrada y unión de MgADP, la que continúa con la transferencia del grupo fosfato β del ADP hasta el grupo OH6' de glucosa y finalizar con la liberación del producto MgAMP y posteriormente glucosa-6 -P.

El mismo tipo de mecanismo ha sido demostrado en la enzima dependiente de ADP *TIGK*³⁴, sin embargo, el orden que se describe para esta enzima difiere respecto a la enzima perGK, ya que la reacción en la enzima *TIGK* se inicia con la unión de MgADP continuando con la unión del azúcar para posteriormente liberar el azúcar fosforilada y MgAMP. Por otra parte, el orden de entrada de los sustratos, glucosa en primer lugar seguido por MgADP, ha sido reportado en miembros de la familia de quinasa dependiente de ATP, fosfofructoquinasa 2 de *E.coli*³⁹, riboquinasa de *E.coli*¹⁷ y adenosina quinasa humana¹⁸, lo que nos lleva a pensar que el cambio en la topología en el sitio de unión del nucleótido podría ser un paso previo al cambio en la especificidad de este sustrato.

Para relacionar el orden de entrada de los sustratos con los cambios conformacionales que sufre la proteína durante la catálisis se generaron las estructuras cristalinas de la enzima en diferentes estados, es decir, en ausencia de ligando, en presencia de glucosa y en complejo ternario con glucosa y el análogo no hidrolizable de ADP, ADP β S. A partir de lo observado en las estructuras cristalinas, se infiere que la enzima glucoquinasa permutada sufre cambios en su conformación luego que se une el primer sustrato, glucosa, no así cuando se forma el complejo ternario, después que se une MgADP. Esto confirma los resultados obtenidos de los experimentos cinéticos que apoyan la entrada de glucosa como el primer sustrato que se une a la enzima. Asimismo, estos cambios conformacionales han sido observados en la enzima *TIGK*, pero a diferencia con la enzima glucoquinasa permutada, *TIGK* muestra cambios en la disposición de sus dominios una vez unido el primer sustrato, MgADP y después experimenta un segundo cambio después de formar el complejo ternario, *TIGK*-MgADP-glucosa. Por otra parte, en la enzima homodimérica riboquinasa dependiente de ATP de *E.coli*, también se han descrito cambios conformacionales asociados a la unión de los sustratos¹⁷. Estos cambios en la estructura riboquinasa se relacionan con el cierre y la

apertura de sus dominio menor y mayor, donde es posible observar que la estructura en su forma apo presenta una conformación abierta, donde el sitio activo se encuentra expuesto para la unión de ribosa. Una vez unido el sustrato ribosa sucede el acercamiento del dominio menor, que actúa como tapa del sitio activo de la riboquinasa, hacia el dominio mayor, lo cual probablemente incrementa la afinidad de la enzima por el segundo sustrato ATP. Luego de la unión del nucleótido es posible observar un segundo cambio en el dominio menor y en el sitio de unión del nucleótido, el que posiblemente facilita la catálisis. Esta secuencia de cambios conformacionales están en acuerdo con el mecanismo cinético bi-reactante ordenado, que también ha sido propuesto para otras quinasas de azúcar¹⁵. Por otra parte, estos cambios se podrían correlacionar con lo propuesto por Koshland para enzima bi-reactantes⁸², cuya hipótesis es conocida como encaje inducido o flexibilidad enzimática, la que señala que el sustrato A induce cambios conformacionales que expone el sitio de unión del sustrato B, resultando en un alineamiento preciso de los grupos catalíticos para que se lleve a cabo la reacción.

Al contrastar las topologías de las estructuras cristalinas de las quinasas dependientes de ATP respecto a las quinasas dependientes de ADP, comparten varias similitudes, tal como la presencia de un dominio menor y el plegamiento tipo riboquinasa, entre otros. Sin embargo, en quinasas dependientes de ADP es posible distinguir, en el extremo N-terminal, que el primer elemento de estructura secundaria corresponde a una hélice $\alpha 1$, además de hélices $\alpha 16$ las cuales no se encuentran en las estructuras de los miembros pertenecientes a la familia de quinasas dependientes de ATP, y que rodea la región donde se encuentra el sitio de unión del nucleótido. Esta diferencia nos lleva a creer que estas hélices podrían estar generando cierta restricción en la flexibilidad de los elementos secundarios, lazo mayor y lazo menor, que están encargados del reconocimiento y unión del nucleótido de adenina, lo que a su vez podría estar influyendo en la selección del nucleótido de adenina (**Figura. 2.23**).

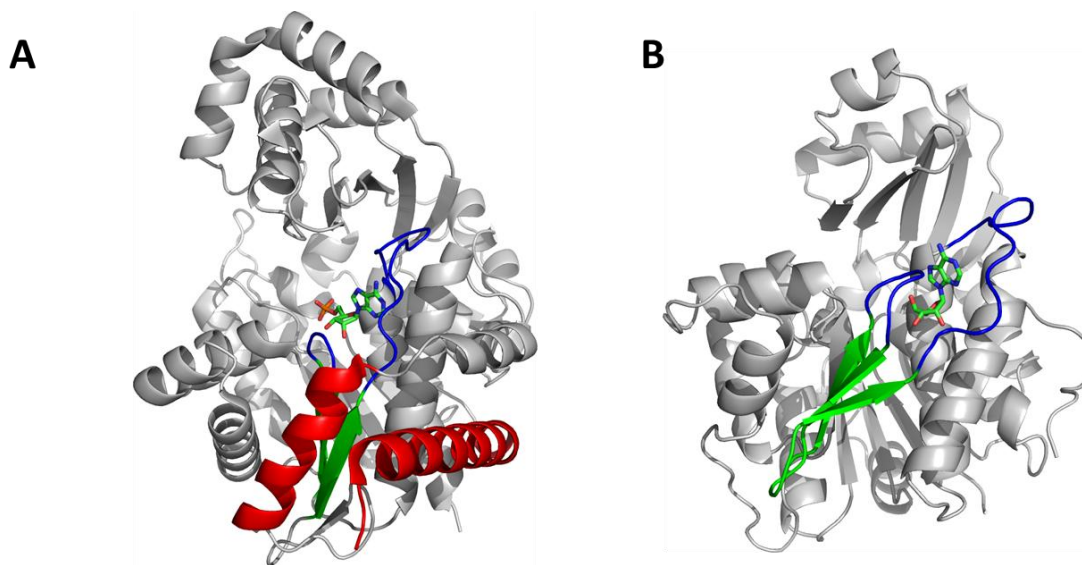


Figura 2.24. Representación de los elementos secundarios involucrados en la unión del nucleótido. **A**, estructura tridimensional de glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis* (4B8S), donde se muestra en rojo las hélices $\alpha 1$ y 16, que restringen la flexibilidad del sitio de unión al nucleótido. **B** estructura cristalina de adenosina quinasa humana dependiente de ATP (1BX4) en donde es posible observar la ausencia de las hélices $\alpha 1$ y 16. En verde se representan las hebras β que constituyen la región β -meandro, mientras que en azul se representa el lazo mayor y menor.

Por otra parte, los residuos que conforman el sitio de unión de glucosa en la proteína perGK (Asp42, Glu96, Gly120, His184) se encuentran altamente conservados respecto a las glucoquinasas dependientes de ADP (ADPGK). Sin embargo, en las fosfofructoquinasas dependientes de ADP (ADPPFK) los residuos que conforman el sitio de unión al sustrato azúcar no se presentan muy conservados respecto a las ADPGK. Dichos residuos corresponden principalmente a los residuos que forman enlace con el anillo pirano de glucosa, Glu y His, junto con Asn que participa en la catálisis, y han sido reemplazados por los residuos Ala, Asn y Arg en ADPPFK, los podrían ser importantes en la selección del azúcar ²⁸.

Al comparar el sitio de unión de ADP de perGK respecto a los miembros de la familia de quinasas dependientes de ADP, es posible observar que los residuos que lo componen se encuentran altamente conservados. Sin embargo, en las ADPGK de *P. horikoshii* y *T. litoralis*, el residuo Glu195/203 respectivamente, difiere respecto a los observado en ADPPFK donde este residuo cambia por una Ser ²⁸.

Sin embargo, la comparar los sitios de unión del nucleótido de adenina entre las familias de quinasas dependientes de ADP respecto a las de ATP, es posible encontrar diferencias en los residuos que lo conforman. Por ejemplo, el residuo Tyr357 de *TIGK* es reemplazado por residuos con cadenas laterales de menor tamaño en las quinasas dependientes de ATP. En riboquinasa humana este residuo corresponde a un residuo de Val221¹⁷, mientras que en la adenosina quinasa de *T. gondii* y humana este residuo cambia por un residuo de Thr271 y Val 284 respectivamente^{18,38}, que podría explicar la discriminación de estas quinasas por el nucleótido ATP o ADP. Uno de los residuos que también podrían estar participando en la selección del nucleótido de adenina es His352 de *TIGK* el cual varía por un residuo de treonina en las quinasas dependientes de ATP, y que podría estar restringiendo el espacio para la unión de ATP. Además, otros residuos conforman el bolsillo de unión del nucleótido y que difieren entre estas familias corresponden a Ala383 de *TIGK* que cambia por Ile 349 /331 en adenosina quinasa humana y de *T. gondii*, y por residuo de valina en la posición 286 en riboquinasa de *E.coli*. Además, los residuos de isoleucina y fenilalanina de *TIGK* aparecen reemplazados por alanina e isoleucina respectivamente en los miembros de las familias de las quinasas dependientes de ATP.

A partir de este estudio se demuestra que cambios en la topología de una enzima, mediante reordenamiento en los elementos de estructura secundaria por permutaciones puede provocar cambios en el funcionamiento de ésta. Los resultados de este trabajo muestra que la permutación en la región β -meandro no es suficiente para generar un cambio en la especificidad en el uso de nucleótido por parte de las proteínas quinasas dependientes de ADP, sino que posiblemente es necesario incluir cambios estructurales y a nivel de secuencia primaria de la proteína. Sin embargo, este reordenamiento en la topología provocó un sorprendente cambio en el orden de unión de los sustratos, lo que nos permite inferir que esta región, más que participar en la especificidad por el nucleótido, podría ser importante en el mecanismo catalítico de la enzima, aunque este cambio en el orden de entrada de los sustratos no provoca cambios en la actividad de la enzima, comparada con la actividad de la enzima *TIGK*, si genera que el orden de entrada se asemeje al que se ha descrito para las enzimas quinasas dependientes de ATP^{17,18}, lo que posiblemente haya sido uno de los cambios estructurales que experimentaron estas enzimas a lo largo de su historia evolutiva²⁵ para transformarse a quinasas dependientes de ADP.

CAPITULO 3

Regulación de la actividad
enzimática en enzimas
bifuncionales
fosfofructoquinasa
/glucoquinasa dependientes de
ADP del orden *Methanococcales*.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

En arqueas del phylum *Euryarchaeota* es posible encontrar organismos metanógenos que habitan en ambientes anaerobios y que son capaces de producir metano a partir de la degradación de la materia orgánica generada por organismos fermentativos^{83,84}. Estos organismos se caracterizan por un estilo de vida autotrófico facultativos utilizando como fuente de carbohidratos CO_2 , acetato, compuesto de un carbono como formiato, metileno y algunos alcoholes. En los metanógenos, la producción de metano ocurre principalmente por dos vías; una de ellas es la reducción de CO_2 con electrones provenientes de H_2 o formiato, mientras que la otra corresponde a la vía acetoclastica⁸⁴ que consiste en una serie de reacciones de clivaje y conversión de acetato, dando como resultado metano y CO_2 .

Las arqueas metanogénicas no son capaces de asimilar hidratos de carbono o sustratos orgánicos complejos, sin embargo, utilizan la gluconeogénesis para la formación de hidratos de carbono (hexosas y pentosas). Incluso, algunos metanógenos sintetizan glicógeno para el almacenamiento interno de carbono, el que posteriormente es degradado mediante vías catabólicas del azúcar. El estudio de estos organismos metanógenos, que habitan diversos ambientes, es un tema de especial interés dado el potencial biotecnológico.

Por otra parte, el flujo glicolítico en estos organismos sucede a través de una versión modificada de la vía Embden-Meyerhof o glicolisis. Una de las modificaciones más notables se observa en las enzimas que fosforilan glucosa y fructosa 6 fosfato, las cuales utilizan ADP, como dador de grupo fosforilo, en vez de ATP como ocurre en la vía clásica. Las enzimas quinasas de azúcar dependientes de ADP descritas hasta ahora corresponden a glucoquinasas (ADPGK) y fosfofructoquinasas (ADPPFK), las cuales son homólogas entre sí, aunque no presentan similitud de secuencia con las quinasas de azúcar dependientes ATP conocidas. Por ese motivo se propuso a las quinasas dependientes de ADP como una nueva familia de quinasas, las que se incluían dentro de la superfamilia riboquinasa ya que presentaban similitud estructural con los otros miembros de la superfamilia³⁷. Generalmente, estas quinasas dependientes de ADP pertenecen a organismos hipertermófilos del orden de los *Thermococcales*^{27-29,35,41}. Por otra parte, datos cinéticos y genómicos indicaron que esta modificación también está presente en algunas arqueas metanogénicas del orden de los *Methanococcales* y *Methanosarcinales*. Recientemente,

también se ha descrito la presencia de una glucoquinasa dependiente de ADP en *Mus musculus* y *Homo sapiens*^{29,30}.

El análisis de la secuencia del genoma de la arquea hipertermófila *Methanocaldococcus jannaschii* sugirió que la enzima fosfofructoquinasa era dependientes de ADP⁸⁵. Además, Verhees en 2001 demostró que en el extracto celular de diferentes organismos del orden *Methanococcales*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanococcus igneus* y *Methanococcus maripaludis*, la fosforilación de F6P era llevada a cabo por quinasas dependiente de ADP³². Posteriormente, se reportó que la enzima ADPPFK de *M. jannaschii* correspondía a una quinasa bifuncional, es decir, cataliza la primera reacción de la glicólisis, así como la tercera, donde la fosforilación de glucosa y fructosa-6-fosfato (F6P) es realizada por la misma enzima (*MjPfk/GK*). Debido a esta actividad dual se propuso que esta enzima podría ser una forma ancestral de la familia dependiente de ADP⁴². Sin embargo, en el trabajo de investigación realizado por Merino y Guixé en el año 2009, el cual tenía como objetivo examinar el carácter ancestral de esta enzima bifuncional, se refutó dicha hipótesis, y se propuso que esta enzima podría corresponder a una forma transicional entre las enzimas glucoquinasa y fosfofructoquinasa dependientes de ADP⁸⁶.

Hasta ahora, la enzima dependiente de ADP de *M. jannaschii* es la única enzima caracterizada del orden de las *Methanococcales*, por lo que se desconoce si este carácter dual de la enzima bifuncional es un rasgo particular de esta enzima, o si es una característica común de los miembros de este orden. Sin embargo, en el genoma del arquea mesófila *M. maripaludis* se reportó la existencia de una proteína ADPPFK homóloga a *M. jannaschii*, lo que lleva a plantear la pregunta si esta proteína homóloga presenta ambas actividades glucoquinasa y fosfofructoquinasa (**Figura 3.1**).

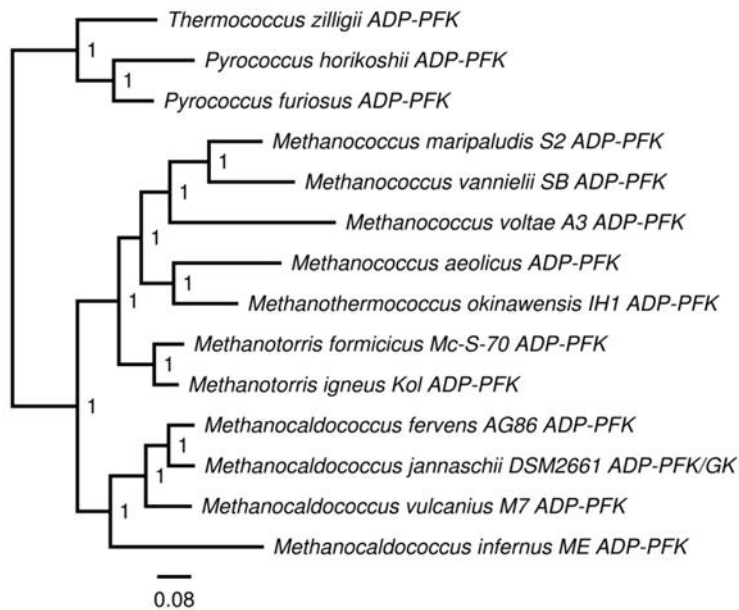


Figura 3.1. Árbol filogenético de la rama de Methanococcales para la familia de quinasa de azúcar dependientes de ADP. Las secuencias de los Thermococcus T. horikoshii, T. zilligii y T. furiosus fueron utilizadas como grupo externo³³.

Por otra parte, se ha indicado que estas enzimas no son reguladas, sin embargo, un trabajo reciente de Merino y colaboradores en 2011⁴³, se propuso un mecanismo de la regulación por metales para las enzimas de las superfamilia riboquinasa, donde el metal regulador se une al estado de transición y modula directamente la diferencia de energía entre el estado de transición y el estado basal, actuando como un inhibidor o activador.

Hasta ahora, los estudios de caracterización de la enzima bifuncional *MjPfk/GK* no han aclarado el mecanismo catalítico que presenta esta quinasa y si está conservado respecto a los otros miembros de la familia dependiente de ADP. Por esta razón, en este trabajo propuso caracterizar bioquímicamente la proteínas *MjPfk/GK* y determinar su mecanismo catalítico.

Asimismo, y como se mencionó anteriormente, la enzima dependiente de ADP de *M. jannaschii* es la única enzima caracterizada, y por lo tanto no se conoce si esta actividad bifuncional es exclusiva de este organismo o es una característica común para todas las enzimas de los organismos de este orden. Por este motivo también se plantea estudiar el

carácter bifuncional de la enzima fosfofructoquinasa del mesófilo *M. maripaludis* y establecer si este rasgo es común a los miembros del orden *Methanococcales*.

Hasta la fecha no se ha descrito que estas enzimas presenten algún mecanismo de regulación de sus actividad, por lo que en este trabajo se evaluó si la actividad glucoquinasas que presentas estas enzimas *Methanococcales* presenta algún tipo de regulación por metal libre, tal como ha sido descrito para otras enzimas de la superfamilia riboquinasa.

Además en este trabajo se observó que el efecto activador de AMP, lo que también podría tratarse de una forma de regular la actividad glucoquinasa de estas enzimas bifuncionales. Este efecto activador ha sido descrito para otras enzimas y explicado como un mecanismo de activación por producto. Dicho efecto fue reportado por Holtzer y colaboradores en 1964, quien estudio la enzima L-Treonina Dehidratasa de lavadura que cataliza transformación de L-Treonina a NH_4^+ y α -cetoglutarato. En este trabajo se describió que el producto de la reacción NH_4^+ presenta un efecto activador de la enzima lo que es característico de una cinética de procesos autocatalíticos⁸⁷. Otro ejemplo de activación por producto fue descrito para la hidrólisis tríptica del compuesto *p*-toluensulfonil-arginina-metil-ester (TAME); en este estudio se demostró que el aumento de la concentración del producto de la reacción de hidrólisis catalizada por tripsina, *p*-toluensulfonil-arginina (*p*-tosil-arginina), incrementa la actividad en un 82% la actividad respecto a la actividad registrada en ausencia del producto en la reacción, lo que sugiere la hidrólisis del sustrato es mayor debido a la formación de un complejo ternario entre el sustrato y *p*-tosil-arginina que lo observado para hidrólisis con la formación de un complejo binario, pero que no se relaciona con la presencia de un segundo sitio catalítico⁸⁸. En un trabajo posterior realizado por Howard en 1965, los autores proponen que el incremento de la velocidad de hidrólisis del sustrato se debe a un aumento en la afinidad de éste, sugiriendo la existencia de un sitio activador relacionado con residuos no polares en lugar de residuos involucrados con el sitio catalítico⁸⁹.

A partir de este estudio se procura explicar que estas enzimas, además de presentar un carácter bifuncional, podrían utilizar diversas estrategias para regular su actividad y así, probablemente, mantener la correcta sintonía de su metabolismo.

II y III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS

La enzima bifuncional fosfofructoquinasa /glucoquinasa de *M. jannaschii* (MjPfk/GK), presenta un mecanismo cinético que es común respecto a otros miembros de la familia de quinasa dependientes de ADP, el cual está regulado por el ión divalente Mg^{2+} y por AMP. Asimismo, el carácter dual de la actividad de la enzima es un rasgo común a todos los miembros del orden *Methanococcales*.

III. OBJETIVOS

III.I. Objetivos generales

- Establecer el mecanismo cinético para las reacciones de fosforilación de glucosa y fructosa-6-fosfato catalizado por la proteína hipertermófila bifuncional MjPfk/GK.
- Determinar el rasgo bifuncional en la proteína fosfofructoquinasa dependiente de ADP del organismo mesófilo *M. maripaludis*.
- Estudiar la regulación de la actividad glucoquinasa de las proteínas del orden *Methanococcales*, *M. jannaschii* y *M. maripaludis*.

III.II. Objetivos específicos.

- Determinar el mecanismo cinético y los parámetros cinéticos (V_{max} , K_M Y k_{cat}) de la proteína MjPfk/GK mediante ensayos de velocidad inicial para las actividades fosfofructoquinasas y glucoquinasa
- Determinar el uso de azúcares, como aceptores de grupo fosfato, midiendo la actividad glucoquinasa de la enzima MjPfk/GK.
- Determinar la especificidad de la enzima fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *M. maripaludis* respecto a glucosa o fructosa-6-fosfato a través de ensayos de velocidad inicial.
- Determinar efecto regulatorio del catión metálico Mg^{2+} y el producto de reacción AMP, sobre la actividad glucoquinasa para ambas proteínas del orden *Methanococcales*, MjPfk/GK y MmPfk/GK.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.I. Material

IV. I.1 Material biológico

Para este estudio, los genes de las proteínas *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK* fueron obtenidos mediante síntesis *de Novo*, a cargo de la empresa Genscript, y enviado al laboratorio en el vector de clonaje pUC57. El uso de codones fue optimizado para la expresión en *E. coli*.

Como vector de expresión se utilizó el plásmido pET-TEV, que es una versión modificada del plásmido pET-28a (Novagen), en el cual la secuencia que codifica el sitio de corte por trombina ha sido remplazada por una secuencia de corte por la proteasa del virus del tabaco (TEV). El vector tiene una longitud de 5369 pb, posee el promotor T7/ lac, otorga resistencia a Kanamicina, presenta la posibilidad de incorporar un *tag* de histidina (His6-tag) en el N-terminal o C-terminal y además el His6-tag del N-terminal puede eliminarse mediante la proteasa TEV. Las proteínas expresadas en este estudio fueron subclonadas en este vector en los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*.

Para llevar a cabo este trabajo experimental se utilizó la cepa bacteriana de *E. coli* BL21 (DE3) disponible en el cepario del laboratorio. Las células crecieron de forma rutinaria a 37°C en medio LB suplementado con antibiótico.

IV. I. 2. Enzimas

Para los ensayos de actividad enzimática se utilizaron las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (G6PDH), quinasa pirúvica (PK) de músculo de conejo, deshidrogenasa láctica (LDH), aldolasa, triosa-P isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa (todas de músculo de conejo), las que fueron obtenidas de Sigma Chem. Co. (MO, E.E.U.U).

Para el trabajo de biología molecular se emplearon las enzimas de restricción FastDigest® *BamHI* y *NdeI* las que fueron obtenidas desde Fermentas, Thermo Scientific (MA, E.E.U.U).

La enzima DNA polimerasa super mix platinumium high fidelity, se obtuvieron de Invitrogen (CA, E.E.U.U), mientras que la enzima DNA ligasa se obtuvo de *New England BioLabs®inc.* (NEB).

IV. I. 3 Sistema de purificación de PCR y DNA plasmídico

El producto de PCR fue purificado desde geles de agarosa, empleando el sistema de purificación Ultraclean 15, MO BIO (CA, E.E.U.U). El DNA plasmídico fue purificado utilizando el sistema plasmid mini kit II, EZNA, OMEGA Bio-tek (E.E.U.U).

IV. I. 4. Medios de cultivo

Se utilizaron los medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB) y el medio de cultivo sólido los que fueron preparado como se indica en la cultivo del Capítulo 1 en la sección Materiales y Métodos. Los medios de cultivos se suplementaron con antibióticos para la selección de las células transformante, para lo cual se usó el antibiótico Kanamicina ($35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

IV. I. 5. Materiales químicos y reactivos

Los reactivos empleados en este trabajo son los que se mencionan en el Capítulo 1 (apartado de Materiales y Métodos), sin embargo, se incluyen el marcador de tamaño molecular de DNA MassRuler™ DNA LadderMix , fosfoenolpiruvato, Fructosa-6-fosfato (F6P), adenosina-5'-monofosfato (AMP), ácido 1,4-piperazinaetanosulfónico, fueron adquiridos a la compañía Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, Estados Unidos).

IV. II. Metodología

IV. II. 1. Síntesis, expresión y purificación de proteínas *MmPfk/GK* y *MjPfk/GK*

El gen de la proteína mutada *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK* fue generado por síntesis *de Novo* (GenScript) y clonado en el vector pUC57. Posteriormente, los genes fueron subclonados en el vector pET-TEV (pET-28a modificado) en los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* y las proteínas fueron expresadas en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). El vector pET-TEV introduce un *tag* de 6 histidinas (His6) en el extremo N-terminal, lo que permitió purificar las proteínas por columnas de afinidad. Además, este vector insertó un sitio de corte para la proteasa del virus del tabaco (TEV) para remover el *tag* luego de la purificación de la proteína. Las bacterias transformadas con los respectivos plásmidos fueron crecidas en medio LB con $35 \mu\text{g}/\text{mL}$ de Kanamicina a 37°C hasta alcanzar OD_{600} de 0.6 aproximadamente. La expresión de las proteínas fue inducida por 1mM de Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante toda la noche a 37°C para *MjPfk/GK* y 30°C para *MmPfk/GK*. Las bacterias fueron centrifugadas por 15 minutos a 3.210 g y resuspendidas en Buffer de unión (Tris 50mM pH7,

8 NaCl 0,5mM, MgCl 5mM, imidazol 20mM). Posteriormente, las bacterias resuspendidas se sonicaron en hielo, con 10 pulsos de 20 segundos a 40% de amplitud con 1 minuto de descanso. Luego, el lisado de *MmPfk/GK* se centrifugó a 18.514 g por 30 minutos y la fracción soluble se filtró y cargó en una columna HisTrap (GE Healthcare) equilibrada con buffer de unión. Para la proteína *MjPfk/GK* el sobrenadante se calentó a 80°C por 10 minutos, luego se centrifugó a 18514 g durante 10 min y el sobrenadante se cargó a la columna. Las proteínas fueron eluidas con un gradiente imidazol de 20 a 500 mM. Las fracciones que presentaban actividades enzimáticas colectadas y dializadas contra PIPES 25mM pH 6,5 y MgCl₂ 5mM. Luego de la diálisis se agregó 20% de glicerol.

IV. II. 2. Cuantificación de proteínas

Para los análisis cinéticos las concentraciones de proteínas fueron determinadas mediante el método de Bradford⁴⁶, empleando albúmina de suero de bovino como estándar. Para los análisis espectroscópicos la concentración fue determinada a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción teóricos de las proteínas, obtenidos desde la herramienta ProtParam de ExPASy Proteomics Server.

IV. II. 3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Para determinar el grado de pureza de la proteína de las fracciones seleccionadas, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalantes, mediante el protocolo que se menciona en la sección Materiales y Métodos en el Capítulo 1.

VI. II. 4. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad glucoquinasa dependiente de ADP de *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK* fue realizada midiendo velocidad inicial, tal como se explica en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 se midió. El ensayo enzimático contenía amortiguador HEPES 25 mM pH 7,8, NAD⁺ 0,5 mM, MgCl₂ libre 5 mM y concentraciones variables de glucosa y Mg-ADP. La producción de glucosa-6-P se acopló a la producción de NADH usando la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* y se siguió espectrofotométricamente por el aumento de la absorbancia a 340 nm. Para el cálculo de las unidades de enzima se utilizó un coeficiente de extinción del NADH de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹

(Bergmeter, 1974). La temperatura a la cual se midió actividad glucoquinasa para la enzima *MjPfk/GK* fue de 50°C, mientras que para la *MmPfk/GK* fue de 30°C.

La actividad fosfofructoquinasa dependiente de ADP se midió espectrofotométricamente de manera continua. El ensayo enzimático contenía amortiguador PIPES 25 mM pH 6,5, NADH 0,16 mM, MgCl₂ libre 5 mM y concentraciones variables de fructosa-6P y Mg-ADP. La producción de fructosa-1,6-bisP fue acoplada al consumo de NADH utilizando como enzimas auxiliares aldolasa, triosa-P isomerasa y α-glicerofosfato deshidrogenasa (todas de músculo de conejo) y seguida por la disminución de la absorbancia a 340nm (Campos y cols., 1984). Tanto para el ensayo de la actividad glucoquinasa como fosfofructoquinasa las enzimas auxiliares no fueron limitantes y la unidad enzimática (U) corresponde a μmol/min de producto (**Figura 3.2**).

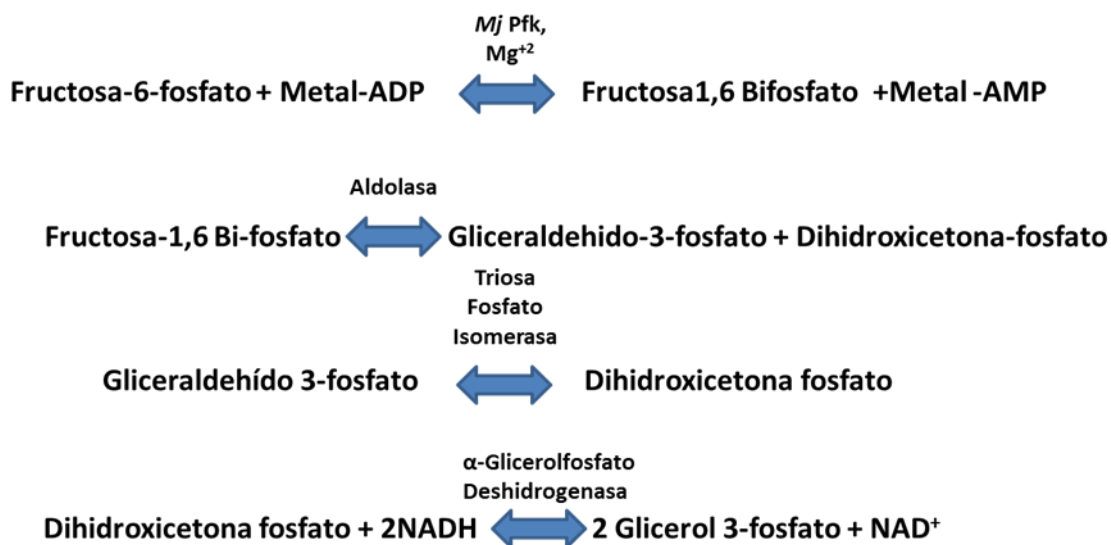


Figura 3.2. Ensayo acoplado utilizado para medir la actividad fosfofructoquinasa de la enzima *MjPfk/GK* Y *MmPfk/GK*.

La temperatura a la cual se midió actividad glucoquinasa para la enzima *MjPfk/GK* fue de 50°C, mientras que para la *MmPfk/GK* fue de 30°C.

Para el ensayo de la actividad quinasa dependiente de ADP con distintos azúcares se empleó un ensayo discontinuo, en el cual se cuantificó la desaparición de ADP. La mezcla de reacción contenía de Tris-HCl 25mM pH 7.0, MgCl₂ 20mM, ADP 25 mM y cada azúcar a 10 mM. La mezcla fue incubada por 15 min a 30°C y la reacción detenida con una concentración de

ácido perclórico al 3% final y puesta en hielo por 5 minutos, para luego ser neutralizada con NaHCO₃ 0.5M final. Las muestras fueron centrifugadas a 18.620 g por 10 minutos y una alícuota del sobrenadante fue titulada en 500 µL para determinar la concentración de ADP a 37 °C. La mezcla de titulación de ADP contenía piruvato quinasa 0,8 U, lactato deshidrogenasa 2,4 U, fosfoenolpiruvato 0,3mM, KCl 125mM, Tris-HCl 25mM pH 7,0, MgCl₂ 5mM y NADH 0,2mM en un volumen final de 0,5 mL. El consumo de ADP fue calculado usando como referencia el control sin azúcar.

VI.II. 5. Determinación de parámetros cinéticos: k_{cat} , K_m y V_{max} .

La determinación de los parámetros cinéticos se realizó mediante estudios de velocidad inicial variando la concentración de un sustrato a concentraciones saturantes del co-sustrato. Para la obtención de V_{max} y K_m aparentes, la información fue analizada mediante el ajuste no lineal con GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), utilizando las ecuaciones de Michaelis-Menten (Ecuación 3.1). La constante k_{cat} (s^{-1}) se determinó a partir de V_{max} (U/mg) considerando los pesos moleculares teóricos de cada proteína estimado con el programa computacional ProtParam del servidor ExPASy (Ecuación 3.2).

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 3.1

$$k_{cat}(s^{-1}) = \frac{V_{max} \left(\frac{U}{mg}\right) * PM\left(\frac{g}{mol}\right)}{1000 * 60(s)}$$

Ecuación 3.2

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.I.1. Purificación de la enzima bifuncional *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK*

La proteína fosfofructoquinasa/glucoquinasa de *M. jannaschii* y *M. maripaludis* fueron purificadas de acuerdo al protocolo descrito anteriormente en la sección Materiales y Métodos. Se realizó un paso cromatográfico de afinidad por ion metálico (Ni^{+2}) (IMAC), que permitió obtener proteínas con un alto grado de pureza, la que se detectaron midiendo la actividad glucoquinasa y fosfofructoquinasa dependiente de ADP, a todas las fracciones eluidas mediante un gradiente de imidazol. La pureza de las proteínas fue determinado por el análisis de SDS-PAGE (**Figura 3.3 A y B**), donde se observa que las fracciones eluidas corresponde a una proteína que migra cercana a los 50 kDa, lo cual se condice con el tamaño reportado el que corresponde a 55 kDa para *M. jannaschii* y 54 kDa para la proteína *M. maripaludis*. Ambas proteínas resultan lo suficientemente homogéneas para realizar los siguientes ensayos estructurales y funcionales propuestos en esta tesis.

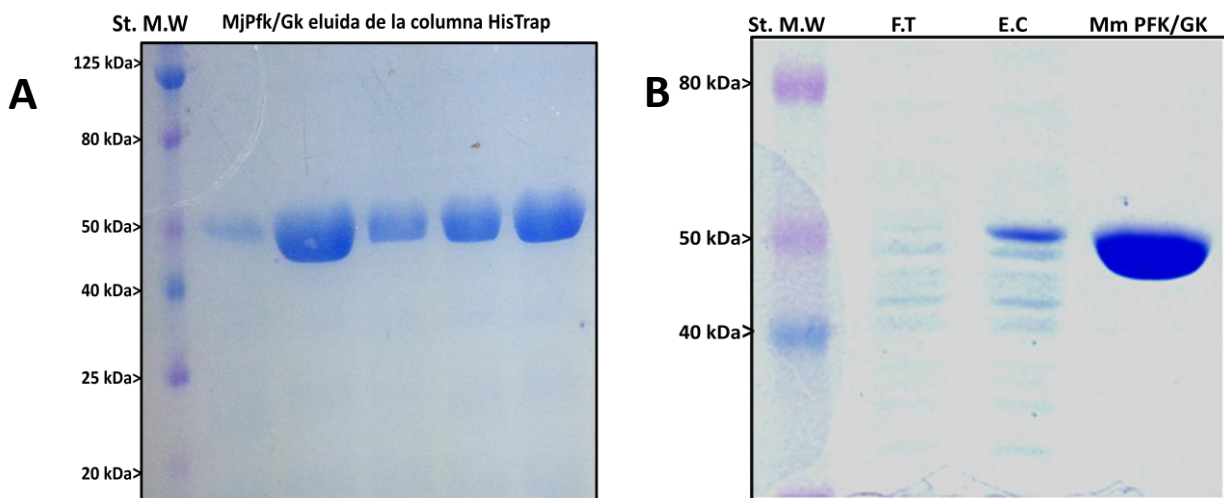


Figura 3.3. SDS-PAGE para las diferentes fracciones eluidas de la proteína *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK*. **A** gel en condiciones desnaturalante de la proteína *MjPfk/GK*, en el borde izquierdo se muestra el estándar de peso molecular de proteínas, en los siguientes carriles se presentas el resultado de la purificación de la proteína *MjPfk/GK* a través de cromatografía de afinidad por ion metálico. **B** gel en condiciones desnaturalante para la proteína *MmPfk/GK*, de izquierda a derecha se muestra estándar de peso molecular (St. M.W), fracción no retenida en la columna (F.T) fracción soluble del lisado (E.T) y finalmente se muestra la proteína eluida desde la columna HisTrap (*MmPfk/GK*).

V. II. Determinación de mecanismo cinético de *MjPfk/GK*.

La enzima bifuncional *MjPfk/GK* cataliza las reacciones de fosforilación de glucosa y F6P, involucrando la entrada de los sustratos glucosa o F6P y MgADP y la liberación de los productos glucosa-6-fosfato o fructosa-1,6-bisfosfato y MgAMP, lo que corresponde a un mecanismo Bi-Bi.

Para comprender el tipo de mecanismo que presenta esta enzima para ambas reacciones y los parámetros cinéticos para los sustratos que participan en la reacción catalizada por *MjPfk/GK*, se llevaron a cabo ensayos de velocidad inicial. Con dichos ensayos es posible discriminar entre los modelos de mecanismo cinético en secuencia, que se caracteriza por la formación del complejo ternario E-A-B antes de la liberación de los productos, de un mecanismo ping-pong que implica un cambio conformacional de la enzima provocado por el reconocimiento y unión del primer sustrato y liberación del primer producto previo a la entrada del segundo sustrato. Por otra parte, los ensayos de velocidad inicial tienen como objetivo determinar las constantes cinéticas para los sustratos glucosa, F6P y MgADP.

Los datos de velocidad inicial para el sustrato glucosa mostraron que la enzima tiene un comportamiento hiperbólico para todas las condiciones cinéticas exploradas, lo que permitió aplicar los protocolos habituales para la determinación de mecanismo cinético. El ajuste a un modelo hiperbólico propuesto por Michaelis-Menten, para el total de las curvas de saturación para el sustrato glucosa a las diferentes concentraciones de MgADP, muestra que la velocidad máxima incrementa proporcionalmente con la concentración del co-sustrato MgADP, sin observar cambios significativos en la afinidad cinética (**Figura 3.4A**). Para el caso del sustrato MgADP, se observó el mismo comportamiento que para glucosa, donde al aumentar la concentración del co-sustrato glucosa la velocidad máxima de la reacción incrementó, no así la K_M para MgADP la que se presenta sin mayores cambios (**Figura 3.4B**). Por otro lado, las gráficas de dobles recíprocos o Lineweaver-Burk ($1/V_0$ vs $1/[S]$) muestran que a concentraciones variables de sustrato MgADP, a diferentes concentraciones de co-sustrato glucosa, se genera un patrón de curvas intersectantes (**Figura 3.4D**) Lo mismo se encontró para el caso contrario donde se usó glucosa como sustrato variable (**Figura 3.4C**). Este comportamiento refleja un mecanismo de tipo secuencial para la reacción de fosforilación de glucosa catalizada por *MjPfk/GK*, indicando que la adición de sustrato es consecutiva y la generación de un complejo ternario previo a la liberación de los productos.

De esta manera, las curvas que se presentan en el análisis de dobles recíprocos deja fuera la opción de un mecanismo ping-pong, debido a que el patrón de curvas que entrega este tipo de análisis son necesariamente paralelas entre sí.

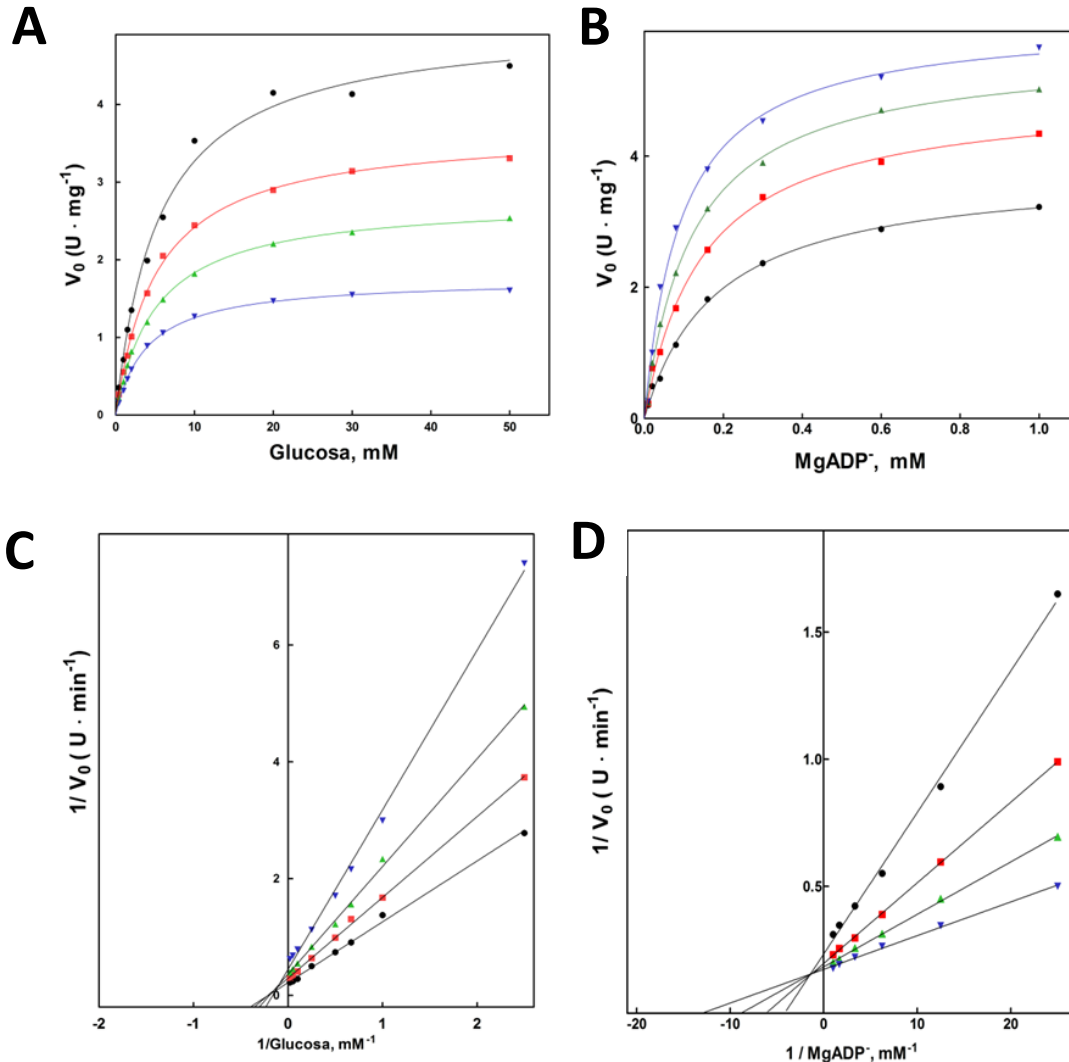


Figura 3.4. Estudios de velocidad inicial de los sustratos glucosa y MgADP en la actividad glucoquinasa catalizada por MjPfk/GK. A, curvas de saturación de glucosa como sustrato variable, a diferentes concentraciones de co- sustrato MgADP. Las diferentes concentraciones de ensayadas están representadas de la siguiente forma (●) 0,3mM MgADP, (■) 0,15 mM MgADP, (▲) 0,05 mM MgADP, (▼) 0,02 mM MgADP. **B** curvas de saturación de MgADP como sustrato variable, a diferentes concentraciones de co-sustrato glucosa las que están simbolizada de la siguiente manera: (●) 2mM glucosa, (■) 3 mM glucosa, (▲) 4mM glucosa, (▼) 6 mM glucosa. En **C** y **D** se muestran las gráficas de los dobles recíprocos para los ensayos de velocidad inicial de los sustratos glucosa y MgADP.

Los estudios de velocidad inicial para la reacción fosfofructoquinasas, catalizada por la enzima MjPfk/GK, mostraron que el sustrato fructosa 6-fosfato presenta un comportamiento hiperbólico ajustado al modelo de Michaelis-Menten, para todas las curvas a las diferentes concentraciones de MgADP ensayadas (**Figura 3.5 A**). Además, se observa que la velocidad máxima de la reacción incrementa con el aumento de la concentración del co-sustrato, en cambio la K_M no se ve alterada de forma significativa con el aumento de la concentración de MgADP.

Para el caso del sustrato MgADP es posible observar el mismo comportamiento que presenta el sustrato F6P, donde las curvas para las diferentes condiciones estudiadas presentan un comportamiento hiperbólico (**Figura 3.5 B**). Por otra parte la afinidad cinética no se ve afectada con el aumento de la concentración del co sustrato F6P, mientras que la V_{max} aumenta cuando la concentración de F6P.

Además, los ajustes de los datos de velocidad inicial de ambos sustratos, F6P y MgADP a las gráficas de los dobles recíprocos (**Figura 3.5 C y D**), muestran un patrón de líneas intersectantes lo que se relaciona con un mecanismo en secuencia, vale decir, que la entrada de los sustratos es consecutiva, lo que implica la formación del complejo ternario, para continuar con la salida sucesiva de los productos.

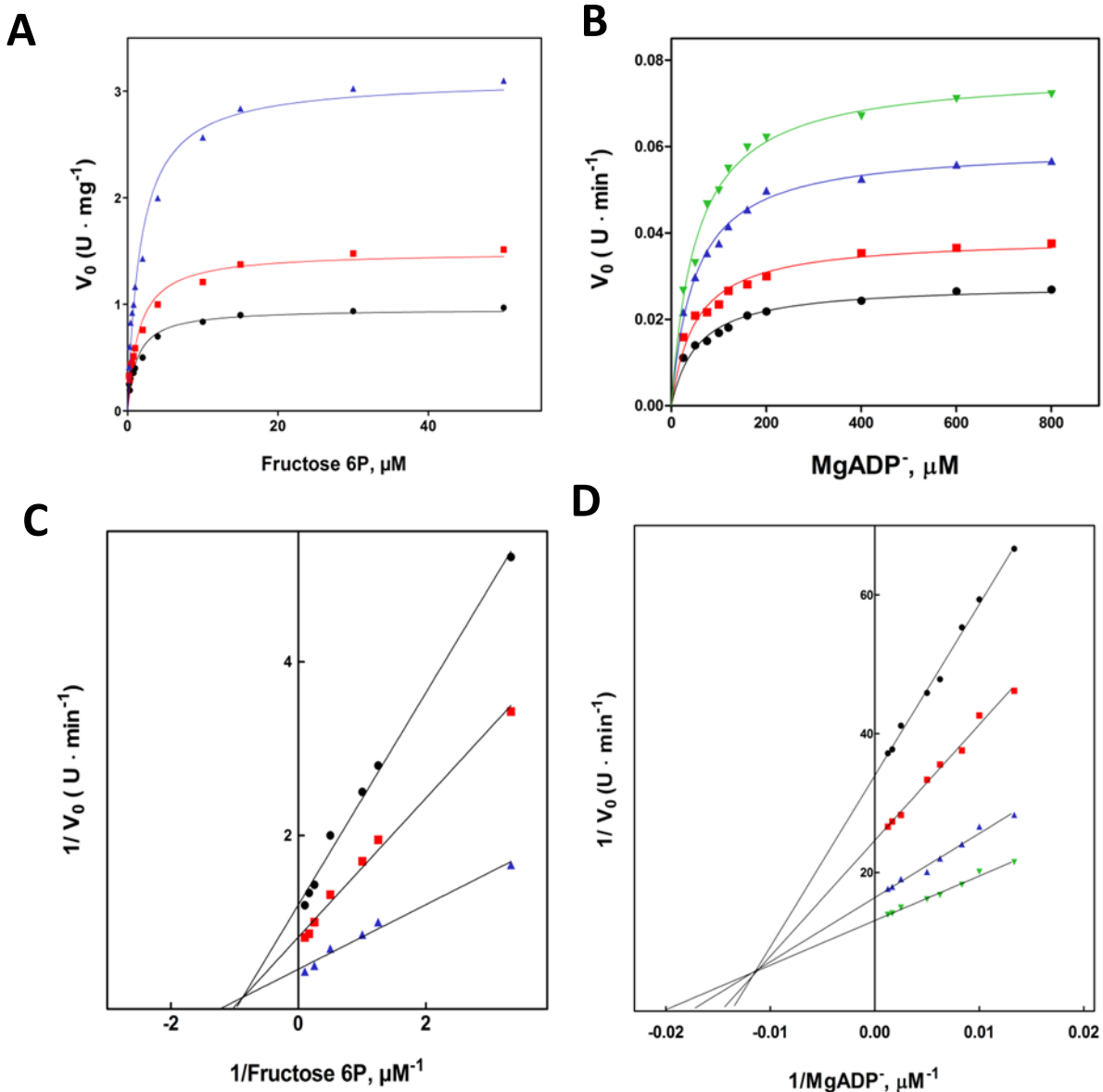


Figura 3.5 Estudios de velocidad inicial de los sustratos fructosa 6-fosfato y MgADP en la actividad fosfofructoquinasa. **A**, curvas de saturación de F6P como sustrato variable, a diferentes concentraciones de co-sustrato MgADP, Las diferentes concentraciones de ensayadas están representadas de la siguiente forma (●) 0,025Mm MgADP, (■) 0,2 5 mM MgADP, (▼) 0,5 mM MgADP. **B**, curvas de saturación de MgADP como sustrato variable, a diferentes concentraciones de co-sustrato F6P las que están simbolizada de la siguiente manera: (●) 0.005 mM F6P, (■) 0.1 mM F6P, (▼) 0.25 mM F6P, (▲) 0.5 mM F6P. En **C** y **D**, se muestran las gráficas de los dobles recíprocos para los ensayos de velocidad inicial de los sustratos glucosa y MgADP. Los ensayos de velocidad inicial fueron realizados a 50°C de temperatura.

Para determinar de manera más adecuada los parámetros cinéticos de los ensayos de velocidad inicial, se asumió un modelo donde los sustratos actúan de manera independiente. Considerando que el mecanismo cinético es en secuencia, los datos cinéticos se ajustaron a un modelo bi-sustrato para un mecanismo secuencial ordenado en estado estacionario representado en la **Ecuación 3.4**.

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_B + K_A \cdot B + K_B \cdot A + A \cdot B}$$

Ecuación 3.3

Donde V_{max} , corresponde a la velocidad máxima de la reacción, mientras que **A** y **B** corresponden a las concentraciones A y B, K_{ia} es la constante de disociación para el complejo Enzima A y K_A y K_B representan las constantes de Michaelis para los sustratos A y B.

Como se mencionó anteriormente, se construyeron gráficas de dobles recíprocos para determinar los parámetros cinéticos bajo el modelo de un mecanismo secuencial ordenado, donde la intersecciones de las curvas representan el recíproco de la velocidad máxima de la reacción. Con los valores de las intersecciones se construyeron gráficas secundarias que permite relacionar el cambio de la intersección (n) respecto al co sustrato. Desde estas nuevas gráficas fue posible calcular el valor de la velocidad de reacción junto con las constantes de Michaelis para los sustratos glucosa, fructosa 6-fosfato y MgADP para ambas actividades. Las **ecuaciones 3.4** y **3.5** se desprenden de las expresión recíproca de velocidad de los sustratos A y B y a la intersección.

$$n = \frac{1}{V} + \left(\frac{K_A}{V}\right) \cdot \frac{1}{A}$$

Ecuación 3.4

$$n = \frac{1}{V} + \left(\frac{K_B}{V}\right) \cdot \frac{1}{B}$$

Ecuación 3.5

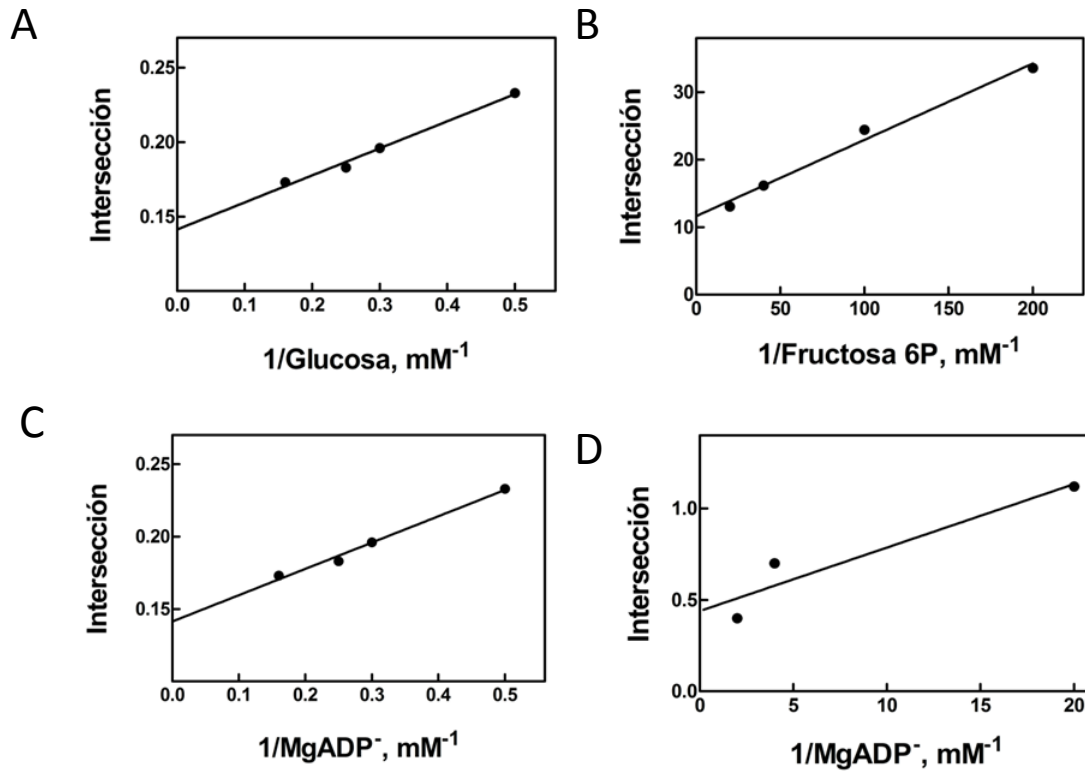


Figura 3.6. Gráficas secundarias construidas para la determinación de los parámetros cinéticos asumiendo un mecanismo cinético secuencial ordenado. **A** representa la relación entre la intersección y el co-sustrato glucosa, para los ensayos de saturación de MgADP. **B** muestra la relación entre la intersección y el co-sustrato fructosa 6-fosfato de los ensayos de saturación para MgADP. **C** y **D** se presentan las gráficas secundarias de la intersección respecto a MgADP como co-sustrato para los ensayos de saturación para glucosa y fructosa-6-fosfato, respectivamente.

En la **Tabla 3.1** se indican los valores para las diferentes constantes cinéticas, calculadas considerando al modelo cinético, para los sustratos glucosa, F6P y MgADP, junto con la velocidad máxima para las reacciones glucoquinasas y fosfofructoquinasa.

Tabla 3.1. Resumen de parámetros cinéticos para los sustratos glucosa, fructosa 6-fosfato y MgADP, para las reacciones catalizadas por la enzima MjPfk/GK.

Actividad glucoquinasa de MjPfk/GK				
	K_M (mM)	V_{max} (U*mg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
Glucosa	2.33	6.06	5.55	2.38×10^3
MgADP	0.02			2.77×10^5
Actividad fosfofructoquinasa de MjPfk/GK				
F6P	9×10^{-3}	5.47	5.014	5.55×10^6
MgADP	0.07			7.16×10^5

V. III. Especificidad por sustrato azúcar.

Para determinar el uso de azúcar por parte de la enzima *MjPfk/GK* se evaluó la actividad quinasa midiendo el consumo de ADP mediante ensayos discontinuos en presencia de diferentes azúcares como aceptores de grupo fosforilo, a una concentración de 10 mM (**Figura 3.7**). El control consistió en medir actividad en ausencia del azúcar.

De todos los azúcares probados sólo se observó una actividad significativa respecto al control cuando se utilizó glucosa y fructosa-6-fosfato. Mientras que con los otros azúcares la actividad no fue significativa respecto al test estadístico ANOVA, utilizado para determinar si existe diferencia significativa entre las mediciones de tres o más grupos independientes y el control.

Los resultados indican que la enzima *MjPfk/GK* no es promiscua respecto al uso de azúcar como aceptor de grupo fosforilo, lo que demuestra que esta enzima es específica para glucosa y F6P. A concentraciones de glucosa de 10 mM, la enzima presenta su mayor actividad comparada con la actividad utilizando la misma concentración de F6P obteniendo una actividad cercana al 30 % respecto a lo observado para glucosa.

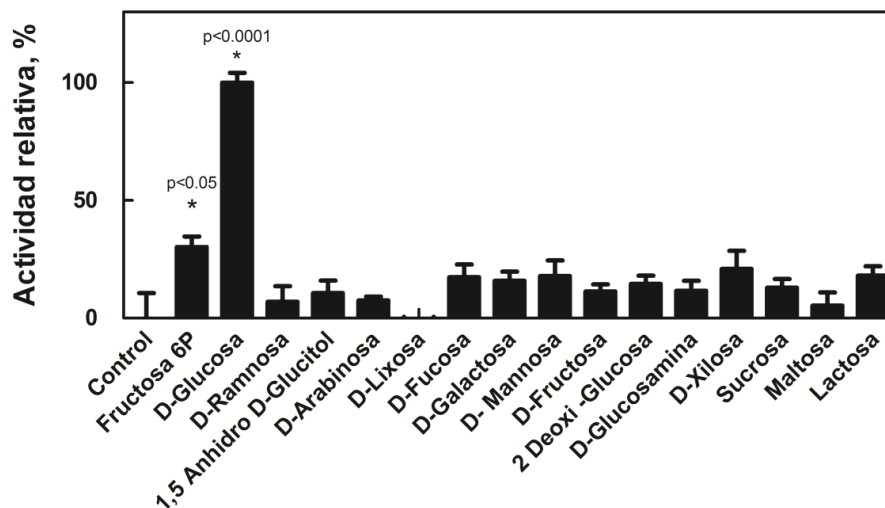


Figura 3.7. Determinación de la actividad quinasa dependiente de ADP utilizando diferentes azúcares como aceptor de fosforilo. La actividad es presentada como porcentaje de actividad respecto a glucosa. El control corresponde a la medición del consumo de ADP en ausencia del sustrato de azúcar. Para determinar la actividad significativa de utilizo el test estadístico ANOVA.

V. IV. Determinación de la actividad bifuncional y parámetros cinéticos aparentes (K_M y k_{cat}) de fosfofructoquinasa de *M. maripaludis* (*MmPfk/GK*)

Con el objetivo de evaluar la especificidad de la enzima respecto a glucosa y F6P se realizaron ensayos de velocidad inicial y se determinaron los parámetros cinéticos para ambos azúcares y el nucleótido ADP. Interesantemente, la enzima *MmPfk/GK* presentó actividad glucoquinasa además de la actividad fosfofructoquinasa, con lo que se demuestra la bifuncionalidad de la enzima *MmPfk/GK*, al igual que la enzima *MjPfk/GK*.

La actividad de *MmPfk/GK* para el sustrato fructosa-6-fosfato exhibió un comportamiento hiperbólico, en cambio la curva de saturación realizada en presencia de glucosa se ajustó de mejor manera al modelo de inhibición por sustrato a altas concentraciones de glucosa (**Figura 3.8**). Por otra parte, los valores de K_M indican que la afinidad de la enzima por F6P es mayor respecto a glucosa, no obstante, la afinidad de MgADP para ambas actividades no varía significativamente, con valores de K_M de 8 mM para la actividad PFK y 16 mM para la actividad GK. Los datos de los parámetros cinéticos obtenidos para ambas actividades enzimáticas se resumen en la **Tabla 3.2**.

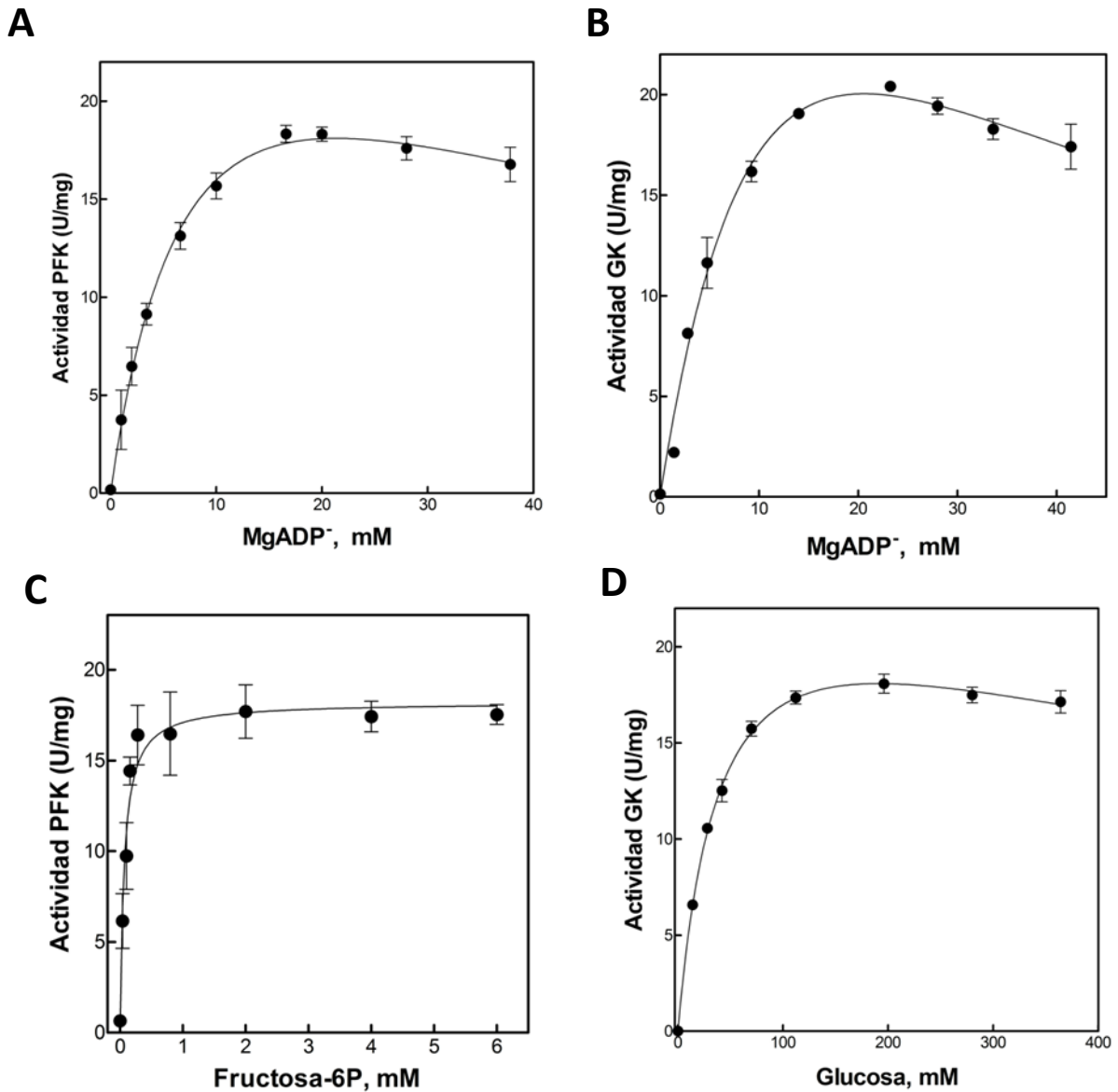


Figura 3.8. Curva de saturación para los sustratos glucosa F6P y MgADP para las actividades glucoquinasa (GK) y fosfofructoquinasa (PFK). En A y B se muestran las curvas de saturación para el complejo MgADP a concentración fija de fructosa 6-P correspondiente a 2 mM para la actividad PFK, mientras que la actividad GK la concentración de glucosa fue 200 mM. C. Curva de saturación de F6P a 20 mM MgADP. Para todos los ensayos se utilizó 5 mM de MgCl₂ libre. D curva de saturación para glucosa a 20 mM de MgADP como co-sustrato. Los ensayos cinéticos fueron llevados a cabo a 30°C de temperatura.

Tabla 3.2. Resumen de los parámetros cinéticos para los sustratos glucosa, F6P y MgADP de las reacciones catalizadas por MmPfk/GK.

Actividad glucoquinasa de MmPfk/GK			
	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
Glucosa	40	23	5.75x10 ²
MgADP	16	48	3.00x10 ³
Actividad fosfofructoquinasa de MmPfk/GK			
F6P	0.065	16.5	2.53x10 ⁵
MgADP	8	30	3.75x10 ³

Los valores de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de MmPfk/GK muestran que la enzima es más eficiente catalizando la reacción fosfofructoquinasa que la actividad glucoquinasa, demostrando que la velocidad con la que F6P es fosforilada es 440 veces mayor que para la reacción de fosforilación de glucosa. Por otra parte los valores de K_M para F6P están en el orden micromolar, en cambio, la K_M obtenida para glucosa se encuentra en el orden milimolar, lo que indica que la enzima es más específica para F6P que para glucosa. Por otra parte, los valores de K_M para MgADP no demuestran diferencias importantes para las actividades GK y PFK, observando que la K_M para la actividad glucoquinasas resulto ser el doble comparada con la obtenida para la actividad fosfofructoquinasa. Respecto a los valores de k_{cat} , tanto para el sustrato azúcar como para el complejo MgADP no varían significativamente entre ellas.

V. V. Estudios de regulación por Mg²⁺ y AMP en *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK*.

Se ha reportado que ciertos metales divalentes ejercen un papel regulador sobre la actividad de miembros de la superfamilia riboquinasa. Con el propósito de comprender el papel del catión metálico sobre la actividad glucoquinasa en las proteínas *MjPfk /GK* y *MmPfk/GK* se determinó el efecto a distintas concentraciones de Mg²⁺ libre sobre los parámetros cinéticos para la actividad glucoquinasa variante y el co-sustrato MgADP a concentraciones saturantes de glucosa. Al realizar los ensayos de velocidad inicial a concentraciones de metal libre de 1 mM se observó en ambas enzimas del orden *Methanococcales*, que el valor de K_M para MgADP disminuye con respecto a las K_M obtenidas a 5 mM de Mg²⁺ libre (**Tabla 3.3**). Por otra parte, en la enzima *MjPfk/GK* la k_{cat} aumenta casi al doble con la disminución de la concentración de Mg²⁺ libre. En cambio la k_{cat} para la actividad glucoquinasa *MmPfk/GK* no sufre cambios significativos a las diferentes concentraciones de Mg²⁺ libre.

Tabla 3.3. Efecto del catión divalente Mg²⁺ sobre la actividad glucoquinasa para las enzimas bifuncionales *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK*.

<i>MjPfk/GK</i>	5mM MgCl ₂	1mM MgCl ₂
k _{cat} (s ⁻¹)	8,78	18,87
K _M ^{MgADP} (mM)	3.58	0.48

<i>MmPfk/GK</i>	5mM MgCl ₂	1mM MgCl ₂
k _{cat} (s ⁻¹)	48	45
K _M ^{MgADP} (mM)	16	0.3

Por otra parte, se evaluó el efecto del producto nucleotídico AMP sobre la reacción glucoquinasa. Para este objetivo se determinó la actividad GK, bajo condiciones saturantes de los sustratos MgADP y glucosa y a concentraciones crecientes de AMP para ambas enzimas *Methanococcales*, *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK*. En ambos casos se observó que a concentraciones bajo 1 mM del nucleótido AMP, éste se comporta como un activador de la actividad GK, presentando un máximo en la actividad a 0.5 mM de AMP para ambas enzimas; no obstante, a concentraciones superiores a 5 mM el comportamiento del nucleótido AMP es de inhibidor (**Figura 3.9**)

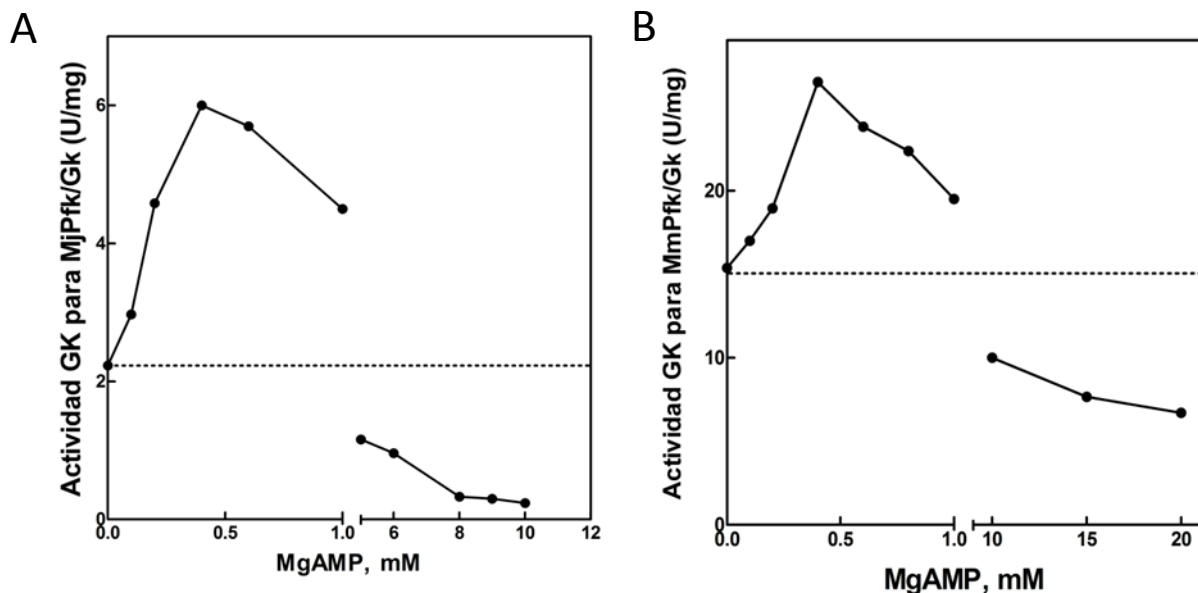


Figura 3.9. Efecto de AMP sobre la actividad glucoquinasa (GK) en enzimas bifuncionales del orden *Methanococcal*. **A** muestra gráfica para la actividad GK para la enzima termófila *MjPfk/GK* a diferentes concentraciones AMP. **B** Gráfica de la determinación de actividad GK de la enzima *MmPfk/GK* A diferentes concentraciones de AMP.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

En el orden de los organismos *Methanococcales*, específicamente en la Archaea hipertermófila *M. jannaschii*, se ha caracterizado una enzima quinasa dependiente de ADP capaz de usar glucosa y F6P como aceptor de grupo fosforilo (*MjPfk/GK*). De acuerdo a la información disponible en la *Enciclopedia Kioto de Genes y Genoma*, el genoma de este organismo es el único que presenta un único gen homólogo lo que llevó a proponer que esta enzima podría actuar simultáneamente como fosfofructoquinasa y como glucoquinasa bifuncional⁴². La existencia de una quinasa bifuncional contrasta con lo observado en otros genomas secuenciados de organismos del orden *Thermococcales* que presentan dos copias de estos genes, cada uno de los cuales posee una de las dos actividades, glucoquinasa y fosfofructoquinasa, de forma separada.

Para determinar si la fosforilación de glucosa y F6P es una característica exclusiva de la enzima *MjPfk/GK* o es un rasgo común del orden *Methanococcal*, se expresaron y purificaron a homogeneidad las proteínas quinasa dependiente de ADP de *M. maripaludis* y de *M. jannaschii* (**Figura 3.3 A y B**), las que corresponden a monómeros de 54 kDa y 55 kDa, respectivamente.

Con el objetivo de determinar el mecanismo de la enzima bifuncional *MjPfk/GK*, se realizaron ensayos de velocidad inicial para ambas actividades, glucoquinasa y fosfofructoquinasa, además de determinar los parámetros cinéticos de ésta. Los análisis de las gráficas de dobles recíprocos de los ensayos de velocidad inicial, para todos los sustratos que participan en ambas reacciones, indican que el mecanismo cinético para ambas reacciones, tanto GK como PFK, corresponde a un mecanismo secuencial, caracterizado por el patrón de rectas que se intersectan y que indica la formación del complejo ternario, que es una característica del mecanismo secuencial. Este mismo mecanismo cinético ha sido descrito para otros representantes de la familia de quinasas dependientes de ADP como por ejemplo *T. litoralis*³⁴. Lo mismo ha sido descrito para las quinasas dependientes de ATP, un ejemplo de esto es lo que se ha reportado para la enzima fosfofructoquinasa-2 de *E. coli*²⁰ y para la adenosina quinasa humana¹⁸. Si bien en este trabajo se ha determinado el mecanismo de la enzima bifuncional de *M. jannaschii* se debe continuar con trabajos futuros

que permitan determinar el orden de entrada de los sustratos en el sitio de unión de la enzima.

Los parámetros cinéticos obtenidos desde las gráficas lineales secundarias indican que la enzima presenta mayor afinidad por el sustrato fructosa comparado con glucosa. Por otra parte, la velocidad máxima obtenida para ambas reacciones no presenta variaciones significativas, sin embargo, las eficiencias catalíticas para la reacción fosfofructoquinasa son mayores que para la reacción glucoquinasa, señalando que cuando estos dos sustratos se encuentran en un mezcla equimolar la velocidad con que se fosforila F6P es 428 veces mayor que para la fosforilación para glucosa. Esta diferencia en el parámetro K_M/k_{cat} se debe a la diferencia que existe entre los valores de K_M para ambos sustratos. Este comportamiento relacionado con la bifuncionalidad de la enzima *MjPfk/GK*, se corrobora al determinar la actividad glucoquinasa con 16 azúcares distintos, donde sólo se observó actividad en presencia del azúcar glucosa y fructosa 6 fosfato (**Figura 3.7**).

Por otra parte, se determinó que la enzima *MmPfk/GK* tiene la capacidad de fosforilar F6P como también glucosa, con lo que se constata el rasgo bifuncional de las enzimas quinasas dependientes de ADP de *M. maripaludis*. Esta evidencia nos da indicio que la bifuncionalidad es un rasgo común a los demás representantes del grupo de quinasas *Methanococcales* por lo que es necesario caracterizar más miembros de dicho grupo.

Los parámetros cinéticos indican que la enzima *MmPfk/GK*, es más eficiente para catalizar reacción de fosforilación de F6P que para glucosa, de la misma manera que sucede con la enzima *MjPfk/GK* aunque en este caso es aún más específica para F6P, aun cuando presenta la capacidad de unir glucosa y realizar su fosforilación.

En este trabajo también se evaluó el efecto de distintas concentraciones del metal divalente Mg^{2+} libre, sobre la actividad de las enzimas *Methanococcales*. Así, como se ha descrito anteriormente, el metal tiene un papel regulador sobre la actividad de enzimas pertenecientes a la familia de quinasas de azúcar dependientes de ADP^{43} , lo que es corroborado con los resultados obtenidos de las determinaciones cinéticas a bajas concentraciones del Mg^{2+} , que indican que la afinidad, de ambas enzimas, por el sustrato $MgADP$ aumenta, en cambio el aumento de la concentración de Mg^{2+} libre a 5 mM provoca un aumento en la K_M lo que implica una disminución en la afinidad. Por otra parte, la velocidad máxima de la reacción glucoquinasa en la enzima de *MjPfk/GK*, a concentraciones

saturantes de glucosa y utilizando MgADP como sustrato variable, presenta una disminución cuando la concentración de Mg^{2+} libre es 5mM. En cambio, la enzima *MmPfk/ GK* no presentó cambios en la velocidad máxima de reacción. Este efecto observado en la enzima *MjPfk/GK* concuerda con lo reportado en el trabajo de Merino y colaboradores⁴³, donde se describió que, la actividad de enzimas fosfofructoquinasa y glucoquinasa dependientes de ADP decrece con el aumento de la concentración de metales divalente libre (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}). En el caso de la fosfofructoquinasa de *P. horikoshii*, el incremento de la concentración de Mg^{2+} libre produce una disminución en la actividad, alcanzando solo el 85 % de la actividad medida a bajas concentraciones de Mg^{2+} (60 μ M). Para el caso de las glucoquinasas de *T. litoralis* y *P. furiosus*, se mostró que a concentraciones superiores a 80 μ M del metal divalente Mn^{2+} la actividad disminuye cercano al 50% respecto a la actividad medida a bajas concentraciones del metal libre. En este mismo trabajo, proponen un mecanismo general de regulación para la enzimas de las familia de quinasa dependientes de ADP, donde el metal regulador se une al estado de transición de la reacción, modulando directamente la diferencia de energía entre el estado basal y el estado de transición, lo que hace que este ion metálico divalente actúe como activador o inhibidor.

Otra evidencia obtenida de este estudio relacionada con la regulación de la actividad de las enzimas *Methanococcales*, fue el efecto activador del producto AMP, donde se observó que a bajas concentraciones de AMP (> 1mM) la actividad glucoquinasa aumenta casi 4 veces, respecto a la actividad determinada en ausencia de AMP. Lo que puede ser explicado como un mecanismo regulador de la actividad enzimática a través de un efecto de activación por producto, tal como fue señalado en el trabajo con la enzima L-Treonina Dehidratasa y también descrito para la hidrólisis trípica de TAME⁸⁷⁻⁸⁹.

Por otra parte, el efecto activador de AMP podría ser explicado como un mecanismo de regulación de la actividad enzimática de tipo alostérico. Este mismo comportamiento activador de AMP ha sido descrito en la enzima fosfructoquinasa de músculo de conejo⁹⁰. Además el autor examinó la unión de los nucleótidos, mostrando que la enzima presenta 2 sitios de unión a nucleótidos, uno que corresponde a un sitio de inhibición y otro a un sitio activador además del sitio de unión de ATP en el sitio activo. Otro ejemplo que indica que AMP actúa como efector positivo es el descrito para fosfofructoquinasa de hígado de rata⁹¹ donde se señala que el AMP aumenta la afinidad de la enzima por fructosa 6-fosfato sin afectar significativamente la V_{max} de la reacción. Por otra parte, se demostró que el AMP se

comporta como un activador de las isoformas de musculo e hígado de la enzima fosfofructoquinasa humana⁹².

Con el objetivo de obtener más información sobre la presencia de sitios de regulación alostérica en las enzimas *Methanococcales*, los modelos de las enzimas bifuncionales de *M. jannaschii* y de *M. maripaludis* fueron sometidas a un análisis predictivo de posibles sitios alostéricos utilizando el servidor web denominado PARS (Protein Allosteric and Regulation Site)⁹³ <http://bioinf.uab.cat/cgi-bin/pars-cgi/pars.pl>. Los resultados obtenidos para el caso de *MjPfk/GK* indican que existe un posible sitio de unión a un ligando, próximo al sitio de unión de MgADP, el cual está conformado por los residuos Lys79 y Pro80 que se localizan en el dominio menor de la enzima, además de los residuos Asp299 y Thr301 que se ubican en el dominio mayor, estos residuos se encuentran a una distancia de 4 Å respecto a la molécula de AMP. En el caso de *MmPfk/GK* el sector donde se ubicaría el sitio de unión de AMP es bastante similar al predicho para la enzima de *M. jannaschii*, ya que también este sitio se encuentra cercano al sitio de unión de MgADP, sin embargo, los residuos que conformarían este sitio de unión, localizados a 4 Å de distancia respecto al AMP, difieren respecto a *MjPfk/GK*. Tales residuos corresponden a His70, ubicado en el dominio menor de la proteína, mientras que los residuos Thr299, Asn303 y Leu 318 se encuentran en el dominio mayor. Cabe destacar que el residuo Thr299 de *MmPfk/GK* también se observa en el sitio de unión a AMP predicho para *MjPfk/GK*, lo que indica que este sitio podría ser común en las enzimas bifuncionales de la familia *Methanococcales* (**Figura 3. 10**)

Este resultado puede relacionar a la molécula de AMP como un metabolito clave que promueva la vía glicolítica actuando como un sensor de la disponibilidad de energía celular aportada por ADP o ATP. De acuerdo con este modelo, una disminución en la concentración de ADP que conlleva un aumento en la concentración de AMP provocaría una activación en la fosforilación de glucosa favoreciendo la generación de ATP o ADP por dicha vía.

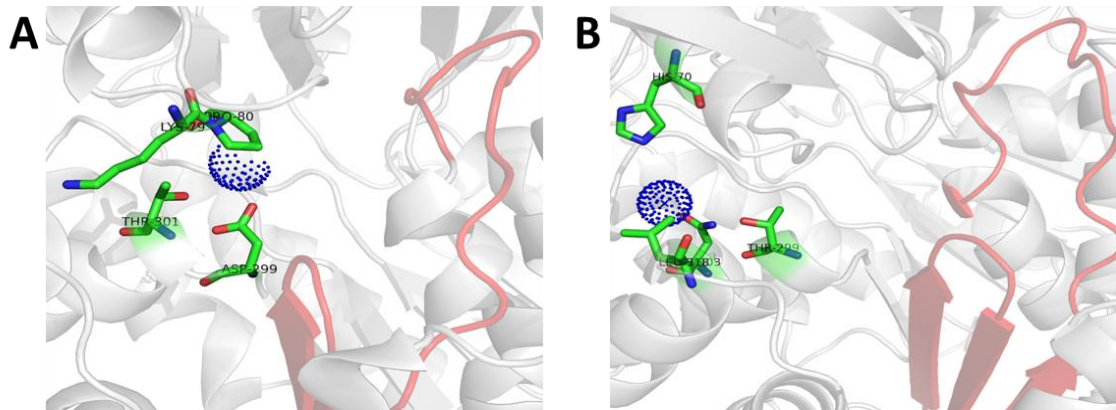


Figura 3.10. Representación del sitio de unión de AMP en *M. jannaschii* y *M. maripaludis* generados por el programa PARS a partir de modelos por homología. A, se muestran los posibles residuos que conforman el sitio de unión de AMP en *M. jannaschii* (Lys 70, Pro 80, Asp299 y Thr301) próximo al sitio de unión de ADP. B corresponde al sitio de unión del AMP en *M. maripaludis* conformado por His70, Thr301, Asn303 y Leu318. Los residuos se representan en varillas, donde los carbonos se muestran en verde, oxígeno en rojo y nitrógeno en azul, en rojo se señala los elementos secundarios que conforman el sitio de unión de ADP y en puntos de color azul se representa la molécula de AMP.

Los resultados de este estudio que consistió en caracterizar las propiedades cinéticas y de regulación de la actividad de las enzimas dependientes de ADP *M. jannaschii* y *M. maripaludis*, indican que las enzimas *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK* son bifuncionales capaces de catalizar dos etapas de la vía glicolítica, con actividad PFK sobre F6P y ADP así como GK sobre Glc y ADP; este rasgo podría ser compartido por las demás enzimas pertenecientes al orden *Methanococcales* con actividad dependiente de ADP; Por otra parte, se ha determinado que estas enzimas PFK/GK tiene mayor actividad con F6P que con glucosa, lo que sugiere que su función principal es promover el funcionamiento de la vía glicolítica; y finalmente hemos demostrado que la actividad glucoquinasa de estas enzimas bifuncionales PFK/GK está regulada por la concentración del metal libre Mg^{2+} y por el producto AMP, el cual a bajas concentraciones, actúa como activador, posiblemente mediante un mecanismo alostérico, que conlleva el aumento de la afinidad de la enzima por Glc.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES.

En esta tesis doctoral se han analizado varias enzimas con actividad glucoquinasa y fosfofructoquinasa dependientes de ADP procedentes de Archaeas, a nivel estructural, mediante cristalografía de rayos-X, y de caracterización enzimática. Concretamente, se han estudiado las enzimas glucoquinasa de *T. litoralis* (*TIGK*), una versión permutante de *TIGK* (*perGK*), y las enzimas bifuncionales fosfofructoquinasa/glucoquinasa de *M. jannaschii* (*MjPfk/GK*) y de *M. maripaludis* (*MmPfk/GK*), donde se logró:

- La caracterización del mecanismo de reacción de *TIGK* como un mecanismo ordenado en secuencias donde el primer sustrato en que ingresa a la enzima es MgADP, seguido por la unión de D-glucosa.
- Establecer las bases estructurales involucradas en la catálisis de la enzima *TIGK* mediante cristalografía de rayos-X.
- Por otra parte, fue posible determinar los cambios conformacionales que suceden en la enzima *TIGK*, mediante cristalografía de rayos-X, donde se observa una estructura abierta en ausencia de ligando (apo) y una estructura cerrada en presencia de los dos sustratos (*TIGK*·MgADP·Glc). La diferencia entre la estructura abierta y cerrada implica cambios en la distancia y orientación relativa de los dominios menor y mayor de *TIGK*.
- Mediante la generación de una versión permutante de la *TIGK* y su posterior caracterización cinética, se estableció que la topología de la región de β -meandro no es la que determina la especificidad en el uso de nucleótido (ADP versus ATP), pero sí tiene relación con el orden de la unión de los ligandos en la enzima *TIGK*.
- Se determinó que el mecanismo de la enzima *perGK* es un mecanismo secuencial ordenado, donde la catálisis se inicia con la unión de D-glucosa seguida por la unión a MgADP y continuando con la liberación de los productos MgAMP y Glucosa 6-fosfato, respectivamente. Este orden de entrada de los sustratos y liberación de los productos es opuesto al de *TIGK*.
- Los cambios conformacionales de *perGK* se elucidaron mediante cristalografía de rayos-X, demostrándose que la enzima *perGK* experimenta cambios de conformación luego de la unión del primer sustrato (D-glucosa) consistente con el acercamiento de

los dominios menor y mayor, respecto a la estructura de la proteína perGK en ausencia de ligandos (apo).

- Se determinó que la enzima bifuncional *MjPfk/GK* sigue una cinética secuencial, para las dos reacciones que cataliza, glucoquinasa y fosfofructoquinasa dependiente de ADP, y que utiliza exclusivamente los dos sustratos canónicos D-glucosa y fructosa 6-fosfato, respectivamente.
- En un estudio paralelo al de *MjPfk/GK*, se descubrió que la enzima *MmPfk/GK*, es capaz de catalizar la reacción glucoquinasa, Por tanto concluimos que la bifuncionalidad de PFK/GK dependientes de ADP podría ser un rasgo común a las demás enzimas homologas presentes en otros miembros del orden *Methanococcal*.
- Empleando *MjPfk/GK* y *MmPfk/GK* se expuso que la concentración libre Mg^{2+} libre y del producto de la reacción AMP afectan la actividad glucoquinasa de dichas enzimas, lo cual permite postular a estos metabolitos como moléculas claves en la regulación de la actividad de las enzimas bifuncionales.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(11):5088-5090. doi:10.1073/pnas.74.11.5088.
2. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(12):4576-4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576.
3. Allers T, Mevarech M. Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet*. 2005;6(1):58-73. doi:10.1038/nrg1504.
4. Bräsen C, Esser D, Rauch B, Siebers B. Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(1):89-175. doi:10.1128/MMBR.00041-13.
5. Brochier-Armanet C, Forterre P, Gribaldo S. Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(3):274-281. doi:10.1016/j.mib.2011.04.015.
6. Friend T, ed. *The Third Domain*. The National Academies Press; 2007. <http://www.nap.edu/catalog/11737/the-third-domain>.
7. Albers S-V, Meyer BH. The archaeal cell envelope. *Nat Rev Micro*. 2011;9(6):414-426. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2576>.
8. Barry ER, Bell SD. DNA replication in the archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(4):876-887. doi:10.1128/MMBR.00029-06.
9. Werner F, Grohmann D. Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(2):85-98. doi:10.1038/nrmicro2507.
10. Margulis L. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(3):1071-1076. doi:10.1073/pnas.93.3.1071.
11. Kengen SWM, Stams a. JM, De Vos WM. Sugar metabolism of hyperthermophiles. *FEMS Microbiol Rev*. 1996;18(2-3):119-137. doi:10.1016/0168-6445(96)00006-X.
12. Siebers B, Schönheit P. Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(6):695-705. doi:10.1016/j.mib.2005.10.014.
13. Sapro R, Bagramyan K, Adams MWW. A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7545-7550. doi:10.1073/pnas.1331436100.

14. Verhees CH, Kengen SWM, Tuininga JE, et al. The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J.* 2003;375(Pt 2):231-246. doi:10.1042/BJ20021472.
15. Park J, Gupta RS. Adenosine kinase and ribokinase – the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(18):2875-2896. doi:10.1007/s00018-008-8123-1.
16. Bork P, Sander, Chris and AV. Convergent evolution of similar enzymatic function on different fold: The hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.* 1993;2:31-40.
17. Sigrell J a, Cameron a D, Mowbray SL. Induced fit on sugar binding activates ribokinase. *J Mol Biol.* 1999;290(5):1009-1018. doi:10.1006/jmbi.1999.2938.
18. Mathews II, Erion MD, Ealick SE. Structure of Human Adenosine Kinase at 1.5 Å Resolution. *Biochemistry.* 1998;37(45):15607-15620. doi:10.1021/bi9815445.
19. Ohshima N, Inagaki E, Yasuike K, Takio K, Tahirov TH. Structure of Thermus thermophilus 2-Keto-3-deoxygluconate kinase: evidence for recognition of an open chain substrate. *J Mol Biol.* 2004;340(3):477-489. doi:10.1016/j.jmb.2004.04.074.
20. Campobasso N, Mathews II, Begley TP, Ealick SE. Crystal Structure of 4-Methyl-5-β-hydroxyethylthiazole Kinase from Bacillus subtilis at 1.5 Å Resolution†,‡. *Biochemistry.* 2000;39(27):7868-7877. doi:10.1021/bi0000061.
21. Ito S, Fushinobu S, Yoshioka I, Koga S, Matsuzawa H, Wakagi T. Structural basis for the ADP-specificity of a novel glucokinase from a hyperthermophilic archaeon. *Structure.* 2001;9(3):205-214. doi:10.1016/S0969-2126(01)00577-9.
22. Merino F, Guixé V. Specificity evolution of the ADP-dependent sugar kinase family - in silico studies of the glucokinase/phosphofructokinase bifunctional enzyme from Methanocaldococcus jannaschii. *FEBS J.* 2008;275(16):4033-4044. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06544.x.
23. Cabrera R, Babul J, Guixé V. Ribokinase family evolution and the role of conserved residues at the active site of the PfkB subfamily representative, Pfk-2 from Escherichia coli. *Arch Biochem Biophys.* 2010;502(1):23-30. doi:10.1016/j.abb.2010.06.024.
24. Merino F, Guixé V. On the Specialization History of the ADP-Dependent Sugar Kinase Family. *Gene Duplic.* 2011:237-256. www.intechopen.com.
25. Zhang Y, Dougherty M, Downs DM, Ealick SE. Crystal structure of an aminoimidazole riboside kinase from Salmonella enterica: Implications for the evolution of the ribokinase superfamily. *Structure.* 2004;12(10):1809-1821. doi:10.1016/j.str.2004.07.020.
26. Sakuraba H, Ohshima T. Novel energy metabolism in anaerobic hyperthermophilic archaea: a modified Embden-Meyerhof pathway. *J Biosci Bioeng.* 2002;93(5):441-448. doi:10.1016/S1389-1723(02)80090-1.

27. Tsuge H, Sakuraba H, Kobe T, Kujime A, Katunuma N, Ohshima T. Crystal structure of the ADP-dependent glucokinase from *Pyrococcus horikoshii* at 2.0-Å resolution : A large conformational change in ADP-dependent glucokinase. *Protein Sci.* 2002;(1):2456-2463. doi:10.1110/ps.0215602.A.
28. Currie M a., Merino F, Skarina T, et al. ADP-dependent 6-phosphofructokinase from *pyrococcus horikoshii* OT3. Structure determination and biochemical characterization of PH1645. *J Biol Chem.* 2009;284(34):22664-22671. doi:10.1074/jbc.M109.012401.
29. Ronimus RS, Koning J, Morgan HW. Purification and characterization of an ADP-dependent phosphofructokinase from *Thermococcus zilligii*. *Extremophiles.* 1999;3(2):121-129. doi:10.1007/s007920050107.
30. Richter S, Richter JP, Mehta SY, et al. Expression and role in glycolysis of human ADP-dependent glucokinase. *Mol Cell Biochem.* 2012;364(1-2):131-145. doi:10.1007/s11010-011-1212-8.
31. Kamiński MM, Sauer SW, Kamiński M, et al. T cell Activation Is Driven by an ADP-Dependent Glucokinase Linking Enhanced Glycolysis with Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation. *Cell Rep.* 2012;2(5):1300-1315. doi:10.1016/j.celrep.2012.10.009.
32. Verhees CH, Tuininga JE, Kengen SWM, Stams a. JM, Van Der Oost J, De Vos WM. ADP-dependent phosphofructokinases in mesophilic and thermophilic methanogenic archaea. *J Bacteriol.* 2001;183(24):7145-7153. doi:10.1128/JB.183.24.7145-7153.2001.
33. Castro-Fernandez V, Bravo-Moraga F, Herrera-Morande A, Guixé V. Bifunctional ADP-dependent phosphofructokinase/glucokinase activity in the order Methanococcales - Biochemical characterization of the mesophilic enzyme from *Methanococcus maripaludis*. *FEBS J.* 2014;281(8):2017-2029. doi:10.1111/febs.12757.
34. Rivas-Pardo JA, Herrera-Morande A, Castro-Fernandez V, Fernandez FJ, Vega MC, Guixé V. Crystal Structure, SAXS and Kinetic Mechanism of Hyperthermophilic ADP-Dependent Glucokinase from *Thermococcus litoralis* Reveal a Conserved Mechanism for Catalysis. *PLoS One.* 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0066687.
35. Koga S, Yoshioka I, Sakuraba H, et al. Biochemical Characterization, Cloning, and Sequencing of ADP-Dependent (AMP-Forming) Glucokinase from Two Hyperthermophilic Archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *J Biochem.* 2000;128 (6):1079-1085. <http://jb.oxfordjournals.org/content/128/6/1079.abstract>.
36. Jeong J-J, Fushinobu S, Ito S, Shoun H, Wakagi T. Archaeal ADP-dependent phosphofructokinase: expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. *Acta Crystallogr Sect D.* 2003;59(7):1327-1329. doi:10.1107/S0907444903010631.

37. Tuininga JE, Verhees CH, van der Oost J, Kengen SWM, Stams AJM, de Vos WM. Molecular and Biochemical Characterization of the ADP-dependent Phosphofructokinase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*. 1999;274(30):21023-21028. doi:10.1074/jbc.274.30.21023.
38. Schumacher M a, Scott DM, Mathews II, et al. Crystal Structures of *Toxoplasma gondii* Adenosine Kinase Reveal a Novel Catalytic Mechanism and Prodrug Binding. 2000. doi:10.1006/jmbi.1999.3753.
39. Campos G, Q VG, Babul J. Kinetic Mechanism of Phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. 1984;259(10):6147-6152.
40. Cabrera R, Fischer H, Trapani S, et al. Domain motions and quaternary packing of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli* studied by small angle x-ray scattering and homology modeling. *J Biol Chem*. 2003;278(15):12913-12919. doi:10.1074/jbc.M212137200.
41. Ito S, Fushinobu S, Jeong JJ, et al. Crystal structure of an ADP-dependent glucokinase from *Pyrococcus furiosus*: Implications for a sugar-induced conformational change in ADP-dependent kinase. *J Mol Biol*. 2003;331(4):871-883. doi:10.1016/S0022-2836(03)00792-7.
42. Sakuraba H, Yoshioka I, Koga S, et al. ADP-dependent glucokinase/phosphofructokinase, a novel bifunctional enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem*. 2002;277(15):12495-12498. doi:10.1074/jbc.C200059200.
43. Merino F, Rivas-Pardo JA, Caniguir A, García I, Guixé V. Catalytic and regulatory roles of divalent metal cations on the phosphoryl-transfer mechanism of ADP-dependent sugar kinases from hyperthermophilic archaea. *Biochimie*. 2012;94(2):516-524. doi:10.1016/j.biochi.2011.08.021.
44. Laemmli UK, Mölbert E, Showe M KE. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol*. 1969;49(1):99-113.
45. Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. Elsevier; 1974. doi:10.1016/B978-0-12-091302-2.50048-7.
46. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
47. Rupp B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. Garland Science; 2009.
48. Pflugrath JW. Macromolecular cryocrystallography - Methods for cooling and mounting protein crystals at cryogenic temperatures. *Methods*. 2004;34(3):415-423. doi:10.1016/j.ymeth.2004.03.032.

49. Kabsch W. Xds. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2010;66(2):125-132. doi:10.1107/S0907444909047337.
50. Evans PR. An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2011;67(4):282-292. doi:10.1107/S090744491003982X.
51. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2011;67(4):235-242. doi:10.1107/S0907444910045749.
52. Scapin G. Molecular replacement then and now. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2013;69(11):2266-2275. doi:10.1107/S0907444913011426.
53. Rossmann MG, Blow DM. The refinement of structures partially determined by the isomorphous replacement method. *Acta Crystallogr*. 1961;14(6):641-647. doi:10.1107/S0365110X61001960.
54. Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*. 1963;7(1):95-99. doi:10.1016/S0022-2836(63)80023-6.
55. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*. 2007;40(4):658-674. doi:10.1107/S0021889807021206.
56. Emsley P, Cowtan K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2004;60(12 Pt 1):2126-2132. doi:10.1107/S0907444904019158.
57. Murshudov GN, Skubák P, Lebedev A a., et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2011;67(4):355-367. doi:10.1107/S0907444911001314.
58. Boehr DD, Nussinov R, Wright PE. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol*. 2009;5(11):789-796. doi:10.1038/nchembio.232.The.
59. Williams Humphry, Andrew Dalke and KS. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal Mol Graph*. 1996;14:33-38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5.
60. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger : Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega, S.L.; 2009. <https://books.google.com.uy/books?id=7kuXQwAACAAJ>.
61. Minoux H, Chipot C. Cation- π Interactions in Proteins: Can Simple Models Provide an Accurate Description? *J Am Chem Soc*. 1999;121(44):10366-10372. doi:10.1021/ja990914p.

62. Gromiha MM, Thomas S, Santhosh C. ROLE OF CATION- π INTERACTIONS TO THE STABILITY OF THERMOPHILIC PROTEINS. *Prep Biochem Biotechnol.* 2002;32(4):355-362. doi:10.1081/PB-120015459.
63. Pecsí I, Leveles I, Harmat V, Vertessy BG, Toth J. Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(20):7179-7186. doi:10.1093/nar/gkq584.
64. Mao L, Wang Y, Liu Y, Hu X. Molecular determinants for ATP-binding in proteins: a data mining and quantum chemical analysis. *J Mol Biol.* 2004;336(3):787-807. doi:10.1016/j.jmb.2003.12.056.
65. Dougherty D a. The cation- π interaction. *Acc Chem Res.* 2013;46(4):885-893. doi:10.1021/ar300265y.
66. Mahadevi AS, Sastry GN. Cation- π Interaction: Its Role and Relevance in Chemistry, Biology, and Material Science. *Chem Rev.* 2013;113(3):2100-2138. doi:10.1021/cr300222d.
67. Vondrášek J, Mason PE, Heyda J, Collins KD, Jungwirth P. The Molecular Origin of Like-Charge Arginine-Arginine Pairing in Water. *J Phys Chem B.* 2009;113(27):9041-9045. doi:10.1021/jp902377q.
68. Zerrad L, Merli A, Schröder GF, et al. A spring-loaded release mechanism regulates domain movement and catalysis in phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem.* 2011;286(16):14040-14048. doi:10.1074/jbc.M110.206813.
69. Varga A, Flachner B, Konarev P, et al. Substrate-induced double sided H-bond network as a means of domain closure in 3-phosphoglycerate kinase. *FEBS Lett.* 2006;580(11):2698-2706. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.024.
70. Sakuraba H, Goda S, Ohshima T. Unique sugar metabolism and novel enzymes of hyperthermophilic archaea. *Chem Rec.* 2004;3(5):281-287. doi:10.1002/tcr.10066.
71. Yu Y, Lutz S. Circular permutation: a different way to engineer enzyme structure and function. *Trends Biotechnol.* 2011;29(1):18-25. doi:10.1016/j.tibtech.2010.10.004.
72. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. <https://books.google.es/books?id=Bosc5JVxNpkC>.
73. Afonine P V., Grosse-Kunstleve RW, Echols N, et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2012;68(4):352-367. doi:10.1107/S0907444912001308.
74. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, et al. MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(SUPPL.2):375-383. doi:10.1093/nar/gkm216.

75. Segel IH. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*. Wiley; 1975. <https://books.google.es/books?id=6uFqAAAAMAAJ>.
76. Cleland WW. *Steady State Kinetic*. Vol third edit. (Boyer PD, ed.). New York: The Enzyme Vol II; 1970.
77. Cleland WW. 3 Steady-State Kinetics. *Enzym*. 1990;19:99-158. doi:10.1016/S1874-6047(08)60196-1.
78. Cleland W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. *Biochim Biophys Acta - Spec Sect Enzymol Subj*. 1963;67:188-196. doi:10.1016/0926-6569(63)90227-X.
79. Cavaluzzi MJ, Borer PN. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(1):e13. doi:10.1093/nar/gnh015.
80. Kuzmič P. DynaFit-A Software Package for Enzymology. *Methods Enzymol*. 2009;467(C):247-280. doi:10.1016/S0076-6879(09)67010-5.
81. D. Svergun. Crysol. *Acta Crystallogr Sect E Struct Reports Online*. 1995;60(4):476-479. doi:10.1107/S1600536804004209.
82. Koshland E. Application of a Theory of Enzyme Specificity To Protein. *Pnas*. 1958;44(2):98-104.
83. Thauer RK, Kaster A-K, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Micro*. 2008;6(8):579-591. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1931>.
84. Ferry JG. Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. *Curr Opin Biotechnol*. 2011;22(3):351-357. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.011.
85. Selkov E, Maltsev N, Olsen GJ, Overbeek R, Whitman WB. A reconstruction of the metabolism of *Methanococcus jannaschii* from sequence data. *Gene*. 1997;197(1-2):GC11-GC26. doi:10.1016/S0378-1119(97)00307-7.
86. Guixé V, Merino F. The ADP-dependent sugar kinase family: Kinetic and evolutionary aspects. *IUBMB Life*. 2009;61(7):753-761. doi:10.1002/iub.217.
87. Holzer, Helmut, C Cennamo MB. Product activation of yeast Threonine Dehydratasa by Ammonia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1964;14(6):555-558.
88. Trowbridge CG, Krehbiel A, Laskowski M. Substrate Activation of Trypsin*. *Biochemistry*. 1963;2(4):843-850. doi:10.1021/bi00904a037.

89. Howard S. Product activation of the tryptic hydrolysis of p-toluenesulfonylarginine methyl ester. *Biochim Biophys Acta*. 1965;105(3):594-596. doi:10.1016/S0926-6593(65)80242-9.
90. Pettigrew W. of Regulatory to Rabbit Muscle Phosphofructokinase. 1979;254(6).
91. Reinhart GD & Lardy HA. Rat liver phosphofructokinase: kinetic activity under near-physiological conditions. *Biochemistry*. 19(7):1477-1484.
92. Meienhofer M-C, Cottreau D, Dreyfus J-C, Kahn A. Kinetic properties of human F4 phosphofructokinase. *FEBS Lett*. 1980;110(2):219-222. doi:10.1016/0014-5793(80)80077-9.
93. Panjkovich A, Daura X. PARS: A web server for the prediction of Protein Allosteric and Regulatory Sites. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1314-1315. doi:10.1093/bioinformatics/btu002.

ANEXOS

ANEXOS

PUBLICACIONES

1. Castro-Fernández, V., Bravo-Moraga, F., **Herrera-Morandé, A.** and Guixé, V. 2014 Bifunctional ADP-dependent Glucokinase/Phosphofructokinase activity in the order *Methanococcales*: Biochemical characterization of the mesophilic enzyme from *Methanococcus maripaludis*. *FEBS Journal*. 1(8):2017-29.

2. Rivas-Pardo, J. A., **Herrera-Morande, A.**, Castro-Fernandez, V., Fernandez, F. J., Vega, M-C and Guixé, V. (2013) Crystal structure, SAXS and kinetic mechanism of hyperthermophilic ADP-dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis* reveal a conserved mechanism for catalysis. *PLoS ONE* 8(6): e66687. doi:10.1371/journal.pone.0066687

CONGRESOS

Herrera-Morandé, A., Rivas-Pardo, J.A, Fernández, F.J., Guixé, V., Vega, M.C. Crystallization and X-ray analysis of the ADP-dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis* in the closed conformation. 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, Spain, July 2012.

Herrera-Morandé. A, Jaime Andrés. Rivas-Pardo, Víctor Castro-Fernández, Francisco J. Fernández, María Cristina Vega, Victoria Guixé. Structure determination in the crystalline state and in solution reveals a conserved mechanism for catalysis in hyperthermophilic ADP-dependent glucokinases. XXXV Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Valdivia, Chile, October 2012.

Alejandra Herrera-Morande, Víctor Castro-Fernandez, Jaime Andrés Rivas-Pardo, M. Cristina Vega and Victoria Guixé. Kinetics studies and thermostability of a hyperthermophilic bifunctional ADP-dependent glucokinase/phosphofructokinase of *Methanocaldococcus jannaschii*. XII Congress of the Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB 2013), Pto. Varas, Chile, November, 2013.

Alejandra Herrera-Morandé, Víctor Castro-Fernández, Felipe Bravo-Moraga, Victoria Guixé. Biochemical characterization of a novel mesophilic enzyme bifunctional ADP-dependent phosphofructokinase/glucokinase from *Methanococcus maripaludis*. XXXVI Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Valdivia, Chile, October 2014.

Alejandra Herrera-Morandé, Víctor Castro-Fernández, César A. Ramírez-Sarmiento, Francisco J. Fernández, Cristina Vega and Victoria Guixé. Folding topology determines substrate binding order in the ribokinase superfamily. 29th Symposium of the Protein Society, Barcelona, Spain, July 2015.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Esta tesis desarrollada bajo el financiamiento de los proyectos:

- FONDECYT 1110137 a cargo Dra. Victoria Guixé Leguía, CONICYT, CHILE.
- PET2008_0101, BIO2009-11184 y BFU2010-22260-C02-02 (Ministerio Español de Economía y Competividad), a cargo de la Dra. M. Cristina Vega.
- Proyecto ComplexINC de la CE en el Programa Marco 7 (FP7) no. 279,039, a cargo de Dra. M. Cristina Vega.