

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**  
**Universidad de Chile**



**Titulo del proyecto de tesis: Catálisis y regulación de la  
riboquinasa humana. Papel de los motivos conservados NXXE y  
GXGD en la catálisis, regulación y unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ .**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Bioquímica  
por: Diego René Quiroga Roger

Director(a) de tesis: Dra. Victoria Guixé Leguía

Lugar de desarrollo de la tesis: Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad  
de Ciencias, Universidad de Chile

Financiamiento FONDECYT: Proyectos N° 1070111 y 1110137

**2014**

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**Informe de aprobación tesis de Doctorado:**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Diego René Quiroga Roger

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día:

Directora de Tesis:

---

Dra. Victoria Guixé

---

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Mauricio González (Presidente)

---

Dra. María Cecilia Rojas

---

Dr. Julio Tapia

---

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quisiera agradecer a todos quienes me han ayudado en el desarrollo de esta memoria. En primer lugar, a mi familia, a la Lalita, a mi novia Lucía José y a mis amigos, pilares fundamentales en mi formación como persona, y apoyo constante en esta larga travesía. También quisiera agradecer de manera muy especial a los profesores Dra. Victoria Guixé, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y a los profesores Dra. Ana Preller , Dr. Tito Ureta y Dr. Jorge Babul por su amistad y consejos. No puedo dejar de mencionar a TODA la gente que he conocido en el laboratorio, con los cuales he pasado momentos muy gratos y han sido parte de mi feliz entorno laboral. Hemos mezclado trabajo y fútbol. Agradezco su amistad y la disposición a ayudarme en todo. También agradezco a la Dra Carolina Aliaga, de la Universidad de Santiago, por haberme permitido usa el equipo para hacer los ensayos de EPR, a Conicyt, y a Fondecyt proyecto 1070111. GRACIAS TOTALES!!!!

## **INDICE GENERAL.**

	pág
Agradecimientos .....	I
Índice General .....	II
Índice de Materias .....	III
Índice de Tablas .....	VII
Índice de Figuras .....	VIII
Abreviaturas .....	XII
Resumen .....	XIII
Abstract .....	XV

## INDICE DE MATERIAS.

	pág.
<b>I</b>	<b>Introducción.</b> ..... 1
I.1	Estructura de los miembros de la superfamilia riboquinasa. ....3
I.2	Motivos conservados en la superfamilia riboquinasa. Motivo NXXE y motivo GXGD. ....5
I.3	Superposición estructural y alineamiento de secuencias en la familia tipo riboquinasa. ....9
I.4	La RK de <i>H. sapiens</i> ..... 11
I.5	Regulación de la actividad enzimática en la familia tipo riboquinasa. Uso de $Mg^{+2}$ , cationes divalentes, monovalentes y $PO_4^{-3}$ .....12
I.5.1	Uso de $Mg^{+2}$ , cationes divalentes y monovalentes.....12
I.5.2	Uso de $PO_4^{-3}$ ..... 16
<b>II</b>	<b>Hipótesis y objetivos</b> .....18
II.1	Hipótesis .....18
II.2	Objetivos generales .....18
II.3	Objetivos específicos .....18
<b>III</b>	<b>Materiales y Metodología</b> .....19
III.1	Materiales .....19
III.1.1	Reactivos y materiales químicos .....19
III.1.2	Medios de cultivos .....19
III.1.3	Enzimas .....20
III.1.4	Partidores para las mutantes de RK de <i>H. sapiens</i> .....20
III.1.5	Sistemas de purificación de productos de PCR y DNA plasmidial .....21
III.1.6	Herramientas bioinformáticas .....21
III. 2	Metodología .....21

III. 2.1	Transformación y expresión de RK de <i>H. sapiens</i> .....	21
III. 2.2	Purificación de RK de <i>H. sapiens</i> .....	22
III. 2.3	Medición de la actividad enzimática de RK de <i>H. sapiens</i> y de PK de <i>M. musculus</i> .....	23
III. 2.4	Método discontinuo para medir actividad de RK de <i>H. sapiens</i> .....	24
III. 2.5	Preparación de células competentes .....	25
III. 2.6	Mutagénesis sitio-específica .....	25
III. 2.7	Secuenciación de mutantes .....	27
III. 2.8	Determinaciones de estructura secundaria .....	28
III. 2.9	Determinaciones de la afinidad proteína-ligando .....	28
III. 2.10	Determinación de concentración de proteínas .....	30
III. 2.11	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes .....	30
<b>IV</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>31</b>
IV.1	Identificación de las posiciones de los residuos Asn y Glu del motivo NXXE, y del residuo Asp del motivo GXGD, en la RK de <i>H. sapiens</i> .....	31
IV.2	Aguas estructurales conservadas, e interacciones entre el $\text{PO}_4^{-3}$ y el $\text{Mg}^{+2}$ y el motivo NXXE en la RK de <i>E. coli</i> y en la RK de <i>E. coli</i> y en la RK de <i>H. sapiens</i> .....	31
IV.2.1	Aguas estructurales conservadas .....	31
IV.2.2	Interacciones entre el $\text{PO}_4^{-3}$ , el $\text{Mg}^{+2}$ y el motivo NXXE en la RK de <i>H. sapiens</i> ..	33
IV.3	Expresión y purificación de la RK silvestre .....	36
IV.4	Caracterización de la RK silvestre .....	37
IV.4.1	Estabilidad térmica y determinación del pH óptimo de la RK silvestre .....	37
IV.4.2	Efecto del KCl, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ y $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ sobre las enzimas del ensayo acoplado PK y LDH.....	39
IV.4.3	Efecto del $\text{PO}_4^{-3}$ sobre los parámetros cinéticos de la RK silvestre .....	41
IV.4.4	Caracterización cinética de la RK silvestre en función de la D-ribosa y del	

	MgATP , y efecto del $\text{PO}_4^{-3}$ sobre los parámetros cinéticos .....	43
IV.4.5	Regulación de la actividad de la RK silvestre por cationes monovalentes. Efecto del $\text{K}^+$ y del $\text{Na}^+$ .....	50
IV.4.6	Regulación de la actividad de la RK silvestre por cationes divalentes. Efecto del $\text{Mg}^{+2}$ , $\text{Mn}^{+2}$ y $\text{Co}^{+2}$ .....	55
IV.4.7	Uso de $\text{Mn}^{+2}$ en la catálisis de la RK silvestre .....	59
IV.4.8	Efecto inhibitorio del $\text{ATP}^{-4}$ .....	62
<b>V.</b>	<b>Motivos GXGD y NXXE.</b> .....	65
V.1	Expresión y purificación de RK D269N, RK N199L y RK E202L .....	65
V.2	Estructura secundaria de RK silvestre, RK D269N y RK N199L.....	68
V.3	Caracterización cinética de la RK D269N. Actividad de la mutante en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP .....	69
V.3.1	Efecto del $\text{K}_2\text{HPO}_4$ sobre la actividad de la RK D269N .....	72
V.4	Caracterización cinética de la RK N199L. Actividad de la mutante en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP .....	73
V.4.1	Efecto del $\text{K}_2\text{HPO}_4$ sobre la actividad de la RK N199L .....	75
V.5	Caracterización cinética de la RK E202L. Actividad de la mutante en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP .....	77
V.5.1	Efecto del $\text{K}_2\text{HPO}_4$ sobre la actividad de la RK E202L.....	79
<b>VI.</b>	<b>Docking (acoplamiento) molecular y construcción de mutantes <i>in silico</i></b> .....	81
VI.11	Acoplamiento molecular del $\text{PO}_4^{-3}$ sobre la RK silvestre .....	81
VI.2	La elección de la celda.....	82
VI.3	La energía libre de unión .....	83
VI.4	Acoplamiento acotado .....	85
VI.5	Construcción de mutantes <i>in silico</i> . Acoplamiento molecular de $\text{PO}_4^{-3}$ sobre la RK D269N, RK N199L y RK E202L .....	87

<b>VII</b>	<b>Discusión</b> .....	90
VII.1	Caracterización de la RK silvestre .....	90
VII.1.1	Estabilidad térmica y determinación del pH óptimo de la RK silvestre .....	90
VII.1.2	Caracterización cinética de la RK silvestre. Efecto del $K_2HPO_4$ sobre los parámetros cinéticos, e inhibición por D-ribosa y MgATP .....	92
VII.1.3	Regulación de la actividad de RK silvestre por cationes monovalentes .....	94
VII.1.3.1	Efecto del $K^+$ y del $Na^+$ .....	94
VII.1.3.2	Sitio de unión de cationes monovalentes en la RK de <i>H. sapiens</i> .....	95
VII.1.4	Acción del $PO_4^{-3}$ sobre la RK de <i>H. sapiens</i> .....	99
VII.1.5	Regulación de la actividad de RK silvestre por cationes divalentes .....	101
VII.2	Motivo GXGD. Caracterización cinética de RK D269N .....	106
VII.3	Motivo NXXE. Interacciones entre los residuos Asn199 y Glu202 con $PO_4^{-3}$ y $Mg^{+2}$ .....	108
VII.3.1	Caracterización cinética de RK N199L y RK E202L .....	109
<b>VIII</b>	<b>Conclusiones</b> .....	114
<b>IX</b>	<b>Referencias</b> .....	115



## INDICE DE TABLAS.

	pág.
Tabla 1. Tabla de purificación de la RK silvestre .....	37
Tabla 2. Parámetros cinéticos de la RK silvestre en función de D-ribosa y $K_2HPO_4$ .....	45
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la RK silvestre en función de MgATP y $K_2HPO_4$ .....	48
Tabla 4. Actividad específica de RK silvestre en función de cationes monovalentes y $K_2HPO_4$ .....	53
Tabla 5. Parámetros cinéticos de la RK silvestre en función de MnATP .....	61
Tabla 6. Parámetros cinéticos de la RK D269N en función de la D-ribosa y MgATP ...	70
Tabla 7. Parámetros cinéticos de la RK N199L en función de D-ribosa y MgATP .....	74
Tabla 8. Parámetros cinéticos de la RK E202L en función de D-ribosa y MgATP .....	79
Tabla 9. Listado de las energías libres de unión para el acoplamiento molecular ciego del $PO_4^{-3}$ dentro de la RK silvestre .....	84
Tabla 10. Listado de las energías libres de unión para el acoplamiento molecular acotado del $PO_4^{-3}$ dentro de la RK silvestre .....	86
Tabla 11. Listado de las energías libres de unión para el acoplamiento molecular del $PO_4^{-3}$ dentro de las mutantes RK D269N, RK N199L y RK E202L .....	88

## INDICE DE FIGURAS.

	<b>pág.</b>
Figura 1. Diagramas topológicos de los miembros de la superfamilia riboquinasa.....	2
Figura 2. Estructura de la RK de <i>E. coli</i> .....	4
Figura 3. Sitos activos de la RK de <i>E. coli</i> , AK de <i>H. sapiens</i> y RK de <i>H. sapiens</i> .....	7
Figura 4. Motivos de secuencias conservados entre los miembros de la familia tipo riboquinasa, e identificación de las posiciones de los residuos Asn y Glu del motivo NXXE, y del residuo Asp del motivo GXGD, en RK de <i>H. sapiens</i> .....	10
Figura 5. Partidores utilizados para la construcción de las mutantes RK de <i>H. sapiens</i> .....	20
Figura 6. Ensayo acoplado utilizado para medir la actividad de la RK de <i>H. sapiens</i> ....	23
Figura 7. Ensayo discontinuo utilizado para medir la actividad de la RK de <i>H. sapiens</i> .....	24
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las mutantes RK D269N, RK N199L y RK E202L .....	26
Figura 9. Alineamiento de las secuencia de los DNA de RK silvestre y de las mutantes RK D269N, RKN199L y RKE202L .....	27
Figura 10. Superposición entre la estructura de la RK de <i>E. coli</i> (PDBid: 1RKD) y la estructura de la RK de <i>H. sapiens</i> (PDBid: 2FV7). Conservación de as aguas dentro de los sitios activos.....	32

Figura 11.	Interacción entre el motivo NXXE y los iones $\text{PO}_4^{-3}$ y $\text{Mg}^{+2}$ , y el ATP .....	34
Figura 12.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalantes de la RK de <i>H. sapiens</i> .....	36
Figura 13.	Estabilidad térmica de la RK de <i>H. sapiens</i> y determinación de su pH óptimo ..	38
Figura 14.	Efecto del KCl, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ y $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ sobre la actividad de PK .....	40
Figura 15.	Efecto del $\text{K}_2\text{HPO}_4$ sobre la actividad de RK silvestre a distintas concentraciones de D-ribosa y MgATP .....	42
Figura 16.	Efecto del $\text{K}_2\text{HPO}_4$ sobre la actividad de la RK silvestre variando la concentración de D-ribosa .....	44
Figura 17.	Efecto del $\text{K}_2\text{HPO}_4$ sobre la actividad de la RK silvestre variando la concentración de MgATP .....	47
Figura 18	Sitio de unión a cationes monovalentes conservado en riboquinasas .....	51
Figura 19.	Efecto de cationes monovalentes y $\text{PO}_4^{-3}$ sobre la actividad de la RK silvestre .....	53
Figura 20.	Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de la RK silvestre .....	58
Figura 21.	Actividad de la RK silvestre en función de la concentración de MnATP .....	60
Figura 22.	Unión de $\text{Mn}^{+2}$ a la RK silvestre determinado por resonancia	

	paramagnética del electrón .....	62
Figura 23.	Actividad de la RK silvestre en función de la concentración de ATP <sup>4</sup> .....	63
Figura 24.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalantes de RK D269N. Formación de cuerpos de inclusión .....	66
Figura 25.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 11,5% en condiciones desnaturalantes de RK D269N. Purificación .....	66
Figura 26.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 11,5% en condiciones desnaturalantes de RK N199L. Purificación .....	67
Figura 27.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 11,5% en condiciones desnaturalantes de RK E202L. Purificación .....	67
Figura 28.	Espectros de dicroísmo circular de la RK silvestre y de las mutantes RK D269N y RK N199L .....	68
Figura 29.	Espectros de dicroísmo circular de la RK silvestre y de la mutante RK E202L .....	69
Figura 30.	Actividad de RK D269N medida en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP .....	70
Figura 31.	Efecto del K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> en la actividad de la RK mutante D269N .....	72
Figura 32.	Actividad de la RK N199L en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP .....	74
Figura 33.	Efecto del K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> en la actividad de la RK mutante N199L .....	76

Figura 34.	Actividad de la RK E202L en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP .....	78
Figura 35.	Efecto del $K_2HPO_4$ en la actividad de RK E202L .....	80
Figura 36.	Ubicación de la celda para el acoplamiento molecular ciego del $PO_4^{-3}$ sobre la RK silvestre .....	82
Figura 37.	Acoplamiento molecular ciego del $PO_4^{-3}$ sobre la RK silvestre .....	84
Figura 38.	Ubicación de la celda para el acoplamiento molecular acotado del $PO_4^{-3}$ sobre la RK silvestre .....	85
Figura 39.	Acoplamiento molecular acotado del $PO_4^{-3}$ sobre la RK silvestre.....	87
Figura 40.	Acoplamiento molecular acotado del $PO_4^{-3}$ sobre las mutantes <i>in silico</i> RK D269N, RK N199L y RKE202L .....	89

## ABREVIATURAS.

AK:	Adenosina quinasa
AIR quinasa:	5-aminoimidazol ribósido quinasa
APS:	Persulfato de amonio
CD:	Dicroísmo circular
DEAE-celulosa:	Dietilaminoetil-celulosa
$\Delta G$ :	Diferencia de energía libre de Gibbs
D-ribosa-5-P:	D-ribosa-5-fosfato
DTT:	Ditiotreitol
<i>E. coli</i> :	Escherichia coli
EPR:	Resonancia paramagnética del electrón
<i>H. sapiens</i> :	Homo sapiens
IPTG:	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactósido
$k_{cat}$ :	Constante catalítica
$k_{cat}/K_M$ :	Eficiencia catalítica
$K_d$ :	Constante de disociación
$K_i$ :	Constante de inhibición
KDa:	KiloDaltons
$K_M$ :	Constante de Michaelis-Menten
LB :	Luria-Bertani
LDH:	Lactato deshidrogenasa
$NAD^+$ :	Nicotinamida-adenina-dinucleótido, forma oxidada
NADH:	Nicotinamida-adenina-dinucleótido forma reducida
<i>pfGK</i> :	Glucoquinasa ADP dependiente de <i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>phPFK</i> :	Fosfofructoquinasa ADP dependiente de <i>Pyrococcus horikoshii</i>
Pfk-2:	Fosfofructoquinasa-2
PK:	Piruvato quinasa
RK:	Riboquinasa
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
<i>tlGK</i> :	Glucoquinasa ADP dependiente de <i>Thermococcus litoralis</i>
$V_{max}$ :	Velocidad máxima

## RESUMEN.

La riboquinasa humana (RK) (E.C. 2.7.15) pertenece a la superfamilia riboquinasa y cataliza la fosforilación de la D-ribosa usando MgATP como cosustrato, produciendo D-ribosa-5-P y ADP. Aunque la D-ribosa participa en importantes etapas metabólicas, los estudios cinéticos en la RK humana son escasos y preliminares. Alineamientos de secuencia por superposición estructural entre varios miembros de la superfamilia, han mostrado que existen dos motivos de secuencia muy conservados, el motivo NXXE y el motivo GXGD, que se encuentran en el sitio activo de las estructuras de los miembros de la superfamilia. Los residuos Asn y Glu del motivo NXXE estarían relacionados con la unión y uso apropiado de los iones  $Mg^{+2}$  y  $PO_4^{-3}$ , mientras que el residuo Asp del motivo GXGD actuaría como la base catalítica, que desprotonaría el hidroxilo del sustrato que va a ser fosforilado. En este trabajo determinamos el efecto del  $K_2HPO_4$  sobre la actividad enzimática, y caracterizamos cinéticamente a la RK humana. A través de mutagénesis sitio dirigida evaluamos el papel de los residuos Asn199, Glu202 y Asp269, en la catálisis y en la unión y regulación por  $PO_4^{-3}$  y  $Mg^{+2}$ .

Los resultados muestran que la RK humana posee una regulación compleja, en la que tanto el  $PO_4^{-3}$  como el  $Mg^{+2}$  actúan como activadores, mientras que ambos sustratos y el  $Mn^{+2}$  libre actúan como inhibidores. La caracterización cinética de las mutantes de los motivos NXXE y GXGD muestran que las mutantes N199L y E202L muestran un descenso dramático en la  $k_{cat}$  y un aumento de entre 50-70 veces el valor de la  $K_M$  para MgATP, mientras que la mutante D269N tiene una  $k_{cat}$  cerca de 55 veces menor que la enzima silvestre, sin cambios en los valores de  $K_M$  para ambos sustratos. Sorpresivamente, ninguna de las mutantes es activada por  $K_2HPO_4$  y todas requieren de una concentración de  $Mg^{+2}$  libre mucho mayor que la requerida por la enzima silvestre, para obtener la actividad máxima. En base al análisis de las estructuras cristalográficas de RK de *E. coli* (PDBID: 1RKD) y RK de *H. sapiens* (PDBID: 2FV7) se ha visto que la RK humana uniría al  $PO_4^{-3}$  y al  $Mg^{+2}$  dentro del sitio activo, y que esta unión estaría mediada por moléculas de aguas estructurales conservadas que permitirían la formación de puentes de hidrógeno entre el  $PO_4^{-3}$  y el  $Mg^{+2}$  y los residuos conservados Asn 199 y Glu202 que se ubican dentro del sitio activo de la enzima, y que forman parte del motivo NXXE. Además, estos residuos participarían en la unión de ATP al sitio activo. Por último, usando el método de acoplamiento molecular del  $PO_4^{-3}$  fue posible inferir que el  $PO_4^{-3}$  regulador se uniría dentro del sitio activo de la RK humana.

Estos resultados demuestran que los residuos Asn199 y Glu202 juegan un rol importante en la catálisis y en la regulación por  $\text{PO}_4^{-3}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  y que aunque se ha señalado que el residuo Asp sería la base catalítica para muchos miembros de la familia riboquinasa, su rol en la RK humana no es concluyente.



## ABSTRACT.

Ribokinase (RK) (E.C. 2.7.15) belongs to the ribokinase superfamily and catalyzes the phosphorylation of the D-ribose using MgATP as cosubstrate, producing D-ribose-5-P and ADP. Even though D-ribose acts in important metabolic steps, kinetic studies of human RK are scarce and preliminary. Structural based sequence alignments of several members of this superfamily have shown two conserved sequence motifs, the NXXE and GXGD motifs, localized at the active site of its members. It has been suggested that the Asn and Glu residues from the NXXE motif are related with  $Mg^{2+}$  and  $PO_4^{3-}$  proper use and binding, while the Asp residue from the GXGD is proposed to act like the catalytic base withdrawing a proton in the substrate to be phosphorylated. In this work we have studied the effect exerted by  $K_2HPO_4$  on human RK activity, and we performed a kinetic characterization of this enzyme. Also, using site-directed mutagenesis we evaluate the role of residues Asn199, Glu202 and Asp269, in catalysis, phosphate and magnesium regulation and binding,

The results shown a complex interplay of regulators of RK activity where phosphate and  $K^+$  act as activators while both substrates and free  $Mn^{2+}$  acts as inhibitors. Kinetic characterization of mutants of the conserved NXXE and GXGD motifs shows that N199L and E202L enzymes display a dramatic decrease in the  $k_{cat}$  value and an increase between 50-70 times in the  $K_M$  for MgATP, whereas the D269N mutant display a  $k_{cat}$  value around 55 times lower than the wild type with almost none changes in the  $K_M$  values for both substrates. Interestingly, all the mutants lack the activating effect of phosphate and require higher free  $Mg^{2+}$  concentrations than the wild type enzyme to obtain maximal activity.

Additionally, molecular docking assays have shown that probably the regulatory  $PO_4^{3-}$  binds inside the active site in human RK. Analysis of the crystallographic structures of *E. coli* RK (PDBid: 1RKD) and *H. sapiens* RK (PDBid: 2FV7) shows that  $PO_4^{3-}$  and  $Mg^{2+}$  bind at the active site of human RK, and that several conserved water molecules facilitate interactions between  $PO_4^{3-}$  and  $Mg^{2+}$  and the conserved residues Asn199 and Glu202 through H bonding. In addition, these residues participate in the ATP binding in human RK active site.

These results demonstrated that residues Asn199 and Glu202 play an important role in catalysis and  $PO_4^{3-}$  and  $Mg^{2+}$  regulation and although the conserved Asp residue has been pointed out as the catalytic base in many members of the ribokinase family its role in human ribokinase is not fully understood.

## I. INTRODUCCIÓN.

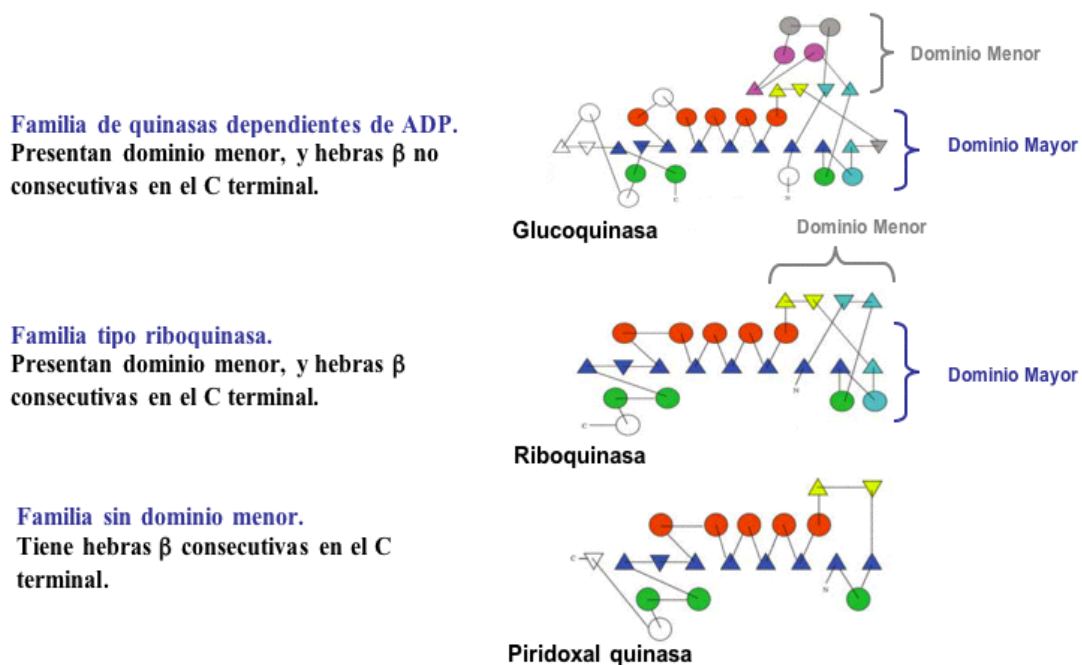
Las quinasas son un grupo de enzimas que participan en una variedad de procesos tales como transducción de señales, regulación génica y motilidad celular, y en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, nucleótidos, cofactores y aminoácidos. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo fosforilo desde una molécula dadora (generalmente ATP) a un sustrato aceptor. El sustrato de una quinasa puede ser una molécula pequeña, un lípido, un azúcar o una proteína.

Algunas quinasas usan ATP, GTP, ADP, como dador de fosfato, y catalizan aparentemente la misma reacción de transferencia de fosforilo, teniendo gran diversidad en sus plegamientos y en el mecanismo de reconocimiento de sus sustratos (Cheek y col., 2005).

La riboquinasa (RK) (E.C. 2.7.15) es una carbohidrato quinasa, que pertenece a la superfamilia riboquinasa y cataliza la fosforilación de la D-ribosa usando MgATP como co-sustrato, para dar como productos D-ribosa-5-fosfato (D-ribosa-5-P) y ADP. Las enzimas que forman parte de esta superfamilia participan en distintas vías metabólicas, tales como la glicólisis, y síntesis de vitaminas y nucleótidos. Desde un punto de vista estructural, los miembros de esta superfamilia tienen un tipo de plegamiento común llamado plegamiento tipo Rossmann, vinculado con la unión al nucleótido, que consiste de una sábana  $\beta$  central, constituida principalmente por hebras paralelas y rodeada por hélices  $\alpha$  ("sándwich"  $\alpha/\beta/\alpha$ ). La superfamilia riboquinasa representa un caso particular dentro de las quinasas que presentan el plegamiento tipo Rossmann, ya que es el azúcar-y no el nucleótido- quien se une al sitio donde suele unirse el nucleótido en el resto de las proteínas que presentan este tipo de plegamiento (Sigrell y col., 1998).

Al comparar los diagramas de la topología de 10 miembros de la superfamilia, se observa que existen tres tipos de variaciones fundamentales en el plegamiento de la superfamilia riboquinasa, lo que da lugar a tres familias dentro de esta superfamilia (fig. 1). La primera familia es la de quinasas dependientes de ADP, y se caracteriza por la correlación entre el uso del nucleótido y la presencia de hebras  $\beta$  no consecutivas en el C terminal. Estas quinasas además presentan un dominio menor constituido por inserciones de elementos de estructura secundaria, que comienza siempre con una hebra  $\beta$  a continuación de la hebra N terminal de la

sábana  $\beta$  central. Los miembros de la segunda familia presentan hebras consecutivas en el C terminal, y además poseen un dominio menor. Este rasgo es compartido por la riboquinasa, adenosina quinasa (AK), 5-aminoimidazol ribósido quinasa (AIR quinasa), 2-ceto-3-deoxigluconato quinasa y todas las proteínas de la familia tipo riboquinasa. Por último, la tercera familia está conformada por enzimas sin dominio menor, pero que contienen hebras  $\beta$  consecutivas en su único dominio. Las funciones de estas enzimas están asociadas a la fosforilación de intermediarios de la síntesis de coenzimas como piridoxal (por ej. piridoxal quinasa) y tiamina. Por lo tanto, la superfamilia riboquinasa se divide en tres familias: la familia de quinazas dependientes de ADP, la familia tipo riboquinasa, y la familia sin dominio menor (Merino y Guixé, 2008; Zhang y col., 2004).

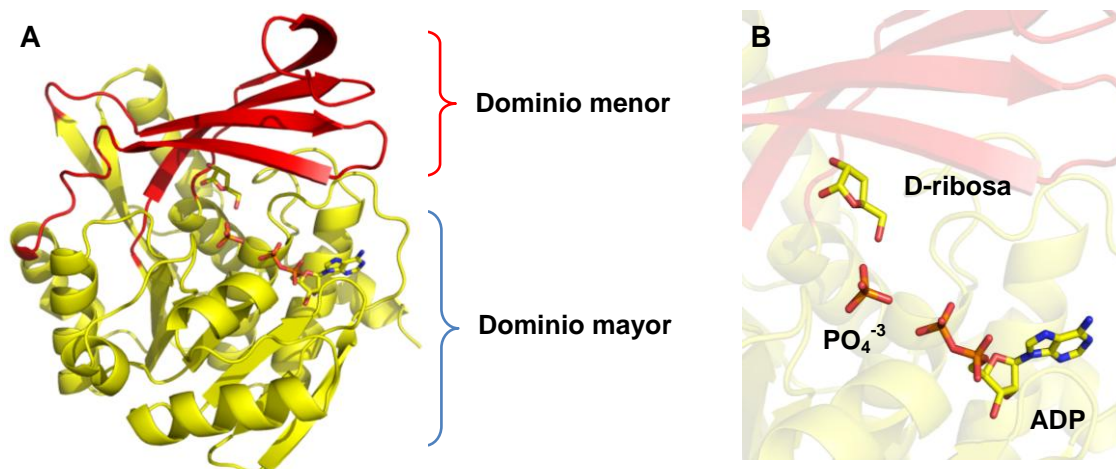


**Figura 1. Diagramas topológicos de los miembros de la superfamilia riboquinasa.** Las hélices  $\alpha$  se muestran como círculos y las hebras  $\beta$  como triángulos. Los elementos de estructura secundaria conservados se muestran en los siguientes colores: sábana  $\beta$  central en azul, las hélices  $\alpha$  a ambos lados en rojo y verde (Zhang y col., 2004).

## I.1 Estructura de los miembros de la superfamilia riboquinasa.

La primera estructura cristalográfica tridimensional determinada en esta superfamilia corresponde a la estructura de RK de *E. coli* resuelta por Sigrell y col. (1998). Esta estructura se determinó en complejo con D-ribosa, un análogo de ATP no hidrolizable (AMP-PNP) y dos iones  $\text{PO}_4^{-3}$ , y ha sido anotada en el Protein Data Bank (PDB) con la sigla 1RKD (PDBid: 1RKD). Uno de los iones  $\text{PO}_4^{-3}$ , se ubica fuera del sitio activo de la RK, mientras el otro se ubica dentro del sitio activo. Como sólo nos va a interesar el ión  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece dentro del sitio activo, para efectos de este trabajo el  $\text{PO}_4^{-3}$  que está fuera del sitio activo no se considerará y no se muestra en la figura 2. Por otro lado, dentro del sitio activo, se observa a la D-ribosa, la porción ADP del AMP-PNP y un ión  $\text{PO}_4^{-3}$ , según se puede apreciar en la figura 2. Este  $\text{PO}_4^{-3}$  tendría un rol regulador, y no correspondería a un  $\text{PO}_4^{-3}$  proveniente de la hidrólisis del ADP, ya que aparece muy lejano del ADP (7,3 Å) (Sigrell y col., 1998; Maj y col., 2002). Con respecto a lo anterior, vale la pena hacer un par de apreciaciones. Primero, que aunque se utilizó al análogo de ATP (AMP-PNP) en la mezcla de cristalización, finalmente en el cristal que se obtuvo sólo se observó AMP-PN o ADP, ya que según se sugiere, el AMP-PNP se habría hidrolizado, y, segundo, que a pesar de que esta RK bacteriana fue cristalizada en presencia de  $\text{Mg}^{+2}$ , no hay evidencia de la presencia de este ión en la estructura resuelta (Sigrell y col., 1998).

Se ha determinado que la RK posee 309 aminoácidos, que en solución existe como un homodímero (Sigrell y col., 1997, Sigrell y col., 1998), y que cada monómero de 33 kDa consiste de dos dominios: un dominio mayor y uno menor (fig. 2). En la RK el dominio mayor está formado por una sábana  $\beta$  de 9 hebras, flanqueada en ambas caras por 10 hélices  $\alpha$ . Las 6 primeras hebras de esta sábana  $\beta$  son paralelas y en conjunto con las hélices  $\alpha$  tienen la topología de plegamiento tipo Rossman. Este dominio se extiende por medio de 3 hebras  $\beta$  antiparalelas hacia el extremo C terminal. Ambas caras de esta extensión están flanqueadas por hélices  $\alpha$ ; por un lado hay un par que conecta esta extensión al plegamiento de Rossman, y por el otro hay 2 de las 3 hélices del extremo C terminal (Sigrell y col., 1998). Por último, el dominio mayor provee la mayor cantidad de interacciones de uniones específicas para los sustratos de RK, D-ribosa y ATP (Sigrell y col., 1999).



**Figura 2. Estructura de la RK de *E. coli*.** **A.** Representación gráfica para la estructura tridimensional de la RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD) junto a sus ligandos, mediante un diagrama de cintas. En rojo se muestra al dominio menor, y en amarillo, al dominio mayor. **B.** Ligandos de la estructura 1RKD: D-ribosa,  $PO_4^{-3}$  y ADP.

Por otro lado, el dominio menor de la RK está compuesto por 2 inserciones dentro del dominio mayor. La primera inserción está en el loop que conecta  $\beta 1$  y  $\alpha 1$ , mientras que la segunda está en el punto de entrecruzamiento que une  $\beta 5$  y  $\alpha 3$ . Cada inserción aporta con 2 hebras  $\beta$  antiparalelas. Estas inserciones constituyen una sábana  $\beta$  que por su cara interna actúa como una tapa sobre el sitio activo, cubriendo completamente al sustrato D-ribosa, pero sin cubrir al ATP, mientras que la cara externa de esta sábana  $\beta$  provee de la superficie para la interacción de los dímeros. Esta región de contacto dimérica a través del dominio menor tiene la forma de un "apretón de manos", y se le conoce como la estructura "β clasp".

A pesar de que la identidad de secuencia entre los miembros de esta superfamilia es menor al 30%, sus estructuras tridimensionales son muy similares. Las enzimas de la superfamilia riboquinasa se clasifican como proteínas de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  (Mathews y col., 1998; Schumacher y col., 2000; Sigrell y col., 1998). El rasgo estructural común que comparten todas las enzimas de esta superfamilia está dado por la sábana  $\beta$  central de 8 hebras que está rodeada por 8 hélices  $\alpha$  estructuralmente conservadas, 5 a un lado y 3 al otro (estructura central  $\alpha/\beta/\alpha$ ).

El sitio activo está localizado en una hendidura poco profunda a lo largo del borde de la sábana  $\beta$  central.

Estudios estructurales hechos en presencia y ausencia de sustratos en dos enzimas de esta familia, RK y AK, muestran que la unión de los sustratos produce cambios conformacionales. Estos cambios están descritos como una apertura y un cierre del dominio menor, tomando como referencia al dominio mayor, lo que permite definir dos conformaciones, una abierta y otra cerrada. Para el caso de la RK, se ha planteado que en un comienzo la forma apo o abierta permitiría la entrada del sustrato D-ribosa. La unión del azúcar induciría el cierre del dominio menor, el que actuaría como tapa, cubriendo a la D-ribosa. Este cierre de la estructura beneficiaría el reconocimiento del cosustrato ATP, promoviendo su unión. La conformación cerrada corresponde al complejo ternario. El residuo Asp255 actuaría como la base catalítica que sacaría un protón del grupo hidroxilo O5' de la D-ribosa. El átomo O5' cargado negativamente haría un ataque nucleofílico sobre el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$  del ATP, resultando un estado de transición con una geometría pentavalente. Este estado de transición sería estabilizado por un "bolsillo aniónico" en el que se posicionaría el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$  del ATP. Este bolsillo aniónico estaría creado por los nitrógenos de la cadena principal de los residuos 252-255. El estado de transición sería finalmente estabilizado por la cadena lateral del residuo Lys43. Cambios conformacionales del dominio menor inducirían el quiebre del estado de transición, después del cual, la enzima volvería a su forma abierta nuevamente. Los productos D-ribosa-5-P y ADP serían liberados, y la enzima estaría lista para llevar a cabo una nueva ronda catalítica. Esta secuencia de eventos sugeriría que la RK tendría un mecanismo de reacción ordenado Bi Bi (Mathews y col., 1998; Sigrell y col., 1999; Sigrell y col., 1998).

## **I.2 Motivos conservados en la superfamilia riboquinasa. Motivo NXXE y motivo GXGD.**

Otro rasgo compartido por miembros de la superfamilia, es la existencia de dos motivos de secuencia altamente conservados, el motivo NXXE y el motivo GXGD, ambos ubicados en el sitio activo de las enzimas. Se ha observado que los residuos Asn y Glu del motivo NXXE estarían relacionados con la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  (Maj y col., 2002, Parducci y col., 2006) y

que el residuo Asp del motivo GXGD actuaría como la base catalítica general que desprotonaría al hidroxilo del sustrato que va a ser fosforilado (Arnfors y col., 2006; Schumacher y col., 2000).

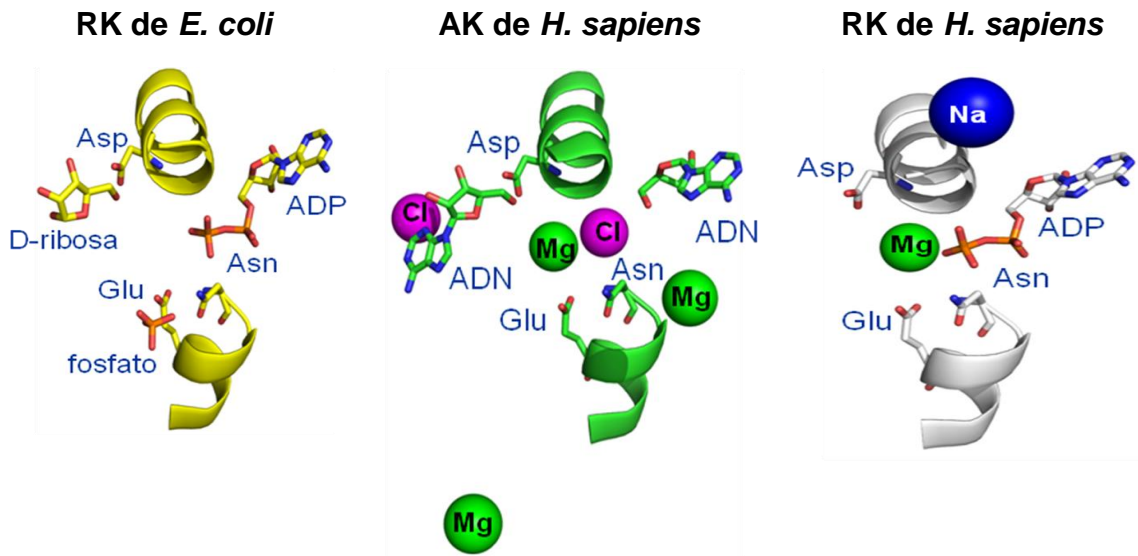
En base a la estructura cristalográfica de la RK de *E. coli* determinada en complejo con D-ribosa, un análogo de ATP no hidrolizable (AMP-PNP) y  $\text{PO}_4^{-3}$ , se observó que dentro del sitio activo, el residuo Asn187 forma puentes de hidrógeno con un átomo de oxígeno del ión  $\text{PO}_4^{-3}$  y con un átomo de oxígeno del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  del ATP, y que el residuo Glu190 forma dos puentes de hidrógeno con dos átomos de oxígeno del ión  $\text{PO}_4^{-3}$  (Sigrell y col., 1998). Ambos residuos, tanto Asn187 y Glu190, son parte del motivo NXXE.

La superposición de las estructuras de la AK humana (PDBid: 1BX4), que es monomérica, y de la RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD) que es dimérica, mostró que ambas proteínas poseían una gran identidad estructural, ya que dicha superposición arrojó una desviación RMS de 2,4 Å para 306 residuos, aún cuando la identidad de secuencia entre ambas sólo alcanza al 22%. Además, permitió observar que los residuos Asn187 y Glu190 de la RK estaban conservados en la AK (Asn223 y Glu226) (Mathews y col., 1998). La identidad estructural entre RK y AK, y la existencia del motivo conservado NXXE, también se evidencia en otras estructuras de AK. En AK de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (PDBid: 1LII) los residuos correspondientes son Asn223 y Glu226 (Schumacher y col., 2000), mientras que en la AK de hámster chino, dichos residuos corresponden a Asn239 y Glu242 (Maj y col., 2002).

La AK humana fue cristalizada en presencia de adenosina y  $\text{Mg}^{+2}$ . Esta estructura muestra dos adenosinas y tres iones  $\text{Mg}^{+2}$ , ubicándose sólo un ión  $\text{Mg}^{+2}$  dentro del sitio activo, muy cerca del motivo NXXE. Este ión tiene una coordinación octaédrica con seis moléculas de agua ordenadas ( $\text{MO}_6$ ) unidas a residuos del sitio activo y se ubica entre ambas adenosinas. Cinco de las seis moléculas de agua tienen interacciones por puentes de hidrógeno con la proteína, incluyendo contactos con las cadenas laterales de los residuos Asn223 y Glu226, así como también con el residuo catalítico Asp300 (Mathews y col., 1998).

Sin embargo, se ha visto que el ión  $\text{Mg}^{+2}$  puede ocupar una posición diferente dentro del sitio activo. Tal es el caso de la AK de *T. gondii*, donde el ión  $\text{Mg}^{+2}$  se encuentra coordinado entre los  $\text{PO}_4^{-3}$   $\alpha$  y  $\beta$  del análogo de ATP no hidrolizable, el AMP-PCP (Schumacher y col, 2000).

Dado lo anterior, cobra vital importancia la resolución de la estructura de la RK de *H. sapiens* en 2008, ya que esta estructura fue resuelta en complejo con ADP,  $Mg^{+2}$  y  $Na^+$  (PDBid: 2FV7), y permitió conocer en qué lugar se unen tanto el  $Mg^{+2}$  como el  $Na^+$ . Esta estructura mostró que el  $Mg^{+2}$  se ubica dentro del sitio activo de esta enzima, muy cercano al motivo NXXE, siendo esta ubicación similar a la que ocupa ese ión dentro del sitio activo de la AK humana (fig. 3).



**Figura 3. Sitos activos de la RK de *E. coli*, AK de *H. sapiens* y RK de *H. sapiens*.** Representación de los sitios activos de las estructuras de la RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD), AK de *H. sapiens* (PDBid: 1BX4) y RK de *H. sapiens* (PDBid: 2FV7), junto a sus ligandos, mediante un diagrama de cintas. Según se puede observar, las cadenas laterales de los residuos conservados Asn y Glu del motivo NXXE se ubican junto al ión  $PO_4^{-3}$  en RK de *E. coli*, y junto a los iones  $Mg^{+2}$  en AK de *H. sapiens* y RK de *H. sapiens*. La cadena lateral del residuo Asp del motivo GXGD está localizado cercano al azúcar ((ADP, en ambas RK), y ADN en AK.)

Con el objeto de evaluar la conservación de los residuos Asn y Glu del motivo NXXE en miembros de la familia tipo riboquinasa, Maj y col. (2002) hicieron un alineamiento de secuencia múltiple entre distintos miembros de esta familia y observaron que estos residuos estaban altamente conservados, identificando un nuevo motivo de secuencia al que llamaron motivo NXXE. Al estar los residuos Asn y Glu del motivo NXXE haciendo contactos cercanos



con el  $Mg^{+2}$  y el  $PO_4^{-3}$  y considerando los antecedentes que mostraban que las actividades de las enzimas RK y AK se veían afectadas por la acción del  $PO_4^{-3}$  y  $Mg^{+2}$ , se estudió la posibilidad de que este motivo estuviera involucrado en la unión de estos iones, requeridos para la actividad catalítica de estas enzimas. Mutagénesis sitio-dirigida del motivo NXXE en AK de hámster chino dio como resultado enzimas con requerimientos muy alterados de  $PO_4^{-3}$  y  $Mg^{+2}$  (Maj y col., 2002).

Además, la mutación sitio-dirigida del motivo NXXE en la fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *E. coli* indicó que el residuo Glu190 de este motivo era requerido para la unión apropiada del ión  $Mg^{+2}$  en el sitio activo y además, apuntó a la existencia de un  $Mg^{+2}$  catalítico en el sitio activo, distinto al ión  $Mg^{+2}$  presente en el complejo metal-nucleótido (Parducci y col., 2006; Rivas y col., 2011). En base a estos resultados, se ha sugerido que el motivo NXXE debería representar el sitio de unión de  $Mg^{+2}$  y de  $PO_4^{-3}$ , lo que podría ser una propiedad que caracterizaría a la familia tipo riboquinasa. Sin embargo, esto sólo ha sido demostrado para 2 enzimas de la superfamilia, la AK (Maj y col., 2002) y la Pfk-2 (Parducci y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, el motivo GXGD contiene un residuo Asp conservado que actuaría como una base catalítica general que desprotonaría al hidroxilo del sustrato que va a ser fosforilado. En base a la resolución de la estructura de la RK de *E. coli*, se ha visto que el residuo Asp255 se encuentra muy cercano a la D-ribosa y se ha sugerido que esta enzima usaría el residuo Asp255 para sacar el protón del grupo hidroxilo 5' de la D-ribosa (Sigrell y col., 1998). Por otro lado, al resolver la estructura de la AK humana, se ha señalado que el residuo Asp300 sería el residuo catalítico importante involucrado en la desprotonación de la adenosina en el grupo hidroxilo 5' (Mathews y col., 1998), ya que este residuo ocupa una posición espacial similar al residuo Asp255 de RK de *E. coli* y porque la adenosina ocupa una posición similar a la de la D-ribosa. Lo mismo ocurre en la estructura resuelta de la AK de *T. gondii*, donde se ha encontrado que la posición que ocupa el residuo Asp318 es similar a la posición de los residuos Asp255 de la RK de *E. coli* y Asp300 de la AK de *H. sapiens* (Schumacher y col., 2000). En estas tres estructuras, RK de *E. coli*, AK de *T. gondii* y AK de *H. sapiens*, el hidroxilo que se fosforila en el sustrato azúcar se encuentra formando un puente de hidrógeno con el residuo Asp del motivo GXGD, lo que da cuenta de que esta interacción debiera ser importante. Además, en estudios realizados en la AK de hámster chino por Maj y col.

(2000), se ha postulado al residuo Asp316 del motivo GXGD como el residuo responsable de la catálisis en esta enzima, ya que se observó que al sustituir el residuo Asp316 por Asn o Glu, hubo una pérdida casi completa de la actividad en la enzima.

Asimismo, siguiendo con los estudios realizados en la familia tipo riboquinasa, en la Pfk-2 de *E. coli* se evaluó la función del residuo Asp256 del motivo GXGD mediante mutagénesis sitio-dirigida, y se observó que el reemplazo de este residuo por Asn condujo a que la  $k_{cat}$  de la enzima mutante fuera 15.000 veces menor que la de la enzima silvestre. Esto ha llevado a sugerir que este residuo funcionaría como la base catalítica en esta enzima (Tesis pregrado, Parducci, 2005). Por último, al observar la estructura resuelta para la enzima nucleósido quinasa de *Methanocaldococcus jannaschii* (MjNK) (PDBid: 2C49), se puede apreciar que el motivo GXGD se encuentra conservado entre los residuos 244-247. El residuo Asp247 sería la base catalítica de esta enzima, y se ha sugerido que el mecanismo sería similar al propuesto para la RK de *E. coli*. En esta estructura también se puede apreciar que el residuo Asp del motivo GXGD se encuentra formando una interacción por puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo hidroxilo 5' del nucleósido (Arnfors y col., 2006).

Los antecedentes expuestos, nos llevan a aseverar que no existen muchas publicaciones que apunten a dilucidar el papel que cumplen los motivos NXXE y GXGD en la unión y en la regulación y catálisis por el uso de iones como  $PO_4^{-3}$  y  $Mg^{+2}$ , y que los estudios se han centrado principalmente en dos enzimas, la AK y la Pfk-2. De esto se desprende la importancia de realizar más estudios que demuestren la directa relación que juegan estos motivos en la unión de iones como  $PO_4^{-3}$  y  $Mg^{+2}$ , para poder ampliar la visión existente, y evaluar si este rasgo es compartido por más miembros dentro la familia. De esta manera, la RK humana se alzó como muy buena candidata para llevar a cabo estos estudios.

### **I.3 Superposición estructural y alineamiento de secuencia en la familia tipo riboquinasa.**

Como se mencionó anteriormente, la superfamilia riboquinasa está subdividida en tres familias, la familia de quinazas dependientes de ADP, la familia tipo riboquinasa y la familia sin dominio menor. Nuestro foco se situó principalmente en la familia tipo riboquinasa ya que la RK humana pertenece a esta familia. Con el fin de evaluar cuán conservados se encontraban los

motivos NXXE y GXGD entre las proteínas que actualmente conforman la familia tipo riboquinasa, realizamos una superposición estructural y posteriormente un alineamiento de secuencia entre todos los miembros de esta familia. Como se puede observar en la figura 4 (A), ambos motivos están conservados tanto en la RK de *H. sapiens* como en la RK de *E. coli*, así como en la mayoría de los miembros de esta familia, destacándose en verde al motivo NXXE, y en amarillo al motivo GXGD. Por medio de esta superposición estructural y posterior alineamiento de secuencia, hemos identificado las posiciones de los residuos que conforman los motivos NXXE y GXGD en la RK humana.

**A**

<b>Riboquinasa de <i>E. coli</i></b>	180	VDIITPNETAEKLTG	246	QAVDTIAAGDTFNGAL
<b>Riboquinasa de <i>H. sapiens</i></b>	193	SDVFCNESAIEILTG	260	KAVDTTGAGDSFVGAL
<b>Adenosinaquinasa de <i>H. sapiens</i></b>	217	VDILFCNETEAATFAR	291	EIIDTNGAGDAFVGGF
<b>Adenosinaquinasa de <i>T. gondii</i></b>	217	TNILFCNEEFHAHLAK	310	KIVDTNGAGDAFVGGF
<b>Aminoimidazol-ribósidoquinasa de <i>S. typhimurium</i></b>	183	ASICKVSADELQQLSG	243	DVVDTTGAGDAFVGGI
<b>Proteína hipotética de <i>T. maritima</i></b>	167	LDLKFVDSREAETLTG	226	SLEGRTGRCDTCTAAF
<b>Fructosa-1-fosfatoquinasa de <i>B. halodurans</i></b>	175	PSFIKPNHHELSLVLS	241	EVRNSVGAGDSVWAGF
<b>2-ceto-3-deoxigluconatoquinasa de <i>T. maritima</i></b>	188	VDVLIANEEDIEKVLG	271	HIVDRVGAGDSFAGAL
<b>Fructoquinasa hipotética de <i>S. tokodaii</i></b>	189	LKFLITDITDSSKIILG	247	PVEDVTGAGDALGCTF
<b>Tagatosa-6-fosfatoquinasa de <i>E. faecalis</i></b>	178	PYLKPNLEELLEGLLG	226	QAKNPVCSGDATIAGL
<b>Fosfofructoquinasa-2 de <i>E. coli</i></b>	181	IELVKPNQKELSAVLN	247	KSQSTVGAGDSMVGAM

**B**



**RK de *E. coli***  
(PDBid:1RKD)



**RK de *H. sapiens***  
(PDBid: 2FV7)



**Superposición estructural entre la RK de *E. coli* y la RK de *H. sapiens***

**Figura 4. Motivos de secuencias conservados entre los miembros de la familia tipo riboquinasa, e identificación de las posiciones de los residuos Asn y Glu del motivo NXXE, y del residuo Asp del motivo GXGD, en RK de *H. sapiens*.** **A.** El alineamiento de secuencias entre los miembros de la familia tipo riboquinasa fue realizado por superposición estructural de las estructuras cristalográficas de los miembros de la familia tipo riboquinasa. En verde se destaca el motivo NXXE, y en amarillo, el motivo GXGD. **B.** La superposición estructural entre la RK de *E. coli* y la RK de *H. sapiens* muestra que estas enzimas poseen una gran identidad estructural..

Los residuos Asn y Glu que forman parte del motivo NXXE en la RK humana, están en las posiciones 199 y 202, muy similar a las posiciones que ocupan en RK de *E. coli* (187 y 190). Asimismo, el residuo Asp que forma parte del motivo GXGD, ocupa la posición 269 en la RK humana y 255 en la RK de *E. coli*. Llama la atención que pese a que la identidad de secuencia entre ambas RK fue tan sólo del 33 %, ambas enzimas poseen una gran identidad estructural (fig. 4B).

#### **I.4 La RK de *H. sapiens*.**

Recapitulando, aunque la RK bacteriana fue cristalizada en presencia de  $Mg^{+2}$ , no hay evidencia de la presencia de este ión en la estructura resuelta (PDBid: 1RKD), observándose dentro del sitio activo a la D-ribosa, al análogo de ATP y a un ión  $PO_4^{-3}$ . El ión  $PO_4^{-3}$  estaría haciendo contactos con los residuos Asn187 y Glu190 del motivo NXXE, motivo muy conservado dentro de la familia tipo riboquinasa, al igual que el motivo GXGD. La existencia de esta estructura permitió contar con una referencia para poder comparar el parentesco entre las distintas proteínas de la superfamilia riboquinasa a las que se les iba determinando la estructura, especialmente entre proteínas que tenían una identidad de secuencia muy baja, menor al 30%. Sin embargo, llama la atención que aunque la actividad de la RK fue descrita originalmente en hígado de ternero (Agranoff y Brady, 1956), la mayoría de los trabajos de caracterización de la RK a nivel estructural y bioquímico han sido realizados en la enzima de *E. coli*, dejando de lado la investigación en enzimas de mamíferos. La reciente identificación del gen que codifica para la RK humana (Park y col., 2007) ha abierto la posibilidad de ocupar esta enzima para ampliar los estudios existentes sobre los motivos NXXE y GXGD en la superfamilia riboquinasa. De esta manera, hemos evaluado el papel del motivo NXXE en la unión de  $PO_4^{-3}$  y  $Mg^{+2}$  y en la regulación de la actividad de esta enzima, y hemos estudiado la importancia del motivo GXGD en la catálisis de RK.

Por otro lado, la disponibilidad de la estructura cristalográfica de RK humana (PDBid: 2FV7), resuelta con ADP,  $Na^+$  y  $Mg^{+2}$ , pero sin  $PO_4^{-3}$  (a diferencia de la estructura de

RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD) resuelta con D-ribosa, un análogo de ATP y  $\text{PO}_4^{-3}$ , resultó ser muy relevante, ya que por primera vez se contaba con una estructura de la RK resuelta con  $\text{Mg}^{+2}$ , lo que permitía conocer la posición que ocupaba este ión dentro del sitio activo de RK y además, nos entrega información sobre cuáles podrían ser los residuos que podrían estar involucrados con su unión.

Considerando la identidad estructural que tienen los sitios activos de las enzimas que son parte de la familia tipo riboquinasa, lo más probable es que los contactos vistos en la estructura de RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD), entre el ión  $\text{PO}_4^{-3}$  y los residuos Asn187 y Glu190 del motivo NXXE, también existieran entre los residuos Asn199 y Glu202 de RK humana, y un ión  $\text{PO}_4^{-3}$ .

Hasta la fecha no existe ningún trabajo en el que se correlacione la información estructural de la RK humana, con los aspectos catalíticos y de regulación de esta enzima. Aunque esta estructura sí se encuentra disponible en el PDB, no existe ningún estudio publicado, razón por la cual toda la información extra que obtuvimos a partir de dicha estructura ha sido mediante el análisis que hemos realizado, y redundará aún más en la importancia de este estudio.

## **I.5 Regulación de la actividad enzimática en la familia tipo riboquinasa. Uso de $\text{Mg}^{+2}$ , cationes divalentes, monovalentes, y $\text{PO}_4^{-3}$ .**

### **I.5.1 Uso de $\text{Mg}^{+2}$ , cationes divalentes y monovalentes.**

Existen dos clases de enzimas que requieren de cationes divalentes para su actividad. Por un lado están las metaloenzimas, que tienen un catión metálico que está fuertemente unido y que no se disocia, y por otro, están las enzimas activadas por un metal, que no son capaces de hacer catálisis en ausencia del catión divalente. Dentro del grupo de las enzimas activadas por metal, las fosfotransferasas son las de mayor importancia (Parducci, 2005). En esas enzimas que requieren del uso de un metal para su actividad, el ATP libre no sería el verdadero sustrato; ya que estas enzimas poseen un mecanismo general de activación que es la unión del metal al nucleótido, lo que formaría al verdadero sustrato (Knowles, 1980). Por otro lado, existen otros casos, en los que se requiere de una concentración de metal mayor que la concentración usual de nucleótido necesaria, para alcanzar la máxima actividad, lo que sugiere un papel adicional para el metal (Budde y col., 1993). De este modo, se ha observado que para la AK de diversas fuentes

el aumento de  $Mg^{+2}$  libre inhibe la actividad enzimática (Maj y col.; 2002, Maj y col., 2001), mientras que en Pfk-2 ocurre lo contrario, activando a la enzima (Parducci y col., 2006).

Por otro lado, se ha sugerido que la función de la carga positiva del ión sería contrarrestar la carga negativa local formada en el sitio activo durante el curso de la reacción, aumentando la electrofilicidad del cofactor, disminuyendo la energía de activación y estabilizando las especies reactivas (Andreini y col., 2008; Ito y col., 2003).

Dentro de la superfamilia riboquinasa, existe evidencia estructural y cinética, de que el motivo NXXE estaría relacionado con la unión de cationes divalentes, particularmente con la unión de  $Mg^{+2}$  (Mathews y col., 1998; Maj y Gupta, 2002; Parducci y col., 2006). Mutagénesis sitio-dirigida del motivo NXXE en AK de hámster chino dio como resultado enzimas con requerimientos muy alterados de  $PO_4^{-3}$  y  $Mg^{2+}$  (Maj y col., 2002). Además, la mutación sitio-dirigida del motivo NXXE en la fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *E. coli* indicó que el residuo Glu190 de este motivo era requerido para la unión apropiada del ión  $Mg^{2+}$  en el sitio activo y además, apuntó a la existencia de un  $Mg^{2+}$  catalítico en el sitio activo, distinto al ión  $Mg^{2+}$  presente en el complejo metal-nucleótido (Parducci y col., 2006; Rivas y col., 2011).

Con respecto a la RK, se ha visto que tanto la RK de mamíferos como la bacteriana no presentan actividad en ausencia de cationes divalentes (Agranoff y Brady, 1956; Chuvikovsky y col., 2006). Por otro lado, se ha demostrado que aparte del  $Mg^{+2}$ , otros cationes divalentes como el  $Mn^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  también pueden activar a la RK de *E. coli* (Chuvikovsky y col., 2006). Sin embargo, el rol activador del  $Mg^{2+}$  no está del todo claro, ya que se ha visto que las actividades catalíticas de AK y de RK bacteriana se inhiben a altas concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre. Para el caso de AK, se ha reportado que utilizando bajas concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre hay un aumento de la actividad enzimática, en tanto que al usar concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre en el intervalo milimolar, este actúa como un inhibidor e incrementa la inhibición por sustrato inducida por adenosina (Maj y col., 2002; Fisher y Newholme, 1984). Por otro lado, Maj y Gupta (2001) observaron que al utilizar en sus ensayos concentraciones de  $Mg^{2+}$  libre superiores a 2,5 mM se produjo una inhibición gradual de la actividad de la RK de *E. coli*.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios recientes centrados en el efecto de los cationes divalentes sobre algunas enzimas de la superfamilia riboquinasa. Para la enzima piridoxal quinasa humana (hPLK) se midió la actividad en presencia de ocho metales diferentes ( $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Co^{+2}$ ) cada uno por separado y como el único metal presente, y lo que se vio fue que de los ocho metales ensayados, sólo el  $Ca^{+2}$  no permite la catálisis. La mayor actividad se observó en presencia de 0,1 mM de  $Zn^{+2}$  total y 0,5 mM de ATP, actividad que disminuye dramáticamente a medida que se aumenta la concentración de  $Zn^{+2}$  libre. Para el  $Mn^{+2}$ , su mayor actividad se dio a concentraciones equimolares, mientras que cuando estuvo en proporción 3:1 con el ATP, la actividad disminuyó (Navarro y col.; 2013). Por otro lado, también se ha observado que la enzima Pfk-2 de *E. coli*, emplea los iones  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  para la catálisis, y en menor medida usa  $Co^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ , descartando la utilización de otros cationes como  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Ni^{+2}$  (Rivas-Pardo, J.A., 2011). Ensayos realizados en la fosfofructoquinasa de *Pyrococcus horikoshii* (phPFK) mostraron que dicha enzima puede utilizar  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Ni^{+2}$ , para su catálisis, encontrándose algo similar para la enzima homóloga glucoquinasa de *Pyrococcus furiosus* (pfGK), la cual fue capaz de utilizar en la catálisis los iones  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Co^{+2}$ , y en menor proporción  $Ni^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  (Merino, F., Rivas-Pardo, J.A. y col., 2011).

Con respecto a los cationes monovalentes, se ha visto que la RK de *E. coli* es capaz de unir  $K^+$  y  $Cs^+$  con una  $K_D$  aparente de 5 mM y 17 mM, respectivamente, pero incapaz de unir  $Li^+$  y  $Na^+$ . Desde un punto de vista fisiológico, en *E. coli*, al igual que en otras células, la concentración intracelular de  $K^+$  fluctúa entre 100 mM y 150 mM, lo que sería suficiente para saturar un sitio con una  $K_D$  igual a 5 mM. La baja concentración de  $Na^+$  en la célula (5 a 15 mM) y el hecho de que RK no se activara por concentraciones de NaCl hasta 140 mM, sugieren que este ión no sería de importancia biológica para la bacteria (Andersson y Mowbray, 2002).

En la RK de *E. coli*, el dominio mayor contiene el sitio de unión de cationes monovalentes entre dos loops abarcando a los residuos desde el 244 al 254, y a los residuos entre el 288 y el 296, adyacentes al bolsillo de unión del MgATP (Sigrell y col., 1998). Por otro lado, la RK de *E. coli* fue cristalizada en presencia de D-ribosa, AMP-PCP,  $Mg^{+2}$  y  $Cs^+$  (PDBid: 1GQT). Se ha postulado que la unión del catión monovalente gatillaría cambios conformacionales que permitirían la activación enzimática. El sitio de unión del catión

monovalente ayudaría a organizar la formación de el bolsillo de unión del nucleótido en el sitio activo (Andersson y Mowbray, 2002).

Más recientemente, se estudió si la RK de *E. coli* podía ser activada por cationes monovalentes ensayándose con  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $NH_4^+$  y  $Cs^+$  determinado que esta enzima es activada por  $K^+$ ,  $NH_4^+$  y  $Cs^+$ , obteniéndose la mayor activación con potasio y la menor con cesio, a una concentración de 100 mM de cada uno de los cationes. Considerando que con potasio se obtuvo el 100% de actividad, con  $NH_4^+$  se obtuvo sólo el 60% de actividad, y con  $Cs^+$  un 40%, mientras que con  $Li^+$  y  $Na^+$  se obtuvo una actividad bajísima (cerca a cero), comparable a la determinación en ausencia de catión monovalente (Chuvikovsky y col., 2006).

Por otro lado, en 2012, se cristalizó la RK de *S. aureus* en ausencia de cationes monovalentes (PDBid: 3RY7) que pudieran activar a la enzima. Al comparar dicha estructura con la de RK de *E. coli*, se ha propuesto que la unión del catión monovalente gatillaría un cambio conformacional de uno de los loops donde se ubica el ATP dentro del sitio activo, lo que organizaría el bolsillo de unión a nucleótido, permitiendo la unión del ATP y aumentando la actividad catalítica. Desde el punto de vista cinético, esta enzima es activa en ausencia de potasio, y la presencia de KCl 100 mM llevó a una disminución de la  $K_M$  para ATP a casi la mitad, y a una duplicación de la  $k_{cat}$  (Li y col., 2012).

Existe evidencia de que la Pfk-2 de *E. coli* también tendría un sitio de unión a cationes monovalentes. Cabe recordar que esta enzima además de unir al ATP que actúa como el dador de fosforilo en el sitio activo, une un ATP alostérico que regula negativamente la actividad enzimática. La caracterización cinética de la enzima mostró que el  $K^+$  y el  $Na^+$  no modifican la  $k_{cat}$  ni la  $K_M$  para fructosa-6-P o MgATP. Sin embargo, la presencia de  $K^+$  (y no de  $Na^+$ ) llevó a un aumento de la inhibición alostérica inducida por MgATP. Por otro lado, la enzima fue cristalizada en presencia de MgATP, y en presencia de  $Cs^+$  (PDBid: 3UMP) o  $K^+$  (PDBid: 3UMO), y se observó un sitio de unión a cationes monovalentes en una posición conservada predicha para el resto de las proteínas de la familia riboquinasa. Este sitio está adyacente al sitio de unión del MgATP alostérico y sólo es posible observarlo en presencia de  $K^+$  o  $Cs^+$ . Para este caso en particular, la unión de cationes monovalentes tendría influencia sobre el sitio alostérico de la Pfk-2 aumentando la afinidad para MgATP, manteniendo inalterado la conformación de los residuos presentes en el sitio catalítico (Báez y col., 2013).



### I.5.2 Uso de $\text{PO}_4^{-3}$ .

Se ha observado que la actividad enzimática de algunos miembros de esta familia se modifica en presencia de iones pentavalentes, y particularmente, en presencia de  $\text{PO}_4^{-3}$ . De este modo, en RK de *E. coli* la presencia de iones pentavalentes tales como fosfato, arsenato y vanadato, aumentaron la velocidad de la reacción enzimática y la afinidad de la enzima por la D-ribosa (Maj y Gupta, 2001). Algo similar ocurre para la enzima AK, ya que hubo un aumento de las actividades enzimáticas de AK de distintas fuentes, en presencia de fosfato, arsenato y vanadato (Maj y col., 2002). Esto coincide con lo visto por Park y col. (2007), quienes encontraron que el  $\text{PO}_4^{-3}$  tenía un efecto activador tanto en la RK de *H. sapiens* como en la de *E. coli*. Tomando en cuenta este último trabajo, podemos decir que es el único trabajo publicado hasta la fecha donde se ha caracterizado muy preliminarmente a la RK humana. Dicha publicación, apuntó a estudiar la especificidad de sustratos de la enzima, y a comparar los efectos de una serie de activadores e inhibidores sobre las actividades enzimáticas de RK de *H. sapiens* y de *E. coli*. Como resultado, se observó que la  $K_M$  de la RK humana para D-ribosa resultó ser 10 veces más grande que la de RK de *E. coli*, 30 mM vs 0,3 mM, respectivamente, aunque sus  $k_{cat}$  fueron similares. Además, la RK humana presentó inhibición por D-ribosa y por ATP, y la presencia de concentraciones crecientes de  $\text{PO}_4^{-3}$  alteró los valores de  $K_M$  y  $K_i$  para ambos sustratos. A medida que aumentó la concentración de  $\text{PO}_4^{-3}$  los valores de  $K_M$  para ATP y D-ribosa fueron disminuyendo y los de  $K_i$ , aumentando. Por otro lado, el uso de activadores tales como fosfato inorgánico, acetil fosfato y dihidroxiacetona fosfato y el de inhibidores como ácido fosfonoacético y etidronato tuvieron el mismo efecto de activación y de inhibición respectivamente, sobre la RK de *H. sapiens* y de *E. coli* (Park y col.; 2007).

No obstante todo lo mencionado anteriormente, el efecto del  $\text{PO}_4^{-3}$  en la actividad de Pfk-2 de *E. coli* contrasta con lo descrito para RK y AK, ya que al aumentar la concentración de  $\text{PO}_4^{-3}$  hubo una disminución de la actividad enzimática, usando concentraciones saturantes de sustratos (Parducci y col., 2006).

Tomando en consideración todos estos antecedentes, se desprende que dentro de la familia tipo riboquinasa, no existe un único efecto atribuible al  $\text{PO}_4^{-3}$  ya que se han observado efectos opuestos en distintos miembros de esta familia. Por otra parte, y considerando que no se ha estudiado con mucho detalle la activación por  $\text{PO}_4^{-3}$ , ni el rol del  $\text{Mg}^{2+}$  en la actividad de RK y que además, no se ha realizado una caracterización de la RK humana a nivel de efectos de

cationes monovalentes, y divalentes, resultó necesario abordar esto como punto de partida para el estudio de esta enzima.

En este proyecto se planteó como primer punto, caracterizar a la RK de *H. sapiens* mediante el estudio del efecto de cationes monovalentes, divalentes, activación por  $\text{PO}_4^{-3}$ , efecto del  $\text{Mg}^{+2}$ , estabilidad térmica y determinación de pH óptimo. Además, bajo la hipótesis de que los residuos conservados Asn199 y Glu202 del motivo NXXE participan en la catálisis como determinantes de la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  al sitio activo, se reemplazó el residuo Asn199 que tiene una cadena lateral polar sin carga por el residuo Leu, que no tiene polaridad y es del mismo tamaño que Asn. El residuo Glu202 está cargado negativamente, y se reemplazó por Leu, que es apolar y una unidad de carbono más pequeña que Glu. Si estos residuos participan en el correcto posicionamiento de  $\text{PO}_4^{-3}$  y del  $\text{Mg}^{+2}$ , entonces cambios en estos residuos deben tener un gran impacto en la estimulación por  $\text{PO}_4^{-3}$  y en el efecto del  $\text{Mg}^{+2}$  en la RK humana. Por otro lado, para evaluar la importancia del residuo Asp269 del motivo GXGD, se reemplazó este residuo aminoacídico por una Asn, con el fin de eliminar la carga negativa. Al mutarlo por Asn, que tiene una cadena lateral polar sin carga, y tiene el mismo tamaño que Asp, estamos evaluando sólo la importancia de la carga en este residuo, ya que ambos residuos tienen un tamaño similar.

Para estudiar el efecto del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la actividad de la RK humana, se midió la actividad enzimática en condiciones estándar en ausencia de  $\text{PO}_4^{-3}$  y a concentraciones crecientes del ión, tomando como referencia, que en el trabajo de Park y col. (2007), se alcanzó la mayor actividad de RK humana en presencia de  $\text{PO}_4^{-3}$  10 mM. Además, se estudió el efecto del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la afinidad de RK por D-ribosa y MgATP, y la relación entre este efector y la inhibición por sustratos. Se determinaron los siguientes parámetros cinéticos  $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$  y  $K_i$ , tanto para D-ribosa como para MgATP, para la enzima silvestre y las enzimas mutantes RK N199L, RK E202L y N199L.

Con el fin de complementar estos estudios, se trabajó con herramientas bioinformáticas para construir las mutantes de RK silvestre N199L, E202L y D269N *in silico* y evaluar la posición que ocuparía el ión  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro del sitio activo en la RK silvestre como en las mutantes *in silico* mediante una técnica llamada docking (acoplamiento) molecular.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **II.1 Hipótesis.**

Los residuos conservados Asn199 y Glu202 del motivo NXXE, y Asp269 del motivo GXGD, participan en el mecanismo catalítico de la RK humana como determinantes de la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  al sitio activo, y como base catalítica general, respectivamente.

### **II.2 Objetivos generales.**

1. Caracterizar la RK humana y analizar el papel de la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  en su actividad, determinando el papel de los residuos Asn199 y Glu202 del motivo NXXE.
2. Establecer la importancia del residuo Asp269 del motivo GXGD en la catálisis de la RK humana.

### **II.3 Objetivos específicos.**

1. Caracterizar la RK humana mediante el estudio de los efectos de cationes monovalentes y divalentes, activación por  $\text{PO}_4^{-3}$ , efecto del  $\text{Mg}^{+2}$ , efecto de la temperatura y determinación del pH óptimo.
2. Evaluar experimentalmente el papel de los residuos Asn199 y Glu202 en la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  al sitio activo de RK humana haciendo mutagénesis sitio-dirigida de ambos residuos.
3. Evaluar experimentalmente el papel del residuo Asp269 en la catálisis de RK humana, haciendo mutagénesis sitio-dirigida de este residuo.
4. Construir las mutantes de Asn199, Glu202, y Asp269 *in silico*.
5. Determinar la posición que ocupa el  $\text{PO}_4^{-3}$  tanto en la RK humana silvestre como en las mutantes *in silico* mediante docking (acoplamiento) molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$ .

### **III. MATERIALES y METODOLOGÍA.**

#### **III.1 Materiales.**

##### **III.1.1 Reactivos y materiales químicos.**

Acrilamida, bisacrilamida, azul de bromofenol, glicina, N, N, N, N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y el estándar de peso molecular de bajo y amplio rango para realizar las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS se obtuvieron de BIO-RAD Laboratories (CA, E.E.U.U.).

El ácido acético, ácido clorhídrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS), etanol, extracto de levadura, glicerol, D (+)-glucosa monohidratada, hidróxido de sodio,  $\beta$ -mercaptoetanol, metanol, peptona de carne, sulfato de amonio, y tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS) se obtuvieron desde Merck & Co., Inc. (Alemania).

Adenosina-5'-trifosfato (ATP) sal disódica, D-ribosa, agarosa, ampicilina, azul de coomasie, bromuro de etidio, Chelex 100, cloruro de  $Mg^{+2}$ , cloruro de manganeso, cloruro de cobalto, cloruro de cadmio, cloruro de níquel, cloruro de zinc, cloruro de calcio, cloruro de cobre, nicotiamida adenina dinucleótido en forma reducida (NADH), N-(2-hidroximetil) piperazina-N'-ácido2-etanosulfónico (HEPES), se obtuvieron de Sigma Chem. Co., (E.E.U.U.) El antibiótico 6-d-alfa-aminofenilacetoamido-penicilánico ácido sal sódica (Ampicilina) se obtuvo desde USBiological (MA, E.E.U.U.).

Los capilares usados para los ensayos de EPR (tubos capilares de hematocrito), se obtuvieron desde BOECO (Alemania).

##### **III.1.2 Medios de cultivos.**

Se emplearon una serie de medios de cultivos para este trabajo. Se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) que estaba formado por extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1% y triptona 1%, ajustado a pH 7 con NaOH. El medio de cultivo de triptona se obtuvo desde BD (NJ, E.E.U.U.).

Para la preparación de células competentes se usó el medio SOC, el que está formado por extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, glucosa 20 mM, KCL 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 0,5 g/L, y triptona 20 g/L, ajustado a pH 7,0 con NaOH. Para la selección de transformantes, se usó ampicilina (100  $\mu$ g/ml).

### III.1.3 Enzimas.

Para las mediciones de cinética enzimática de la RK, se utilizaron 2 enzimas; la Piruvato quinasa (PK) de músculo de conejo, y la Lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo de conejo. Ambas fueron obtenidas de Sigma Chem. Co. (E.E.U.U.).

Para los trabajos de biología molecular, se utilizó la enzima DNA polimerasa Taq High Fidelity, que fue obtenida desde Invitrogen (CA, E.E.U.U.).

### III.1.4 Partidores para las mutantes de RK de *H. sapiens*.

Para fabricar las mutantes de la RK se diseñaron los partidores (fig. 5), siguiendo los consejos y especificaciones del GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System de Invitrogen. A continuación se muestra cada pareja de partidores para cada una de las mutantes, escritos desde 5' a 3'. El triplete de bases en rojo corresponde al codón del aminoácido reemplazado. Todos los partidores fueron sintetizados por Invitrogen (CA, E.E.U.U.) a través de Bios Chile. En azul se muestra el partidor forward (f) y en verde el reverse (r).

#### Motivo NXXE: N199L y E202L

##### Partidores:

N199L: CUU  $\rightleftharpoons$  L

CAGATGTGTTCTGCTGCCTTGAAGTGAGGCTG Tm: 66 °C

GCAGCAGAACACATCTGAGAGGGTGTAGAAC Tm: 64 °C

##### Partidores:

E202L: CUU  $\rightleftharpoons$  L

GTTCTGCTGCAATGAAAGTCTTGCTGAGATTTAAC Tm: 62 °C

ACTTTCATTGCAGCAGAACACATCTGAGAGG Tm: 62 °C

#### Motivo GXGD: D269N

##### Partidores:

D269N: AAC  $\rightleftharpoons$  N

GATACCACGGGTGCTGGTAACAGCTTTGTGGGAG Tm: 68 °C

ACCAGCACCCGTGGTATCCACAGCCTTGAC Tm: 67 °C

Figura 5. Partidores utilizados para la construcción de las mutantes RK de *H. sapiens*.

### **III.1.5 Sistemas de purificación de productos de PCR y DNA plasmidial.**

Los productos de PCR se purificaron a través del sistema QIAquick PCR purification kit de QIAGEN (E.E.U.U.), mientras que los plásmidos fueron purificados utilizando el sistema plasmid mini kit II, E.Z.N.A., de OMEGA Bio-tek (E.E.U.U.).

Los fragmentos de DNA fueron purificados desde los geles, usando Ultraclean 15, MO BIO (E.E.U.U)

### **III.1.6 Herramientas Bioinformáticas.**

Las estructuras cristalográficas utilizadas se obtuvieron desde el Protein Data Bank. Se utilizó el programa PyMOL Molecular Visualization 1.3 para hacer superposiciones estructurales y alineamientos de secuencia, y para visualizar el sitio activo de las estructuras de la RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD) y de RK humana (PDBid: 2FV7).

Para hacer el acoplamiento molecular de  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la RK humana se utilizó el programa Autodock Vina 1.1.2.

## **III.2 Metodología.**

### **III.2.1 Transformación y expresión de RK de *H. sapiens*.**

La RK de *H. sapiens* estaba clonada en el plasmidio EX-W1395-B01 (con extremo N Terminal de His) adquirido en Genecopeia. Se transformó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , que fue crecida en medio SOC suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Se hizo una segunda transformación dentro de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), que posee en su genoma una copia del gen de la RNA polimerasa T7 inducible por IPTG, la que fue crecida en medio SOC suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

Para obtener bacterias en fase exponencial se inocularon 50 ml de medio LB con una colonia de la cepa BL21 (DE3) transformada con el plásmido EX-W1395-B01 que contiene la RK humana. El medio contenía ampicilina a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  y se incubó durante toda la noche a 37 °C (~ 14 h). Al día siguiente se inoculó al 5 % 1 L de medio LB más ampicilina a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  y se incubó a 37 °C con agitación hasta que el

cultivo alcanzó una absorbancia de 0,5 a 580 nm. Para inducir la expresión de la RK se adicionó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se continuó la incubación a 37 °C por 4 h. Las bacterias inducidas se colectaron por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min en una centrifuga eppendorf 5810 R a 4°C.

### **III.2.2 Purificación de RK de *H. sapiens*.**

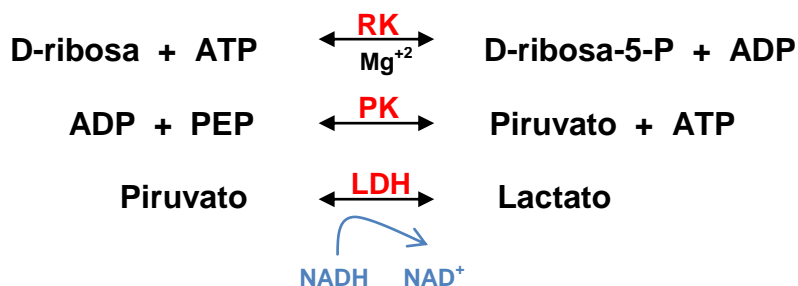
Las bacterias inducidas, colectadas por centrifugación, fueron resuspendidas en 100 ml de amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 7,8. La suspensión de bacterias fue lisada mediante la aplicación de pulsos de 30 s de ultrasonido y 60 s de descanso en hielo. El lisado de bacterias se centrifugó a 9.000 rpm durante 15 min en una centrifuga eppendorf 5810 R a 4°C. El líquido sobrenadante se aplicó sobre una columna de DEAE-celulosa (1,5 cm x 9,5cm) equilibrada en un amortiguador A que tenía: glicerol 5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 0,1 mM, β-mercaptoetanol 15 mM, y PMSF 1 mM. La columna se lavó con 150 ml del mismo amortiguador y se eluyó con 90 ml de un gradiente lineal de 0 a 0,5 M de concentración de KCl en el amortiguador A. Se colectaron fracciones de 1 ml a las que se les midió la actividad de RK. Las fracciones con actividad RK se juntaron en un pool, el que se aplicó sobre una columna HisTrap empacada con níquel sefarosa equilibrada en un amortiguador B que tenía: fosfato de potasio 20 mM, NaCl 0,5 M e imidazol 20 mM, pH 7,4. La columna se lavó con 200 ml del amortiguador B y se eluyó con 50 ml de un gradiente lineal de 20 a 500 mM de imidazol en amortiguador B. El conjunto de las fracciones colectadas que presentaban actividad RK se juntaron en un pool que fue concentrado y dializado contra 1 L de amortiguador Tris 25 mM pH 7,2 y MgCl<sub>2</sub> 2 mM. Finalmente, para determinar la pureza de la RK humana, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.

### **III.2.3 Medición de la actividad enzimática de RK de *H. sapiens* y de PK de *Mus musculus*.**

La actividad enzimática de RK se determinó espectrofotométricamente a 37 °C, basándose en los protocolos de Ogbunude y col., (2007), acoplado la producción de ADP a la oxidación de NADH, mediante el uso de las enzimas auxiliares (PK de

músculo de conejo y LDH de músculo de conejo), según el esquema que se muestra en la figura 6. La RK cataliza la fosforilación de D-ribosa a D-ribosa-5-P, usando D-ribosa y MgATP como sustratos. El ADP que se genera como producto es usado junto al fosfoenolpiruvato en una reacción catalizada por PK para regenerar ATP y el piruvato resultante es convertido a lactato por medio de LDH. En este proceso, el NADH es oxidado a NAD<sup>+</sup>, lo que permite que la velocidad de la reacción se monitoree a 340 nm como un decaimiento en la absorbancia de NADH cuando es convertido a NAD<sup>+</sup>. Una unidad (U) de RK está definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto en condiciones experimentales definidas. La mezcla de reacción tenía amortiguador Tris-HCl a pH 7,2, D-ribosa 0,5 mM, MgATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 125 mM, PEP 0,3 mM, NADH 1 X, PK 0,4 U, y LDH 1,2 U, en un volumen final de 0,7 ml.

En los experimentos cinéticos, las concentraciones de D-ribosa, MgATP y Mg<sup>+2</sup> se variaron según se indica en cada ensayo. La reacción se inició agregando el ATP y la actividad enzimática se midió a 37 °C.



**Figura 6. Ensayo acoplado utilizado para medir la actividad de la RK de *H. sapiens*.** Para el ensayo se necesitaron en la cubeta, 0,5 unidades de PK y 1,2 unidades de LDH.

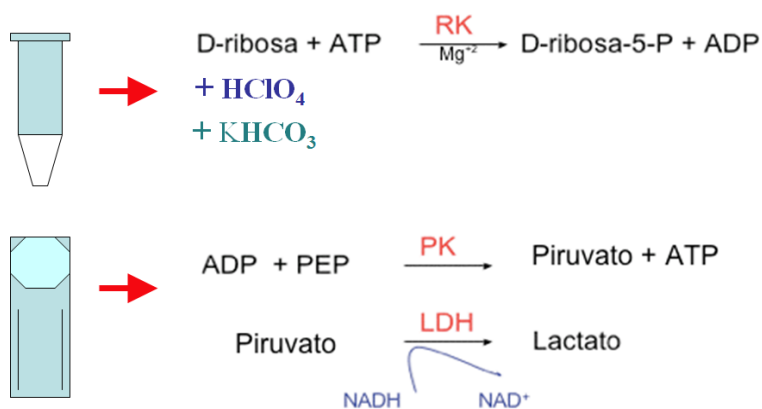
También se hicieron ensayos en los que se midió la actividad de la enzima PK en ausencia de KCl. Esto, ya que se planteó investigar la actividad de la RK humana en presencia y ausencia de KCl, para estudiar el posible efecto activador del ión potasio en la RK de *H. sapiens*. La actividad enzimática de PK se determinó espectrofotométricamente a 37 °C, acoplado la enzima LDH, según el esquema que se muestra en la figura 6. Una unidad (U) de PK está



definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto en condiciones experimentales definidas. La mezcla de reacción tenía amortiguador Tris-HCl 25 mM a pH 7,2, ADP 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, PEP 0,3 mM, NADH 1 X, PK 6,5 U, y LDH 1,2 U, en un volumen final de 0,7 ml. La reacción se inició agregando el ADP y la actividad enzimática se midió a 37 °C.

### III.2.4 Método discontinuo para medir actividad de RK de *H. sapiens*.

Con el objeto de medir la actividad de la RK en presencia de cationes monovalentes ( $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ ) y divalentes ( $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ ) y observar el efecto que ejercerían dichos iones sobre la enzima, dejando de lado el efecto que pudieran tener sobre las enzimas del ensayo acoplado, se utilizó un método discontinuo para medir la actividad riboquinasa (fig. 7).



**Figura 7. Ensayo discontinuo utilizado para medir la actividad de la RK de *H. sapiens*.**

Básicamente, en un tubo eppendorf se llevó a cabo la reacción catalizada por la RK y posteriormente ésta se detuvo agregando  $\text{HClO}_4$  hasta una concentración final de 3%. Después de 5 minutos en hielo, el medio se neutralizó agregando  $\text{KHCO}_3$ , y se centrifugó durante 30

minutos a 4 °C. A continuación se tomó una alícuota del líquido sobrenadante y se agregó a un medio de reacción que contenía todos los reactivos necesarios para medir la actividad de la PK espectrofotométricamente, y se procedió a titular el ADP. Esto permitió que cualquier efector que pudiera modificar la actividad de las enzimas del ensayo acoplado se diluyera muchas veces de manera de no alterar la actividad de ellas.

### **III.2.5 Preparación de células competentes.**

Un pre-inoculo de la cepa DH5 $\alpha$  se incubó durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se inocularon 50 ml del medio LB con 0,5 ml del pre-inoculo y se incubó a 37 °C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,2-0,4 a 550 nm. Una vez que se alcanzó dicho valor de absorbancia el cultivo se incubó en hielo durante 10 min, y se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min a 4 °C en una centrifuga eppendorf 5810 R. El sobrenadante se descartó y el sedimento de bacterias se resuspendió en la mitad de volumen de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril y frío (en hielo). Esta suspensión se dejó en hielo de 20 a 40 min, y se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min a 4°C en una centrifuga eppendorf 5810 R. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió suavemente en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril y frío, incubándose en hielo de 1 a 40 h. En este momento las células se encontraban competentes para la transformación, y fueron almacenadas dispensando 100  $\mu$ l en tubos eppendorf con 2 ml con glicerol al 50% y guardadas a -80 °C.

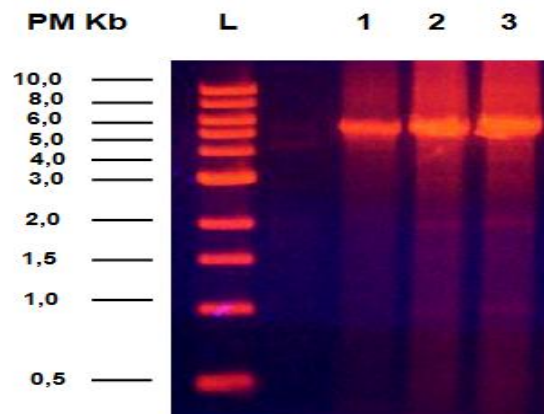
### **III.2.6 Mutagénesis sitio-específica.**

Para fabricar las mutantes se utilizó el kit GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System de Invitrogen. El procedimiento básico utiliza como plantilla el plásmido de doble hebra que contiene el gen silvestre de la RK y como partidores dos oligonucleótidos complementarios,

donde solo uno de ellos posee la mutación deseada. Previo a la mutagénesis el DNA plasmidial se metila por medio de incubación por 1 h a 37 °C con DNA metilasa. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 µl. La mezcla de reacción contenía 10 µl de 10 X High Fidelity PCR Buffer, 1,5 µl de dNTP 10 mM, 1µl de MgSO<sub>4</sub> 50 µM, 3 µl de la pareja de partidores (10 µM cada uno), 2 µl de DNA metilado, 0,2 µl de Platinum® Taq High Fidelity (5U/µl), y 37,3 µl de agua destilada autoclavada. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante el protocolo que se muestra a continuación:

Etapas	T °C	Tiempo	Ciclos
<b>Melting inicial</b>	<b>94</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>Melting</b>	<b>94</b>	<b>1</b>	
<b>Annealing</b>	<b>57</b>	<b>1</b>	<b>20</b>
<b>Extension</b>	<b>68</b>	<b>5</b>	
<b>Extensión Final</b>	<b>68</b>	<b>10</b>	<b>1</b>

Los productos de PCR generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Como puede observarse en la figura 8, aparecen 3 bandas de amplificado de un tamaño cercano a 6 Kb, lo que está de acuerdo con el tamaño esperado, ya que el plasmidio EX-W1395-B01 tiene 5.634 pares de bases.



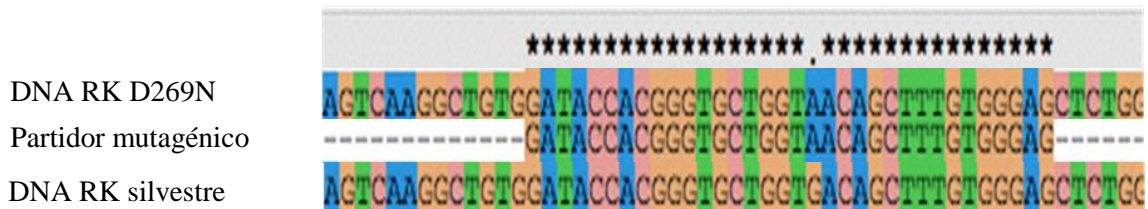
**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las mutantes RK D269N, RK N199L y RK E202L.** Carril L: estándares de peso molecular; cada uno de los carriles del 1 al 3 fue cargado con los productos de PCR para cada las mutantes, en el siguiente orden: Carril 1: RK D269N, carril 2: RK N199L, carril 3: RK E202L. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con solución GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X.

### III.2.7 Secuenciación de las mutantes RK D26N, RK N199L y RK E202L.

Los productos de PCR generados fueron secuenciados con el fin de corroborar la existencia de la mutación propuesta, y la ausencia de mutaciones no deseadas (fig.9).

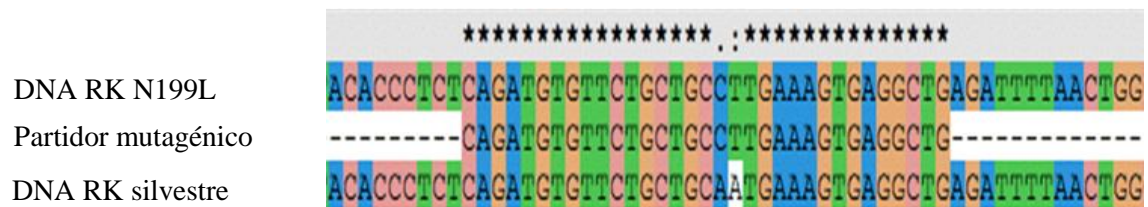
#### • Residuo Asp269 por Asn

Partidor mutagénico 5´-GATACCACGGGTGCTGGT**A**CAGCTTTGTGGGAG-3´



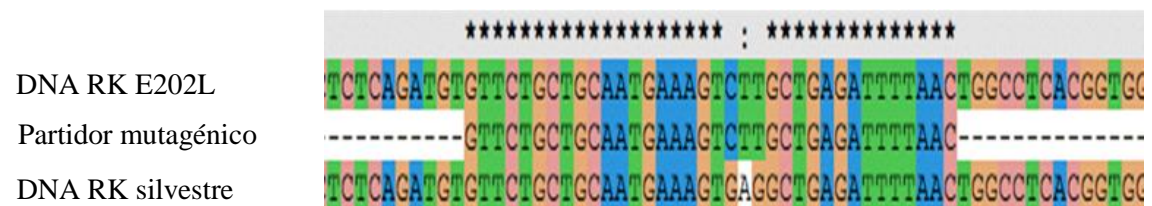
#### • Residuo Asn199 por Leu

Partidor mutagénico 5´-CAGATGTGTTCTGCTGC**CTT**GAAAGTGAGGCTG-3´



#### • Residuo Glu202 por Leu

Partidor mutagénico 5´-GTTCTGCTGCAATGAAAGT**CTT**GCTGAGATTTTAAC-3´



**Figura 9. Alineamiento de las secuencias de los DNA de RK silvestre y de las mutantes RK D269N, RK N199L y RK E202L.** Para cada mutante propuesta se muestra el partidor mutagénico utilizado y en rojo se destaca el triplete donde se inserta la mutación.

### **III.2.8 Determinaciones de estructura secundaria de la RK silvestre, y de las mutantes RK D269N, RK N199L y RK E202L.**

Los espectros de dicroísmo circular fueron determinados en un espectropolarímetro marca JASCO modelo J-815, disponible en el laboratorio del Dr. Richard Garrat, Instituto de Física de Sao Carlos, Universidad de Sao Paulo, Brasil. Se midió en la zona UV-lejano en el intervalo de longitud de onda de 190 a 240 nm, usando una celda con 1 mm de paso óptico, a 37 °C. Las muestras contenían amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y una concentración de proteína de 5 μM. Los espectros son el promedio de 16 barridos, para eliminar el ruido de la señal. Los datos son representados en términos de la elipticidad observada, en unidades de miligrados. Estos se ajustaron usando el programa controlador del instrumento, Spectra Manager, versión 1.53.01 (JASCO Corporation, Japón).

### **III.2.9 Determinación de la afinidad de RK de *H. sapiens* por Mn<sup>+2</sup>.**

La determinación de la afinidad entre Mn<sup>+2</sup> y la proteína se llevó a cabo mediante la técnica de resonancia paramagnética del electrón (EPR). Esta técnica permite cuantificar las especies libres paramagnéticas en solución, en este caso el Mn<sup>+2</sup>. Para realizar estas mediciones se utilizó un espectrómetro EPR Bruker Biospin GmbH modelo EMX 1572, disponible en el laboratorio de la Dra. Carolina Aliaga, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. El instrumento se utilizó en la banda-X en la frecuencia 9,2-9,9 GHz, usando la cavidad estándar TE<sub>102</sub>, que contaba con un puente de microondas de máximo poder. La cavidad en la que se ubicó la muestra estaba termoestabilizada a 310 K (37°C). Los parámetros del equipo fueron ajustados a través del programa WinEPR Acquisition versión 4.33 y los registros fueron obtenidos y procesados mediante el programa Bruker EMX. El cálculo del cambio para cada condición fue llevado a cabo mediante el programa GRAMS.

Para los ensayos se utilizó una solución de 12,4 mg/ml de RK en amortiguador HEPES 25 mM pH 7,8 tratada con la resina Chelex-100 para la eliminación de los metales interferentes en la determinación paramagnética. La concentración total de enzima se varió en cada determinación en un rango de 0-250 μM a una concentración fija de Mn<sup>+2</sup> de 80 μM. El volumen de muestra incluida en el capilar fue de 60 μl, los que se incubaron en la misma cavidad por tres minutos previo a la medición. Cada condición se midió cuatro veces.

La constante de disociación ( $K_d$ ) del complejo proteína-ligando se determina usando los equilibrios para la formación del complejo proteína-ligando. Los equilibrios quedan establecidos de la siguiente manera:



$$K_d = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]}$$

P corresponde a la concentración de proteína libre, L a la concentración de  $Mn^{+2}$  libre y PL a la concentración del complejo proteína- $Mn^{+2}$ . Los resultados encontrados para todas las determinaciones proteína-ligando se ajustaron a la ecuación de Scatchard (Fersht, 1998):

$$v = \frac{n \cdot L}{K_d + L}$$

v corresponde al cociente entre el complejo  $[PL]/[P]$  total, n a la estequiometría, L a la concentración de ligando libre y  $K_D$  a la constante de disociación del complejo proteína-metal. El modelo predice una hipérbola, donde la mitad del cambio corresponde al valor de la  $K_D$  del complejo proteína-metal. Sin embargo, en las mediciones el titulado no es la proteína, sino que el  $Mn^{+2}$ , por lo que para el ajuste de los datos las especies P y L se intercambian de manera que la expresión de Scatchard queda de la siguiente forma:

$$v = \frac{n \cdot P}{K_d + P}$$

v corresponde al cociente entre el complejo  $[PL]/[Mn^{+2}]$  total, n a la estequiometría, P a la concentración de enzima libre y  $K_D$  a la constante de disociación del complejo proteína-metal. El ajuste de los datos obtenidos se realizó usando el programa Sigma-Plot 10.0 (Systat Software, Inc.).

### **III.2.10 Determinación de la concentración de proteínas.**

La determinación de la concentración de proteínas se hizo utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), usando BSA como proteína patrón.

### **III.2.11 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes.**

Se utilizaron geles de acrilamida-bisacrilamida al 12%. El gel concentrador contuvo 0,4 M Tris-HCl pH 6,8 % acrilamida/bis-acrilamida, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio (PSA) y 10  $\mu$ l de TEMED, mientras que el gel separador incluía 0,4 M Tris-HCl pH 8,8, 15% acrilamida/bis-acrilamida, 0,1% SDS, 0,1% PSA y 20  $\mu$ l de TEMED. Las muestras se cargaron en conjunto con un estándar de peso molecular de bajo rango. Se aplicó un campo eléctrico a voltaje constante de 80 voltios. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron con ácido acético al 10%.

## **IV. RESULTADOS.**

### **IV.1 Identificación de las posiciones de los residuos Asn y Glu del motivo NXXE y del residuo Asp del motivo GXGD, en la RK de *H. sapiens*.**

Para el desarrollo de este proyecto fue necesario estudiar cuán conservados estaban los motivos NXXE y GXGD en la RK de *H. sapiens*, e identificar las posiciones de los residuos Asn y Glu que forman parte del motivo NXXE, y la posición del residuo Asp que forma parte del motivo GXGD. Mediante un alineamiento de secuencias por superposición estructural de los miembros de la familia tipo riboquinasa, determinamos que los residuos Asn y Glu que forman parte del motivo NXXE en la RK de *H. sapiens*, estaban en las posiciones 199 y 202, respectivamente, muy similar a las posiciones que ocupan en la RK de *E. coli* (Asn187 y Glu190). Asimismo, mientras en la RK de *E. coli* el residuo Asp que forma parte del motivo GXGD está en la posición 255, en la RK humana se encuentra en la posición 269 (fig. 4).

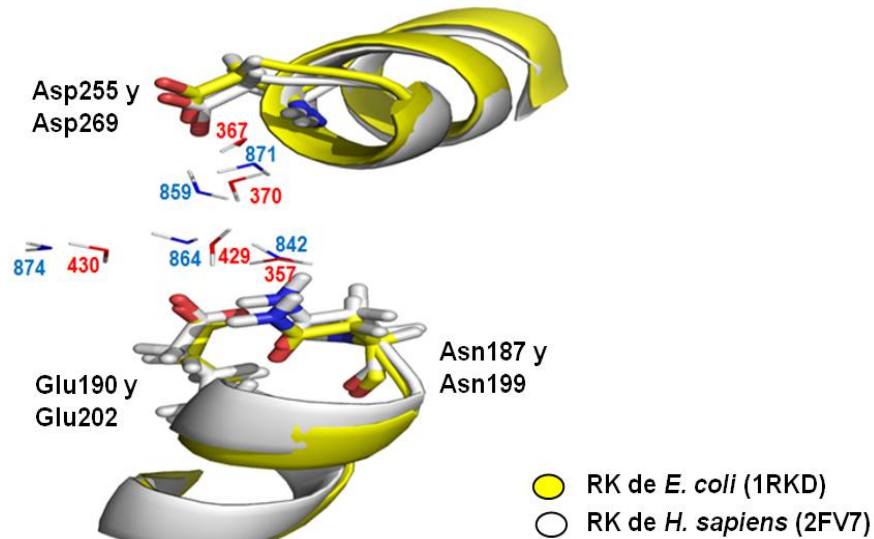
En base a esto, y a la similitud espacial que tienen los sitios activos de la RK humana y la RK bacteriana, se infirió que era muy probable que el  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece como ligando en la estructura resuelta para la RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD) ocupara el mismo sitio dentro del sitio activo de la RK humana, y que los contactos existentes entre este ión y los residuos Asn187 y Glu190, se replicaran entre el  $\text{PO}_4^{-3}$  y los residuos Asn199 y Glu202 en la RK de *H. sapiens*.

### **IV.2 Aguas estructurales conservadas e interacciones entre el $\text{PO}_4^{-3}$ y el $\text{Mg}^{+2}$ y el motivo NXXE en la RK de *E. coli* y en la RK de *H. sapiens*.**

#### **IV.2.1 Aguas estructurales conservadas.**

Se utilizaron las estructuras 1RKD de RK de *E. coli*, y 2FV7 de RK de *H. sapiens* para analizar las posiciones de moléculas de agua conservadas y para estudiar las interacciones que se podían generar entre el motivo NXXE y los iones  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . Para visualizar los sitios activos tanto de la RK humana como de la RK bacteriana, se utilizó el programa PyMOL. Como se mencionó en el punto anterior, ambas RK tienen una gran identidad estructural, lo que dio pie para pensar que si los sitios activos eran tan similares, entonces era posible que las interacciones entre residuos y ligandos que se generaban en la RK bacteriana, también se repitieran en la RK humana, y que estas interacciones podían estar mediadas por moléculas de agua.





**Figura 10. Superposición entre la estructura de la RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD) y la estructura de la RK de *H. sapiens* (PDBid: 2FV7). Conservación de las aguas dentro de los sitios activos.** La superposición entre ambas estructuras de RK muestra que cada una de ellas posee 5 moléculas de agua que tienen una posición conservada dentro del sitio activo. Esta superposición fue realizada utilizando el programa PyMOL. Las moléculas de agua provenientes de la cristalización de la RK bacteriana (PDBid: 1RKD) se muestran con el átomo de oxígeno en rojo, mientras que las provenientes de la cristalización de la RK humana (PDBid: 2FV7) se muestran con el átomo de oxígeno en azul. Para cada uno de los residuos de Asn y de Glu, se muestran en rojo los átomos de oxígeno, y en azul, los de nitrógeno.

Como se puede apreciar en la figura 10, la superposición entre la estructura de la RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD) y la estructura de la RK de *H. sapiens* (PDBid: 2FV7) estableció que dentro de los sitios activos de ambas enzimas hay cinco moléculas de agua conservadas que ocupan una posición idéntica. Las moléculas de agua provenientes de la estructura 1RKD de RK de *E. coli* (367, 429, 430, 357 y 370) se muestran con el átomo de oxígeno en color rojo, mientras que las provenientes de la estructura 2FV7 de la RK de *H. sapiens* (842, 859, 864, 874 y 871) se muestran con el átomo de oxígeno en color azul. La ubicación que tienen estas aguas dentro del sitio activo no es para nada trivial, ya que estarían cumpliendo un rol esencial para la interacción entre los residuos Asn y Glu del motivo NXXE con los iones  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ .

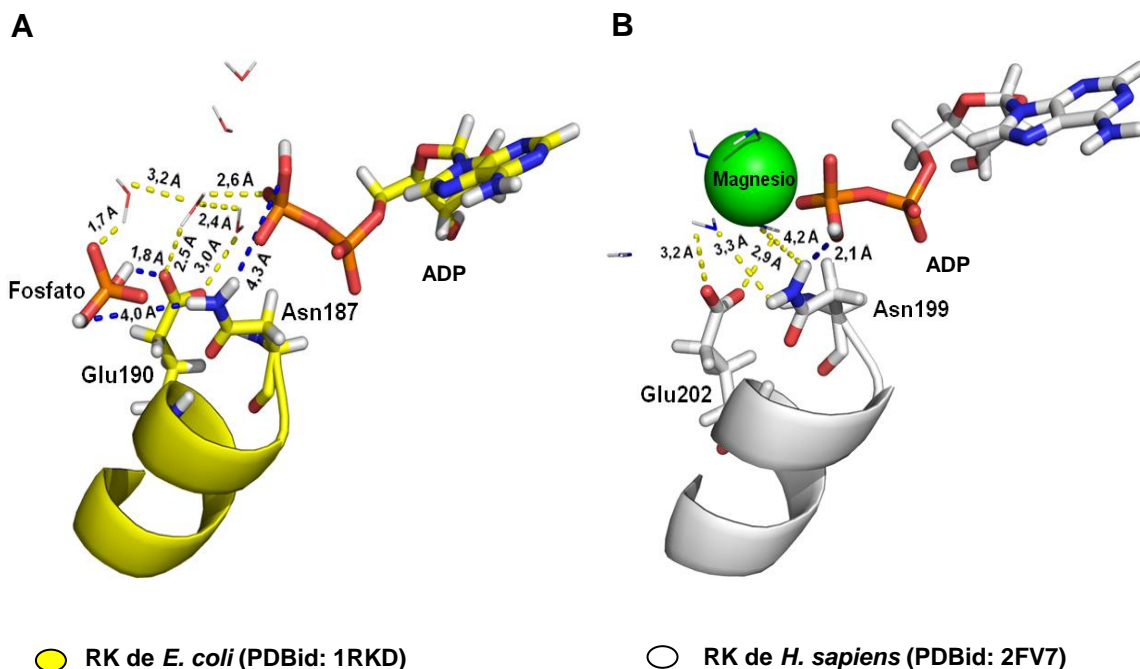
#### IV.2.2 Interacciones entre el $\text{PO}_4^{-3}$ , el $\text{Mg}^{+2}$ y el motivo NXXE en la RK de *H. sapiens*.

Una vez que se demostró que existían aguas estructurales conservadas dentro de los sitios activos de la RK de *E. coli* y de la RK de *H. sapiens*, se hizo un análisis de las interacciones existentes entre los residuos Asn y Glu del motivo NXXE, con los iones  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . Para este estudio se utilizó la estructura 1RKD de RK de *E. coli* y la estructura 2FV7 de RK de *H. sapiens*. La estructura 1RKD de RK de *E. coli* posee tres ligandos en su sitio activo, ADP, D-ribosa y  $\text{PO}_4^{-3}$ , y vale la pena recordar que aunque la mezcla de cristalización para dicha estructura incluía originalmente al análogo de ATP AMP-PNP, sólo se observó un dinucleótido unido en el sitio activo de la RK bacteriana. Los autores señalan que al no haber densidad electrónica detectable para el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$  del análogo de ATP (AMP-PNP), y al apreciarse moléculas de agua en el espacio que debería ocupar el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$ , suponen que el AMP-PNP debe haberse hidrolizado para formar AMP-PN o ADP, y que al no ser capaces de distinguir entre ambas especies, el modelo utilizado trata al nucleótido análogo como ADP. Por lo tanto, se ha señalado que el  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece dentro del sitio activo de la estructura 1RKD de RK de *E. coli* no debería corresponder al  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$  del ATP, sugiriéndose que podría tener un rol regulador (Sigrell y col., 1998, Maj y col., 2002).

Por otro lado, la estructura de la RK de *H. sapiens* (PDBid: 2FV7) posee dos ligandos en su sitio activo, ADP y  $\text{Mg}^{+2}$ , y un ión  $\text{Na}^+$  que se ubica cerca del sitio activo. Dado que resultaba imposible estudiar cómo sería la interacción del motivo NXXE de la RK humana con ambos iones ( $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ) simultáneamente, ya que hasta la fecha no existe ninguna estructura de RK (ni de la familia tipo riboquinasa) que haya sido resuelta con  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  como ligandos, se decidió parcelar el análisis. Por un lado, se analizó la estructura 1RKD de RK de *E. coli* y se estudiaron las interacciones del motivo NXXE con el ión  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece como ligando en su sitio activo, y por otro, usando la estructura 2FV7 de RK de *H. sapiens* se estudiaron las interacciones del motivo NXXE con el  $\text{Mg}^{+2}$  que aparece como ligando en su sitio activo.

Lo que se observó en la estructura 1RKD de la RK de *E. coli* fue que el ión  $\text{PO}_4^{-3}$  era capaz de interactuar con los residuos Asn187 y Glu190 del motivo NXXE mediante la formación de puentes de hidrógeno (fig.11 A). Según puede apreciarse, el grupo amino de la cadena lateral del residuo Asn187 está a una distancia apropiada (4,0 Å) del átomo de oxígeno O2 del ión  $\text{PO}_4^{-3}$ , como para considerar la posibilidad de que ambos interaccionaran directamente a través de un puente de hidrógeno. Por otro lado, el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo Glu190 podría interactuar directamente con el átomo de oxígeno O1 del ión  $\text{PO}_4^{-3}$ , que se

encontraría protonado, formando un puente de hidrógeno, ya que están muy cercanos (1,8 Å). Además, este residuo podría interactuar indirectamente con el átomo de oxígeno O4 del ión  $\text{PO}_4^{-3}$ , a través de dos moléculas de agua (429 y 430).



**Figura 11. Interacción entre el motivo NXXE y los iones  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , y el ATP.** **A.** Los residuos de Asn187 y Glu190 del motivo NXXE de la RK de *E. coli*, forman puentes de hidrógeno con el ión  $\text{PO}_4^{-3}$ , de manera directa y a través de moléculas de agua conservadas. Además, el residuo Asn187 interactúa con un oxígeno del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  del análogo de ATP **B.** El residuo Glu202 del motivo NXXE en la RK de *H. sapiens* interactúa con dos aguas coordinadas con el  $\text{Mg}^{+2}$ , lo que permitiría la interacción de este residuo con el ión, por medio de puentes de hidrógeno. Por otro lado, el residuo Asn199 interactúa con un oxígeno del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  del análogo de ADP. Los sitios activos de ambas RK fueron estudiados con el programa PyMOL. Para cada uno de los residuos de Asn y de Glu, en rojo se muestran los átomos de oxígeno, y en azul, los de nitrógeno.

Otro aspecto a destacar, y deducible del análisis de la estructura 1RKD de RK de *E. coli* son las interacciones generadas entre los residuos Asn187 y Glu190 del motivo NXXE con el ADP (fig. 11 A). En este caso, el grupo amino de la cadena lateral del residuo Asn187 podría formar un puente de hidrógeno con el átomo O1 del  $\text{PO}_4^{-3}$  del ADP, ya que están a una distancia de 4,3 Å. Esto nos estaría indicando que tanto el residuo Asn187 como el residuo Glu190 del motivo NXXE deberían

ser importantes en la estabilización del  $\text{PO}_4^{-3}$  y del ATP dentro del sitio activo de la RK bacteriana, y estaría entregándole una gran relevancia a la presencia de moléculas de agua conservadas, ya que ellas serían necesarias para mediar las interacciones entre ligandos y residuos.

Por último, también se ha señalado que la cadena lateral del residuo Glu190 podría formar un puente de hidrógeno con el nitrógeno de la cadena principal del residuo Asn187 lo que ayudaría a estabilizar al ADP (Sigrell et al., 1997).

Dado que la superposición entre la estructuras 1RKD de RK de *E. coli* y 2FV7 de RK de *H. sapiens* realizada en nuestro laboratorio, mostró que existe una gran identidad estructural entre ambas enzimas (sitios activos idénticos), y que los residuos del motivo NXXE estaban muy conservados, pensamos que era muy probable que en la RK humana el ión  $\text{PO}_4^{-3}$  se ubicase dentro del sitio activo, en un lugar similar al que ocupa en la estructura de RK de *E. coli*, y que además, pudiera formar contactos cercanos con los residuos Asn y Glu del motivo NXXE, ubicados en las posiciones 199 y 202, respectivamente.

En base a esto, se utilizó la estructura 2FV7 de RK de *H. sapiens* para evaluar las interacciones que podrían generarse entre los residuos Asn199 y Glu202 del motivo NXXE de la RK humana con el ión  $\text{Mg}^{+2}$ . Lo que se observó fue que el ión  $\text{Mg}^{+2}$  aparece dentro del sitio activo de la enzima lo suficientemente cerca del motivo NXXE como para poder formar interacciones con los residuos Asn y Glu (fig. 11 B). Según puede apreciarse, el ión  $\text{Mg}^{+2}$  está coordinado por 5 moléculas de agua. El grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo Glu202 podría interactuar indirectamente con el ión  $\text{Mg}^{+2}$ , formando dos puentes de hidrógeno, mediados por dos moléculas de agua (864 y 842). Esto, considerando que las distancias entre dicho residuo y ambas moléculas de agua, son 3,2 Å y 2,9 Å, respectivamente, y que las distancias entre las moléculas de agua 864 y 842 y el ión  $\text{Mg}^{+2}$ , son de 2,5 Å y 2,7 Å, respectivamente. Por otro lado, la distancia entre el residuo Asn199 y las moléculas de agua 864 y 842, ha sugerido que podrían generarse interacciones por puentes de hidrógeno, que mediaran la interacción entre ese residuo y el ión  $\text{Mg}^{+2}$ . El grupo  $\text{NH}_2$  de este residuo está a 3,3 Å de la molécula de agua 864 y a 4,2 Å de la molécula de agua 842, lo que eleva la posibilidad de interacción entre el residuo Asn199 y dichas moléculas de agua.

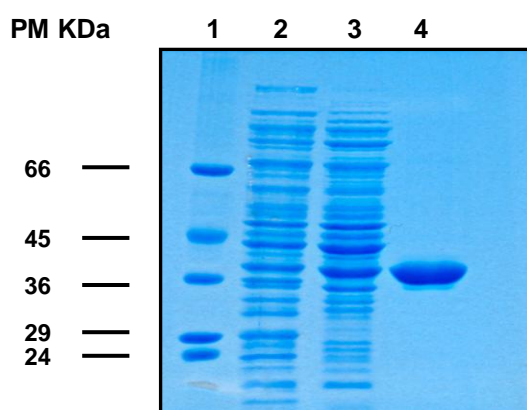
Considerando que la estructura 2FV7 de RK de *H. sapiens* también tiene como ligando al ADP, se estudiaron las interacciones que se podrían generar entre los residuos Asn199 y Glu202 del motivo NXXE de la RK humana con el nucleótido. De esta manera, se observó que el residuo Asn199 sería capaz de formar una interacción por puente de hidrógeno con el O1 del  $\text{PO}_4^{-3}$  β del

ADP, ya que están a una distancia de 2,1 Å. Todo esto estaría indicando que los residuos Asn199 y Glu202 del motivo NXXE en la RK humana deberían ser importantes en la estabilización del ión  $Mg^{+2}$  y del ATP dentro del sitio activo, lo que redundaría en la importancia de la conservación de aguas dentro del sitio activo, ya que ellas cumplirían con la función de mediar la interacción entre los residuos Asn y Glu del motivo NXXE con los iones  $PO_4^{-3}$  y  $Mg^{+2}$ , y con el ATP.

### IV.3 Expresión y purificación de la RK silvestre.

La expresión y purificación de la RK humana, se llevó a cabo según lo referido anteriormente en materiales y metodología. Para determinar cuán pura se encontraba la RK humana, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (fig.12). Según se puede observar en el carril 4, la RK humana se encuentra pura, y aparece con una masa cercana a los 36 kDa, lo que está de acuerdo con lo esperado, ya que cada monómero de la RK pesa 33 kDa (Sigrell y col., 1997).

Según se puede observar en la tabla 1, el rendimiento de la purificación fue discreto (18%), pero suficiente como para tener una cantidad de proteína óptima (1,92 mg totales) que permitiera la caracterización cinética de la enzima silvestre.



**Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalantes de RK de *H. sapiens*.** Carril 1: estándares de peso molecular; carril 2: extracto crudo; carril 3: pool a partir del eluido de la columna de DEAE celulosa; carril 4: pool a partir del eluido de la columna His Trap. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomasie. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína por carril.

**Tabla 1. Tabla de purificación de la RK silvestre.**

<b>Fración</b>	<b>Actividad (U/ml)</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Actividad total (U)</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>*A.E. (U/mg)</b>	<b>Purificación (veces)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
Extracto crudo	13,5	40	540	8,1	324	1,7	1	100
DEAE	5,9	30	177	2,5	73,8	2,36	1,4	33
His trap	83,5	1,2	100	1,6	1,92	52,2	31	18,5

\*A.E. = Actividad Específica

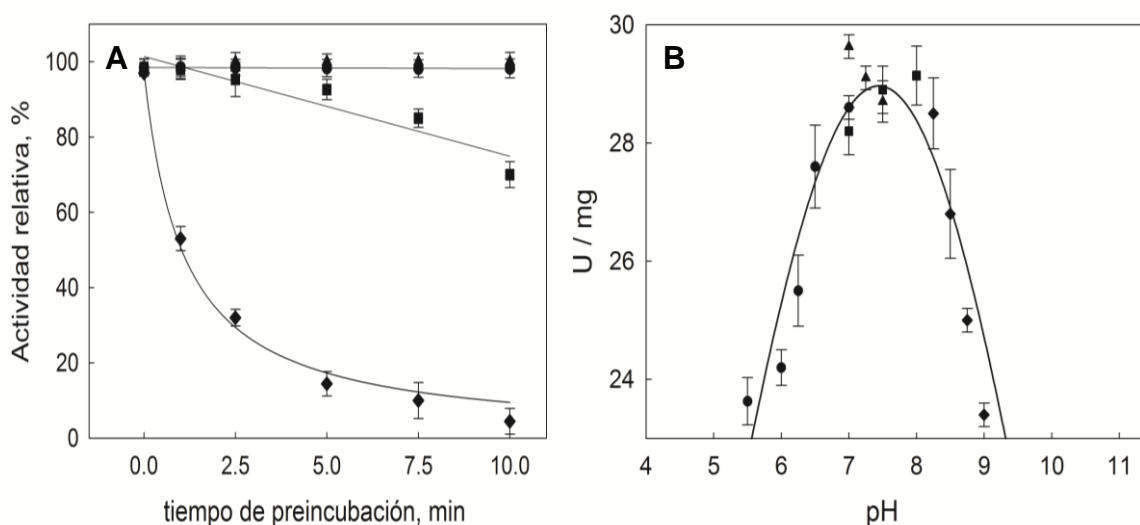
#### **IV.4 Caracterización de la RK silvestre.**

##### **IV.4.1 Estabilidad térmica y determinación del pH óptimo de la RK silvestre.**

Existen muy pocos estudios que tengan relación con la temperatura y la actividad enzimática de RK. Cabe señalar que hay una publicación en la que se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en la RK de *E. coli*, y otra en la que se evaluó la estabilidad térmica de la RK de hígado de ternero. El efecto de la temperatura sobre la actividad de RK de *E. coli* se estudió en un rango de temperaturas que fueron desde 25 °C a 75 °C, donde la enzima mostró su mayor actividad en el rango entre 30 °C a 50 °C. Al subir la temperatura de 50 °C hasta 60 °C, se observó una brusca caída de la actividad, lo que los autores atribuyen a la desnaturalización de la enzima (Chuvikovsky y col., 2006). Por otro lado, la estabilidad térmica de la RK de hígado de ternero se estudió preincubando la enzima durante cinco minutos a 60 °C, con el resultado de que la enzima perdió toda su actividad (Agranoff y Brady, 1956). Con respecto al pH, se ha estudiado la actividad de la enzima entre valores de pH 6,0 y 9,0, observándose que la mayor actividad para la RK de *E. coli* está en el rango de pH que va entre 8,0 y 9,0 (Chuvikovsky y col., 2006). Sin embargo, para la RK de hígado de ternero su máxima actividad se logró entre los pH 7,1 y 7,8 (Agranoff y Brady, 1956).

Con respecto a la RK humana, no existen publicaciones donde se haya estudiado la estabilidad térmica de la enzima, ni tampoco se sabe cuál es su pH óptimo, razón por la cual nos enfocamos al

estudio de estos dos aspectos. Para determinar la estabilidad térmica de la RK humana, se utilizó a la enzima pura, y se hicieron ensayos que consistieron en preincubar la enzima a distintas temperaturas durante distintos tiempos, para luego medir la actividad enzimática a 37 °C, utilizando el método espectrofotométrico, tal y como se describe en materiales y metodología. La preincubación se realizó en ausencia de ligandos, y lo que se puede observar es que la preincubación a 20 °C y 37 °C no afectó a la actividad de la enzima, ya que la actividad medida se mantuvo dentro del 100%, mientras que la preincubación a 60 °C y 80 °C sí lo hizo.



**Figura 13. Estabilidad térmica de la RK de *H. sapiens* y determinación de su pH óptimo.**

**A.** Para la determinación de la estabilidad térmica de la RK humana se preincubó la enzima a distintos tiempos y temperaturas, y posteriormente se midió la actividad enzimática a 37 °C. Las temperaturas de preincubación fueron (●) preincubación a 20 °C; (▲) preincubación a 37 °C; (■) preincubación a 37 °C y (◆) preincubación a 80 °C. **B.** Para la determinación del pH óptimo, se utilizaron cuatro amortiguadores distintos y la actividad se midió a 37 °C. Los amortiguadores utilizados fueron (◆) GLY-GLY; (▲) TRIS-HCl, (●) PIPES, y (■) HEPES. Cada punto de los gráficos A y B representan el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

La preincubación a 60 °C durante 2,5 minutos produjo una leve caída en la actividad medida, y la extensión de dicha preincubación durante 10 minutos llevó a que la actividad enzimática decayera cerca del 30 %. Un efecto aún más importante se puede apreciar cuando la RK

fue preincubada a 80 °C, ya que después de un minuto de preincubación se produjo una caída de cerca del 50% de la actividad, mientras que a los 10 minutos de preincubación se perdió casi el 100% de la actividad (fig. 13 A). Todo esto indica que la RK humana tiene una estabilidad térmica dentro de un rango de temperaturas que es coherente con su naturaleza mesófila.

Por otro lado, la determinación del pH óptimo se hizo midiendo la actividad enzimática en presencia de distintos amortiguadores y a distintos pH. Se utilizaron los amortiguadores PIPES, HEPES, TRIS-HCl y GLY-GLY, y la actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 37 °C, tal y como se describe en materiales y metodología. La curva que aparece en la figura 13 B muestra que el pH óptimo de la RK humana fue cercano a 7,2, lo que concuerda con lo publicado para la RK de hígado de ternero ya que la máxima actividad enzimática se logra entre los pH 7,1 y 7,8 (Agranoff y Brady, 1956), mientras que para la RK de *E. coli*, la mayor actividad medida se obtuvo en el rango de pH que va entre 8,0 y 9,0 (Chuvikovsky y col., 2006).

#### **IV.4.2 Efecto de KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sobre las enzimas del ensayo acoplado (PK y LDH).**

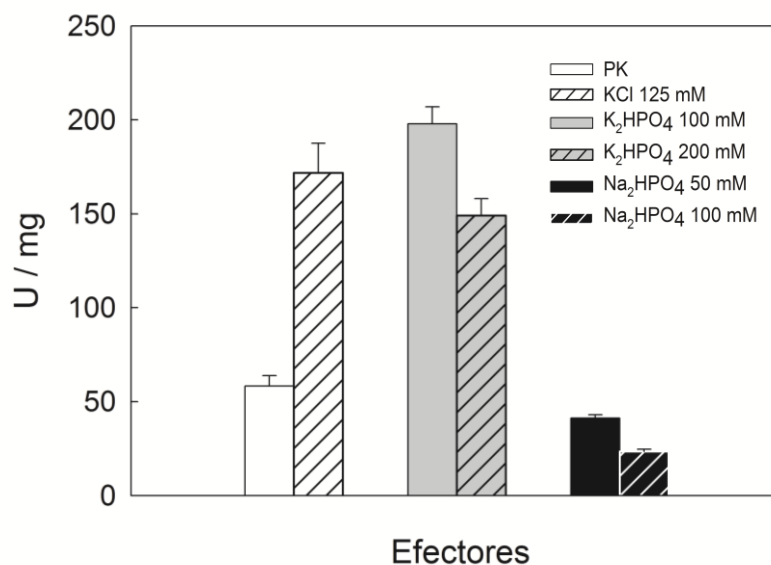
Con el objeto de estudiar el efecto que tenían el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y otros efectores como el KCl y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sobre la actividad de la RK, previamente se realizó un control donde se determinó la actividad de la PK en presencia de dichos efectores. Considerando que la PK y la LDH se utilizan en el ensayo acoplado para medir la actividad de la RK, era oportuno descartar la posibilidad de que estos efectores disminuyeran la actividad de alguna de estas enzimas. Mientras que para la PK se ha señalado que su actividad puede modificarse por acción del K<sup>+</sup> y del Mg<sup>+2</sup>, activándola, para la LDH no existe dicha información. Por lo tanto, lo óptimo era que tanto el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, el KCl, y el Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no tuvieran ningún efecto sobre las enzimas del ensayo acoplado, o bien, que activaran. Por el contrario, si alguno de ellos disminuía la actividad enzimática del ensayo acoplado, significaba un problema. La actividad de la enzima se midió tal y como se describe en materiales y metodología, utilizando 6,5 U de PK en la cubeta, considerando la ausencia de KCl en el medio de reacción.

Como se puede observar en la figura 14, al medir la actividad de la PK en presencia de KCl 125 mM se produjo un gran incremento en la actividad enzimática, si se compara con la condición en



ausencia de KCl, lo que está en concordancia con lo que se ha descrito, ya que el KCl es un potente activador de la PK (Ramírez-Silva y Oria-Hernández, 2003). La mayor activación de la PK se logró en presencia de  $K_2HPO_4$  100 mM, siendo esta activación mayor que la lograda con KCl 125 mM, y con  $K_2HPO_4$  50 mM (no se muestra). Al utilizar  $K_2HPO_4$  200 mM se produjo una disminución de la actividad enzimática, en comparación a lo visto con 100 mM de ese efector. Por último al evaluar el efecto de  $Na_2HPO_4$  a 50 mM y 100 mM, se observó una gran disminución de la actividad enzimática, en comparación a la actividad medida en ausencia de efectores.

Los resultados obtenidos en este ensayo permitieron que tomáramos la decisión de que para todos los experimentos de medición de la actividad de RK en presencia de  $K_2HPO_4$ , la máxima concentración de  $K_2HPO_4$  a utilizar iba a ser 100 mM y que para determinar el efecto del  $Na_2HPO_4$  sobre la RK sería necesario buscar otra metodología en la que no se afectara la actividad de las enzimas del ensayo acoplado. Una solución para resolver esta y otras interrogantes, fue utilizar un ensayo discontinuo para medir la actividad de la RK humana, ensayo que se detalla en materiales y metodología



**Figura 14. Efecto de KCl,  $K_2HPO_4$  y  $Na_2HPO_4$  sobre la actividad de PK.** Las concentraciones de KCl utilizadas fueron 0 mM y 125 mM. Las concentraciones  $K_2HPO_4$  utilizadas fueron 100 mM y 200 mM y de  $Na_2HPO_4$  fueron 50 mM y 100 mM. Cada una de las barras en el gráfico representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

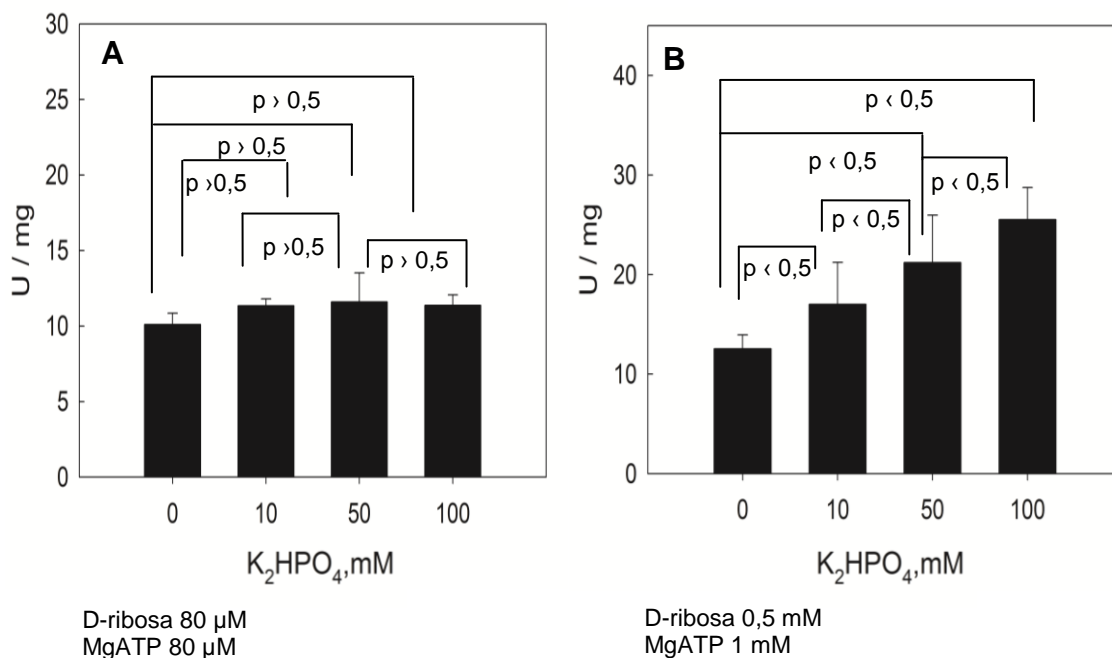
#### IV.4.3 Efecto del $\text{PO}_4^{-3}$ sobre los parámetros cinéticos de la RK silvestre.

Con el propósito de determinar el efecto que tenía el  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la actividad de la RK humana, se realizaron experimentos en los que se midió la actividad enzimática de la RK en presencia de distintas concentraciones de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . En primer lugar se hizo un ensayo preliminar en el que se midió la actividad de la enzima utilizando concentraciones subsaturantes de ambos sustratos en ausencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y en presencia de concentraciones de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  iguales a 10, 50 y 100 mM (fig. 15). La máxima concentración de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ensayada fue 100 mM, dado que concentraciones superiores interferían con la medición, tal como se explicó anteriormente.

Como se puede observar en la figura 15 A, comenzamos el estudio del efecto del  $\text{PO}_4^{-3}$  haciendo ensayos preliminares a concentraciones subsaturantes de ambos sustratos (0,7 veces  $K_M$ ), y lo que se observó bajo estas condiciones, fue que la enzima presentó actividad en ausencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y que la presencia de este efector no modificó de manera alguna la actividad de la RK humana. En ausencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , la actividad específica de RK fue de casi 10 U/mg, y al ensayar con concentraciones de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM, 50 mM y 100 mM, se obtuvo una actividad específica cercana a 11,5 U/mg.

Las pequeñas diferencias entre las actividades de RK determinadas en ausencia y en presencia de todas las concentraciones de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ensayadas, no fueron estadísticamente significativas. Por otro lado, al utilizar concentraciones de MgATP 1 mM (9 veces la  $K_M$ ) y D-ribosa 0,5 mM (4,2 veces la  $K_M$ ), la RK presentó actividad en ausencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y se produjo una activación que aumentó a medida que se incrementó la concentración de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , determinándose la mayor actividad en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  100 mM (fig.15B). La actividad de RK en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM, fue 1,5 veces mayor que la actividad de la enzima en ausencia del activador, y la actividad de RK en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  100 mM, fue 1,7 veces mayor que la actividad de la enzima en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM, y 1,3 veces mayor que la actividad de la enzima en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM. Si comparamos la condición en la que se midió la actividad de la enzima en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  100 mM, con la condición en la que se midió la actividad en ausencia del efector, la presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  hizo que la actividad enzimática aumentara más de 2 veces.

Al comparar los valores entre las actividades de RK en ausencia de  $K_2HPO_4$  y en su presencia, se observa que todas las diferencias de actividad fueron estadísticamente significativas. Esto indicaría que bajo estas concentraciones de sustratos, el  $K_2HPO_4$  tendría un rol activador importante en la RK humana, a diferencia de lo visto en condiciones donde las concentraciones de D-ribosa y MgATP fueron 0,7 veces  $K_M$ , ya que la actividad enzimática no varió al haber un incremento en la concentración del efector.



**Figura 15. Efecto del  $K_2HPO_4$  sobre la actividad de RK silvestre a distintas concentraciones de D-ribosa y MgATP.** Las concentraciones de  $K_2HPO_4$  utilizadas fueron: 0 mM , 10 mM, 50 mM y 100 mM. Tanto en (A) como en (B) la concentración de  $Mg^{+2}$  libre fue de 2 mM. Cada una de las barras en los gráficos representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

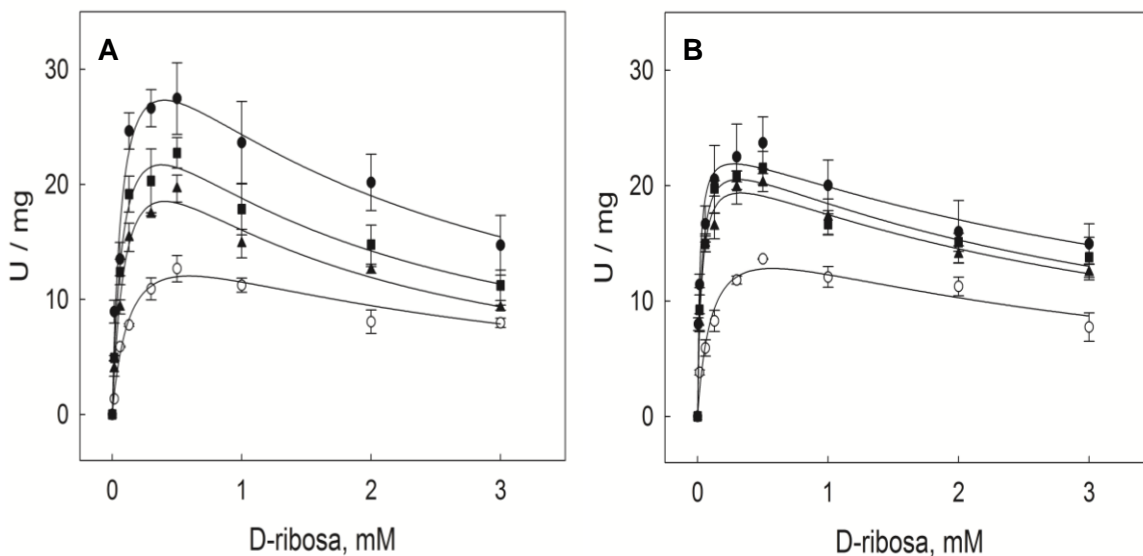
Por último, es necesario señalar que en los ensayos mostrados en la figura 15, tanto en A como en B se utilizó la misma concentración de  $Mg^{+2}$  libre, igual a 2 mM, lo que descarta que las diferencias vistas se hayan debido a alguna diferencia en la concentración del metal libre.

#### **IV.4.4 Caracterización cinética de la RK silvestre en función de la D-ribosa y del MgATP, y efecto del $K_2HPO_4$ sobre los parámetros cinéticos.**

Se caracterizó cinéticamente a la RK humana. La finalidad de estos ensayos fue determinar de qué manera el  $K_2HPO_4$  ejercía su efecto activador sobre la RK humana. Para este estudio se determinaron las siguientes constantes cinéticas: constante de Michaelis ( $K_M$ ), constante catalítica ( $k_{cat}$ ), eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) y constante de inhibición ( $K_i$ ) para ambos sustratos, como consecuencia de las distintas concentraciones de  $K_2HPO_4$ . La actividad de la enzima se midió tal y como se describe en materiales y metodología.

Para caracterizar a la RK silvestre en función de la D-ribosa y evaluar los efectos del  $K_2HPO_4$  sobre los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $k_{cat}$ , se utilizaron 2 concentraciones fijas del nucleótido: MgATP 0,5 mM y MgATP 5 mM. Según se demuestra más adelante, la RK tiene inhibición por concentraciones de MgATP superiores a 1 mM, por lo tanto al realizar ensayos con dos concentraciones distintas de MgATP, 0,5 mM y 5 mM, quisimos evaluar si este aspecto influía sobre los valores de los parámetros cinéticos determinados en este ensayo. El MgATP se fijó en 0,5 mM para observar que ocurría a una concentración superior a la  $K_M$  para MgATP, cercana a 0,16 mM, que no eran ni inhibitorias ni saturante, y por otro lado, el MgATP se fijó en 5 mM porque dicha concentración era saturante para la RK y estaba en el rango inhibitorio según se muestra en la figura 17. Los ensayos se realizaron en ausencia de  $K_2HPO_4$  y en presencia de concentraciones de  $K_2HPO_4$  iguales a 25, 50 y 100 mM.

Según se puede observar en la figura 16, al medir la actividad enzimática de RK a distintas concentraciones de  $K_2HPO_4$ , fijando la concentración de MgATP en 0,5 mM (A) y 5 mM (B), y la de  $Mg^{+2}$  libre en 2 mM en todos los ensayos, la RK mostró actividad en ausencia del efector y la presencia de  $K_2HPO_4$  produjo un aumento en la actividad de RK. Sin embargo, al ensayar con concentraciones de D-ribosa superiores a 0,5 mM, la enzima presentó inhibición. Esto último está de acuerdo con lo publicado por Park y col., (2007), quienes observaron que a una concentración fija de MgATP 5 mM y  $Mg^{+2}$  libre 2 mM, la RK humana se inhibía en presencia de concentraciones de D-ribosa superiores a 0,5 mM.



**Figura 16. Efecto del  $K_2HPO_4$  sobre la actividad de la RK silvestre variando la concentración de D-ribosa.** En (A) la concentración fija de MgATP fue 0,5 mM y en (B) fue 5 mM. La concentración de  $Mg^{+2}$  libre fue 2 mM en ambos ensayos (A y B). Las concentraciones de  $K_2HPO_4$  utilizadas fueron: 0 mM (○), 25 mM (▲) 50 mM (■) y 100 mM (●). Cada uno de los puntos en los gráficos representan el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

Los datos se ajustaron al siguiente modelo que describe la velocidad de una reacción bisustrato donde la concentración de un sustrato inhibitorio, en este caso la D-ribosa, se varía, manteniendo fija la concentración del otro sustrato, el MgATP:

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_M + S + \left( \frac{S^2}{K_i} \right)} \quad \text{Ecuación 1}$$

En base a esto, se determinaron los siguientes parámetros cinéticos:  $K_M$  para D-ribosa,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$  y  $K_i$ . Al comparar los parámetros cinéticos que aparecen en la tabla 2, obtenidos para una concentración fija de MgATP igual a 0,5 mM, se

determinó que el valor de la  $K_M$  para D-ribosa en ausencia de  $K_2HPO_4$  fue cercana a los  $0,17 \pm 0,01$  mM, y la  $k_{cat}$  fue de  $11,04 \pm 0,66$  s<sup>-1</sup>. Asimismo, en presencia de MgATP 5 mM, se determinó que el valor de la  $K_M$  para D-ribosa en ausencia de  $K_2HPO_4$  fue cercana a los  $0,12 \pm 0,01$  mM, y la  $k_{cat}$  fue de  $10,36 \pm 0,38$  s<sup>-1</sup>.

**Tabla 2. Parámetros cinéticos de la RK silvestre en función de D-ribosa y  $K_2HPO_4$ .**

$K_2HPO_4$ (mM)	MgATP 0,5 mM				MgATP 5 mM			
	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)
0	$0,17 \pm 0,01$	$11,04 \pm 0,66$	$63,89 \pm 8,32$	$1,68 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,01$	$10,36 \pm 0,38$	$80,03 \pm 13,20$	$3,29 \pm 0,52$
25	$0,09 \pm 0,01$	$14,89 \pm 0,68$	$150,73 \pm 6,38$	$1,79 \pm 0,15$	$0,03 \pm 0,005$	$12,68 \pm 0,56$	$454,30 \pm 22,58$	$3,50 \pm 0,17$
50	$0,08 \pm 0,01$	$18,81 \pm 2,16$	$223,54 \pm 11,73$	$1,81 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,006$	$13,29 \pm 0,36$	$509,69 \pm 92,88$	$3,57 \pm 0,43$
100	$0,08 \pm 0,01$	$21,37 \pm 1,11$	$261,76 \pm 23,09$	$1,88 \pm 0,10$	$0,02 \pm 0,004$	$13,51 \pm 1,74$	$821,67 \pm 79,58$	$5,55 \pm 0,92$

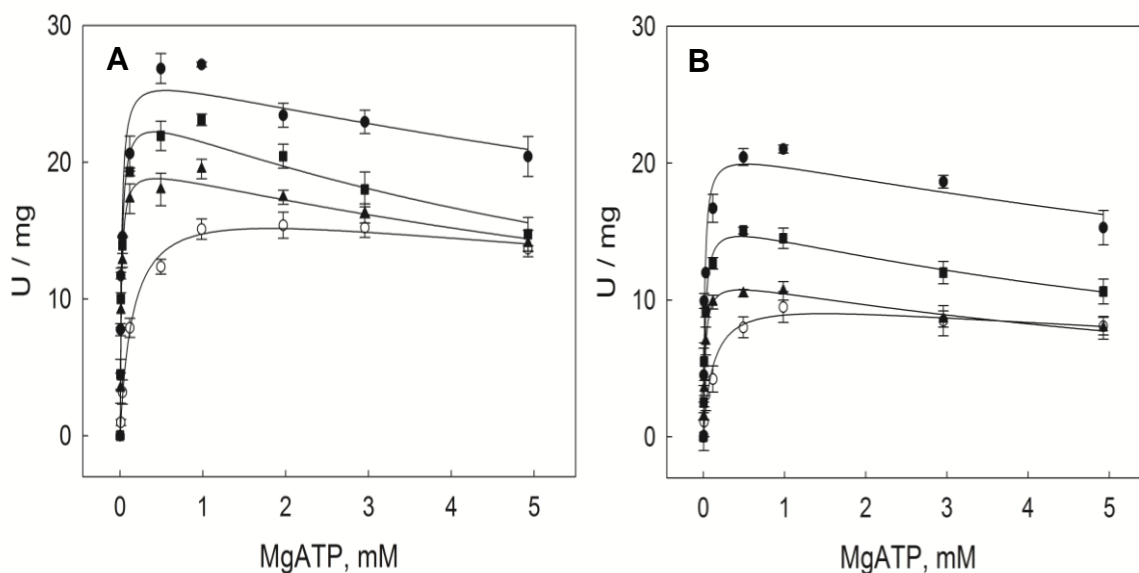
Otro punto por dilucidar fue identificar de qué manera el  $K_2HPO_4$  ejercía su efecto sobre la actividad de la RK, evaluando los cambios producidos en los valores de los parámetros cinéticos que se muestran en la tabla 2. A concentraciones no inhibitorias de MgATP iguales a 0,5 mM, el efecto activador del  $K_2HPO_4$  se manifestó al duplicar los valores de  $k_{cat}$  ( $11,04 \pm 0,66$  s<sup>-1</sup> vs.  $21,37 \pm 1,11$  s<sup>-1</sup>), y reduciendo a la mitad los valores de  $K_M$  para D-ribosa ( $0,17 \pm 0,01$  mM vs.  $0,08 \pm 0,01$  mM). Si comparamos la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) obtenida en ausencia de  $K_2HPO_4$  y la encontrada en presencia de 100 mM del efector, observamos que se produjo un aumento de la eficiencia catalítica cercano a las 4,1 veces.

Por otro lado, al utilizar concentraciones de MgATP 5 mM, que son saturantes e inhibitorias, se observa que el  $K_2HPO_4$  ejerció su efecto activador sobre la RK, principalmente disminuyendo los valores de  $K_M$  para D-ribosa. Esto, ya que al comparar las condiciones sin  $K_2HPO_4$  y en presencia de 100 mM del efector, el valor de  $K_M$  para D-ribosa cayó cerca de 6 veces ( $0,12 \pm 0,01$  mM vs.  $0,02 \pm 0,004$  mM), mientras que el valor de  $k_{cat}$  sólo tuvo un aumento discreto de 1,3 veces ( $10,36 \pm 0,38$  s<sup>-1</sup> vs.  $13,51 \pm 1,74$  s<sup>-1</sup>). Esta combinación de cambios en ambos parámetros cinéticos, generados por la presencia de  $K_2HPO_4$ , lleva a que el aumento de la concentración del ión traiga consigo un gran incremento de la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ), cercano a las 10,3 veces, si comparamos las condiciones sin  $K_2HPO_4$  y en presencia de 100 mM del efector, para la actividad medida con MgATP 5 mM.

Otro punto a considerar, fue estudiar cómo se afectaban los valores de  $K_i$  para D-ribosa en presencia de las distintas concentraciones de  $K_2HPO_4$ . Al observar los parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura 16, nos percatamos que para el caso de los ensayos de actividad en presencia de MgATP 0,5 mM, concentraciones crecientes de  $K_2HPO_4$  no revirtieron la inhibición causada por la D-ribosa, ya que los valores de  $K_i$  fueron casi idénticos ( $1,68 \pm 0,07$  mM vs.  $1,88 \pm 0,10$  mM). Sin embargo, para las ensayos de actividad realizados a concentraciones de MgATP saturantes e inhibitorias iguales a 5 mM, se aprecia que concentraciones crecientes de  $K_2HPO_4$  llevaron a un pequeño incremento en los valores de  $K_i$ , cercano a las 1,7 veces, sugiriendo que para este caso, este efector podría estar revirtiendo levemente la inhibición por D-ribosa ( $3,29 \pm 0,52$  mM vs.  $5,55 \pm 0,92$  mM).

Por otro lado, para caracterizar a la RK silvestre en función de MgATP y evaluar los efectos del  $K_2HPO_4$  sobre los parámetros cinéticos, se usaron dos concentraciones fijas del azúcar; D-ribosa 0,5 mM y D-ribosa 2 mM, fijando la concentración de  $Mg^{+2}$  libre en 2 mM. Según se evidenció anteriormente, la RK humana se inhibe a concentraciones de D-ribosa superiores a 0,5 mM. En base a este antecedente, la concentración de D-ribosa se fijó en 0,5 mM para observar que ocurría a concentraciones superiores a la  $K_M$  para D-ribosa (0,17 mM) pero que no eran ni inhibitorias ni saturantes, y se fijó en 2 mM para observar qué ocurría a concentraciones saturantes del azúcar, pero que también eran inhibitorias. Al igual que en la caracterización en función de D-ribosa, en este ensayo la actividad de RK fue medida en ausencia de  $K_2HPO_4$  y en presencia de concentraciones crecientes de  $K_2HPO_4$  iguales a 25, 50 y 100 mM. Según se puede observar en la

figura 17, (A) y (B), concentraciones crecientes de  $K_2HPO_4$  aumentaron la actividad de RK y la enzima presentó inhibición a concentraciones de MgATP superiores a 1 mM, lo que concuerda con lo que aparece en la literatura (Park y col., 2007).



**Figura 17. Efecto del  $K_2HPO_4$  sobre la actividad de la RK silvestre variando la concentración de MgATP.** En (A) la concentración fija de D-ribosa fue 0,5 mM y en (B) 2 mM. La concentración de  $Mg^{+2}$  libre fue 2 mM en ambos ensayos. Las concentraciones de  $K_2HPO_4$  utilizadas fueron: 0 mM (○), 25 mM (▲) 50 mM (■) y 100 mM (●). Cada uno de los puntos en los gráficos representan el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

Los datos se ajustaron al modelo descrito en la Ecuación 1, que describe la velocidad de una reacción bisustrato donde la concentración de un sustrato inhibitorio, en este caso el MgATP, se varía, manteniendo fija la concentración del otro sustrato, la D-ribosa. En base a esto, se determinaron los siguientes parámetros cinéticos:  $K_M$  para MgATP,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$  y la  $K_i$ . Al comparar los parámetros cinéticos que aparecen en la tabla 3, obtenidos a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura 17, se observa que a concentraciones no inhibitorias de D-ribosa, iguales a 0,5 mM, el  $K_2HPO_4$  ejerció su efecto activador sobre la RK, principalmente disminuyendo



los valores de  $K_M$  para MgATP. El valor de la  $K_M$  para MgATP, medida en ausencia de  $K_2HPO_4$ , fue cercano a los  $0,16 \pm 0,04$  mM, mientras que en presencia del efector, la  $K_M$  para MgATP cayó cerca de 8 veces ( $0,02 \pm 0,006$  mM). Asimismo, la  $k_{cat}$  tuvo un valor de  $9,81 \pm 0,80$  s<sup>-1</sup> en ausencia de  $K_2HPO_4$  y aumentó 1,6 veces en presencia de dicho efector ( $15,33 \pm 0,15$  s<sup>-1</sup>). Si comparamos la eficiencia catalítica obtenida en ausencia de  $K_2HPO_4$ , y la determinada en presencia de 100 mM del efector, observamos que hubo un aumento de la eficiencia catalítica cercana a las 13 veces.

**Tabla 3. Parámetros cinéticos de la RK silvestre en función de MgATP y  $K_2HPO_4$ .**

$K_2HPO_4$ (mM)	D-ribosa 0,5 mM				D-ribosa 2 mM			
	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)
0	$0,16 \pm 0,04$	$9,81 \pm 0,80$	$61,89 \pm 9,24$	$16,91 \pm 2,61$	$0,11 \pm 0,02$	$5,73 \pm 0,71$	$53,35 \pm 7,78$	$15,16 \pm 0,88$
25	$0,02 \pm 0,006$	$11,07 \pm 0,35$	$676,38 \pm 23,49$	$12,50 \pm 0,56$	$0,02 \pm 0,003$	$6,51 \pm 0,25$	$257,94 \pm 9,51$	$9,45 \pm 1,12$
50	$0,02 \pm 0,004$	$13,03 \pm 0,31$	$678,09 \pm 29,30$	$11,89 \pm 0,73$	$0,02 \pm 0,006$	$8,83 \pm 0,25$	$369,26 \pm 4,64$	$8,51 \pm 0,44$
100	$0,02 \pm 0,006$	$15,33 \pm 0,15$	$802,63 \pm 11,41$	$10,54 \pm 0,81$	$0,02 \pm 0,005$	$12,53 \pm 0,30$	$639,23 \pm 55,1$	$7,10 \pm 0,21$

Por otro lado, al utilizar concentraciones de D-ribosa iguales a 2 mM, se observa que el  $K_2HPO_4$  ejerció su efecto activador sobre la RK principalmente disminuyendo los valores de  $K_M$  para MgATP, al igual que lo visto en la condición de D-ribosa no inhibitoria. En presencia de D-ribosa 2 mM, la  $K_M$  para MgATP fue cercana a los  $0,11 \pm 0,02$  mM en ausencia de  $K_2HPO_4$  y al haber  $K_2HPO_4$  100 mM en el medio de reacción la  $K_M$  cayó cerca de 5,5 veces ( $0,02 \pm 0,005$  mM), mientras que la  $k_{cat}$  fue  $5,73 \pm 0,71$  s<sup>-1</sup> en ausencia de  $K_2HPO_4$ , y en presencia del efector hubo un aumento cercano a 2 veces ( $12,53 \pm 0,30$  s<sup>-1</sup>). Esto implica que a medida que aumentó la concentración del efector, se produjo un gran incremento de la eficiencia catalítica, cercano a las 12 veces, si comparamos las condiciones sin  $K_2HPO_4$  y en presencia de 100 mM del efector.

El otro punto a considerar, es estudiar cómo se afectaron los valores de  $K_i$  para MgATP en presencia de las distintas concentraciones de  $K_2HPO_4$  evaluando esto en 2 condiciones de D-ribosa (0,5 mM y 2 mM). Al observar los parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura 16, nos percatamos que tanto para los ensayos realizados con D-ribosa 0,5 mM, como para los realizados con D-ribosa 2 mM, la presencia de concentraciones crecientes de  $K_2HPO_4$  no revierten la inhibición causada por MgATP. Por el contrario, al existir una correlación entre el aumento de la concentración de  $K_2HPO_4$  y una disminución de los valores de  $K_i$  para MgATP, se podría sugerir que el  $K_2HPO_4$  por un lado, estaría ejerciendo un efecto activador disminuyendo la  $K_M$  y aumentando la  $k_{cat}$  para MgATP, y además podría estar potenciando la inhibición dada por el MgATP. Para D-ribosa 0,5 mM la presencia de 100 mM del efector hizo que la  $K_i$  pasara de  $16,91 \pm 2,61$  mM a  $10,34 \pm 0,81$  mM, mientras que con D-ribosa 2 mM, 100 mM del efector llevó a que la  $K_i$  bajara de  $15,16 \pm 0,88$  mM a  $7,10 \pm 0,21$  mM.

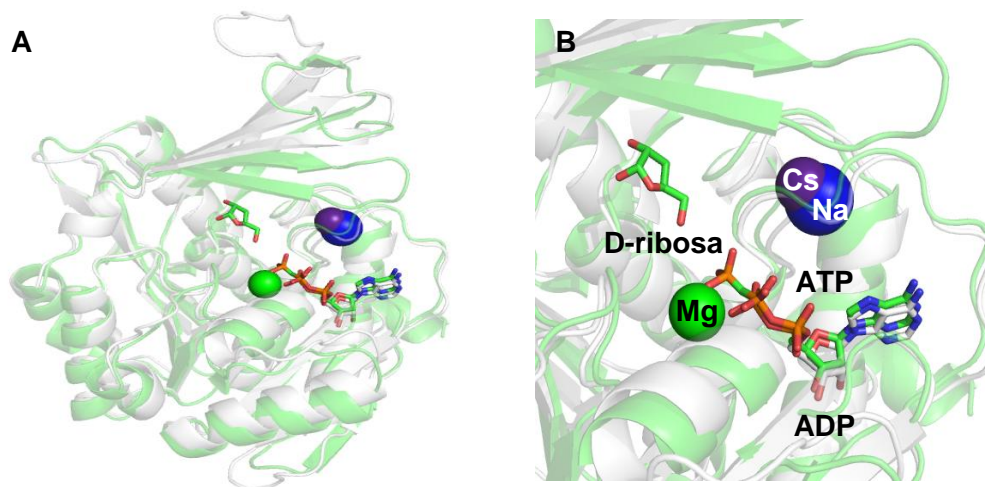
Lo que estaba descrito en la literatura para RK humana, era que en ensayos en los que se medía la actividad de la enzima en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP, y en presencia de concentraciones crecientes de  $PO_4^{-3}$ , entre 0 y 10 mM, al comparar los parámetros cinéticos en ausencia de  $PO_4^{-3}$  y con 10 mM del efector, los valores de  $K_M$  para D-ribosa disminuyeron 14 veces mientras que la eficiencia catalítica ( $k_{cat} / K_M$ ) se incrementó 4,4 veces, y los valores de  $K_i$  aumentaron 8,5 veces, mientras que para los valores de  $K_M$  para MgATP hubo una disminución de 1,4 veces, un incremento de la eficiencia catalítica en 1,3 veces y un aumento en 15,8 veces para los valores de  $K_i$  (Park y col., 2007).

Tomando en consideración que la RK humana es activada por  $K_2HPO_4$  y que los ensayos de activación realizados anteriormente en AK de varias fuentes, en RK de *E. coli* y RK de *H. sapiens* habían sido hechos con  $PO_4^{-3}$  inorgánico, y no con  $K_2HPO_4$  (Maj y Gupta, 2001; Maj y col., 2002; Park y col., 2007) nos preguntamos entonces, de qué manera el  $K_2HPO_4$  estaba ejerciendo su efecto activador sobre la RK humana. De esta manera, indagamos si el efector usado,  $K_2HPO_4$ , pudiera estar activando a la RK por medio del efecto del ión  $K^+$  por medio del efecto del ión  $PO_4^{-3}$ , o por ambos simultáneamente. Además, hay que considerar que en el medio de reacción del ensayo acoplado, utilizado para medir espectrofotométricamente la actividad de RK hay KCl 125 mM, lo que también podría activar a la RK humana. Con el objeto de complementar el estudio del efecto del  $K^+$  sobre la RK y siguiendo en el marco del estudio del efecto de cationes monovalentes, se estudió también el efecto del  $Na^+$  sobre la RK humana.

#### **IV.4.5 Regulación de la actividad de RK silvestre por cationes monovalentes. Efecto del $K^+$ y del $Na^+$ .**

Existe evidencia de que algunos miembros de la superfamilia riboquinasa poseen sitios de unión para cationes monovalentes, y que además ciertos cationes monovalentes, son capaces de modificar la actividad enzimática. Según se mencionó en la introducción, la resolución de la estructura de RK de *E. coli* en presencia de D-ribosa, AMP-PCP,  $Mg^{+2}$  y  $Cs^+$  (PDBid: 1GQT), mostró que el cesio se une entre dos loops inmediatamente adyacentes al bolsillo aniónico del sitio activo, sugiriendo que el catión monovalente se uniría cerca del sitio activo y no dentro de él. Además, esta enzima puede ser activada por  $K^+$  y  $Cs^+$  con una  $K_D$  aparente de 5 mM y 17 mM respectivamente, mientras que  $Li^+$  y  $Na^+$  no tuvieron efecto alguno, dentro del rango de concentraciones ensayado, el que llegó hasta 140 mM (Andersson y Mowbray, 2002). Por otro lado, existe otro trabajo en el que se observó que la RK de *E. coli* era activada decrecientemente por  $K^+$ ,  $NH_4^+$  y  $Cs^+$  (Chuvikovsky y col., 2006). Más recientemente, se cristalizó la RK de *S. aureus* en ausencia de iones monovalentes (PDBid: 3RY7), y se observó que el sitio de unión de cationes monovalentes está desorganizado lo que se traduce en una oclusión del bolsillo de unión a nucleótido, comparándola a la estructura unida a  $Cs^+$  (PDBid: 1GQT). Asimismo, se ha propuesto que la unión del catión monovalente gatillaría el cambio conformacional de las hebras  $\beta 11$  y  $\beta 12$ , para organizar la formación del bolsillo de unión al nucleótido, permitiendo la unión del ATP. Desde el punto de vista cinético, esta enzima es activa en ausencia de potasio, y la presencia de KCl 100 mM llevó a una disminución de la  $K_M$  para ATP, y a un aumento de la  $k_{cat}$  a más del doble (Li y col., 2012).

Con respecto a la RK humana, superpusimos la estructura de la RK humana resuelta con ADP,  $Na^+$  y  $Mg^{+2}$  (PDBid: 2FV7) con la estructura de RK de *E. coli* cristalizada en presencia de D-ribosa, AMP-PCP,  $Mg^{+2}$  y  $Cs^+$  (PDBid: 1GQT), con el objeto de evaluar si los sitios de unión a cationes monovalentes eran idénticos. Según se puede observar en la figura 18, el sodio y el cesio se unen al mismo sitio dentro de las respectivas riboquinasas. Por lo tanto, hemos inferido que es probable que la RK humana sea regulada por cationes monovalentes ya que presenta un sitio de unión a cationes monovalentes conservado



**Figura 18. Sitio de unión a cationes monovalentes conservado en riboquinasas. A.** Superposición estructural de la RK de *E. coli* que tiene un sitio con  $\text{Cs}^+$  (PDBid: 1GQT) y de la RK de *H. sapiens* que tiene un sitio con  $\text{Na}^+$  (PDBid: 2FV7), dibujadas en verde, y en blanco, respectivamente. **B.** Vista cercana de los sitios activos de las enzimas, y de los ligandos de cada una. Tal como se puede apreciar, el  $\text{Cs}^+$  y el  $\text{Na}^+$  ocupan el mismo sitio dentro de las respectivas riboquinasas.

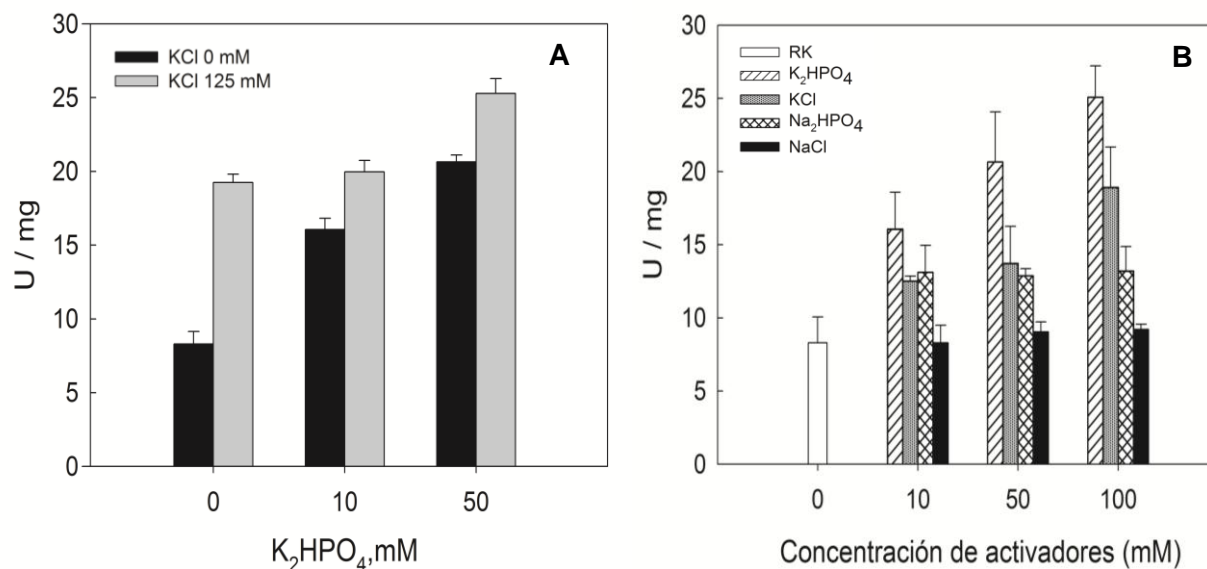
Para estudiar la regulación por cationes monovalentes, determinamos el efecto del  $\text{K}^+$  sobre la RK humana, considerando la evidencia de que la RK humana era activada por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y buscamos discriminar entre los efectos que el  $\text{K}^+$  y el  $\text{PO}_4^{-3}$ , por separado, podían tener sobre la RK. Para determinar si el  $\text{K}^+$  actuaba como un activador en la RK humana, se realizó un ensayo donde se determinó la actividad de la RK en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y en presencia y ausencia de  $\text{KCl}$  125 mM. Se fijó la concentración de D-ribosa en 0,5 mM, la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre en 2 mM, y la concentración de  $\text{MgATP}$  en 1 mM. La actividad de la enzima se midió tal y como se describe en materiales y metodología. Cabe destacar que a pesar de que estaba descrito que la enzima PK es inactiva en ausencia de  $\text{K}^+$ , controles realizados en nuestro laboratorio demostraron lo contrario, por lo que no tuvimos problemas en medir actividad enzimática de RK en ausencia de  $\text{K}^+$  en el medio de reacción. Por lo tanto la medición hecha en ausencia de  $\text{KCl}$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  es una medición realizada en ausencia de cualquier efector.

Como se puede observar en la figura 19 A, en ausencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KCl}$ , la RK presentó una baja actividad, cercana a las 7 U/mg. Al medir la actividad de la RK sólo en presencia de  $\text{KCl}$

125 mM, y compararla con la actividad medida en ausencia de activadores, se produjo un incremento en la actividad enzimática, cercana a las 2,8 veces, lo que estaría indicando que el KCl sería un activador de la RK. Si comparamos la actividad en ausencia de activadores con la medida sólo en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM, la actividad aumentó cerca de 2,8 veces. Ahora bien, si comparamos la actividad en ausencia de activadores con la actividad medida en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM y KCl 125 mM, podemos observar que la presencia de ambos efectores llevó a un mayor incremento de la actividad, cercano a las 3,6 veces. Por lo tanto, podemos decir que bajo cualquier condición de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ensayada, el KCl siempre tuvo un efecto activador, lo que demuestra que el  $\text{K}^+$  por sí solo, efectivamente actúa como un activador de la RK. Además, dada la diferencia de actividad vista en la condición en que se midió la actividad RK en presencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM y KCl 125 mM, con la actividad medida con  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM y KCl 125 mM, podemos sugerir que la diferencia vista debería ser consecuencia de la mayor concentración de  $\text{PO}_4^-$ .<sup>3</sup> Todos estos resultados, nos permiten inferir que el efecto activador del  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  debería ser consecuencia de la suma de las contribuciones dadas por el  $\text{K}^+$  y por el  $\text{PO}_4^{-3}$ , indicando que tanto el  $\text{K}^+$  como el  $\text{PO}_4^{-3}$  tienen un efecto activador sobre la RK humana. Todos estos resultados nos permiten concluir que la RK humana es activada por  $\text{K}^+$ , siendo la primera vez que se describe activación por cationes monovalentes en la RK humana.

Con la idea de ampliar el estudio sobre cationes monovalentes, y considerando el efecto activador del  $\text{K}^+$ , estudiamos si el  $\text{Na}^+$  era capaz de activar a la RK humana. Para la determinación del efecto del  $\text{Na}^+$  sobre la RK, la actividad de la enzima se midió tal y como se describe en materiales y metodología, utilizando el ensayo discontinuo, ya que como se comentó anteriormente, el  $\text{Na}^+$  afecta la actividad del ensayo acoplado. Se fijó la concentración de D-ribosa en 0,5 mM, la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre en 2 mM, y la concentración de MgATP en 1 mM.

Como se puede apreciar en la figura 19 B, el  $\text{Na}^+$  no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la RK humana. En presencia de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  se produjo una activación cercana a las 1,6 veces, al comparar la actividad de RK en ausencia de cualquier efector y en presencia de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, mientras que al ensayar con concentraciones mayores de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  iguales a 50 mM y a 100 mM, no se logró una mayor activación de la RK. Por otro lado, la actividad de RK medida a distintas concentraciones de NaCl fue similar a la actividad en ausencia de cualquier activador, lo que indicaría que el  $\text{Na}^+$  no tendría ningún efecto sobre la RK humana, y que el aumento de actividad registrado en presencia de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  podría deberse únicamente a la activación por  $\text{PO}_4^{-3}$  (tabla 4).



**Figura 19. Efecto de cationes monovalentes y  $\text{PO}_4^{3-}$  sobre la actividad de la RK silvestre. A.** Efecto del KCl sobre la actividad de RK silvestre a concentraciones crecientes de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . **B.** La actividad de RK se midió en presencia de concentraciones crecientes de cuatro efectores:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y NaCl. Cada una de las barras en ambos gráficos representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

**Tabla 4. Actividad específica de RK silvestre en función de cationes monovalentes y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$**

Efectores	RK (U/mg)	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (U/mg)	KCl (U/mg)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (U/mg)	NaCl (U/mg)
<b>0 mM</b>	8,30 ± 1,76	8,30 ± 1,76	8,30 ± 1,76	8,30 ± 1,76	8,30 ± 1,76
<b>15 mM</b>	-----	16,06 ± 3,53	12,50 ± 0,35	13,11 ± 1,20	8,30 ± 1,20
<b>50 mM</b>	-----	20,65 ± 4,42	13,72 ± 2,53	12,87 ± 0,50	9,05 ± 1,20
<b>100 mM</b>	-----	25,08 ± 3,14	18,90 ± 2,78	13,20 ± 1,67	9,21 ± 0,35

De esta manera, queda claro que en la RK humana, el rol activador del  $K_2HPO_4$  100 mM está siendo ejercido a través de los efectos que el  $K^+$  y el  $PO_4^{-3}$  tienen por separado, pudiéndosele atribuir al  $K^+$  un efecto activador superior a las 2, veces y al  $PO_4^{-3}$  uno cercano a las 1,4 veces, lo que sugiere que el  $K^+$  sería un activador más potente que el  $PO_4^{-3}$ . Por otro lado, pese a que la estructura de RK humana fue cristalizada en presencia de  $Na^+$ , que el sitio de unión de cationes monovalentes estaría conservado en esta enzima, y considerando que este catión es muy similar al  $K^+$ , ya que ambos son metales alcalinos y tienen radio iónico similar, el  $Na^+$  no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la RK humana., a diferencia de lo observado para el  $K^+$ . Todos estos datos sugieren que el efecto activador de los cationes monovalentes podría ser específico y determinado por la identidad del catión. La razón detrás de este fenómeno se plantea más adelante en el capítulo discusión.

Por otro lado, sabiendo que muchas fosforil transferasas requieren de un catión divalente metálico para su actividad y que el rol de los metales en la catálisis puede ser unirse a ligandos formando el verdadero sustrato, o alternativamente, unirse directamente a la enzima y tener un rol catalítico, es que hemos considerado importante determinar el efecto que los cationes divalentes ejercen sobre la RK humana. De este modo, estudiamos si la RK es capaz de utilizar otros cationes divalentes, además del  $Mg^{+2}$  para realizar su catálisis, y el efecto que el  $Mg^{+2}$  y otros cationes divalente podían tener sobre la actividad de la RK humana.

#### IV.4.6 Regulación de la actividad de RK silvestre por cationes divalentes. Efecto del $Mg^{+2}$ , $Mn^{+2}$ y $Co^{+2}$ .

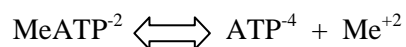
Las quinasas requieren para su actividad de un catión divalente, en la mayoría de los casos  $Mg^{+2}$ , ya sea como un catalizador electrofílico que ayuda a la transferencia del grupo fosforilo o formando parte del complejo metal-nucleótido que actúa como el verdadero sustrato (Parducci y col., 2006). Estudios recientes de nuestro laboratorio, realizados en enzimas de la superfamilia riboquinasa, han mostrado que la enzima Pfk-2 de *E. coli*, emplea los iones  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  para la catálisis, y en menor medida  $Co^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ , descartando la utilización de otros cationes como  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Ni^{+2}$  (Rivas-Pardo, J.A. y col., 2011). Por otra parte, la actividad catalítica de la *ph*PFK, pareciera ser más promiscua al momento de escoger un catión para la catálisis, utilizando tanto  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Ni^{+2}$ . Algo similar se ha encontrado para el caso de la enzima *pf*GK, la cual fue capaz de utilizar en la catálisis los iones  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Co^{+2}$ , y en menor proporción  $Ni^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ . La enzima *ph*PFK, es inhibida por concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre, mientras que la enzima glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis* (tlGK) es inhibida por concentraciones de  $Mn^{+2}$  libre (Merino, F., Rivas-Pardo, J.A. y col., 2011). Dentro de la superfamilia riboquinasa el papel del  $Mg^{+2}$  en el mecanismo catalítico de estas enzimas es una materia que está en pleno estudio.

Con respecto a la RK, se ha visto que tanto la RK de mamíferos como la bacteriana no presentaron actividad en ausencia de cationes divalentes (Agranoff y Brady, 1956; Chuvikovsky y col., 2006). Por otro lado, se ha demostrado que aparte del  $Mg^{+2}$ , la RK bacteriana también presenta actividad en presencia de otros cationes divalentes como el  $Mn^{+2}$  y el  $Ca^{+2}$ . Los autores señalan que el catión divalente se uniría al ATP y esto facilitaría la transferencia del grupo fosforilo (Chuvikovsky y col., 2006). Sin embargo, en este trabajo no se consideró la influencia de los cationes divalentes en su forma libre. Por otro lado, el rol activador del  $Mg^{2+}$  no está del todo claro, ya que se ha visto que las actividades catalíticas de AK y de RK bacteriana se inhiben a altas concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre (Fisher y Newholme, 1984; Maj y col., 2002; Maj y Gupta, 2001).

De esta manera, se buscó hacer un estudio que fuera acucioso en determinar la influencia de los cationes divalentes sobre la actividad de la RK humana, ya sea como parte del sustrato unido al ATP, o en su forma libre. La actividad de la enzima se midió tal y como se describe en materiales y metodología, utilizando el ensayo discontinuo.



Considerando que el sustrato de la enzima corresponde al complejo metal-nucleótido, hubo que determinar la concentración de cada una de las especies que se encuentran en el equilibrio:



La concentración de cada una de las especies se determinó a partir de las concentraciones totales y las constantes de disociación respectivas. Las constantes de disociación para los diferentes complejos fueron extraídas desde la base de datos Critically.

Las especies iónicas presentes en la solución se calcularon usando la siguiente ecuación cuadrática:

$$[\text{MeATP}^{-2}] = \{([\text{ATP}]_{\text{T}} + [\text{Me}]_{\text{T}} + K_{\text{d}}) - \sqrt{([\text{ATP}]_{\text{T}} + [\text{Me}]_{\text{T}} + K_{\text{D}})^2 - 4[\text{ATP}]_{\text{T}}[\text{Me}]_{\text{T}}}\} / 2$$

$$[\text{Me}^{+2}] = [\text{Me}]_{\text{T}} - [\text{MgATP}^{-2}]$$

$$[\text{ATP}^{-4}] = [\text{ATP}]_{\text{T}} - [\text{MeATP}^{-2}]$$

Constantes de disociación:

$$\text{MgATP} = 45,7 \mu\text{M}$$

$$\text{MnATP} = 12,9 \mu\text{M}$$

$$\text{NiATP} = 13,8 \mu\text{M}$$

$$\text{ZnATP} = 11,2 \mu\text{M}$$

$$\text{CuATP} = 0,81 \mu\text{M}$$

$$\text{CoATP} = 15,8 \mu\text{M}$$

$$\text{CdATP} = 4,7 \mu\text{M}$$

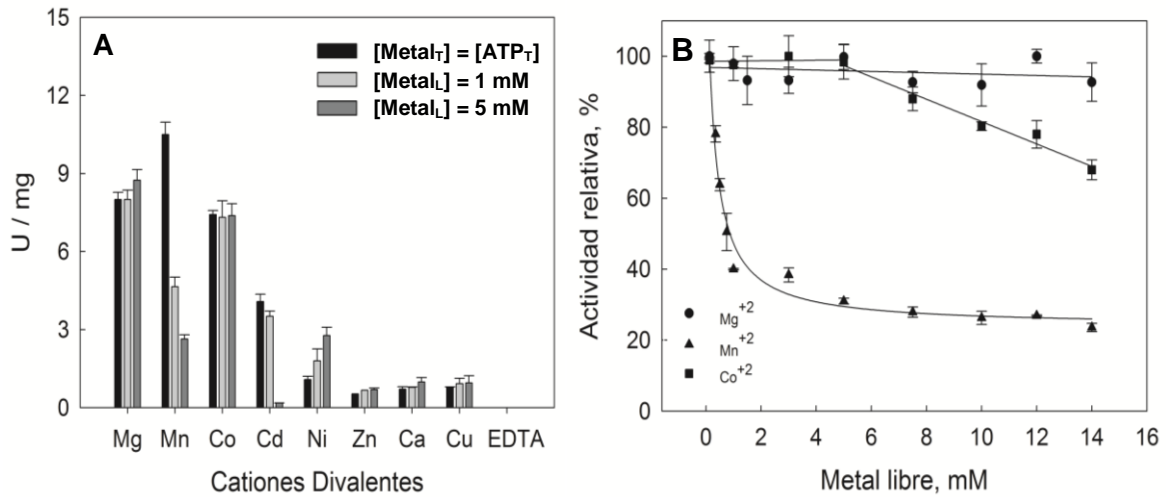
$$\text{CaATP} = 102,3 \mu\text{M}$$

El estudio del efecto de cationes divalentes sobre la RK humana se inició realizando un ensayo control, en el que se midió la actividad de la enzima en ausencia del metal libre ( $Mg^{+2}$ ), utilizando al quelante EDTA, con el objeto de evaluar si el metal era indispensable para la catálisis, en particular para la formación del complejo metal nucleótido. Lo que se observó, fue que la RK no presenta actividad en presencia del quelante. Esto sugiere que el verdadero sustrato para la RK humana debería ser el complejo formado por metal-nucleótido ( $MgATP$ ), ya que en ausencia de este complejo no hubo catálisis (fig. 20 A).

Se investigó si además del  $Mg^{+2}$ , la RK era capaz de utilizar otros cationes divalentes para su catálisis. Para este estudio se midió la velocidad enzimática en presencia de  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Cu^{+2}$ , como el único metal presente, empleando sales de cloruro. Según se puede observar en la figura 20 A, los resultados obtenidos muestran que esta enzima puede emplear  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  y  $Cd^{+2}$  para su catálisis, además del  $Mg^{+2}$ . Para descartar cualquier efecto del ión  $Cl^-$  en los experimentos en los que se utilizó sales de cloruro, que incluyen a todos los ensayos presentados en el estudio del efecto de cationes divalentes, se realizó un control utilizando sulfato de  $Mg^{+2}$ , reemplazando así al anión cloruro y manteniendo el catión divalente. Como resultado se observó que la actividad de la RK es similar en presencia de cualquiera de las dos sales (no se muestra).

Otro fenómeno observable es el efecto que trae consigo el incremento de la concentración del metal libre sobre la actividad de la RK humana. Las enzimas que requieren del uso de un metal para su actividad, poseen un mecanismo general de activación que es la unión del metal al nucleótido, lo que forma al verdadero sustrato. Sin embargo, existen otros casos, en los que se requiere de una concentración de metal mayor que la concentración usual de nucleótido necesaria, para alcanzar la máxima actividad, lo que sugiere un papel adicional para el metal (Budde y col., 1993). De este modo, se ha observado que para la AK de diversas fuentes, el aumento de  $Mg^{+2}$  libre inhibe la actividad enzimática (Maj y col.; 2002, Maj y col., 2001), mientras que en PFK-2 ocurre lo contrario, observándose activación por este metal libre (Parducci y col., 2006). Esto motivó a que se ensayara el efecto de la concentración de distintos cationes divalentes sobre la actividad de la RK humana. Se ensayaron tres condiciones: en la primera existe una equimolaridad entre la concentración del metal total y del ATP total, en una segunda condición la concentración del metal total aumentó, lo que llevó a que hubiera una concentración de metal libre igual a 1 mM, y en la tercera condición la concentración de metal libre fue igual a 5 mM. Para cada una de estas condiciones, la concentración del complejo metal-ATP siempre fue igual a 0,5 mM, la de D-ribosa fue 0,5 mM y en el medio de reacción no hubo  $K^+$  ni  $PO_4^{-3}$ . La mayor actividad se logró con

Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> y Co<sup>+2</sup>. Dentro de este grupo, la mayor actividad de RK se logró con Mn<sup>+2</sup>, en condiciones de equimolaridad entre el metal total y el ATP total, ya que la actividad de RK es 1,4 veces mayor que lo visto en presencia de Mg<sup>+2</sup>. En el caso del exceso de metal libre, a concentraciones de 1 y 5 mM, para el caso del Mg<sup>+2</sup>, el exceso de metal libre no produjo ninguna variación en la actividad de la enzima, al igual que lo ocurrido con Co<sup>+2</sup>, mientras que con exceso de Mn<sup>+2</sup> libre, se observó disminución de la actividad enzimática. Por el lado de los cationes que tienen un menor efecto sobre la RK, podemos ver que el exceso de Ni<sup>+2</sup> libre pareciera tener efecto activador mientras que el exceso de Cd<sup>+2</sup> tiene un efecto inhibitorio. Por último, el exceso de Zn<sup>+2</sup>, el Ca<sup>+2</sup> y el Cu<sup>+2</sup>, pareciera que no tiene ningún efecto sobre la RK humana.



**Figura 20. Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de la RK silvestre.** **A.** El efecto de distintos cationes divalentes sobre la actividad de RK se estudió a 3 concentraciones del catión libre. **B.** Se estudió el efecto del exceso de metal libre sobre la actividad de RK, en un amplio rango de concentraciones de Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> y Co<sup>+2</sup> sobre la actividad de RK. Para los ensayos mostrados en A y B, se fijó en 0,5 mM la concentración de D-ribosa y se mantuvo constante la concentración de los distintos complejos con ATP, en 0,5 mM para cada uno de los ensayos. Cada una de las barras en el gráfico A y cada uno de los puntos en el gráfico B representan el promedio de 3 mediciones ± e.s..

Tomando como punto de partida el hecho de que el exceso de metal libre tuvo distintos efectos sobre la RK dependiendo del metal ensayado, se decidió ampliar el rango de las concentraciones de metal libre ensayadas para estudiar este fenómeno con más detalle. Con este objetivo se estudió el efecto que tenían sobre la actividad de la RK humana, concentraciones crecientes de  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Co^{+2}$ , ensayando hasta 14 mM del metal libre, y conservando constante el complejo metal-nucleótido en 0,5 mM para cada uno de los ensayos, y la concentración de D-ribosa en 0,5 mM. En la figura 20 B, se puede observar que el exceso de  $Mg^{+2}$  libre no modificó la actividad de la RK humana, mientras que a medida que se incrementó la concentración de  $Co^{+2}$  libre por encima de los 5 mM, se observó inhibición. Finalmente, para el caso del ensayo con exceso de  $Mn^{+2}$  libre, la enzima presentó inhibición, disminuyendo la actividad casi en un 70% una vez superado los 7 mM del metal libre, y determinándose una  $K_i$  igual a 250  $\mu M$ .

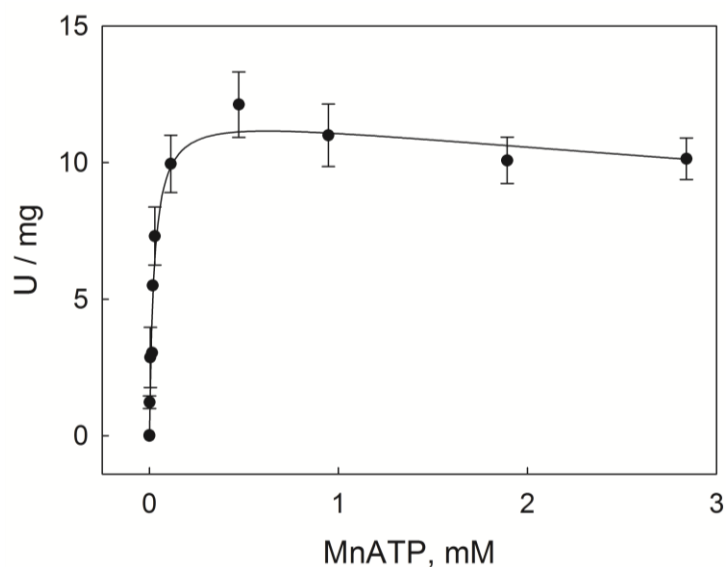
Nos llamó la atención que el  $Mg^{+2}$  libre no tuviera ningún efecto sobre la RK silvestre. Tal como se mencionó anteriormente, al comienzo de este capítulo, existe vasta evidencia de los efectos de este metal libre sobre la actividad enzimática. Sin embargo, tal como se muestra más adelante, los resultados obtenidos en los ensayos cinéticos con las mutantes RK N199L y RK E202L nos entregaron más información que permite inferir qué tipo de efecto tendría el  $Mg^{+2}$  libre sobre la RK humana (ver discusión).

#### **IV.4.7 Uso de $Mn^{+2}$ en la catálisis de RK silvestre.**

En base a los resultados obtenidos en el ensayo con cationes divalentes, se buscó indagar más sobre la actividad enzimática en presencia de  $Mn^{+2}$  para lo cual se caracterizó cinéticamente a la RK humana en función del  $Mn^{+2}$ , fijando la concentración de D-ribosa en 0,5 mM, y la concentración de  $Mn^{+2}$  libre en 0,2 mM. La actividad de la enzima se midió tal y como se describe en materiales y metodología. Como se muestra en la figura 21, la RK también presenta inhibición por MnATP. A bajas concentraciones de MnATP, se produce un incremento en la actividad enzimática y a concentraciones superiores a 0,5 mM se observa inhibición. Este comportamiento coincide con lo observado para el MgATP.

Los datos se ajustaron al siguiente modelo (Ecuación 1) que describe la velocidad de una reacción bisustrato donde la concentración de un sustrato inhibitorio, en este caso el MnATP, se varía, manteniendo fija la concentración del otro sustrato, la D-ribosa. En base a esto, se determinaron los siguientes parámetros cinéticos:  $K_M$  para MnATP,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$  y  $K_i$ . Al observar los parámetros cinéticos que aparecen en la tabla 5, obtenidos a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura 21, podemos advertir que el valor de la  $K_M$  para MnATP es cercano a los  $0,029 \pm 0,006$  mM, medida realizada en ausencia de  $K_2HPO_4$ . Al comparar este resultado con la  $K_M$  para MgATP ( $0,16 \pm 0,04$  mM), vemos que bajo condiciones similares de medición, esto es, D-ribosa  $0,5$  mM y ausencia de  $K_2HPO_4$ , la RK humana tiene una mayor afinidad por el MnATP.

En términos comparativos, la  $K_M$  para MnATP es cerca de 5,5 veces más pequeña que la  $K_M$  para MgATP. Cabe señalar, que la determinación de la  $K_M$  para MnATP se llevó a cabo con una concentración de  $Mn^{+2}$  libre igual a  $0,2$  mM, ya que el  $Mn^{+2}$  libre tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de RK (fig. 20 B), por lo que se buscó utilizar una concentración baja de  $Mn^{+2}$  libre, de manera que el efecto inhibitorio no tuviera injerencia.



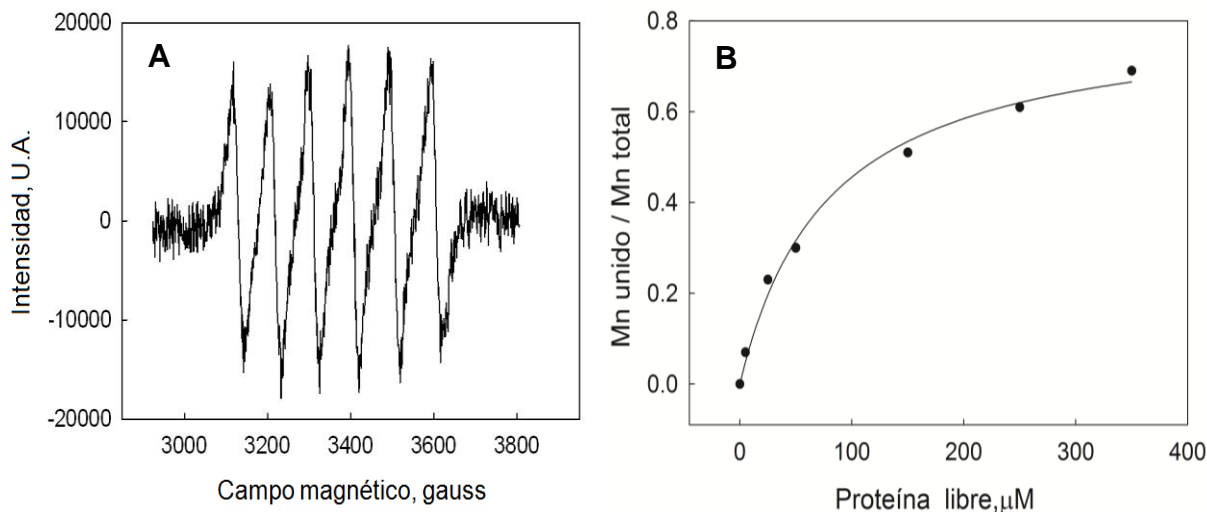
**Figura 21. Actividad de la RK silvestre en función de la concentración de MnATP.** La concentración fija de D-ribosa fue  $0,5$  mM. La concentración de  $Mn^{+2}$  libre fue  $0,2$  mM. Cada una de los puntos en el gráfico representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

**Tabla 5. Parámetros cinéticos de la RK silvestre en función de MnATP.**

	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )	$K_i$ (mM)
<b>MnATP</b>	$0,029 \pm 0,006$	$7,25 \pm 1,57$	$247,30 \pm 21,50$	$10,27 \pm 1,60$
<b>MgATP</b>	$0,16 \pm 0,04$	$9,81 \pm 0,80$	$61,89 \pm 9,24$	$16,91 \pm 2,61$

Por otro lado, en presencia de MnATP la RK tiene una  $k_{cat}$  1,35 veces más pequeña que al usar MgATP. Sin embargo, si centramos nuestra atención en la eficiencia catalítica, observamos que hay una gran diferencia en términos de cuán eficiente es la enzima al usar MgATP o MnATP. La eficiencia catalítica al usar MnATP es de  $247,3 \pm 21,5 s^{-1} mM^{-1}$  mientras que al usar MgATP alcanza a  $61,89 s^{-1} \pm 9,24 mM^{-1}$ . La explicación a esta diferencia radica en que la RK tiene una gran afinidad por el MnATP, lo que lleva a que la eficiencia catalítica para el uso de MnATP sea casi 4 veces más grande que la eficiencia catalítica para el uso de MgATP. Por último, si comparamos los valores de  $K_i$  para MnATP y para MgATP, podemos observar que la  $K_i$  para MnATP es un poco más pequeña que la  $K_i$  para MgATP ( $10,27 \pm 1,6 mM$  vs.  $16,91 \pm 2,61 mM$ ), aunque sus valores son parecidos, lo que nos estaría indicando que la enzima es un poco más sensible a la inhibición por MnATP.

Tomando en consideración que la RK humana puede usar  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  para su catálisis, usamos al  $Mn^{+2}$  como una sonda paramagnética para determinar su unión a la enzima libre por medio de resonancia paramagnética del electrón (EPR). Según se puede apreciar en la figura 22, los experimentos realizados con la RK silvestre muestran que el manganeso se puede unir a la enzima con una  $K_D$  de  $50 \mu M$  y una estequiometría de 0,8. Como las mediciones fueron hechas en ausencia de otros ligandos, la  $K_D$  determinada corresponde a la unión del metal libre a la enzima.

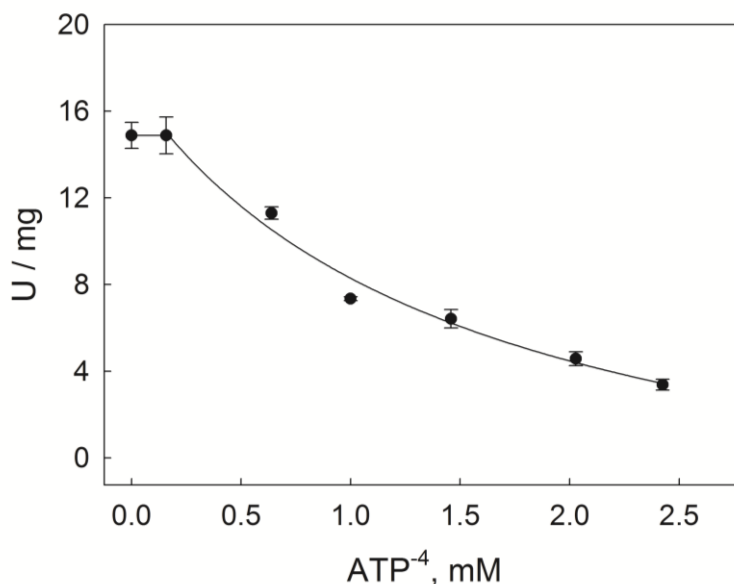


**Figura 22. Unión de  $Mn^{+2}$  a la RK silvestre determinado por resonancia paramagnética del electrón.** La unión de  $Mn^{+2}$  fue medida a 25 °C en presencia de buffer HEPES 25 mM pH 8,2. **(A)** Curva de absorción del  $Mn^{+2}$  libre en presencia de la RK silvestre. **(B)** Curva de unión del  $Mn^{+2}$  a la enzima RK silvestre. Se utilizó una concentración fija de  $Mn^{+2}$  igual a 50  $\mu M$ , mientras que la concentración de proteína utilizada varió entre 0 y 400  $\mu M$ .

#### IV.4.8 Efecto inhibitorio del $ATP^{-4}$ .

Como consecuencia del equilibrio que existe entre el nucleótido y el metal, la concentración del  $ATP^{-4}$  puede variar, principalmente cuando hay un incremento en las concentraciones del complejo metal-ATP, lo que podría afectar la actividad de la RK, ya que existe evidencia referente al  $ATP^{-4}$  que indica que esta especie puede actuar como un inhibidor competitivo con respecto a  $MgATP$ , en la Pfk-2 (Rivas-Pardo y col., 2011). También se ha estudiado el efecto de  $ATP^{-4}$  en la *ph*PFK, en la *tl*GK y en la *pf*GK, donde se observó que estas tres quinasas dependientes de ADP también presentan inhibición competitiva de  $MgADP$  por el nucleótido libre (Merino, F., Rivas-Pardo, J.A. y col., 2011). Por otro lado, en *h*PLK se observó que el  $ATP^{-4}$  no se comporta como un inhibidor en esta enzima (Navarro y col., 2013). Tomando en consideración el hecho de que el  $ATP^{-4}$  en la mayoría de los casos inhibe a las enzimas que forman parte de la superfamilia riboquinasa, se hizo un ensayo en el que se evaluó el efecto que tenía el  $ATP^{-4}$  sobre la actividad de la RK humana.

La actividad de la enzima se midió tal y como se describe en materiales y metodología.



**Figura 23. Actividad de la RK silvestre en función de la concentración de ATP<sup>4-</sup>.** Para llevar a cabo este ensayo, la concentración fija de D-ribosa fue 0,5 mM, y la concentración del complejo MgATP se fijó en 1,2 mM. Cada una de los puntos en el gráfico representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

Como se puede apreciar en la figura 23, el ATP<sup>4-</sup> tiene un efecto inhibitorio sobre la RK humana. Sin embargo, resulta importante señalar que existe un rango de concentraciones de ATP<sup>4-</sup> en el que no se observa este fenómeno, cuyo límite superior está en los 0,2 mM de ATP<sup>4-</sup>. La inhibición sobre la actividad de RK sólo es visible una vez que las concentraciones de ATP<sup>4-</sup> superan los 0,2 mM. Todos los ensayos realizados en esta tesis tienen una concentración de ATP<sup>4-</sup> en la cubeta, que no excedieron dicho límite.

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, la existencia de dos motivos de secuencia altamente conservados, el motivo NXXE y el motivo GXGD, ambos ubicados en el sitio activo de las enzimas, es un rasgo común para los miembros de la familia tipo riboquinasa, sugiriéndose que los residuos Asn y Glu del motivo NXXE estarían relacionados con la unión de



$\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  (Maj y col., 2002, Parducci y col., 2006) y que el residuo Asp del motivo GXGD actuaría como la base catalítica general que desprotonaría al hidroxilo del sustrato que va a ser fosforilado (Arnfors y col., 2006; Schumacher y col., 2000). Además, bajo la hipótesis de que los residuos conservados Asn199 y Glu202 del motivo NXXE participan en la catálisis de RK como determinantes de la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  al sitio activo, se construyó la mutante RK N199L reemplazando al residuo Asn199 que tiene una cadena lateral polar sin carga por Leu, que no tiene polaridad y es del mismo tamaño que Asn. Por otro lado, se construyó la mutante RK E202L reemplazando al residuo Glu202 que está cargado negativamente, por Leu, que es apolar y una unidad de carbono más pequeña que Glu. Si estos residuos participan en la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y del  $\text{Mg}^{+2}$ , entonces cambios en estos residuos debieran tener un gran impacto en la estimulación por  $\text{PO}_4^{-3}$  y en el aparentemente nulo efecto del  $\text{Mg}^{+2}$  sobre la RK humana.

Por último, para evaluar la importancia del residuo Asp269 del motivo GXGD, se construyó la mutante RK D269N, reemplazando este residuo aminoacídico por Asn, con el fin de eliminar la carga negativa. El residuo Asp tiene un grupo carboxilato, que sería fundamental para ejercer su función catalítica. Al mutarlo por Asn, que tiene una cadena lateral polar sin carga, y el mismo tamaño que Asp, estamos evaluando sólo la importancia de la carga en este residuo, ya que ambos tienen un tamaño similar.

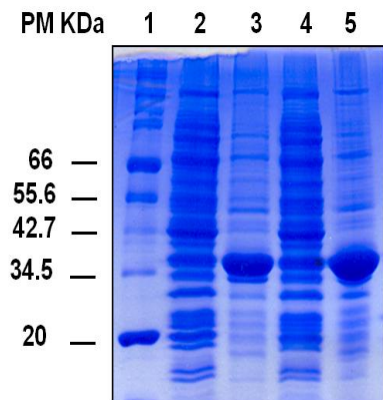
## **V. MOTIVOS GXGD y NXXE.**

### **V.1 Expresión y purificación de RK D269N, RK N199L y RK E202L.**

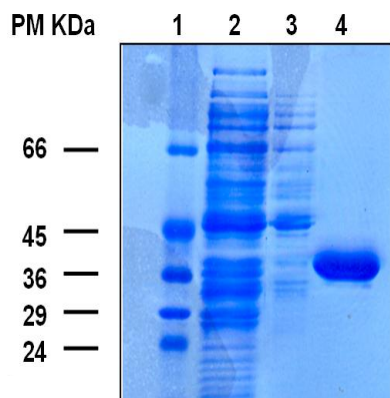
La RK D269N se expresó y purificó a homogeneidad utilizando el mismo protocolo de purificación de la RK silvestre. Sin embargo, se obtuvo mucho menos proteína purificada, en comparación a lo obtenido con la enzima silvestre. Esto se debe a que la mutante tuvo una buena sobreexpresión pero formó cuerpos de inclusión. Frente a esta situación, se realizaron numerosos test de inducción donde se variaron las condiciones de temperatura, concentración de IPTG y tiempo de inducción, hasta encontrar una condición más propicia. En la figura 24, se muestra el test de inducción en el que se probaron distintas temperaturas de inducción, y se mantuvo la concentración de IPTG en 1 mM. Se buscaron condiciones para que la proteína se sobre-expresara principalmente en la fracción soluble, o en su defecto, que la proporción en la fracción soluble aumentara, en comparación a la fracción en el pellet. Este mismo problema lo tuvimos para la expresión de las mutantes RK N199L y RK E202L. Finalmente se encontraron condiciones propicias para poder sobreexpresar la RK D269N, RK N199L y RK E202L. En el caso de la RK mutante RK D269N, se indujo con 1 mM de IPTG a 22°C, durante 8 h.

El seguimiento de las mutantes RK D269N, RK N199L y RK E202L, resultó bastante complicado, ya que por un lado, al ser tan poco activas resultó muy difícil ubicar las fracciones en que estaban presentes. Por otro lado, alícuotas del extracto crudo y del pool de columna DEAE, puestas en la cubeta para medir la actividad de RK, generaban un decaimiento en el NADH en ausencia de ATP, enmascarando la real actividad de la enzima. Es por esta razón que las purificaciones se siguieron por determinación de proteínas, y la medición de actividad en el extracto crudo y en el pool DEAE quedaron sin determinación.

En la figura 25 se muestra la purificación de la mutante, y según se puede apreciar en el carril 4, se encuentra lo suficientemente pura como para poder caracterizarla cinéticamente.

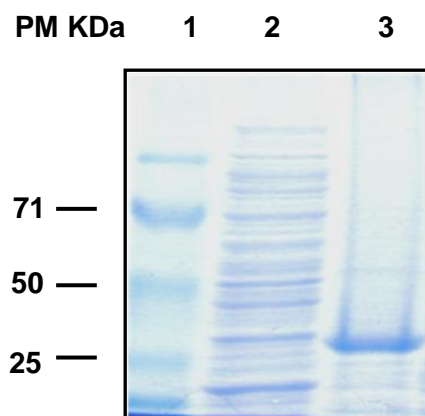


**Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalantes de RK D269N. Formación de cuerpos de inclusión.** Carril 1: estándares de peso molecular; carril 2: sobrenadante de extracto crudo proveniente de inducción a 37 °C e IPTG 1 mM; carril 3: resuspensión del pellet de extracto crudo proveniente de inducción a 37 °C e IPTG 1 mM, carril 4: sobrenadante de extracto crudo proveniente de inducción a 22 °C e IPTG 1 mM, carril 5: resuspensión del pellet de extracto crudo proveniente de inducción a 22 °C e IPTG 1 mM. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomasie. Se cargaron 20 µg de proteína por carril.



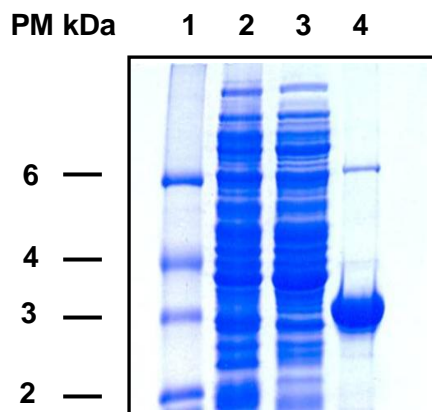
**Figura 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalantes de RK D269N. Purificación.** Carril 1: estándares de peso molecular; carril 2: extracto crudo; carril 3: pool a partir del eluído de la columna de DEAE celulosa; carril 4: pool a partir del eluído de la columna His Trap. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomasie. Se cargaron 20 µg de proteína por carril.

Por otro lado, para la expresión de la mutante RK N199L se realizaron numerosos test de inducción donde se variaron las condiciones de temperatura, concentración de IPTG y tiempo de inducción, para encontrar la condición propicia de sobreexpresión, la que resultó ser con 1 mM de IPTG a 14°C, durante 14 h. En la figura 26 se muestra la purificación de la mutante. Según se puede apreciar, en el carril 3 hay una banda que coincide con el tamaño esperado para la RK.



**Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalantes de RK N199L. Purificación.** Carril 1: estándares de peso molecular; carril 2: pool a partir del eluído de la columna His-Trap, fracciones 1-30; carril 3: pool a partir del eluído de la columna His Trap, fracciones 31-40. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomasie. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína por carril.

Finalmente, la RK mutante RK E202L se expresó y purificó a homogeneidad, a excepción de la diminuta banda de 66 kDa, tal como se observa en la figura 27, donde se aprecia una banda que coincide con el estándar de peso molecular de 36 KDa, que es el tamaño esperado para la RK. La sobreexpresión de esta mutante se indujo con 1 mM de IPTG a 14°C, durante 14 h.

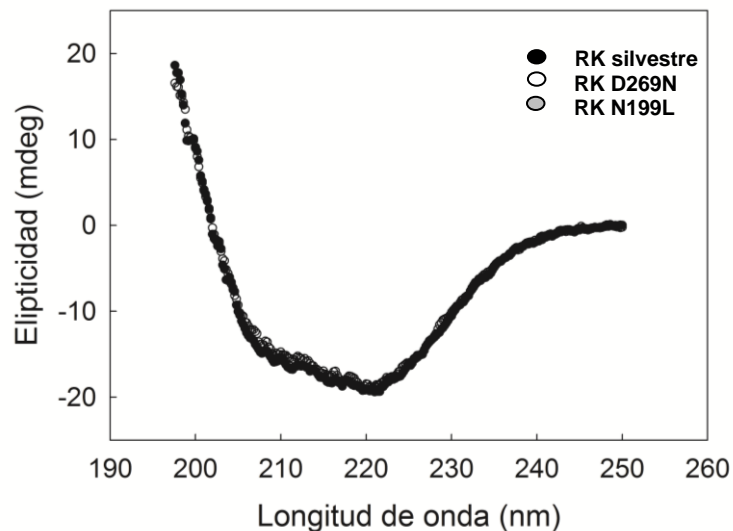


**Figura 27. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalantes de RK E202L. Purificación.** Carril 1: estándares de peso molecular; carril 2: extracto crudo; carril 3: pool a partir del eluído de la columna de DEAE celulosa; carril 4: pool a partir del eluído de la columna His Trap. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomasie. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína por carril.

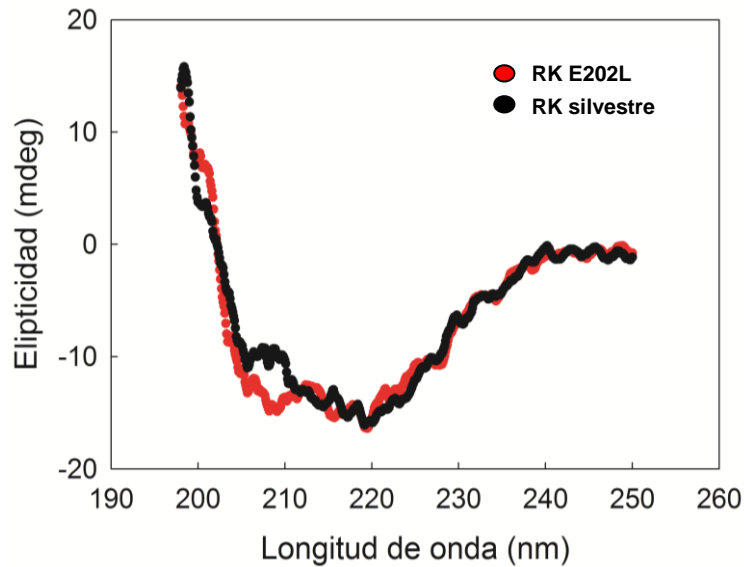
## V.2 Estructura secundaria de RK silvestre, RK D269N y RK N199L.

Con el fin de descartar que cualquier cambio aminoacídico en la RK trajera consigo alguna alteración en la estructura secundaria, se determinaron espectros de dicroísmo circular para las mutantes RK D269N, N199L y RK E202L. Como se puede observar en la figura 28, los espectros para la RK silvestre, RK D269N y RK N199L son idénticos, lo que sugiere que las tres proteínas deben poseer una estructura secundaria similar, y que los reemplazos de los residuos Asp269 por Asn y Glu 202 por Leu no trajeron consigo cambios en la estructura secundaria de la RK humana.

En la figura 29 se muestra un espectro de dicroísmo circular para la RK silvestre y para la mutante RK E202L, y lo que se observa es que ambos espectros son similares, lo que descarta que el reemplazo del residuo Glu202 por Leu haya traído consigo alguna alteración en la estructura secundaria de la RK mutante. Estos resultados nos permiten inferir que cualquier variación en los parámetros cinéticos en las enzimas mutantes deberían ser consecuencias de las mutaciones puntuales, y no de alguna alteración estructural.



**Figura 28. Espectros de dicroísmo circular de la RK silvestre y de las mutante RK D269N, y RK N199L.** La concentración de proteína usada fue de 0,14 mg/ml para la RK y las mutantes.



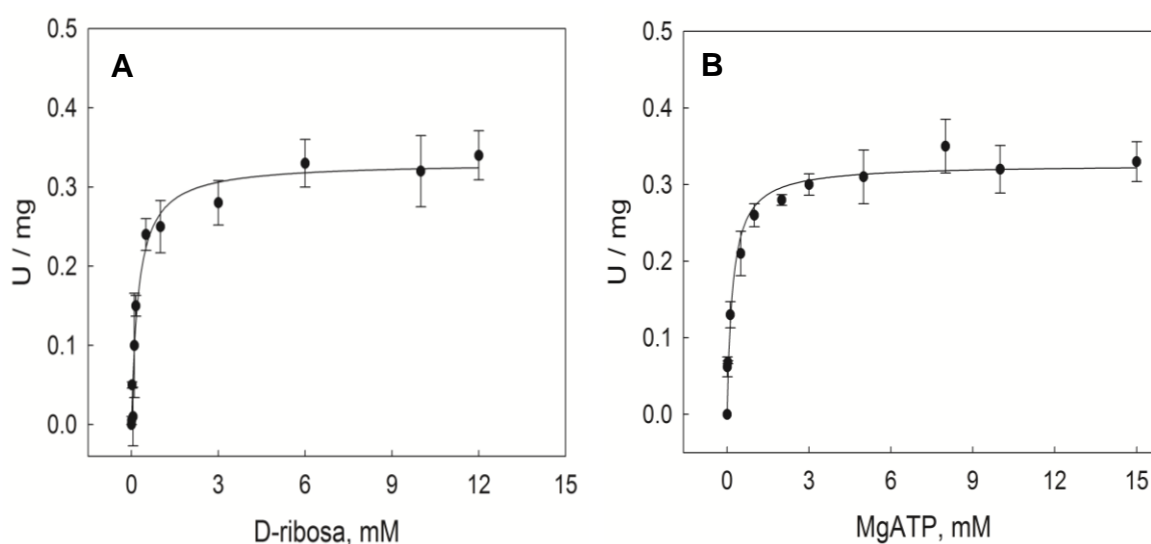
**Figura 29. Espectros de dicroísmo circular de la RK silvestre y de la mutante RK E202L.** La concentración de proteína usada fue de 0,13 mg/ml para la RK y la mutante.

### V.3 Caracterización cinética de la RK D269N. Actividad de la mutante en función de la concentración de D-ribosa y MgATP.

Se caracterizó cinéticamente a la mutante RK D269N, con el objeto de determinar si el cambio del residuo Asp 269 por Asn afectaba la catálisis enzimática, y /o modificaba la afinidad por alguno de los sustratos. Los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $k_{cat}$  que se muestran en la tabla 6, se obtuvieron ajustando los datos de manera independiente para cada uno de los sustratos, al modelo hiperbólico propuesto por Michaelis-Menten (Segel, 1975), variando la concentración de uno de los sustratos, manteniendo fija la concentración del otro, a partir de los datos mostrados en la figura 30 A y B.

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_M + S} \quad \text{Ecuación 2}$$

En primer lugar, se determinó la actividad de RK D269N variando la concentración de D-ribosa. Para este ensayo, la concentración fija de MgATP fue de 5 mM ya que hemos determinado que la mutante posee una  $K_M$  para MgATP igual a  $0,16 \pm 0,03$  mM. La  $K_M$  para D-ribosa en ausencia de  $K_2HPO_4$  tuvo un valor de  $0,29 \pm 0,01$  mM, y la  $k_{cat}$  fue  $0,19 \pm 0,04$  s<sup>-1</sup>. Si comparamos los valores de la  $K_M$  para D-ribosa medidos en RK silvestre y en la RK D269N, observamos que la enzima mutante tiene una  $K_M$  para D-ribosa que es 2,4 veces más grande que la de RK silvestre ( $0,29 \pm 0,01$  mM vs.  $0,12 \pm 0,01$  mM).



**Figura 30. Actividad de RK D269N medida en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP.** A. Para este ensayo, la concentración fija de MgATP fue de 5 mM, mientras que en (B), la concentración fija de D-ribosa fue de 5 mM. Cada uno de los puntos en ambos gráficos representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

**Tabla 6. Parámetros cinéticos de RK D269N en función de D-ribosa y MgATP.**

MgATP 5 mM			D-ribosa 5 mM		
$K_M$ D-ribosa (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$K_M$ MgATP (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
$0,29 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,004$	$0,61 \pm 0,12$	$0,16 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,008$	$0,97 \pm 0,11$

Por otro lado, si analizamos los valores de  $k_{cat}$  para cada una de las enzimas, la RK mutante tiene una  $k_{cat}$  que es 54,5 veces más pequeña que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre ( $0,19 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$  vs.  $10,36 \pm 0,38 \text{ s}^{-1}$ ).

En términos de eficiencia catalítica, podemos apreciar que la  $k_{cat}/K_M$  determinada para la RK D269N es  $0,61 \pm 0,12 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , siendo 131,2 veces más pequeña que la determinada para la RK silvestre ( $80,03 \pm 13,20 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ). Por último, el fenómeno de inhibición por D-ribosa no se aprecia en esta mutante, a diferencia de lo que ocurre con la RK silvestre, donde la  $K_i$  para D-ribosa fue igual a  $3,29 \pm 0,52 \text{ mM}$  (ver tabla 2). Las concentraciones de D-ribosa ensayadas alcanzaron los 30 mM, 10 veces superior a las concentraciones ensayadas con la enzima silvestre, lo que sugeriría que la ausencia de inhibición es un fenómeno independiente de las concentraciones ensayadas, y propio de esta mutante.

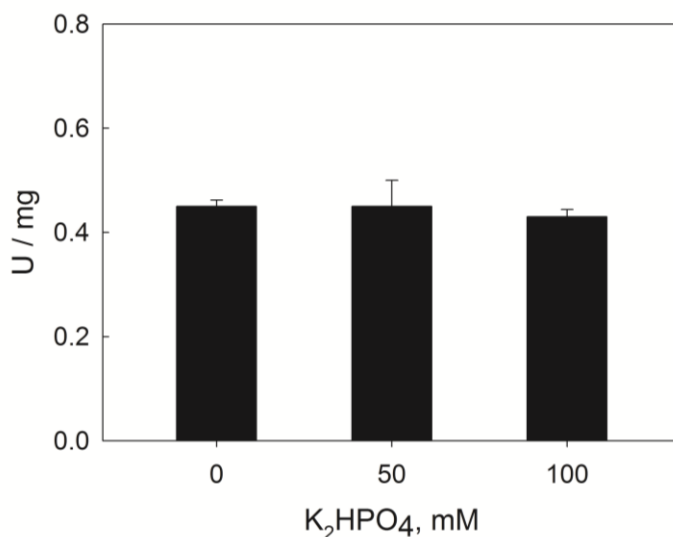
Para determinar los parámetros cinéticos en función de MgATP, la concentración de D-ribosa se fijó en 5 mM para observar que ocurría a concentraciones saturantes del azúcar, ya que según se muestra en la tabla 6, se determinó que la  $K_M$  para D-ribosa era igual a  $0,29 \pm 0,01 \text{ mM}$ . En estas condiciones, la  $K_M$  para MgATP en ausencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  fue igual a  $0,16 \text{ mM} \pm 0,03$ , y la  $k_{cat}$  tuvo un valor de  $0,18 \pm 0,008 \text{ s}^{-1}$ . Si comparamos los valores de la  $K_M$  para MgATP medidos en la RK D269N y en la RK silvestre, observamos que ambas enzimas tienen valores de  $K_M$  para MgATP similares ( $0,16 \pm 0,03 \text{ mM}$  y  $0,11 \pm 0,02 \text{ mM}$ ). Por otro lado, si analizamos los valores de  $k_{cat}$  para cada una de las enzimas, vemos que la RK mutante tiene una  $k_{cat}$  igual a  $0,18 \pm 0,008 \text{ mM s}^{-1}$  que es 31,8 veces más pequeña que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre ( $5,73 \pm 0,71 \text{ s}^{-1}$ ).

En términos de eficiencia catalítica, podemos apreciar que la eficiencia catalítica para la RK D269N es  $0,97 \pm 0,11 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , siendo 55 veces más pequeña que la determinada para la RK silvestre ( $53,35 \pm 7,78 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ). El fenómeno de inhibición por MgATP no se observa, a diferencia de lo que ocurre con la RK silvestre, ya que para esa enzima se determinó una  $K_i$  de  $15,16 \pm 0,88 \text{ mM}$ .



### V.3.1 Efecto del $K_2HPO_4$ sobre la actividad de la RK D269N.

Con el propósito de determinar el efecto del  $K_2HPO_4$  sobre la actividad de la RK D269N, se midió la actividad enzimática en presencia de este efector. Como se puede observar en la figura 31, se midió la actividad de la enzima en ausencia y en presencia de concentraciones de  $K_2HPO_4$  iguales a 50 y 100 mM. Los resultados muestran que este efector no modifica la actividad de la RK D269N. Este resultado difiere de lo visto para la RK silvestre, ya que una concentración 100 mM de  $K_2HPO_4$  produce una activación de la RK silvestre cercana a las 2 veces. El efecto activador del  $K_2HPO_4$  en la RK silvestre se ve a concentraciones saturantes de los sustratos; condición que se usó también para la determinación del efecto del  $K_2HPO_4$  en la RK mutante D269N, por lo que, la ausencia de activación en la mutante no podría ser explicada por esta causa.



**Figura 31. Efecto del  $K_2HPO_4$  en la actividad de la RK mutante D269N.** Las concentraciones de  $K_2HPO_4$  utilizadas fueron: 0 mM, 50 mM y 100 mM. La actividad enzimática se determinó utilizando concentraciones de MgATP 5 mM y D-ribosa 5 mM. Cada una de las barras en el gráfico representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

La mutación del residuo Asp269 por Asn condujo a que la enzima mutante RK D269N no sea activada por el  $K_2HPO_4$ , que tenga una  $k_{cat}$  que es 54,5 veces más pequeña que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre, y una  $K_M$  para D-ribosa que es 2,4 veces más grande que la de RK silvestre, mientras que los valores de  $K_M$  para MgATP medidos en la RK D269N y en la RK silvestre son similares. De

esta manera, es posible inferir que el residuo Asp269 es muy importante en la catálisis, en la unión de D-ribosa, y en la regulación por  $K_2HPO_4$ , aunque su papel como el residuo catalítico en la RK humana no es concluyente

#### **V.4 Caracterización cinética de la RK N199L. Actividad de la mutante en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP.**

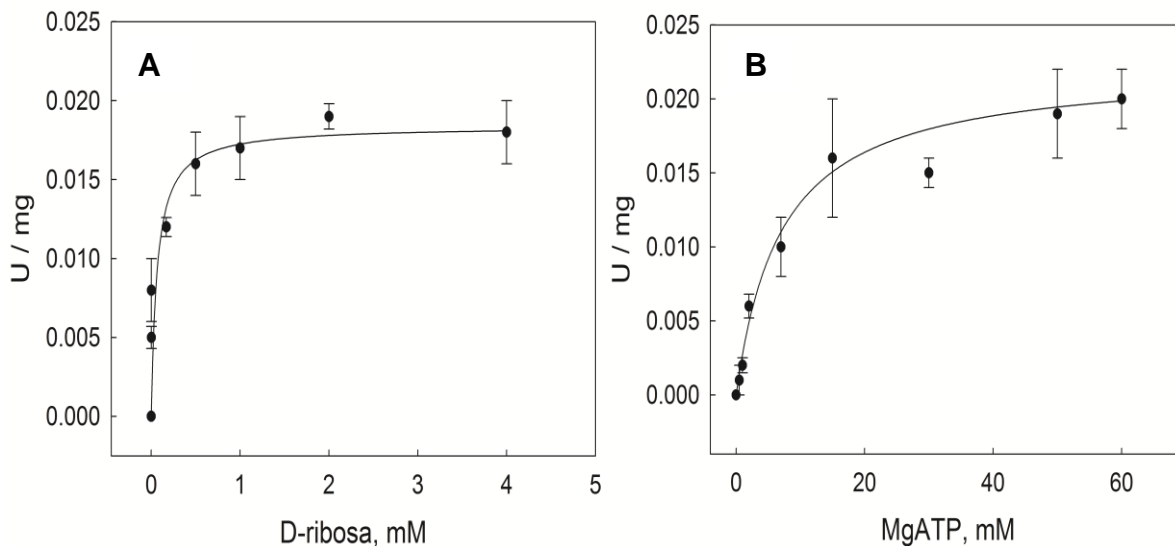
Con el objeto de estudiar el rol del residuo Asn199 como determinante de la unión de  $PO_4^{-3}$  o  $Mg^{+2}$  dentro del sitio activo, se reemplazó al residuo Asn199 por Leu, y se caracterizó cinéticamente a la enzima N199L. Los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $k_{cat}$  que se muestran en la tabla 7, se obtuvieron ajustando los datos de manera independiente para cada uno de los sustratos, al modelo hiperbólico propuesto por Michaelis-Menten (Segel, 1975), variando la concentración de uno de los sustratos, dejando fija la concentración del otro, a partir de los datos mostrados en la figura 32 A y B (Ecuación 2). Vale la pena señalar que todos los ensayos cinéticos en la RK N199L tuvieron que ser realizados a concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre altísimas, iguales a 30 mM, ya que a concentraciones inferiores, no fue posible observar actividad.

En primer lugar se determinó la actividad de RKN199L variando la concentración de D-ribosa. Para este ensayo, la concentración fija de MgATP fue de 75 mM. Se utilizó dicha concentración del complejo ya que previamente determinamos que la mutante posee una  $K_M$  para MgATP igual a  $7,48 \pm 1,49$  mM (ver tabla 7).

Al observar los parámetros cinéticos que aparecen en la tabla 7, obtenidos a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura 32 (A), la  $K_M$  para D-ribosa en ausencia de  $K_2HPO_4$  tuvo un valor de  $0,12 \pm 0,03$  mM y la  $k_{cat}$  de la enzima fue igual a  $0,01 \pm 0,001$  s<sup>-1</sup>. Si comparamos los valores de la  $K_M$  para D-ribosa medidos en RK N199L y RK silvestre, observamos que ambas enzimas tienen una  $K_M$  idéntica ( $0,12 \pm 0,03$  mM y  $0,12 \pm 0,01$  mM). Por otro lado, si analizamos los valores de  $k_{cat}$  para cada una de las enzimas, vemos que la RK mutante tiene una  $k_{cat}$  que es 1.036 veces más pequeño que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre ( $0,01 \pm 0,001$  s<sup>-1</sup> vs.  $10,36 \pm 0,38$  s<sup>-1</sup>).

En términos de eficiencia catalítica, podemos apreciar que la  $k_{cat}/K_M$  determinada para la RK N199L es  $0,07 \pm 0,004$  s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, siendo 1.143 veces más pequeña que la determinada para la RK silvestre ( $80,03 \pm 13,20$  s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>). Por último, la RK N199L no presenta inhibición por D-

ribosa, a diferencia de lo observado en la enzima silvestre, ya que para esa enzima la  $K_i$  para D-ribosa fue igual a  $3,29 \pm 0,52$  mM (ver tabla 2).



**Figura 32. Actividad de RK N199L en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP.** A. Para este ensayo, la concentración fija de MgATP fue de 75 mM, mientras que en (B), la concentración fija de D-ribosa fue de 5 mM. Cada uno de los puntos en ambos gráficos representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

**Tabla 7. Parámetros cinéticos de RK N199L en función de D-ribosa y MgATP.**

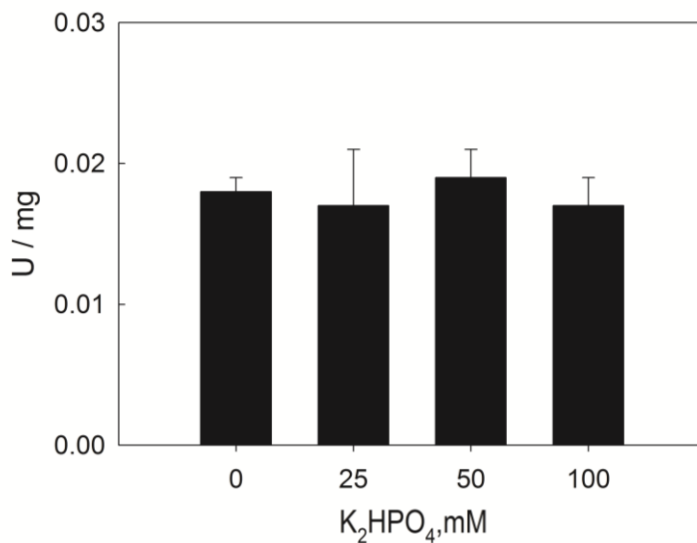
MgATP 75 mM			D-ribosa 5 mM		
$K_M$ D-ribosa (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )	$K_M$ MgATP (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )
$0,12 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,001$	$0,07 \pm 0,004$	$7,48 \pm 1,49$	$0,01 \pm 0,002$	$0,002 \pm 0,0007$

Para determinar los parámetros cinéticos en función del MgATP, la concentración de D-ribosa se fijó en 5 mM para observar que ocurría a concentraciones saturantes del azúcar, considerando que la  $K_M$  para D-ribosa era igual a  $0,12 \pm 0,03$  mM (tabla 7). Al observar los parámetros cinéticos que aparecen en la tabla 7, obtenidos a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura 32 (B), vemos que en presencia de D-ribosa 5 mM, se determinó que el valor de la  $K_M$  para MgATP en ausencia de  $K_2HPO_4$  fue igual a  $7,48 \pm 1,49$  mM, y que la  $k_{cat}$  de la enzima tuvo un valor de  $0,01 \pm 0,002$  s<sup>-1</sup>. Si comparamos los valores de la  $K_M$  para MgATP medidos en la RK N199L y en la enzima silvestre, observamos que la enzima mutante tiene una  $K_M$  para MgATP que es 68 veces más grande que la de RK silvestre ( $0,11 \pm 0,02$  mM). Por otro lado, si analizamos los valores de  $k_{cat}$  para cada una de las enzimas, vemos que la RK mutante tiene una  $k_{cat}$  igual a  $0,01 \pm 0,002$  s<sup>-1</sup> que es 573 veces más pequeña que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre ( $5,73 \pm 0,71$  s<sup>-1</sup>).

En términos de eficiencia catalítica, podemos apreciar que la eficiencia catalítica para la RK N199L es  $0,002 \pm 0,0007$  s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, siendo 26.675 veces más pequeña que la determinada para la RK silvestre ( $53,35 \pm 7,78$  s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>). El fenómeno de inhibición por MgATP no se observa en la RK N199L, a diferencia de lo que ocurre con la RK silvestre, ya que para esta enzima se determinó una  $K_i$  de  $15,16 \pm 0,88$  mM.

#### **V.4.1 Efecto del $K_2HPO_4$ sobre la actividad de RK N199L.**

Se determinó el efecto del  $K_2HPO_4$  sobre la mutante RK N199L. Como se puede observar en la figura 33, se midió la actividad de la enzima en ausencia del efector y en presencia de concentraciones iguales a 25, 50 y 100 mM. Los resultados muestran que el  $K_2HPO_4$  no ejerce ningún efecto sobre la actividad de la RK N199L, a diferencia de lo observado en la RK silvestre, a concentraciones saturantes de ambos sustratos.



**Figura 33. Efecto del K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en la actividad de la RK mutante N199L.** Las concentraciones de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> utilizadas fueron: 0 mM, 50 mM y 100 mM. La actividad enzimática se determinó utilizando concentraciones de MgATP 75 mM y D-ribosa 5 mM. Cada una de las barras en el gráfico representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

Estos resultados indican que el reemplazo del residuo Asn199 por Leu da lugar a una enzima que tiene una bajísima actividad y que no es activada por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. La mutante RK N199L tiene una  $k_{cat}$  que es más de 500 veces más pequeña que la de la enzima silvestre y una  $K_M$  para MgATP casi 70 veces mayor que la enzima silvestre. De esta manera, es posible inferir que el residuo Asn199 es muy importante en la catálisis, en la unión de ATP, y que debe cumplir un rol importante en la regulación por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

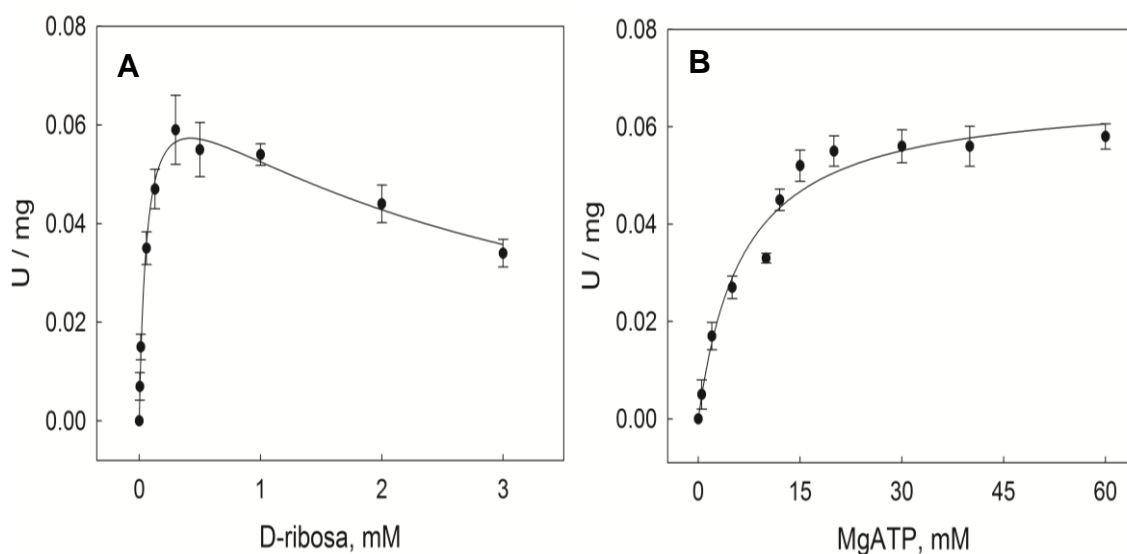
## V.5 Caracterización cinética de RK E202L. Actividad de la mutante en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP.

Para estudiar el rol del residuo E202L como determinante de la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  dentro del sitio activo, se reemplazó al residuo Glu202 por Leu, y se caracterizó cinéticamente a la enzima RK E202L. Todos los ensayos cinéticos en la RK E202L tuvieron que ser realizados a concentraciones de  $\text{Mg}^{+2}$  libre altísimas, iguales a 30 mM, ya que, al igual que para la RK N199L, a concentraciones inferiores a 30 mM de  $\text{Mg}^{+2}$  libre, no fue posible observar actividad. Los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $k_{\text{cat}}$  que se muestran en la tabla 8, se obtuvieron ajustando los datos de manera independiente para cada uno de los sustratos. Para el caso de la D-ribosa, la RK mutante mostró inhibición por el azúcar, razón por la cual los datos se ajustaron a la ecuación 1 que describe la velocidad de una reacción bisustrato donde la concentración de un sustrato inhibitorio, en este caso, la D-ribosa, se varía, manteniendo fija la concentración del otro sustrato, el MgATP. En el caso del MgATP, la enzima no mostró inhibición, por lo que los datos se ajustaron al modelo hiperbólico propuesto por Michaelis-Menten (Segel, 1975), variando la concentración del nucleótido, dejando fija la concentración del azúcar, a partir de los datos mostrados en la figura 34 B (ecuación 2).

En el ensayo de determinación de la actividad de RK E202L en función de la D-ribosa, la concentración fija de MgATP fue de 70 mM. Se utilizó dicha concentración del complejo ya que hemos determinado que la RK E202L posee una  $K_M$  para MgATP igual a  $5,73 \pm 1,12$  mM (ver tabla 8). Al observar los parámetros cinéticos que aparecen en la tabla 8, obtenidos a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura 34 A, se determinó que el valor de la  $K_M$  para D-ribosa en ausencia de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  fue  $0,08 \pm 0,02$  mM, y que la  $k_{\text{cat}}$  de la enzima tuvo un valor de  $0,04 \pm 0,006$   $\text{s}^{-1}$ . Si comparamos los valores de la  $K_M$  para D-ribosa medidos en la RK E202L y en la enzima silvestre, observamos que la enzima mutante tiene una  $K_M$  para D-ribosa que es 1,5 veces más pequeña que la de RK silvestre ( $0,12 \pm 0,01$  mM), mientras que la  $k_{\text{cat}}$  de la enzima mutante es 259 veces más pequeña que la medida en la enzima silvestre ( $10,36 \pm 0,38$   $\text{s}^{-1}$ ). En términos de eficiencia catalítica, podemos apreciar que la  $k_{\text{cat}}/K_M$  determinada para la RK E202L es  $0,56 \pm 0,09$   $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ , siendo 142,9 veces más pequeña que la determinada para la RK silvestre ( $80,03$   $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ ). Por último, puede apreciarse, que al medir la actividad enzimática de RK E202L en función de D-ribosa, la enzima

presenta inhibición por el azúcar. A bajas concentraciones de D-ribosa se produjo un incremento en la actividad enzimática, y a concentraciones mayores a 0,5 mM, se observó una inhibición de la actividad, midiéndose una  $K_i$  igual a  $2,61 \pm 0,66$  mM. Esto coincide con lo observado para la RK silvestre, ya que la enzima silvestre tiene una  $K_i$  para D-ribosa igual a  $3,29 \pm 0,52$  mM.

Para la determinación de los parámetros cinéticos en función del MgATP, la concentración de D-ribosa se fijó en 0,8 mM para observar que ocurría a concentraciones saturantes del azúcar ( $K_M$  para D-ribosa es  $0,08 \pm 0,02$  mM). La actividad de la RK E202L tiene una dependencia hiperbólica con la concentración de MgATP, a concentraciones saturantes de D-ribosa. Al observar los parámetros cinéticos que aparecen en la tabla 8, obtenidos a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura 34 (B), vemos que en presencia de D-ribosa 0,8 mM, se determinó que el valor de la  $K_M$  para MgATP en ausencia de  $K_2HPO_4$  tuvo un valor de  $5,73 \pm 1,12$  mM, y que la  $k_{cat}$  de la enzima fue igual a  $0,04 \pm 0,002$  s<sup>-1</sup>. Si comparamos los valores de la  $K_M$  para MgATP medidos en la RK E202L y en la enzima silvestre, observamos que la enzima mutante tiene una  $K_M$  para MgATP que es 52,1 veces más grande que la de RK silvestre ( $5,73 \pm 1,12$  mM vs.  $0,11 \pm 0,02$  mM). Por otro lado, si analizamos los valores de  $k_{cat}$  para cada una de las enzimas, vemos que la RK E202L tiene una  $k_{cat}$  igual a  $0,04 \pm 0,002$  s<sup>-1</sup> que es 143,25 veces más pequeña que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre ( $5,73 \pm 0,71$  s<sup>-1</sup>).



**Figura 34. Actividad de RK E202L en función de la concentración de D-ribosa y de MgATP. A.** Para este ensayo, la concentración fija de MgATP fue de 70 mM. **B.** Para este ensayo, la concentración fija de D-ribosa fue de 0,8 mM. Cada uno de los puntos en ambos gráficos representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

**Tabla 8. Parámetros cinéticos de RK E202L en función de D-ribosa y MgATP.**

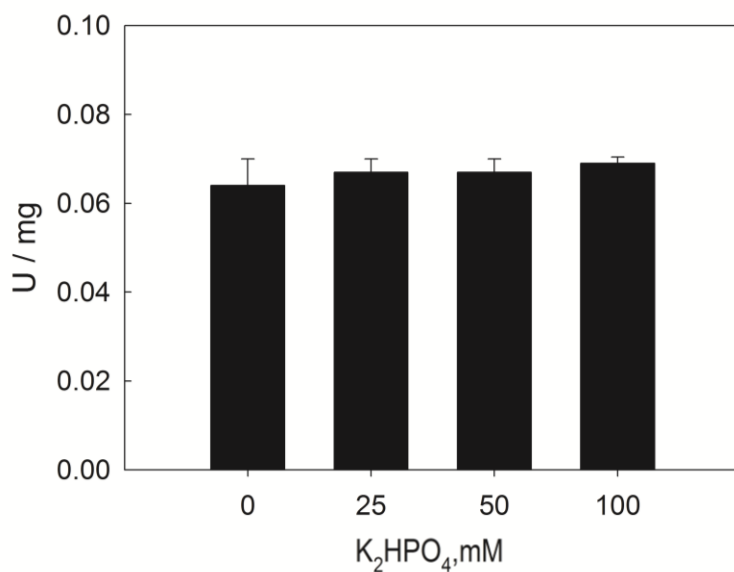
<b>MgATP 70 mM</b>				<b>D-ribosa 0,8 mM</b>		
<b>K<sub>M</sub> D-ribosa</b> (mM)	<b>k<sub>cat</sub></b> (s <sup>-1</sup> )	<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub></b> (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	<b>K<sub>i</sub></b> (mM)	<b>K<sub>M</sub> MgATP</b> (mM)	<b>k<sub>cat</sub></b> (s <sup>-1</sup> )	<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub></b> (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,006	0,56 ± 0,09	2,61 ± 0,66	5,73 ± 1,12	0,04 ± 0,002	0,01 ± 0,0001

En términos de eficiencia catalítica, podemos apreciar que la eficiencia catalítica para la RK E202L es  $0,01 \pm 0,001 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , siendo 5.335 veces más pequeña que la determinada para la RK silvestre ( $53,35 \pm 7,78 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ). Por último, no se observa inhibición por MgATP en la RK E202L, a diferencia de lo que ocurre en la RK silvestre, ya que para esta enzima se determinó una  $K_i$  de  $15,16 \pm 0,88 \text{ mM}$

#### **V.5.1 Efecto del K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sobre la actividad de RK E202L.**

Se determinó el efecto del K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sobre la mutante RK E202L. Como se puede observar en la figura 35, se midió la actividad de la enzima en ausencia del efector y en presencia de concentraciones iguales a 25, 50 y 100 mM. Los resultados muestran que el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no ejerce ningún efecto sobre la actividad de la RK E202L.





**Figura 35. Efecto del K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en la actividad de RK E202L.** Las concentraciones de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> utilizadas fueron: 0 mM, 25 mM, 50 mM y 100 mM. La actividad enzimática se determinó utilizando concentraciones de MgATP 70 mM y D-ribosa 0,8 mM. Cada una de las barras en el gráfico representa el promedio de 3 mediciones  $\pm$  e.s.

Todos estos resultados muestran el reemplazo del residuo Glu202 por Leu llevó a que la enzima tuviera una actividad bajísima y que no fuera activada por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. La mutante E202L tiene una  $k_{cat}$  que es más de 140 veces más pequeña que la de la enzima silvestre y una  $K_M$  para MgATP casi 50 veces más grande que la de la enzima silvestre. De esta manera, es posible inferir que el residuo E202L es muy importante en la catálisis, en la unión de ATP, y que debe cumplir un rol en la regulación por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

## VI DOCKING (ACOPLAMIENTO MOLECULAR) Y CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES *IN SILICO*.

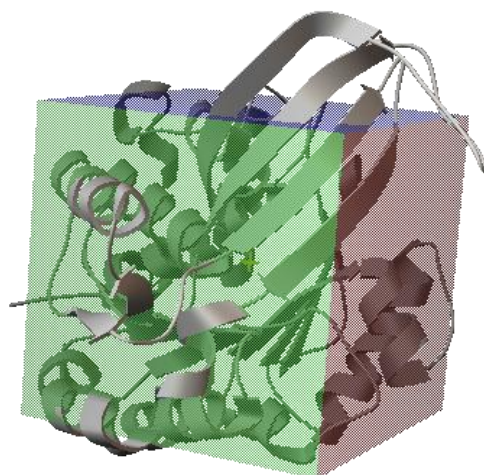
### VI.1 Acoplamiento molecular del $\text{PO}_4^{-3}$ sobre la RK silvestre.

El acoplamiento molecular es un procedimiento que intenta predecir eficientemente la unión entre una molécula pequeña (ligando) y una macromolécula (receptor), comenzando con ambas estructuras separadas. El éxito de esta técnica radica en predecir las conformaciones del ligando y la afinidad de su unión con el receptor, lo que se traduce en determinar la conformación unida preferida y la energía libre de unión, lo que va asociado a un ranking de resultados que incluye distintas conformaciones con distintas energías de unión, basadas en una función de puntuación, que considera interacciones interatómicas, cargas eléctricas, repulsiones y puentes de hidrógeno, entre otras cosas (Trott y Olson, 2009).

Como se planteó anteriormente, tomando como base que la estructura para la RK de *E. coli* estaba resuelta en complejo con  $\text{PO}_4^{-3}$ , un análogo de ATP y D-ribosa (PDBid: 1RKD), se utilizó dicho  $\text{PO}_4^{-3}$  para hacer el acoplamiento molecular sobre la estructura de la RK de *H. sapiens*. Para llevar a cabo el acoplamiento, se usó como receptor a la estructura de la RK de *H. sapiens* (PDBid: 2FV7) junto a sus ligandos ADP,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Na}^+$ , y como ligando, al  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece en la estructura cristalográfica de la RK de *E. coli*. Nuestra apuesta fue la siguiente: considerando que la estructura de la RK de *H. sapiens* y la estructura de la RK de *E. coli* tienen una gran homología estructural, era muy probable que la posición que ocupara el  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro del sitio activo de la RK bacteriana, fuera idéntica a la que ocuparía este ión dentro del sitio activo de la RK humana. Una vez demostrado que ambas RK poseían una gran homología estructural (fig. 8), se utilizó el programa AutoDock Vina (Trott y Olson, 2009) para hacer el acoplamiento molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la estructura de la RK de *H. sapiens*, y estudiar qué lugar debería ocupar el  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la RK humana.

## VI.2 La elección de la celda.

Un paso crucial para llevar a cabo el acoplamiento molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$  fue ubicar una celda dentro de la macromolécula receptora (RK humana), ya que esta celda representaba el área dentro de la cual se esperaba que el ligando se situara. La ubicación que tuviera la celda dentro del receptor era decisión del usuario, al igual que su tamaño. Ahora bien, para tener la certeza que el resultado obtenido a partir del acoplamiento fuera consecuencia de que se había encontrado el sitio más propicio dentro de la proteína para el acoplamiento del  $\text{PO}_4^{-3}$ , y además, evitar que existieran dudas de que la ubicación y tamaño de la celda pudieran direccionar de alguna manera el acoplamiento hacia un sitio en específico dentro de la proteína, lo primero que se hizo fue realizar un control llamado “acoplamiento ciego” (fig. 36). Este control consistió en insertar una celda de tamaño gigante, que abarcara a toda la proteína. De esta manera, el resultado del acoplamiento molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$  sólo sería consecuencia de la afinidad existente entre la proteína y el ligando, y no resultado del tamaño de la celda y/o de la ubicación de ésta dentro de la RK humana. Como puede observarse en la figura 36 para el acoplamiento ciego se utilizó una celda que abarcó a más del 95% de la superficie de la RK humana. Una vez establecido el tamaño de la celda expresados en una unidad arbitraria de puntos totales en la grilla, igual a 29791, se procedió a hacer el acoplamiento molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la proteína.



**Figura 36. Ubicación de la celda para el acoplamiento molecular ciego del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la RK silvestre.** Representación de la estructura de la RK humana junto a sus ligandos, mediante un diagrama de cintas. El cubo tricolor dentro del cual aparece la RK humana constituye la celda dentro de la cual se hizo el acoplamiento molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$ .

### VI.3 La energía libre de unión.

El programa Autodock Vina entregó 9 soluciones para el acoplamiento molecular ciego de  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la RK humana. Cada una de las soluciones corresponde a una posición y/o conformación que ocupa el  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la celda. La diferencia entre cada uno de ellas radica en que cada solución tiene asignada una energía libre de unión, existiendo una jerarquización entre ellas donde la posición número uno dentro de la lista de las posibles soluciones la ocupa la posición y/o conformación del  $\text{PO}_4^{-3}$  que tiene asignada la energía libre de unión más negativa. Sin embargo, cabe señalar que la mejor solución no es siempre la que tenga el mínimo de energía, ya que dicho resultado puede corresponder a una ubicación o conformación del  $\text{PO}_4^{-3}$  que no se ajusta a la solución esperada, que en este caso, sería, la posición que ocupa el  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la estructura de la RK de *E. coli*, que de aquí en adelante llamaré “ $\text{PO}_4^{-3}$  referencial”, dentro del sitio activo de la proteína, cerca del motivo NXXE.

Dicho esto, y analizando los resultados del acoplamiento molecular, la posición y/o conformación más probable tiene asignada una energía libre de unión de -3,4 Kcal/mol. Según se puede observar en la tabla 9, existen 2 soluciones que tienen la misma energía libre de unión. La diferencia entre cada una de ellas está en que el  $\text{PO}_4^{-3}$  está ubicado en la misma posición, pero con conformaciones distintas. Las siguientes soluciones tienen una energía libre de unión menor, y se descartan porque la primera solución es la que tiene la orientación más similar al  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial.

La única manera de analizar si la posición que ocupó el  $\text{PO}_4^{-3}$  que se acopló dentro de la RK humana era similar a la posición que ocupa el  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial dentro de la RK bacteriana, fue haciendo una superposición estructural entre la RK de *H. sapiens* junto al  $\text{PO}_4^{-3}$  acoplado dentro de ella (color rojo), y la estructura de la RK de *E. coli* junto al  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece como ligando en su estructura, cuyo nombre con fines prácticos es  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial (color amarillo), y observar cuán cerca quedaron ambos  $\text{PO}_4^{-3}$  (fig.37).

Según se puede apreciar, el  $\text{PO}_4^{-3}$  acoplado se muestra en color rojo, y dicho  $\text{PO}_4^{-3}$  aparece acoplado dentro del sitio activo, muy cercano del  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial, que es el  $\text{PO}_4^{-3}$  que se observa en la estructura de la RK de *E. coli*, y que en esta figura tiene color amarillo.

Tabla 9. Listado de las energías libres de unión para el acoplamiento molecular ciego del  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la RK silvestre.

Soluciones	Energías libre de unión (Kcal / mol)
1	-3,4
2	-3,4
3	-3,3
4	-3,2
5	-3,2
6	-3,1
7	-3,1
8	-3,1
9	-3,0

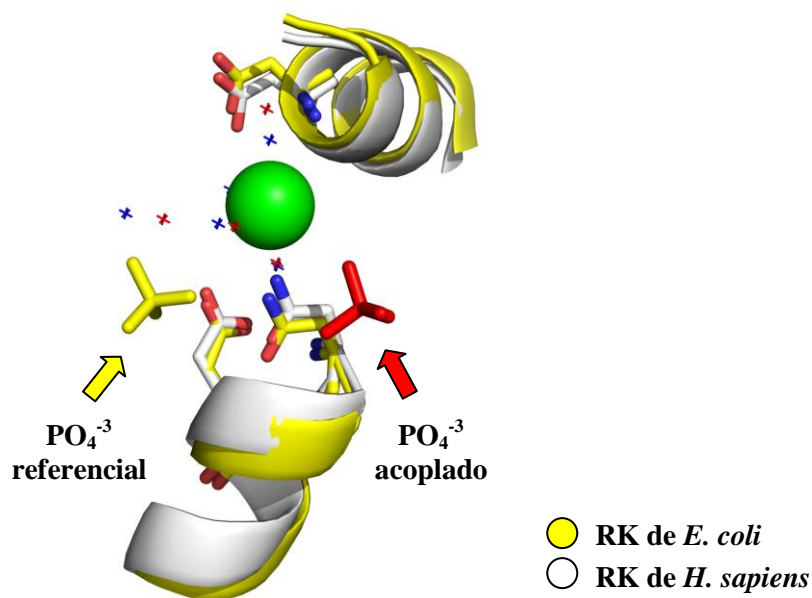


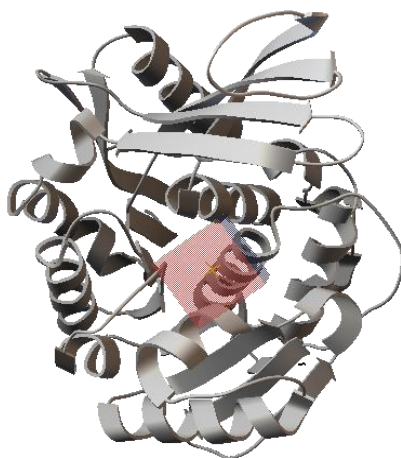
Figura 37. Acoplamiento molecular ciego del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la RK silvestre. Superposición estructural entre la RK de *H. sapiens* (cintas color blanco) y el  $\text{PO}_4^{-3}$  que fue acoplado dentro de ella (color rojo), y la estructura de la RK de *E. coli* (cintas color amarillo) junto al  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece como ligando en su estructura, cuyo nombre con fines prácticos es  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial (color amarillo).

La distancia que separa a ambos  $\text{PO}_4^{-3}$  es de 7,8 Å, lo que nos estaría indicando que pese a que se utilizó una celda gigante para fijar los límites espaciales del acoplamiento del  $\text{PO}_4^{-3}$ , el programa Autodock Vina estimó que la posición más probable que el  $\text{PO}_4^{-3}$  acoplado ocuparía dentro de la RK humana es precisamente en su sitio activo.

Este resultado fue muy auspicioso, y el siguiente paso fue acotar la celda al sitio activo y observar si dentro de estos nuevos límites, más pequeños, la posición que ocuparía el  $\text{PO}_4^{-3}$  acoplado después de un nuevo acoplamiento sería más parecida a la que tiene el  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial.

#### VI.4 Acoplamiento acotado.

Considerando el resultado obtenido en el acoplamiento ciego, se insertó una celda más pequeña dentro de la RK humana, ubicada en el sitio activo de la RK humana, y se realizó un nuevo acoplamiento de  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre dicha enzima (fig. 38). Se procedió de igual manera que para el acoplamiento ciego, y la única diferencia estuvo en la asignación de las dimensiones de la celda, y en la ubicación de ésta dentro de la quinasa humana. El tamaño de la celda, es 41 veces más pequeña que la usada en el acoplamiento ciego, ocupando un espacio muy pequeño dentro de la proteína, posicionándose en su sitio activo.



**Figura 38. Ubicación de la celda para el acoplamiento molecular acotado del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la RK silvestre.** Representación de la estructura de la RK humana junto a sus ligandos, mediante un diagrama de cintas. El cubo que aparece dentro de la RK humana constituye la celda dentro de la cual se hizo el acoplamiento molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$ .

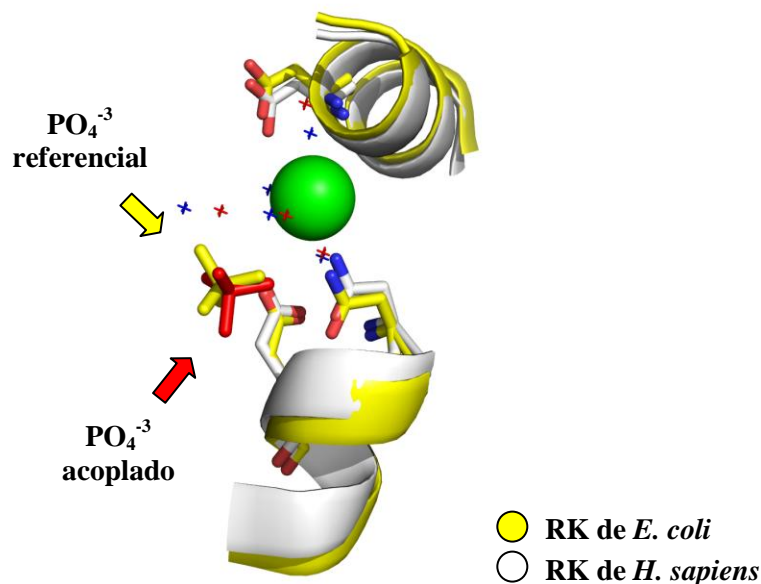
El programa Autodock Vina entregó 9 soluciones para el acoplamiento molecular acotado de  $\text{PO}_4^{-3}$ , dentro de la estructura de la RK humana (tabla 10). La solución con la posición y conformación más parecida a la del  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial tiene asignada una energía libre de unión de -2,5 Kcal/mol.

**Tabla 10. Listado de las energías libres de unión para el acoplamiento molecular acotado del  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la RK silvestre.**

Soluciones	Energías libre de unión (Kcal / mol)
1	-2,5
2	-2,4
3	-2,4
4	-2,4
5	-2,3
6	-2,3
7	-2,3
8	-2,3
9	-2,2

El resultado del acoplamiento molecular acotado se puede observar con claridad en la figura 39, en la que se muestra una superposición estructural entre la RK de *H. sapiens* y el  $\text{PO}_4^{-3}$  acoplado dentro de ella, y la estructura de la RK de *E. coli* junto al  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece como ligando en su estructura.

Según se puede apreciar, el  $\text{PO}_4^{-3}$  acoplado aparece muy cercano del  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial. La distancia que separa a ambos  $\text{PO}_4^{-3}$  es de 0,5 Å, lo que nos estaría indicando que, según esta herramienta bioinformática, si hubiera un  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la RK humana, éste ocuparía una posición casi idéntica a la que tiene el  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la RK de *E. coli*.



**Figura 39. Acoplamiento molecular acotado del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la RK silvestre.** Superposición estructural entre la RK de *H. sapiens* (cintas color blanco) y el  $\text{PO}_4^{-3}$  que fue acoplado dentro de ella (color rojo), y la estructura de la RK de *E. coli* (cintas color amarillo) junto al  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece como ligando en su estructura ( $\text{PO}_4^{-3}$  referencial, color amarillo).

### VI.5 Construcción de mutantes *in silico*. Acoplamiento molecular de $\text{PO}_4^{-3}$ sobre la RK D269N, RK N199L y RK E202L.

Con el objeto de buscar una explicación a los resultados obtenidos para cada una de las mutantes, en relación al nulo efecto que el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tuvo sobre RKD269N, N199L y E202L, se utilizó el acoplamiento molecular como una herramienta que pudiera responder esta inquietud. Para esto se construyeron las mutantes *in silico* RK D269N, RK N199L y RK E202L haciendo mutaciones puntuales en la estructura de la RK humana, utilizando el programa Pymol. Luego se procedió a realizar el acoplamiento molecular de  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre cada una de las mutantes *in silico*, tal como se hizo con la RK silvestre. El programa Autodock Vina entregó 9 soluciones para el acoplamiento molecular acotado de  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre la RK D269N, la RK N199L y la RK E202L. Según se puede observar en la tabla 11, para la RK D269N, la solución con la posición y conformación más parecida a la del  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial tiene asignada una energía libre de unión de

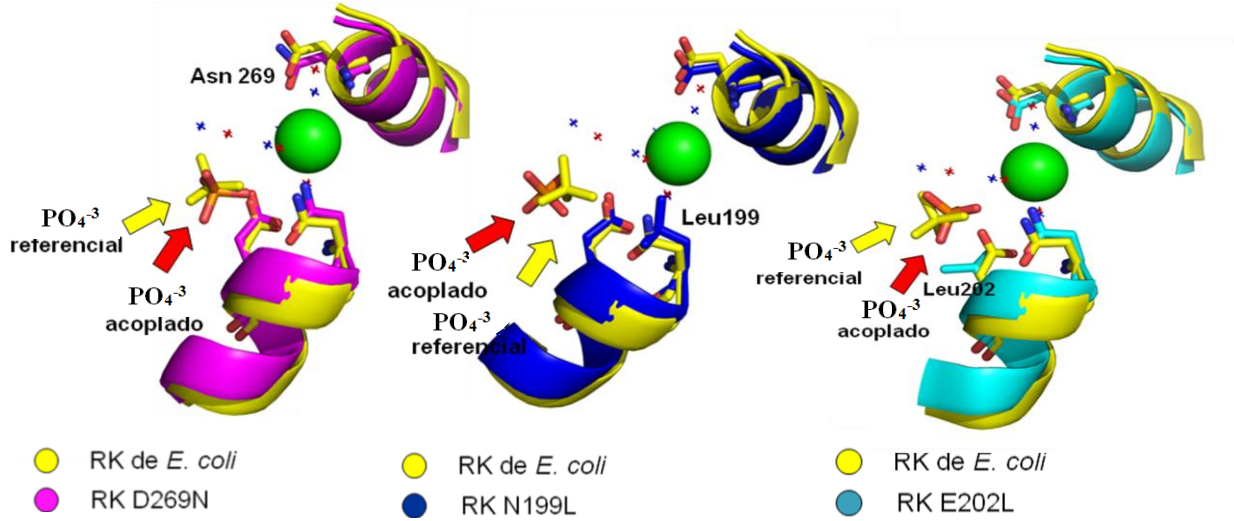


-2,5 Kcal/mol., mientras que para la RK N199L la conformación más parecida a la del  $\text{PO}_4^{-3}$  referencial tuvo una energía libre de unión igual a -2,3 Kcal/mol y para la RK E202L fue de -2,4 Kcal/mol. El resultado del acoplamiento molecular acotado para cada una de las tres mutantes, se puede observar con claridad en la figura 40, en la que se muestra una superposición estructural entre las mutantes RK D269N, RK N199L y RK E202L y el  $\text{PO}_4^{-3}$  acoplado dentro de ellas, y la estructura de la RK de *E. coli* junto al  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece como ligando en su estructura, observándose a ambos  $\text{PO}_4^{-3}$  muy cerca uno del otro.

Para las tres mutantes, la distancia que separa a ambos  $\text{PO}_4^{-3}$  es 0,5 Å, lo que nos estaría indicando que si hubiera un  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de alguna de las tres mutantes, éste ocuparía una posición casi idéntica a la que tiene el  $\text{PO}_4^{-3}$  en la RK de *E. coli*, y estaría sugiriendo que para el programa Autodock Vina, los reemplazos del residuo Asp269 por Asn, del residuo Asn199 por Leu, y del residuo Glu202 por Leu, no alteran el acoplamiento del  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro del sitio activo de la RK humana, lo que indicaría que las mutaciones no tienen incidencia en la ubicación del  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro del sitio activo. Por lo tanto, el acoplamiento molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre las mutantes *in silico* no es capaz de explicar los resultados obtenidos empíricamente en relación a la nula respuesta de cada una de las mutantes al  $\text{PO}_4^{-3}$ .

**Tabla 11. Listado de las energías libres de unión para el acoplamiento molecular acotado del  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de las mutantes RK D269N, RK N199L y RK E202L.**

Soluciones	Energías libre de unión (Kcal / mol)		
	D269N	N199L	E202L
1	-2,5	- 2,3	-2,4
2	-2,4	- 2,3	-2,4
3	-2,4	-2,3	-2,3
4	-2,4	-2,3	-2,3
5	-2,3	-2,3	-2,1
6	-2,3	-2,3	-2,1
7	-2,3	-2,2	-2,1
8	-2,3	-2,2	-2,1
9	-2,2	-2,1	-2,1



**Figura 40. Acoplamiento molecular acotado del  $\text{PO}_4^{-3}$  sobre las mutante *in silico* RK D269N, RK N199L y RK E202L.** Superposición estructural entre la RK D269N (cintas de color morado), la RK N199L (cintas color azul) y la RK E202L (cintas de color celeste), y el  $\text{PO}_4^{-3}$  que fue acoplado dentro de ellas ( $\text{PO}_4^{-3}$  acoplado, color rojo), y la estructura de la RK de *E. coli* (cintas color amarillo) junto al  $\text{PO}_4^{-3}$  que aparece como ligando en su estructura ( $\text{PO}_4^{-3}$  referencial, color amarillo).

## **VII DISCUSIÓN.**

### **VII.1 Caracterización de la RK silvestre.**

#### **VII. 1.1 Estabilidad térmica y determinación del pH óptimo de RK silvestre.**

Determinar la estabilidad térmica y el pH óptimo de la RK humana, era información clave con el objeto de impedir la desnaturación de la enzima y para asegurarnos que las determinaciones de actividad eran realizadas en condiciones óptimas, siendo ambas el primer paso para una caracterización exhaustiva de la RK humana. Como se mencionó anteriormente, no existen publicaciones donde estos aspectos se hayan estudiado para esta enzima.

Para determinar la estabilidad térmica de la RK humana, se preincubó la enzima a distintas temperaturas y durante distintos tiempos, para luego medir la actividad enzimática a 37 °C (fig. 13 A). La preincubación se realizó en ausencia de ligandos, y lo que se observó principalmente fue que al preincubar la RK humana a 20°C y a 37 °C, la enzima no sufrió modificación alguna en su actividad, mientras que al hacerlo a temperaturas superiores a los 60 °C hubo una pérdida de la actividad enzimática, correlacionándose el alza de temperatura de preincubación con un aumento de la pérdida de actividad. Los resultados obtenidos indican que la RK humana al ser una enzima mesófila, es térmicamente muy inestable, y demuestran que la decisión de fijar la temperatura en 37 °C para todos los ensayos enzimáticos que se realizarían en esta tesis fue acertada, ya que esto nos aseguraba que cualquier cambio producido en la actividad enzimática, no era consecuencia de una desnaturación térmica. Al comparar este resultado con la información que hay en la literatura, se observó que la RK de *E. coli* ha sido estudiada en un rango de temperaturas desde 25 °C a 75 °C y que la enzima mostró su mayor actividad en el rango entre 30 °C a 50 °C. Al subir la temperatura de 50 °C hasta 60 °C, se observó una brusca caída de la actividad, lo que se debería a la desnaturación de la enzima (Chuvikovsky y col., 2006), lo que concuerda con lo encontrado por Agranoff y Brady (1956), quienes señalan que la RK de hígado de ternero se desnaturaba al someterla a 60 °C.

Dentro de la familia tipo riboquinasa, existen antecedentes en relación a la estructura de la proteína y su estabilidad térmica. Se ha sugerido que la termolabilidad de la AK de ovario de hámster chino, enzima que comparte una altísima identidad estructural con la RK humana, estaría dada por ciertas regiones de su estructura cuyos residuos aminoacídicos forman contactos y puentes de hidrogeno entre regiones que constituyen el

“core” de la sábana  $\beta$  del sándwich  $\alpha\beta\alpha$ , y que espacialmente están muy cerca de residuos que están vinculados con la formación del sitio de unión a adenosina. En estos experimentos, se realizaron deleciones sistemáticas desde los extremos N- y C- terminal, y se midió la actividad en cada una de las mutantes delecionadas. Al deleccionar los residuos aminoacídicos que van desde el 16 al 26 desde el extremo N-terminal, la actividad de la AK disminuyó en un 97 %. Luego se exploró si la disminución de la actividad enzimática era consecuencia de un efecto estructural, y lo que se hizo fue examinar la estabilidad térmica de la AK preincubando la enzima a 45°C. Lo que dedujeron a partir de la vida media de la actividad residual de la AK, fue que la región delecionada está directamente relacionada con la estabilización de la estructura, lo que finalmente lleva a que la enzima sea menos activa y más termolábil. Se infirió que estos residuos tendrían relación con la estabilización de la estructura terciaria y con la formación del bolsillo de unión a adenosina. Por otro lado, al deleccionar los primeros once residuos aminoacídicos desde el extremo C terminal, la actividad bajó a un 2 %, infiriéndose que estos residuos tendrían relación con la unión del ATP, ya que la  $K_M$  para ATP aumentó 5 veces (Maj y col., 2000). Considerando la altísima identidad estructural existente entre las AK y las RK, es muy probable que la termolabilidad de la RK humana pueda ser explicada por la desestructuración de regiones involucradas en la estabilización del core de la sábana  $\beta$  del sándwich  $\alpha\beta\alpha$ , región que como se mencionó anteriormente, es la que provee la mayor cantidad de interacciones específicas que permiten la unión de los sustratos D-ribosa y MgATP (Sigrell y col., 1998).

Por otra parte, las enzimas tienen un pH óptimo en el que logran tener su actividad máxima. La determinación del pH óptimo de la RK humana se hizo midiendo la actividad enzimática en presencia de distintos amortiguadores y a distintos pH. Se utilizaron los amortiguadores PIPES, HEPES, TRIS-HCl y GLY-GLY, y la actividad enzimática fue medida espectrofotométricamente a 37 °C. La curva que aparece en la figura 13 B muestra que el pH óptimo de la RK humana es cercano a 7,2, lo que concuerda con lo publicado para la RK de hígado de ternero (Agranoff y Brady, 1956), ya que en ese trabajo se señala que dicha enzima alcanza su máxima actividad enzimática entre los pH 7,1 y 7,8, mientras que para la RK de *E. coli*, la mayor actividad medida se obtuvo en el rango de pH que va entre 8,0 y 9,0 (Chuvikovsky y col., 2006). En base a este resultado se decidió que todos los ensayos

enzimáticos en esta tesis serían realizados a pH 7,2 de manera tal de que las mediciones de actividad fueran realizadas en condiciones de poder medir la máxima actividad posible.

### **VII.1.2 Caracterización cinética de RK silvestre. Efecto del $K_2HPO_4$ sobre los parámetros cinéticos, e inhibición por D-ribosa y MgATP.**

Luego de purificar la RK humana a homogeneidad, estudiamos el efecto del  $PO_4^{3-}$  sobre la actividad, haciendo ensayos preliminares a concentraciones subsaturantes de ambos sustratos (0,7 veces  $K_M$ ), en presencia de concentraciones crecientes de  $K_2HPO_4$ . Bajo estas condiciones, se observó que la enzima era activa en ausencia de  $K_2HPO_4$  y que la presencia de este efector no modificó de manera alguna la actividad de la RK humana (fig. 15 A). Por otro lado, al utilizar concentraciones de MgATP (9 veces superior a la  $K_M$ ) y D-ribosa 0,5 mM (4,2 veces superior a la  $K_M$ ), la RK presentó actividad en ausencia de  $K_2HPO_4$ , y se produjo una activación que aumentó a medida que se incrementó la concentración de  $K_2HPO_4$ , determinándose la mayor actividad en presencia de  $K_2HPO_4$  100 mM, duplicándose la actividad (fig. 15 B).

De esta manera, luego se caracterizó cinéticamente a la RK humana mediante la determinación de las constantes cinéticas  $K_M$ ,  $k_{cat}$ , y  $K_i$ , con tal de evaluar de qué manera el  $K_2HPO_4$  afectaba la actividad de la enzima. La modificación de la actividad de la enzima por acción del  $K_2HPO_4$  podía ser consecuencia de cambios en la afinidad por los sustratos, por cambios en la catálisis enzimática, o por reversión de la inhibición por sustrato.

Se midió la actividad de la RK humana silvestre en función de la D-ribosa, y del MgATP, y se estudió el efecto del  $K_2HPO_4$  sobre la actividad enzimática. Principalmente, se observó que la RK presenta inhibición por D-ribosa, a concentraciones superiores a 0,5 mM, y que tiene inhibición por MgATP a concentraciones superiores a 1 mM, y que el efecto activador del  $K_2HPO_4$  sobre la actividad de la RK humana, está dado principalmente por medio de un aumento de la afinidad de la RK por ambos sustratos, y por un aumento de la catálisis, lo que queda reflejado por la disminución de los valores de  $K_M$  para D-ribosa y para MgATP, y por un incremento en la  $k_{cat}$ , lo que lleva a una correlación entre el aumento de la concentración de  $K_2HPO_4$  con un aumento de la eficiencia catalítica de la RK humana, lo que en términos

generales, significa que a una concentración 100 mM del efector se duplique la actividad específica de la enzima (figs 16 y 17).

Sin embargo, la capacidad del  $K_2HPO_4$  de revertir la inhibición por sustrato sólo fue visible en condiciones bien específicas, esto fue, sólo para la inhibición por D-ribosa a concentraciones inhibitorias de MgATP (5 mM). En cambio, para las demás condiciones ensayadas, o bien el  $K_2HPO_4$  no tuvo ningún efecto sobre la  $K_i$ , según se observó para la inhibición por D-ribosa a concentraciones no inhibitorias de MgATP (0,5 mM), o por el contrario, el  $K_2HPO_4$  promovió la inhibición por sustrato, lo que se aprecia al haber una disminución en los valores de  $K_i$  en la inhibición por MgATP, para cualquier condición de D-ribosa ensayada (concentración inhibitoria y no inhibitoria).

En este proyecto no se identificó el tipo de inhibición ejercida por la D-ribosa y por el MgATP, pero a modo especulativo podríamos plantear que una posible causa de la inhibición por MgATP podría ser explicada considerando una reacción en la que el exceso del nucleótido se una a la enzima libre, en el sitio activo, secuestrándola, actuando como un inhibidor competitivo, impidiendo que la D-ribosa pueda unirse a la RK. De esta manera, el ATP en exceso se uniría a la enzima libre, en el sitio de la D-ribosa, para formar un complejo enzima-ATP, que no llevaría a catálisis.

Esto tendría sustento considerando lo que se ha planteado en relación al mecanismo de reacción de la RK de *E. coli*. Para esta enzima se ha planteado un mecanismo de reacción ordenado Bi Bi en el que en un comienzo una forma abierta apo de la RK permitiría la entrada del sustrato D-ribosa el que induciría el cierre del dominio menor de la RK, que actuaría como tapa, cubriendo a la D-ribosa. Este cierre de la estructura beneficiaría el reconocimiento del cosustrato ATP, promoviendo su unión, y luego el residuo Asp255 (Asp269 en RK humana) actuaría como la base catalítica que sacaría un protón del grupo hidroxilo O5' de la D-ribosa. El átomo O5' cargado negativamente haría un ataque nucleofílico sobre el  $PO_4^{-3}$   $\gamma$  del ATP, resultando un estado de transición con una geometría pentacovalente. Este estado de transición sería estabilizado por un "agujero aniónico" en el que se posicionaría el  $PO_4^{-3}$   $\gamma$  del ATP. Este agujero aniónico estaría creado por los nitrógenos de la cadena principal de los residuos 252-255. El estado de transición sería finalmente estabilizado por la cadena lateral del residuo Lys43.

Cambios conformacionales del dominio menor inducirían el quiebre del estado de transición, después del cual, la enzima volvería a su forma abierta nuevamente. Los productos D-ribosa-5-P y ADP serían liberados, y la enzima estaría lista para llevar a cabo una nueva ronda catalítica (Sigrell y col., 1998).

Asimismo, la inhibición por D-ribosa podría darse considerando una reacción en la que el exceso de D-ribosa podría ocupar el sitio que utiliza la D-ribosa que forma parte de la molécula de ATP, dentro del sitio activo de la RK, actuando como un inhibidor no competitivo, uniéndose al complejo enzima-D-ribosa, e impidiendo que el ATP se uniera a la RK.

### **VII.1.3 Regulación de la actividad de RK silvestre por cationes monovalentes.**

#### **VII.1.3.1 Efecto del $K^+$ y del $Na^+$ .**

Se ha señalado que concentraciones crecientes de  $PO_4^{-3}$  estaban correlacionadas con un aumento de la afinidad de la RK humana por D-ribosa y ATP y con una reversión de la inhibición por ambos (Park y col., 2007). Además, considerando que en AK de varias fuentes y en RK de *E. coli* la presencia  $PO_4^{-3}$  y otros iones pentavalentes activan a la enzima (Maj y Gupta, 2001; Maj y col., 2002; Andersson y Mowbray, 2002), y que la RK de *E. coli* es capaz de unir  $K^+$  y  $Cs^+$  con una  $K_d$  aparente de 5 mM y 17 mM, respectivamente, pero incapaz de unir  $Li^+$  y  $Na$  (Andersson y Mowbray, 2002), nos preguntamos entonces, si el  $K_2HPO_4$  pudiera estar activando dualmente a la RK humana, por medio de los iones  $K^+$  y  $PO_4^{-3}$ , ya que para los ensayos de activación realizados en AK y RK se utilizó fosfato inorgánico y no  $K_2HPO_4$ , que fue el efector usado en esta tesis. Además, hay que considerar que en el medio de reacción del ensayo acoplado, utilizado para medir espectrofotométricamente la actividad de RK humana hay KCl 125 mM, lo que también podría activar a la RK humana.

En base a todo lo expuesto, se estudió si el  $K^+$  tenía un efecto activador sobre la RK humana, y si el efecto activador del  $K_2HPO_4$  podría deberse a las contribuciones del  $K^+$  y del  $PO_4^{-3}$ , y lo que se observó fue que rol activador del  $K_2HPO_4$  100 mM está siendo ejercido a través de los efectos que el  $K^+$  y el  $PO_4^{-3}$  tienen por separado, pudiéndosele atribuir al  $K^+$  un efecto activador superior a las 2 veces y al  $PO_4^{-3}$  uno cercano a las 1,4 veces, lo que sugiere que el  $K^+$  sería un activador más potente que el  $PO_4^{-3}$ . Por otro lado, con el objeto de determinar si el  $Na^+$  al igual que el  $K^+$  tenía un efecto activador sobre la RK humana, se hicieron ensayos de actividad usando  $K_2HPO_4$ , KCl,  $Na_2HPO_4$  y NaCl utilizando el método discontinuo.

Los resultados mostraron que el  $\text{Na}^+$  no tiene ningún efecto sobre la actividad de la RK humana, a diferencia de lo observado para el  $\text{K}^+$  (figs. 19 A y B).

### **VII.1.3.2 Sitio de unión de cationes monovalentes en la RK de *H. sapiens*.**

Pese a que la estructura de RK humana fue cristalizada en presencia de  $\text{Na}^+$ , y que hemos visto que el sitio de unión de cationes monovalentes estaría conservado en esta enzima, y además, considerando que este catión es muy similar al  $\text{K}^+$ , ya que ambos son metales alcalinos y tienen radio iónico similar, el  $\text{Na}^+$  no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la RK humana, a diferencia de lo observado para el  $\text{K}^+$ . Por lo tanto, nos abocamos a buscar una explicación para este resultado.

Se ha señalado que el efecto activador del  $\text{K}^+$  en la RK humana, podría tener relación con cambios conformacionales en el sitio activo de la enzima. Existen diversos antecedentes basados en la suma de información cinética y resolución de estructuras cristalográficas que apuntan a que el efecto activador de ciertos cationes monovalentes estaría asociado a cambios conformacionales relacionados con la formación del sitio de unión del nucleótido en el sitio activo. Como se mencionó anteriormente, la RK de *E. coli* es activada por  $\text{K}^+$ . Esta enzima fue cristalizada en presencia de D-ribosa, AMP-PCP,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Cs}^+$  (PDBid: 1GQT). Se ha postulado que dentro de la RK existe un sitio de unión al catión monovalente, ubicado adyacente al sitio activo, y que su unión gatillaría cambios conformacionales que permitirían la activación enzimática, ya que ello ayudaría a formar el “bolsillo aniónico” que estabilizaría el estado de transición en la reacción catalizada por la RK (Andersson y Mowbray, 2002). Más recientemente, se cristalizó la RK de *S. aureus* en su forma apo, y lo más importante, en ausencia de iones monovalentes (PDBid: 3RY7), y al compararla con la estructura conocida de RK unida a  $\text{Cs}^+$  (PDBid: 1GQT), se observó que en ausencia de cationes monovalente el sitio de unión para los cationes está desorganizado lo que conlleva a una oclusión del bolsillo de unión a nucleótido. Se ha propuesto que la unión del catión monovalente gatillaría el cambio conformacional de las hebras  $\beta 11$  y  $\beta 12$  para organizar la formación del bolsillo de unión al nucleótido, permitiendo la unión del ATP. Desde el punto de vista cinético, esta enzima es activa en ausencia de potasio, y la presencia de KCl 100 mM llevó a una disminución de la  $K_M$  para ATP, y a un aumento de la  $k_{cat}$  a más del doble (Li y col., 2012).



Por otro lado, existe evidencia de que la Pfk-2 de *E. coli* también tendría un sitio de unión a cationes monovalentes. Cabe recordar que esta enzima además de unir al ATP que actúa como el dador de fosforilo en el sitio activo, une un ATP alostérico que regula negativamente la actividad enzimática. La caracterización cinética de la enzima mostró que el  $K^+$  y el  $Na^+$  no modifican la  $k_{cat}$  ni la  $K_M$  para fructosa-6-P o MgATP. Sin embargo, la presencia de  $K^+$  (y no de  $Na^+$ ) llevó a un aumento de la inhibición alostérica inducida por MgATP. Por otro lado, la enzima fue cristalizada en presencia de MgATP, y en presencia de  $Cs^+$  (PDBid: 3UMP) o  $K^+$  (PDBid: 3UMO), y se observó un sitio de unión a cationes monovalentes en una posición conservada predicha para el resto de las proteínas de la familia riboquinasa. Este sitio está adyacente al sitio de unión del MgATP alostérico y sólo es posible observarlo en presencia de  $K^+$  o  $Cs^+$ . Para este caso en particular, la unión de cationes monovalentes tendría influencia sobre el sitio alostérico de la Pfk-2 aumentando la afinidad para el MgATP alostérico, manteniendo inalterado la conformación de los residuos presentes en el sitio catalítico (Báez y col., 2013).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el  $K^+$  tiene un efecto activador sobre la RK humana, mientras el  $Na^+$  no ejerce ningún efecto. Hemos señalado que en base a los antecedentes existentes, el efecto activador de los cationes monovalentes podría estar relacionado con cambios conformacionales que ayudarían a la formación del bolsillo de unión del ATP, como consecuencia de la unión del catión monovalente. Ahora bien, la razón que explicaría por qué de los dos cationes monovalentes ensayados, sólo el  $K^+$  activa, y no el  $Na^+$ , podría estar dada por las diferencias en el radio iónico de ambos cationes. En base a la cristalización de la RK de *E. coli* en presencia de  $Cs^+$  (PDBid: 1GQT), se estableció que esta enzima tiene un sitio de unión de cationes monovalentes adyacente al sitio activo, y que la geometría de coordinación para el  $Cs^+$  está mejor descrita como una bipirámide pentagonal, en la que el ión interactúa principalmente con los átomos de oxígeno del carbonilo de la cadena principal, y en la que las cadenas laterales del residuo Asp249 y Ser294 también se encuentran a una distancia de coordinación. Esta geometría de coordinación también es común para el  $K^+$ . En base a esto, se ha sugerido que la preferencia que tienen los sitios de unión a cationes para unirlos con mayor o menor afinidad, sería función del radio iónico de dichos cationes. De este

modo, el sitio de unión de cationes podría tener una preferencia por cationes de un radio atómico pequeño, como  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$ , o por cationes de un radio atómico mayor, como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ , y  $\text{NH}_4^+$ , que sería lo que ocurriría para la RK de *E. coli*. (Andersson y Mowbray, 2002; Li y col., 2012).

Por otro lado, en Pfk-2, para la unión del  $\text{K}^+$  y  $\text{Cs}^+$ , se ha observado que la primera esfera de coordinación contiene átomos de oxígeno de los carbonilos de las cadenas principales de los residuos de Ser250, Val252, Ala286, Asn289, Gly291 y Arg293. Para el  $\text{K}^+$ , cuyo radio iónico es 1,52 Å, se observó que la distancia promedio medida entre el ión y el oxígeno en coordinación octaédrica fue 2,93 Å, lo que concuerda con la distancia oxígeno- $\text{K}^+$  en coordinación octaédrica esperada, igual a 2,79 Å. Asimismo, se observó que para el  $\text{Cs}^+$ , cuyo radio iónico es de 1,81 Å, la distancia promedio entre el ión y el oxígeno en coordinación octaédrica medida fue 3,04 Å. Según los autores, la razón que explicaría el nulo efecto del  $\text{Na}^+$ , estaría precisamente, en las diferencias existentes en las distancias entre el ión y los átomos con los que coordina. Dado que el  $\text{Na}^+$  posee un radio iónico menor que el  $\text{K}^+$  y que el  $\text{Cs}^+$ , y que la distancia de coordinación octaédrica entre el  $\text{Na}^+$  y el oxígeno esperada es de 2,49 Å, la afinidad que tendría el  $\text{Na}^+$  por el sitio de unión de cationes monovalentes sería muy baja, ya que el menor radio iónico del  $\text{Na}^+$  no permitiría satisfacer la distancias de coordinación observadas en Pfk-2, iguales a 3,04 Å. De esta manera, la estructura al estar constreñida no sería capaz de colapsar alrededor del  $\text{Na}^+$  para producir una esfera de coordinación más compacta (Báez y col., 2013).

De manera que en la Pfk-2 la distancia promedio medida entre el  $\text{K}^+$  coordinado octaédricamente con los átomos de oxígeno de los residuos del sitio de unión del catión fue 2,93 Å y que en la RK de *E. coli*, las distancias medidas entre el  $\text{Cs}^+$  coordinado con los átomos de oxígeno que forman el sitio de unión del ión son cercanas a los 3 Å, es factible pensar que, precisamente, esa debería ser la distancia que debería haber entre el catión monovalente y los oxígenos que lo coordinan, para poder formar una esfera de coordinación que permita establecer una buena afinidad entre el sitio de unión del catión, y el catión. Ahora bien, y dado a que el radio iónico del  $\text{Na}^+$  es más pequeño que los radios iónicos del  $\text{K}^+$  y del  $\text{Cs}^+$ , es muy probable

que el  $\text{Na}^+$  no pueda coordinar con los oxígenos de los residuos que forman parte del sitio de unión del catión monovalente en la RK humana, o bien que la esfera de coordinación que se forma no esté bien conformada, de manera que el  $\text{Na}^+$  no se puede unir al sitio de unión de cationes monovalentes, o bien su unión sea de muy baja afinidad. Esto explicaría que en el caso de la RK humana sólo el  $\text{K}^+$ , al tener un radio iónico mayor que el  $\text{Na}^+$ , sea capaz de satisfacer las distancias mínimas requeridas para formar una esfera de coordinación compacta, y esto explicaría porque en la RK humana sólo se observa activación en presencia de  $\text{K}^+$  y no de  $\text{Na}^+$ .

Hemos superpuesto la estructura de la RK humana resuelta con ADP, sodio y  $\text{Mg}^{+2}$  (PDBid: 2FV7), con la estructura de RK de *E. coli* cristalizada en presencia de D-ribosa, AMP-PCP,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Cs}^+$  (PDBid: 1GQT), y observamos que el sodio y el cesio se unen al mismo sitio dentro de las respectivas enzimas. En la RK humana, el sitio de unión de cationes monovalentes se encuentra entre dos loops abarcando a los residuos desde el 258 al 268, y a los residuos entre el 302 y el 310, adyacente al bolsillo de unión del MgATP, de manera similar a lo visto en la RK bacteriana. Ahora bien, existe evidencia que al comparar la RK de *E. coli* unida a  $\text{Cs}^+$  con cualquiera de la estructuras de Pfk-2 resueltas con  $\text{K}^+$  o con  $\text{Cs}^+$ , los sitios de unión de los cationes monovalente son homólogos (Báez y col., 2013). Asimismo, considerando toda la evidencia expuesta anteriormente en relación a la activación causada por el  $\text{K}^+$  en la RK de *E. coli*, (Andersson y col., 2002) y en la RK de *S. aureus* (Li y col., 2012), y que en la Pfk-2 también se ha visto que la enzima tiene un sitio de unión para cationes monovalentes y que en presencia de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cs}^+$  aumenta la inhibición causada por el MgATP alostérico (Báez y col., 2013) y que el  $\text{Na}^+$  no tuvo ningún efecto; queda de manifiesto que la regulación por cationes monovalentes, y en particular por el  $\text{K}^+$ , debería ser una característica común a nivel de la familia tipo riboquinasa..

Por otro lado, y considerando la identidad estructural entre las RK de *E. coli*, de *H. sapiens* y de *S. aureus*, es muy probable que el mecanismo de activación por catión monovalente basado en un cambio conformacional en el sitio activo que ayudaría a formar el bolsillo de unión al MgATP, sea el mecanismo por medio del cual el  $\text{K}^+$  esté activando a la RK humana. Una manera de evaluar esto sería realizando ensayos en que se evaluaran cambios de fluorescencia de la RK humana en ausencia y presencia de  $\text{K}^+$ .

#### VII.1.4 Acción del $\text{PO}_4^{-3}$ sobre la RK de *H. sapiens*.

La RK humana es activada por el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  de manera dual, a través de la acción de los iones  $\text{K}^+$  y  $\text{PO}_4^{-3}$ . Según lo observado en otras riboquinazas, es muy probable que el  $\text{K}^+$  active a la RK humana por medio de cambios conformacionales que facilitarían la unión del nucleótido en el sitio activo. Por otro lado, el mecanismo por el cual el  $\text{PO}_4^{-3}$  ejerce su efecto activador no se ha demostrado aún. Estudios realizados en AK muestran que este activador no se consume y que no participa directamente en la reacción catalizada por la AK (Gupta, 1996; Hao y Gupta, 1996). Se ha observado que en AK la actividad de esta enzima depende principalmente de la presencia de  $\text{PO}_4^{-3}$  y que también es activada por iones como arsenato y vanadato. El  $\text{PO}_4^{-3}$  aumentó la  $V_{\text{max}}$  de la AK, disminuyó la  $K_M$  para adenosina y no alteró la  $K_M$  para ATP (Hao y Gupta, 1996). Asimismo, se ha observado que en la RK de *E. coli* la presencia de este ión aumentó la  $V_{\text{max}}$ , disminuyó la  $K_M$  para D-ribosa, y no varió la  $K_M$  para ATP (Maj y Gupta, 2001). Además de lo evidenciado en AK y RK, se han reportado otras tres enzimas que participan de la transferencia de un  $\text{PO}_4^{-3}$  desde el ATP a un azúcar, que son la 6-fosfofructoquinasa (Hofer y col., 1982), la PRPP sintetasa (Switzer, 1969) y la 6-fosfructo-2-quinasa (Laloux y col., 1985), cuyas actividades también son moduladas por el  $\text{PO}_4^{-3}$ . Sin embargo, no se ha determinado un sitio de unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  para ninguna de ellas. Todo esto sugiere que la dependencia por  $\text{PO}_4^{-3}$  es una característica común entre quinazas de azúcares. Además, la información entregada por las estructuras resueltas para RK y AK, evidencian la existencia de cambios conformacionales cuando hay unión de sustratos, relacionados con el cierre de los dominios, sugiriendo que los cambios conformacionales estarían vinculados con sus mecanismos cinéticos (Sigrell y col., 1998; Sigrell y col., 1999; Mathews y col., 1998; Schumacher y col., 2000), por lo que el mecanismo por el cual el  $\text{PO}_4^{-3}$  ejerce su efecto activador debería tomar en consideración todos estos aspectos.

La activación ejercida por el  $\text{PO}_4^{-3}$  radicaría en su naturaleza química. Básicamente, es un centro pentacovalente unido a cuatro átomos de oxígeno, en donde uno de los oxígenos está unido por un doble enlace. Dada la gran electronegatividad del oxígeno por sobre la del fósforo, sobre el átomo de fósforo va a quedar una carga neta positiva, otorgándole al fósforo un carácter

electrofílico, y actuando de esta manera como un aceptor de un grupo nucleofílico. Se ha sugerido que el  $\text{PO}_4^{-3}$  unido en el sitio activo participaría en la catálisis de la AK formando un intermediario pentavalente transitorio con uno de los oxígenos no enlazantes del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  del ATP. Esta interacción facilitaría la transferencia del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$  desde el ATP a la adenosina. En dicho trabajo se presenta un modelo en el que se muestra el posible rol del  $\text{PO}_4^{-3}$  como un activador (Park y col., 2004).

Considerando la altísima identidad estructural entre la AK y la RK, y tomando dicho modelo como base, hemos planteado un mecanismo mediante el cual el  $\text{PO}_4^{-3}$  actuaría como un activador en la RK humana. Una vez que el  $\text{PO}_4^{-3}$  se encuentra en el sitio activo de la RK, unido a los residuos del motivo NXXE Asn199 y Glu202, este activador atraería al ión  $\text{Mg}^{+2}$  que se ubica cercano, debido a sus interacciones por puente de hidrógeno. Esta acción facilitaría la unión de la D-ribosa cerca del residuo catalítico Asp269, probable base catalítica que desprotonaría el extremo 5'-hidroxil de la D-ribosa. La carga positiva en el átomo de fósforo del  $\text{PO}_4^{-3}$  activador atraería al oxígeno no enlazante del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  del ATP, de manera que el oxígeno no enlazante del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  haría un ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo del activador. Como resultado, el átomo de fósforo en el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  del ATP ahora tendría una carga positiva, y los electrones del oxígeno enlazante entre los  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  y  $\gamma$  del ATP serían atraídos hacia esa carga positiva. De esta manera, el enlace entre el oxígeno enlazante y el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$  se debilitaría y se alargaría. Luego, el centro positivo del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$  atraería al átomo de oxígeno ubicado en el extremo 5' de la D-ribosa, que quedó cargado negativamente luego que el residuo Asp269 le sacará su protón. Hasta este paso, este mecanismo sería general para las AK y para las RK's. Sin embargo, en la AK de ovario de hámster chino, este estado de transición sería estabilizado por un movimiento de translocación que acercaría al residuo Arg148 hacia el ATP. Dicho residuo estabilizaría las cargas negativas en los oxígenos no enlazantes del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$ . Luego el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\gamma$  sería transferido a la D-ribosa, el residuo Arg148 volvería a su posición original, y los productos D-ribosa-5-P y ADP serían liberados. Sin embargo, la participación de la Arg148 como un estabilizador de las cargas negativas, es claramente visible para la AK, no así para la RK, ya que tanto en la RK de *E. coli*, como en la RK humana, la posición de la Arg148 de AK es ocupada por los residuos Asn108, y Asn119, respectivamente. Al inspeccionar qué clase de residuos son las Asn, encontramos que este residuo es polar sin carga, mientras que

la Arg es un residuo cargado positivamente, lo que implica que deberíamos buscar otro residuo que pudiera estar efectuando esta función. Al buscar un residuo cargado positivamente, como Lys o His en la estructura de la RK humana, no existe otro residuo que esté cerca de Asn199 y que pudiera cumplir este papel.

Dada la gran similitud estructural entre la AK y la RK, y considerando que en ambas enzimas el  $\text{PO}_4^{-3}$  ejerce un efecto activador, es posible sugerir que este mecanismo mediante el cual el  $\text{PO}_4^{-3}$  está actuando como un activador en la AK podría ser perfectamente extrapolable a la RK humana, otorgándole validez a lo aquí planteado.

Es menester hacer hincapié que el modelo de activación acá planteado se basa principalmente en el modelo de acción del  $\text{PO}_4^{-3}$  sugerido para la AK (Park y col., 2004), y en la información provista por las estructuras resueltas para la RK humana (PDBid: 2FV7), y para las RK de *E. coli* en complejo con D-ribosa, ADP y  $\text{PO}_4^{-3}$  (PDBid: 1RKD) (Sigrell y col, 1998) y para la misma enzima pero en su forma apo (Sigrell y col., 1999).

#### **VII.1.5 Regulación de la actividad de RK silvestre por cationes divalentes.**

Se estudió el rol de los cationes divalentes en la RK humana, determinándose que el  $\text{Mg}^{+2}$  era indispensable para que hubiera catálisis en la RK humana. Además, se evaluó si otros cationes divalentes podían reemplazar al  $\text{Mg}^{+2}$ , observándose que la RK humana, además del  $\text{Mg}^{+2}$  usa  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$ , y en menor medida  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Ni}^{+2}$  para su catálisis. Lo observado está dentro de lo esperado, ya que existen varias quinasas en las que se ha demostrado que el  $\text{Mg}^{+2}$  puede ser reemplazado en su función por  $\text{Mn}^{+2}$  o por  $\text{Co}^{+2}$ , como la AK de diferentes fuentes (Rotllan, P. y Miras, M, 1985; Chang C. y col., 1979; Schnebli y col., 1967), PFK ATP dependiente de *T. marítima* (Hansein, T. y col., 2002), y PK de músculo (Baek, Y. y Nowak, T., 1981). Por otro lado, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que la enzima Pfk-2 de *E. coli* emplea los iones  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  para la catálisis, y en menor medida  $\text{Co}^{+2}$  y  $\text{Ca}^{+2}$ , descartando la utilización de otros cationes como  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Ni}^{+2}$  (Rivas-Pardo, J.A., 2011). Por otra parte, la *ph*PFK sería más promiscua al momento de usar un catión para la catálisis, utilizando también  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Ni}^{+2}$ . Algo similar se ha encontrado para el caso de la enzima homóloga *pf*GK, la cual fue capaz de utilizar en la catálisis los iones  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$ , y en menor proporción  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  (Merino, F., Rivas-Pardo, J.A. y col., 2011).

Para estas tres enzimas se observó que en ausencia del catión divalente no hubo actividad enzimática.

A pesar de que en la RK humana el  $Mg^{+2}$  puede ser reemplazado por  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ , y en mucho menor medida por  $Cd^{+2}$  y  $Ni^{+2}$ , dentro de la mayoría de las enzimas, el  $Mg^{+2}$  es el catión divalente preferido debido a su tremenda afinidad por sustratos que contienen  $PO_4^{-3}$  incluyendo al ATP, DNA y RNA. El  $Mg^{+2}$  tiene un radio de 0,72 Å y dentro de la célula se mantiene a una concentración alta (milimolar). La predilección por el  $Mg^{+2}$  sería consecuencia de su capacidad de estabilizar electrostáticamente y de activar electrofílicamente a los sustratos a través de la polarización de enlaces P-O y C-O. De esta manera el metal contribuiría de dos maneras a bajar la energía de activación de la reacción enzimática: activando al sustrato, y estabilizando al estado de transición. La coordinación del  $Mg^{+2}$  por parte de los oxígenos del ATP, aumentaría el carácter electrofílico del fósforo, activándolo para un ataque nucleofílico (Andreini y col., 2008).

Por otra parte, el uso del  $Mn^{+2}$  por parte de la RK aparece como esperable, ya que al igual que el  $Mg^{+2}$ , este catión tiene un estado de oxidación +2 y se comporta como un ácido de Lewis y como un estabilizador electrostático. Además, se ha documentado para varias enzimas que el  $Mg^{+2}$  puede ser reemplazado por el manganeso cuando la enzima usa MgATP como sustrato (Maguire, M.E y Cowan, J.A., 2002). La intercambiabilidad del  $Mn^{+2}$  por  $Mg^{+2}$  se puede explicar porque su radio iónico (0,83 Å) es parecido al  $Mg^{+2}$ ; sin embargo, la concentración intracelular del manganeso es del orden micromolar, en donde el  $Mg^{+2}$  sería preferido fisiológicamente dada su abundancia.

Para el caso del  $Co^{+2}$ , este catión divalente participa principalmente en reacciones en las que se requiere de un centro redox y muy pocas veces en reacciones de fosfotransferencia. De lo anterior, es posible inferir que el radio iónico y la geometría de coordinación del catión divalente dentro del sitio activo, han de ser muy relevantes para la reacción de fosfotransferencia. De esta manera se puede relacionar la diferencia de actividad enzimática con diferencias en la geometría de coordinación.  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Co^{+2}$  tienen en común el estado de oxidación +2, y el tipo de coordinación que generan. Los radios iónicos son 0,72 Å, 0,83 Å y 0,75 Å, respectivamente. Al observar los números de coordinación y las formas que estos metales adoptan en estructuras que han sido resueltas con una resolución de 1,8 Å, observamos que, para la mayoría de los casos, estos tres metales tienen una coordinación de tipo octaédrica, constituida por seis ligandos, que sería la conformación óptima del metal dentro del sitio activo de la

mayoría de las enzimas. Por lo tanto, lo más probable es que  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Ni}^{+2}$  tengan número diferente de coordinación, y que esta coordinación no sea tan propicia como la octaédrica.

Por otro lado, la coordinación está relacionada con la disposición que debe adoptar el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  del ADP. Existe evidencia de que la conformación de los  $\text{PO}_4^{-3}$  del ADP puede variar dependiendo de la presencia de un catión divalente en su sitio activo, ya que estos se torsionan alrededor del catión, estableciéndose un estado conformacional de máxima energía, disposición que favorecería el ataque nucleofílico sobre el  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$ , como para el caso de la enzima glucoquinasa de *Thermococcus litoralis* (TIGK) (PDBid: 1GC5) (Rivas, A. tesis para el grado de Doctor en Ciencias, 2011). Sin embargo, al observar la estructura de RK de *H. sapiens* (PDBid: 2FV7) se puede apreciar que los  $\text{PO}_4^{-3}$  del ATP no están torsionados alrededor del  $\text{Mg}^{+2}$ , situación que se repite para la estructura de la RK de *E. coli* (PDBid: 1RKD), por lo tanto esto último no es aplicable para el caso de las estructuras utilizadas en este trabajo.

En términos del uso de metales para la catálisis, la RK humana es bastante promiscua y más similar a las enzimas que pertenecen a la familia de las quinasas de azúcares dependientes de ADP. Además del metal necesario para llevar a cabo la catálisis, hemos descrito por primera vez la presencia de un sitio regulatorio altamente específico para  $\text{Mn}^{+2}$  libre en la RK humana.

Otro fenómeno observable fue el efecto que trajo consigo el incremento de la concentración del metal libre, llegando hasta 5 mM. En el caso del  $\text{Mg}^{+2}$ , el exceso de metal libre no produjo ninguna variación en la actividad de la enzima, al igual que lo ocurrido con  $\text{Co}^{+2}$ , mientras que con exceso de  $\text{Mn}^{+2}$  libre, se observó disminución de la actividad enzimática. Al ensayar hasta 14 mM del metal libre, el exceso de  $\text{Mg}^{+2}$  libre no modificó la actividad de la RK humana, mientras que a medida que se incrementó la concentración de  $\text{Mn}^{+2}$  libre, se observó inhibición determinándose una  $K_i$  con un valor cercano a los 250  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, también hubo inhibición como consecuencia del aumento de la concentración de  $\text{Co}^{+2}$  libre, cuando se sobrepasó los 5 mM de ese metal libre.

Considerando que el aumento de la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre no afectó la actividad de la enzima, pero que por el contrario, el aumento de la concentración del  $\text{Mn}^{+2}$  libre produjo una inhibición de la actividad de la RK humana, se determinó el valor de la constante de disociación para el complejo Mn-proteína, mediante EPR, obteniéndose una  $K_d$  para el complejo proteína- $\text{Mn}^{+2}$  igual a 50  $\mu\text{M}$ , con una estequiometría de 0,8. Dado que las mediciones fueron hechas en ausencia de otros ligandos, la  $K_d$  determinada debería corresponder a la unión del metal libre a la



enzima, valor que podemos comparar con la  $K_i$  determinada del ajuste de la curva de inhibición para  $Mn^{+2}$  libre. No obstante, el valor determinado por el ajuste es  $250 \mu M$ , mientras que el determinado por medio del EPR es  $50 \mu M$ . El valor entregado por el EPR representa la unión del complejo metal proteína, mientras que la  $K_i$  es consecuencia de una serie de constantes de velocidad que entregan un valor que refleja la acción del  $Mn^{+2}$  libre sobre la enzima, que en este caso es inhibición.

En base a los resultados obtenidos en el ensayo con cationes divalentes, se buscó indagar más sobre la actividad enzimática en presencia de  $Mn^{+2}$ , para lo cual se determinaron los parámetros cinéticos de la RK humana en función de MnATP, midiéndose una  $K_m$  igual a  $29 \mu M$ . De este modo, es probable que la constante medida por EPR corresponda a la del metal-nucleótido, pero eso no se puede determinar con certeza a partir de los experimentos realizados. De esta manera, sería óptimo hacer ensayos de inhibición para determinar el mecanismo mediante el cual el  $Mn^{+2}$  libre está inhibiendo a la enzima. De esta manera la  $K_i$  determinada para el EPR no es lo mismo que la  $K_i$  determinada por los ensayos cinéticos, ya que probablemente el metal se une a formas diferentes de la enzima. Estos resultados apoyan al existencia de un sitio alostérico para el  $Mn^{+2}$ , responsable de la regulación negativa de la actividad enzimática.

La regulación por metales libres ha sido descrita para AK, donde hay activación hasta  $1 mM$ , aunque sobre dicha concentración el metal divalente inhibe (Maj y Gupta, 2002), y para la Pfk-2 de *E. coli*, en donde el  $Mn^{+2}$  se puede unir al sitio activador con mayor afinidad que el  $Mg^{+2}$  (). En el caso de las quinasas dependientes de ADP, se propuso que la unión de un segundo metal produce un complejo con una constante catalítica reducida (Merino, Rivas-Pardo y col., 2012).

Considerando que la presencia de dos metales en el sitio activo pudiera ser una característica general del mecanismo catalítico dentro de los miembros de la superfamilia riboquinasa y la evidencia catalítica disponible, se ha propuesto que los metales regulatorios se unirían al estado de transición y modularía la diferencia energética entre el estado de transición y el estado basal, y de este modo, actuaría como un activador o un inhibidor (Merino, Rivas-Pardo y col., 2012; Rivas-Pardo y col., 2011). Este podría ser el caso de la inhibición por  $Mn^{+2}$  libre observada en este trabajo para la RK humana.

La otra especie relevante en el equilibrio metal nucleótido es el ATP<sup>4</sup> libre; por lo que se hizo necesario determinar el efecto de esta especie sobre la actividad enzimática de la RK humana. Existe evidencia referente al ATP<sup>4</sup> que indica que esta especie puede actuar como un inhibidor competitivo en la Pfk-2 (Rivas-Pardo y col., 2011). También se han realizado ensayos en la *ph*PFK, en la *tl*GK y en la *pf*GK, y lo que se observó fue que las tres enzimas dependientes de ADP también sufren inhibición competitiva por el nucleótido libre (Merino, F., Rivas-Pardo, J.A. y col., 2011). Por otro lado, en hPLK se observó que el ATP<sup>4</sup> no se comporta como un inhibidor en esta enzima (Navarro y col., 2013). Tomando en consideración el hecho de que el ATP<sup>4</sup> en la mayoría de los casos inhibe a las enzimas que forman parte de la superfamilia riboquinasa, se hizo un ensayo en el que se evaluó el efecto que tenía el ATP<sup>4</sup> sobre la actividad de la RK humana. Como se pudo apreciar en la figura 23, el ATP<sup>4</sup> tiene un efecto inhibitorio sobre la RK humana. La inhibición sobre la actividad de RK sólo es visible una vez que las concentraciones de ATP<sup>4</sup> superan los 0,2 mM. Todos los ensayos realizados en esta tesis tienen una concentración de ATP<sup>4</sup> que no excedieron dicho límite, descartando que algún efecto visto sobre la RK pueda deberse al fenómeno de inhibición producido por el ATP<sup>4</sup>, siempre y cuando la concentración de MgATP haya sido saturante, ya que, si llegase a disminuir la concentración de MgATP, y en el caso de que el ATP<sup>4</sup> fuera un inhibidor competitivo, es probable que la inhibición causada por el ATP<sup>4</sup> aumentara.

## VII 2. Motivo GXGD. Caracterización cinética de RK D269N.

Se caracterizó cinéticamente a la RK D269N y el principal cambio con respecto a la enzima silvestre se observa a nivel de  $K_M$  para el azúcar y a nivel de  $k_{cat}$ . Se determinó que la enzima mutante tiene una  $K_M$  para D-ribosa que es 2,4 veces más grande que la de RK silvestre, y una  $k_{cat}$  que es 54,5 veces más pequeña que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre. Mientras que los valores de  $K_M$  para MgATP medidos en la RK D269N y en la RK silvestre son similares, la  $k_{cat}$  de la mutante es 31,8 veces más pequeña que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre. No se observó inhibición para D-ribosa ni para MgATP. Las concentraciones de D-ribosa ensayadas alcanzaron los 30 mM, 10 veces superior a las concentraciones ensayadas con la enzima silvestre, lo que sugeriría que la ausencia de inhibición por D-ribosa es un fenómeno independiente de las concentraciones ensayadas, y propio de esta mutante.

El residuo Asp tiene un grupo carboxilato, que sería fundamental para ejercer su función catalítica. Al mutarlo por Asn, que tiene una cadena lateral polar sin carga, y el mismo tamaño que Asp, evaluamos la importancia de esa carga. Estos resultados indican que el cambio del residuo Asp269 por Asn, redundaría en la eliminación de la carga negativa de este residuo, lo que da lugar a una enzima cuya afinidad por la D-ribosa disminuye, y cuya  $k_{cat}$  también baja, sugiriendo que Asp269 sería muy relevante para la catálisis. Esto podría explicarse, considerando que en las estructuras tridimensionales de RK de *E. coli*, AK de *H. sapiens* y AK de *T. gondii*, y en la RK humana, el hidroxilo que se fosforila en el sustrato azúcar se encuentra formando un puente de hidrógeno con el residuo Asp del motivo GXGD (Sigrell y col., 1998; Mathews y col., 1998; Schumacher y col., 2000). Por lo tanto, es muy probable que al reemplazar el residuo Asp por Asn, la interacción entre el residuo Asp269 y el hidroxilo de la D-ribosa se haya perdido, lo que explicaría el incremento en la  $K_M$  para D-ribosa en esta mutante. Por otro lado, la disminución en la  $k_{cat}$  superior a las 30 veces, indicaría que el residuo Asp269 tendría un rol relevante en la catálisis, sin poder afirmar que este residuo sea la base catalítica de la reacción de fosforilación. El residuo Asp es un residuo polar con carga negativa, por lo tanto una razón que explicaría que a pesar de haber eliminado la carga negativa, por el reemplazo de Asp por Asn, haya habido actividad enzimática, podría ser explicada infiriendo que algún otro residuo cercano podría estar actuando como la base catalítica. Sin embargo, los residuos que están cercanos al Asp269 son Gly, Ala, Gly, Ser, Phe y Val, y ninguno de estos residuos está cargado negativamente, dificultando su participación en la catálisis.

Por otro lado, la RKD29N no es activada por  $K_2HPO_4$ . Este resultado difiere de lo visto para la RK silvestre, ya que una concentración 100 mM de  $K_2HPO_4$  produce una activación de la RK silvestre cercana a las 2 veces. El efecto activador del  $K_2HPO_4$  en la RK silvestre se ve a concentraciones saturantes de los sustratos; sin embargo, las concentraciones de D-ribosa y de MgATP usadas en la determinación del efecto del  $PO_4^{-3}$  en la RK mutante D269N también fueron saturantes, por lo tanto, la ausencia de activación de la mutante no podría ser explicada por esta causa.

Es probable que el residuo Asp269 no esté relacionado con la unión del  $PO_4^{-3}$  dentro del sitio activo, ya que no existe evidencia de interacciones entre este residuo y el  $PO_4^{-3}$ . Sin embargo, la ausencia de activación por  $PO_4^{-3}$  en la mutante D269N sugiere que el residuo

aspártico podría tener algún rol en la activación por  $\text{PO}_4^{-3}$ . De esta manera, es probable que el reemplazo del residuo Asp por Asn, y la consecuente eliminación de la carga negativa, pueda estar distorsionando el correcto posicionamiento de la D-ribosa en el sitio activo, o provocando una alteración en la conformación de los ligandos dentro del sitio activo, lo que llevaría a que el mecanismo de activación por medio del cual el  $\text{PO}_4^{-3}$  ejerce su efecto activador no se ejecute de manera eficiente, y por lo tanto, la mutante no sea activada por el  $\text{PO}_4^{-3}$ .

### **VII.3 Motivo NXXE. Interacciones entre los residuos Asn190 y Glu202 con $\text{PO}_4^{-3}$ y $\text{Mg}^{+2}$ .**

Dentro de la superfamilia riboquinasa, existe evidencia estructural y cinética, de que el motivo NXXE estaría relacionado con la unión de cationes divalentes, particularmente con la unión de  $\text{Mg}^{+2}$  y con la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  (Mathews y col., 1998; Maj y Gupta, 2002; Parducci y col., 2006). Mutagénesis sitio-dirigida del motivo NXXE en AK de hámster chino dio como resultado enzimas con requerimientos muy alterados de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Maj y col., 2002). Además, la mutación sitio-dirigida del motivo NXXE en la fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *E. coli* indicó que el residuo Glu190 de este motivo era requerido para la unión apropiada del ión  $\text{Mg}^{2+}$  en el sitio activo y además, apuntó a la existencia de un  $\text{Mg}^{2+}$  catalítico en el sitio activo, distinto al ión  $\text{Mg}^{2+}$  presente en el complejo metal-nucleótido (Parducci y col., 2006; Rivas-Pardo, J.A y col., 2011). Para la enzima *TfGK* se ha observado que esta enzima tiene inhibición por uno de sus sustratos, la glucosa, y no por MgADP. Además, no es afectada por el  $\text{PO}_4^{-3}$  y el residuo Glu308 del motivo NXXE, estaría vinculado con la estabilización del MgADP ya que la  $K_M$  para MgADP se incrementó 40 veces en la mutante y tendría un rol fundamental en el proceso catalítico, razón por la cual la  $k_{\text{cat}}$  de la mutante también decayó (tesis doctorado en Ciencias, Andrés Rivas, 2011). Para el caso de la *PfGK* las mutantes E295Q y E295L, del motivo NXXE, presentaron una disminución severa en la  $k_{\text{cat}}$ , y un aumento en el valor de la  $K_M$  para el complejo MgADP y para glucosa, lo que demuestra lo esencial de este residuo para la unión de los sustratos y para la catálisis enzimática (tesis de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Ivonne García, 2011).

Para estudiar las interacciones entre el motivo NXXE y los iones  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , como primera medida se analizaron los sitios activos tanto de la estructura de la RK humana (PDBid: 2FV7) como de la RK bacteriana (PDBid: 1RKD). La superposición de ambas estructuras de RK estableció que dentro de los sitios activos de ambas RK existen moléculas de agua conservadas que están ocupando posiciones idénticas dentro de ese espacio, cumpliendo un rol esencial para la interacción entre los residuos Asn y Glu del motivo NXXE con los iones  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , y con el ATP.

Ahora bien, considerando que los residuos del motivo NXXE están conservados a nivel estructural tanto para la RK bacteriana como para la humana, y habiéndose demostrado por medio del acoplamiento molecular del  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la RK humana que existe una altísima probabilidad de que la posición que ocupa el  $\text{PO}_4^{-3}$  dentro de la RK humana, sea la misma que ocupa dentro del sitio activo de la RK bacteriana, podemos pensar que es muy probable que en la RK humana el ión  $\text{PO}_4^{-3}$  también está haciendo contactos cercanos con los residuos Asn y Glu del motivo NXXE, ubicados en las posiciones 199 y 202, respectivamente.

### **VII.3.1 Caracterización cinética de RKN199L y RKE202L.**

Se evaluó la hipótesis de que los residuos conservados Asn199 y Glu202 del motivo NXXE participan en la catálisis de RK como determinantes de la unión de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  en el sitio activo, para lo cual construimos la mutante N199L reemplazando al residuo Asn199 que tiene una cadena lateral polar sin carga por Leu, que no tiene polaridad y es del mismo tamaño que Asn, y además, se construyó la mutante E202L reemplazando al residuo Glu202 que está cargado negativamente, por Leu, que es apolar y una unidad de carbono más pequeña que Glu.

Los ensayos cinéticos en la enzima silvestre mostraron que la RK humana es estimulada por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , de manera dual, por medio de la acción del  $\text{PO}_4^{-3}$  y del ión  $\text{K}^+$ . Sin embargo, la mutante N199L no es estimulada por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y mostró una bajísima actividad en la que se requirió una concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre altísima, igual a 30 mM, para que fuera posible observar actividad. La mutación del residuo Asn por Leu lleva a que la  $k_{\text{cat}}$  sea más de 500 veces más pequeña que la de la enzima silvestre y que la  $K_M$  para  $\text{MgATP}$  sea casi 70 veces más grande que la enzima silvestre. En base al análisis de la estructura de la RK humana 2FV7 hemos observado que el residuo Asn199 sería capaz de formar una interacción por puente de

hidrógeno con el O1 del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\beta$  del ADP que aparece como ligando en su estructura, ya que están a una distancia de 2,1 Å. Además, observamos que el ión  $\text{Mg}^{+2}$  está coordinado por 5 moléculas de agua, y que el grupo  $\text{NH}_2$  de este residuo está a 3,3 Å de la molécula de agua 864 y a 4,2 Å de la molécula de agua 842, lo que sugiere que podrían haber interacciones por puentes de hidrógeno entre el residuo N199 y el ión  $\text{Mg}^{+2}$  mediados por moléculas de agua. Este  $\text{Mg}^{+2}$  correspondería al  $\text{Mg}^{+2}$  catalítico, y no al que forma parte del complejo MgATP. Por otra parte, en la estructura 1RKD de la RK de *E. coli* se observó que el ión  $\text{PO}_4^{-3}$  era capaz de interactuar con el residuo Asn187 del motivo NXXE mediante la formación de puentes de hidrógeno, ya que el grupo amino de la cadena lateral del residuo Asn187 se encuentra a 4,0 Å del átomo de oxígeno O2 del ión  $\text{PO}_4^{-3}$ . Asumiendo que el  $\text{PO}_4^{-3}$  ocupa una posición similar en la RK humana, el residuo Asn199 debería participar en la unión del  $\text{PO}_4^{-3}$  en la RK humana. Por lo tanto, al reemplazar el residuo Asn199 por Leu, es muy probable que estemos impidiendo que se generen interacciones por puente de hidrógeno que son cruciales para la correcta unión del ión  $\text{Mg}^{+2}$ , del ión  $\text{PO}_4^{-3}$  y del ATP, lo que se traduciría en una disminución dramática de la constante catalítica, de la disminución de la afinidad por el MgATP, y de la nula activación por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Estos resultados indican que el residuo Asn199 debe estar cumpliendo un rol importantísimo en la catálisis de la RK humana participando en la unión del ATP, del  $\text{Mg}^{+2}$  y del  $\text{PO}_4^{-3}$  lo que ratificaría la idea de que el  $\text{PO}_4^{-3}$  se ubica dentro del sitio activo en la RK humana.

Por otro lado, los ensayos cinéticos en la RK mutante E202L muestran que no es estimulada por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y que posee una bajísima actividad en la que se requirió una concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre altísima, igual a 30 mM, para que fuera posible observar actividad. La mutación del residuo Glu por Leu lleva a que la  $k_{\text{cat}}$  sea más de 140 veces más pequeña que la de la enzima silvestre y que la  $K_M$  para MgATP sea casi 50 veces más grande que la de la enzima silvestre. En base al análisis de 2FV7, observamos que el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo Glu202 podría interactuar indirectamente con el ión  $\text{Mg}^{+2}$ , formando dos puentes de hidrógeno, mediados por dos moléculas de agua (864 y 842). Esto, considerando que las distancias entre dicho residuo y ambas moléculas de agua, son 3,2 Å y 2,9 Å, respectivamente, y que las distancias entre las moléculas de agua 864 y 842 y el ión  $\text{Mg}^{+2}$ , son de 2,5 Å y 2,7 Å, respectivamente. Por otra parte, aunque se ha señalado que sólo el residuo Asn199 sería importante para estabilizar el ATP en el sitio activo de la RK humana, el residuo Glu202 también sería importante en este contexto, ya que según se ha observado en la estructura

de RK de *E. coli* 1RKD, la cadena lateral del residuo Glu190 podría formar un puente de hidrógeno con el nitrógeno de la cadena principal del residuo Asn187 lo que ayudaría a estabilizar al ADP dentro del sitio activo (Sigrell y col., 1997). Asimismo, en 1RKD hemos observado que el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo Glu190 podría interactuar directamente con el átomo de oxígeno O1 del ión  $\text{PO}_4^{-3}$ , que se encontraría protonado, formando un puente de hidrógeno, ya que están muy cercanos (1,8 Å). Además, este residuo podría interactuar indirectamente con el átomo de oxígeno O4 del ión  $\text{PO}_4^{-3}$ , a través de dos moléculas de agua (429 y 430).

Por lo tanto, al reemplazar el residuo Glu202 que está cargado negativamente por una leucina, que es apolar y un carbono más pequeño, es muy probable que estemos impidiendo que se generen las interacciones por puente de hidrógeno que son cruciales para la correcta unión del ión  $\text{Mg}^{+2}$ , del ión  $\text{PO}_4^{-3}$  y del ATP, lo que se traduce en una gran disminución de la  $k_{\text{cat}}$ , y en un aumento de la  $K_M$  para MgATP, sumándose a la ausencia de activación por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Estos resultados sugieren que el residuo Glu202 debe estar cumpliendo un rol importantísimo en la catálisis de la RK humana participando en la unión del ATP, del  $\text{Mg}^{+2}$  y del  $\text{PO}_4^{-3}$  lo que confirmaría la idea de que el  $\text{PO}_4^{-3}$  se ubica dentro del sitio activo de la RK humana.

La mutación de los residuos Asn199 y Glu202 llevó a que disminuyera la afinidad por MgATP, pero no tuvo ninguna incidencia en la afinidad por la D-ribosa. Esto podría explicarse, considerando el hecho de que existen más puentes de hidrógeno directos entre la D-ribosa y la proteína, que entre el ATP y la RK de *E. coli* (Sigrell y col., 1998). Al revisar el sitio de unión de ATP en la RK humana observamos que está ubicado en un surco poco profundo en la sábana  $\beta$  de nueve hebras. La base adenina está entre los átomos de la cadena principal de los residuos 237 y 238, y la cadena lateral del residuo Val302. Los átomos de nitrógeno 1 y 3 de la adenina hacen un total de cinco puentes de hidrógeno mediados por agua con átomos de la cadena principal de la proteína (residuos 257, 259 y 295). El oxígeno de la D-ribosa forma un puente de hidrógeno con la proteína, entre el O2' y el residuo Asn295. Uno de los átomos de oxígeno del  $\text{PO}_4^{-3}$   $\alpha$  del ATP está a una distancia propicia para formar puentes de hidrógeno con los átomos de nitrógeno del residuo Gly237 y el átomo de oxígeno del hidroxilo del residuo Thr235. Ahora bien con respecto al azúcar, en la RK humana los residuos involucrados en la unión de la D-ribosa por puentes de hidrógeno directos serían Met25, Asp27, Gly53, Lys54, Asn57, Glu154 y Asp269, y mediados por moléculas de agua, los residuos Gly268, Asp269 y Gly266. Todos los

residuos involucrados en la unión de la D-ribosa, se encuentran en el dominio mayor, a excepción de los residuos Met25 y Asp27.

De esta manera, los residuos Asn199 y Glu202 no participan de la unión del azúcar en el sitio activo, mientras que sí lo hacen para la unión del ATP. Esto explicaría que las mutaciones realizadas en estos residuos, no se traduzcan en una alteración de la afinidad por el azúcar, y que sí disminuyan la afinidad por el ATP, considerando además que el ATP forma menos interacciones con la RK, en comparación al azúcar.

Por otro lado, nos llamó la atención que en la RK silvestre el  $Mg^{+2}$  libre no ejerciera ningún efecto sobre la actividad enzimática, más aún considerando que se ensayaron un rango amplio de concentraciones (hasta 14 mM), y que existen varios antecedentes de miembros de la familia tipo riboquinasa, en los que el  $Mg^{+2}$  libre sí afecta la actividad enzimática. Basta ver casos como el de la enzima AK de corazón de rata, en donde el  $Mg^{+2}$  libre actuaría como un inhibidor (Fisher y Newholme, 1984), o lo estudiado en la AK de Ovario de Hamster Chino, donde el  $Mg^{+2}$  libre tendría un efecto activador hasta los 2 mM, y luego actuaría como un inhibidor (Maj y col., 2002). Asimismo, para la RK bacteriana, se ha visto que concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre sobre 2,5 mM causan inhibición (Maj y Gupta, 2001). Por otro lado, existe un ejemplo de activación para el  $Mg^{+2}$  libre en la Pfk-2, en donde sólo es posible observar la activación por  $Mg^{+2}$  libre en la enzima mutante E190Q, y no en la silvestre, ya que esta mutante tiene una constante de activación para  $Mg^{+2}$  libre lo suficientemente alta como para ser visible, igual a 10 mM, mientras que la enzima silvestre tiene una constante de activación tan baja que pareciera que la velocidad es independiente de la concentración de  $Mg^{+2}$  libre estudiada (Parducci, 2005).

Tomando todo esto en consideración, y recordando que todos los ensayos cinéticos en las mutantes RK N199L y la RK E202L fueron realizados a concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre muy altas, iguales a 30 mM, ya que a concentraciones inferiores, no fue posible observar actividad, creemos que el  $Mg^{+2}$  libre en la RK humana debería tener un efecto activador. De modo similar a lo que ocurre en la Pfk-2, la constante de activación para la RK silvestre ha de ser tan baja, que no es posible observar el efecto activador en la RK silvestre. Para entender esto mejor, y de manera de interpretar bien los resultados obtenidos, es necesario considerar dos antecedentes: primero, que para todos los ensayos cinéticos, es imposible lograr la condición en la que se tenga cero concentración de  $Mg^{+2}$  libre en la cubeta, y segundo, que cuando se realizan ensayos en los



que la concentración de  $Mg^{+2}$  libre es muy baja, la concentración de  $ATP^{-4}$  aumenta, y según hemos visto, esta especie produce inhibición sobre la RK humana. Por lo tanto, los ensayos en la enzima silvestre fueron realizados de manera que la concentración de  $ATP^{-4}$  fuera lo suficientemente baja como para que no inhibiera, y que la mínima concentración de  $Mg^{+2}$  libre en la cubeta fuera igual a  $151,3 \mu M$ . En estas condiciones es muy probable que la RK silvestre ya esté totalmente activada por  $Mg^{+2}$  libre, lo que implica que concentraciones superiores de  $Mg^{+2}$  libre no muestren un efecto activador en la RK silvestre.

De esta manera, los ensayos cinéticos han demostrado que el  $K_2HPO_4$  tiene un efecto activador sobre la RK humana, aumentando la  $k_{cat}$  e incrementando la afinidad por la D-ribosa y el  $MgATP$ . El efecto activador del  $K_2HPO_4$  estaría dado por un efecto dual, ya que se demostró que tanto el ión  $PO_4^{-3}$  como el ión  $K^+$  regulan la actividad enzimática, activando a la RK, no así el ión  $Na^+$ , que no ejerce ningún efecto sobre la enzima. Los cationes monovalentes se unirían en un sitio de unión de cationes monovalentes conservado en la RK humana, que se ubicaría entre dos loops inmediatamente adyacentes al bolsillo aniónico, fuera del sitio activo. Por otro lado, se observó que la enzima también estaría regulada por cationes divalentes, principalmente por  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$ , atribuyéndosele al  $Mg^{+2}$  libre un efecto activador en la RK humana, mientras que el  $Mn^{+2}$  libre tendría el efecto opuesto, inhibiendo a la enzima. Por medio de la técnica EPR fue posible demostrar que la RK humana tendría un sitio de unión para  $Mn^{+2}$ .

Por otro lado, usando el método de acoplamiento molecular del  $PO_4^{-3}$  fue posible inferir que el  $PO_4^{-3}$  regulador se uniría dentro del sitio activo de la RK humana, y en base al análisis de las estructuras cristalográficas de RK se ha visto que la RK humana uniría al  $PO_4^{-3}$  y al  $Mg^{+2}$  dentro del sitio activo, y que esta unión estaría mediada por moléculas de aguas estructurales conservadas que permitirían la formación de puentes de hidrógeno entre el  $PO_4^{-3}$  y el  $Mg^{+2}$  y los residuos conservados Asn 199 y Glu202 que se ubican dentro del sitio activo de la enzima, y que forman parte del motivo NXXE. Además, estos residuos participarían en la unión del ATP en el sitio activo. Ensayos cinéticos mostraron que el reemplazo del residuo Asn199 por Leu da lugar a una enzima que tiene una bajísima actividad y que no es activada por  $K_2HPO_4$ . La mutante RK N199L tiene una  $k_{cat}$  que es más de 500 veces más pequeña que la de la enzima silvestre y una

$K_M$  para MgATP casi 70 veces más grande que la enzima silvestre. Por otro lado, el reemplazo del residuo Glu202 por Leu llevó a que la enzima también tuviera una actividad bajísima y que tampoco fuera activada por  $K_2HPO_4$ . La mutante E202L tiene una  $k_{cat}$  que es más de 140 veces más pequeña que la de la enzima silvestre y una  $K_M$  para MgATP casi 50 veces más grande que la de la enzima silvestre. De esta manera, se infiere que los residuos Asn199 y Glu202 cumplen un rol importantísimo tanto en la catálisis, como en la regulación. Por otro lado, la mutación del residuo conservado del motivo GXGD Asp269 por Asn condujo a que la enzima mutante RK D269N tenga una  $K_M$  para D-ribosa que es 2,4 veces más grande que la de RK silvestre, y una  $k_{cat}$  que es 54,5 veces más pequeña que la  $k_{cat}$  de la enzima silvestre, y a que tampoco sea activada por el  $K_2HPO_4$ . De esta manera, es posible inferir que este residuo sería muy importante en la catálisis, en la unión de D-ribosa, y en la regulación por  $K_2HPO_4$ , sin poder afirmar que este residuo sería el residuo catalítico en la RK humana.

### **Proyecciones**

Las proyecciones de este trabajo deberían apuntar principalmente a estudiar de qué manera los cationes monovalentes y divalentes regulan la actividad en la RK humana. De este modo, se debería hacer hincapié en determinar si el efecto activador del  $K^+$  involucra cambios conformacionales en la enzima, y a estudiar el mecanismo mediante el cual el  $Mn^{+2}$  ejerce su efecto inhibitorio. Además sería también muy importante establecer las bases estructurales de la regulación de la RK humana determinando su estructura tridimensional con varios ligandos que afectan su actividad

## VIII CONCLUSIONES.

- La RK humana posee una regulación muy compleja, en la que el  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{+2}$  ejercen un efecto activador, mientras que el  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$ , y ambos sustratos, inhiben. El mecanismo de activación por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  debería estar dado por una activación dual, ejercida por  $\text{K}^+$  y por  $\text{PO}_4^{-3}$ .
- Los residuos Asn199 y Glu202 del motivo conservado NXXE cumplen un rol importante en la catálisis, regulación, en la unión de los iones  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y en la unión de ATP en la RK de *H. sapiens*.
- El residuo Asp269 del motivo conservado GXGD juega un papel importante en la catálisis, en la unión de D-ribosa, y en la regulación por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , aunque su rol en la RK humana como base catalítica no es concluyente.
- El acoplamiento molecular predice que dentro de la estructura de la RK humana, el  $\text{PO}_4^{-3}$  debería ocupar una posición muy similar a la que tiene en la estructura de la RK de *E.coli*, dentro de su sitio activo, muy cercana al motivo NXXE.

## IX REFERENCIAS.

1. Agranoff, B.W. y Brady, R.O. (1956) Purification and properties of calf liver ribokinase. *J. Biol. Chem.* 219, 221-229.
2. Andersson, C.E. y Mowbray, S.L. (2002) Activation of ribokinase by monovalent cations. *J. Mol. Biol.* 315, 409-419.
3. Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L. y Thornton, J.M. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 1205-1218
4. Arnfors, L., Hansen, T., Schonheit, P., Ladenstein, R. y Meining, W. (2006) Structure of *Methanocaldococcus jannaschii* nucleoside kinase: an archeal member of the ribokinase family. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62, 1085-1097.
5. Báez, M., Cabrera, R., Pereira, H.M., Blanco, A., Villalobos, P., Ramírez-Sarmiento, C.A., Caniuguir, A., Guixé, V., Garratt, R.C., Babul., J. (2013) A ribokinase family conserved monovalent cation binding site enhances the MgATP-induced inhibition in *E. coli* phosphofructokinase-2. *Biophys. J.*, 105 (1), 185-193.
6. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
7. Budde, R.J., Ramdas, L. and Ke, S. (1993) Recombinant pp60-src from baculovirus-infected insect cells: purification and characterization. *Prep. Biochem.* 23 (4), 493-515.
8. Chuvikovsky, D.V., Esipov, R.S., Skoblov, Y.S., Chupova, L.A., Muravyova, T.I., Miroshnikov, A.I., Lapinjoki, S. y Mikhailopoulo, I.A. (2006) Ribokinase from *E. coli*: expression, purification, and substrate specificity. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 6327-6332.
9. Gupta, R.S. (1996) Adenosine-AMP exchange activity is an integral part of the mammalian adenosine kinase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 493-502.
10. Laloux, M., Van Shaftingen, E., Francois, J. y Hers, H. (1985) Phosphate dependency of phosphofructokinase-2. *Eur. J. Biochem.* 148, 155-159.
11. Li, J., Wang, C., Wu, Y., Wu, M., Wang, L., Wang, Y. y Zang, J. (2012) Crystal structure of Sa239 reveals the structural basis for the activation of ribokinase by monovalent cations. *J. Struct. Biol.* 177, 578-582.

12. Maguire, M.E., Cowan, J.A. (2002) Magnesium chemistry and biochemistry. *Biometals* 15, 203-210.
13. Maj, M.C., Singh, B. y Gupta, R.S. (2002) Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry*, 41, 4059-4069.
14. Maj, M.C. y Gupta, R.S. (2001) The effect of inorganic phosphate on the activity of bacterial ribokinase. *J. Protein. Chem.* 20, 139-144.
15. Maj, M.C., Singh, B. y Gupta, R.S. (2000) Structure-activity studies on mammalian adenosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 386-393.
16. Mathews, I. I., Erion, M. D. Y Ealick, S. E. (1998) Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution, *Biochemistry* 37, 15607-15620.
17. Merino, F., Rivas-Pardo, J.A., Caniuguir, A., García, I. y Guixé, V. (2011) Catalytic and regulatory roles of divalent metal cations on the phosphoryl-transfer mechanism of ADP-dependent sugar kinases from hyperthermophilic archaea. *Biochimie.* 94, 516-524.
18. Navarro, Freddy. (2010) Análisis estructural, evolutivo y funcional de la Piridoxal Quinasa humana. Tesis pregrado, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
19. Navarro, F., Ramírez-Sarmiento, C.A. y Guixé, V. (2013) Catalytic and regulatory roles of species involved in metal-nucleotide equilibriums in human pyridoxal kinase. *Biometals.* 26, 805-812.
20. Ogbunude, P., Lamour, N. y Barret, M. (2007) Molecular cloning, expression and characterization of ribokinase of *Leishmania major*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39(6), 462-466.
21. Parducci, R.E., Cabrera, R., Baez, M. y Guixé, V. (2006) Evidence for a catalytic Mg<sup>2+</sup> ion and effect of phosphate on the activity of *Escherichia coli* Phosphofructokinase-2: Regulatory properties of a Ribokinase family member. *Biochemistry* 45, 9291-9299.
22. Parducci, R.E. (2005) Importancia de residuos conservados en la familia riboquinasa: Efecto de Mg<sup>+2</sup> y PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> sobre la catálisis y regulación de la actividad enzimática de fosfofructoquinasa-2 de *Escherichia coli*. Tesis pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

23. Park, J. y Gupta, R.S. (2008) Adenosine kinase and ribokinase-the RK family of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2875-2896.
24. Park, J., van Koeverden, P., Singh, B., y Gupta, R.S. (2007) Identification and characterization of human ribokinase and comparison of its properties with *E. coli* ribokinase and human adenosine kinase. *FEBS Lett.* 581, 3211-3216.
25. Park, J. Singh, B. y Gupta, R.S. (2006) Inhibition of adenosine kinase by phosphonate and bisphosphonate derivatives. *Mol. Cell. Biochem.* 283, 11-21.
26. Park, J. Singh, B., Maj, M. y Gupta, R.S. (2004). Phosphorylated derivatives that activate or inhibit mammalian adenosine kinase provide insights into the roles of pentavalent ions in AK catalysis. *Protein J.* 23, 167-177.
27. Ramírez-Silva, L. y Oria-Hernández, J. (2003) Selectivity of pyruvate kinase for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in water/ dimethylsulfoxide mixtures. *Eur. J. Biochem.* 270, 2377-2385.
28. Rivas-Pardo, J.A., Caniuguir, A., Wilson, C.A.M., Babul, J. y Guixé, V. (2011) Divalent metal cation requirements of phosphofructokinase-2 from *E. coli*. Evidence for a high affinity binding site for Mn<sup>2+</sup>. *Arch. Biochem. Biophys.* 505, 60-66.
29. Schumacher, M.A., Scott, D.M., Mathews, I.I., Ealick, S.E., Roos, D.S., Ullman, B. y Brennan, R.G. (2000) Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. *J. Mol. Biol.* 296, 549-567.
30. Sigrell, J.A., Cameron, A.D., Jones, T.A. y Mowbray, S.L. (1999) Induced fit sugar binding activates ribokinase. *J. Mol. Biol.* 290, 1009-1018.
31. Sigrell, J.A., Cameron, A.D., Jones, T.A. y Mowbray, S.L. (1998) Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure* 6, 183-193.
32. Sigrell, J.A., Cameron, A.D., Jones, T.A. y Mowbray, S.L. (1997) Purification, characterization, and crystallization of *Escherichia coli* ribokinase. *Protein Sci.* 6, 2474-2476.
33. Switzer, R.L. (1969) Regulation and mechanism of Phosphoribosylpyrophosphate Synthetase. I. Purification and properties of the enzyme from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 244, 2854-2863.

34. Trott, O. y Olson, A. J. (2010) Autodock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 455-461.
35. Werner Hofer, H., Allen, B.L., Kaeini, M.R., Pette, D. y Harris, B.G. (1982) Phosphofructokinase from *Ascaris suum*. Regulatory kinetic studies and activity near physiological conditions. *J. Biol. Chem.* 257, 3801-3806.
36. Zhang, Y., Dougherty, M., Downs, D.M. y Ealick, S.E. (2004) Crystal structure of an imidazole riboside kinase from *Salmonella enterica*: implications for the evolution of the ribokinase superfamily. *Structure* 12, 1809-1821.

#### Programas

1- Martel, A. E. and Smith, R. M. (1998) NIST critically selected stability constant of metal complexes. NIST standard references database 46, version 5.0.

2- Autodock Vina 4.2 .