

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Y FARMACÉUTICAS



**DETERMINACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE
ADAPTACIÓN A SAL DE UNA QUINASA
DEPENDIENTE DE ADP DE *NANOHALOARQUEA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de especialización en
Bioquímica de Proteínas y Biotecnología
y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

Amparo Elisa Núñez Verdejo

Directores de Tesis:
Dra. Victoria Guixé Leguía
Dr. Víctor Castro Fernández

Agosto 2020
Santiago, Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato:

Amparo Elisa Núñez Verdejo

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización: Bioquímica de Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Victoria Guixé Leguía _____

Co-director de Tesis:

Dr. Víctor Castro Fernández _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mauricio Baez _____

(presidente de comisión)

Dra. María Antonieta Valenzuela _____

Dra. Jenny Blamey _____

Agradecimientos

A mis padres, por todo su apoyo, comprensión y, sobre todo, por su amor infinito. Por su esfuerzo y sacrificio durante mis 25 años de existencia, que me ha permitido alcanzar desde mis metas más pequeñas, a las más gigantes. A Rocío, mi hermana mayor favorita y modelo a seguir, por su apoyo y su cariño. A Rodri, mi compañero, por apoyarme, soportarme y quererme incondicionalmente. A mis amigos del colegio y de la U, que llenaron mis años universitarios de risas, cariño y buenos momentos.

A mis tutores, Dra. Victoria Guixé y Dr. Víctor Castro, por darme un espacio en el laboratorio y guiarme siempre con dedicación, paciencia y rigurosidad durante el desarrollo de esta tesis.

Finalmente agradecer a todos los integrantes del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, que de alguna u otra forma contribuyeron a este trabajo: Ale, Exe, Gabo, Gisse, Juan Carlos, Isa, Leslie, Luis, Matu, Nico, Pablo C., Pablo V., Ricardo Coñuecar, Ricardo Cabrera, Seba, Sixto, Steffy, Señora Elizabeth y en especial a Felipe, que me recibió cuando recién llegue al laboratorio, me enseñó a trabajar y me guió durante toda mi unidad experimental (y más), siempre con mucha paciencia.

Financiamiento

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el apoyo del proyecto FONDECYT 1191321.

Índice

Agradecimientos.....	i
Financiamiento.....	ii
Índice de figuras.....	vi
Índice de tablas.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
<i>Abstract</i>	xi
1.introducción.....	1
1.1 Microorganismos halófilos.....	1
1.2 Mecanismos de adaptación a sal.....	4
1.3 Adaptaciones estructurales de las proteínas halófilas.....	6
1.4 Quinasas dependientes de ADP.....	11
1.5 Clase <i>Nanohaloarquea</i>	14
2. Hipotesis y objetivos.....	19
2.1 Hipotesis.....	19
2.2 Objetivo general.....	19
2.3 Objetivos específicos.....	19
3. Materiales	21
3.1 Reactivos.....	21
3.2 Vectores y cepas.....	22

3.3 Medios de cultivo.....	22
4. Metodología	23
4.1 Métodos de caracterización bioquímica.....	23
4.1.1 Expresión y purificación quinasa dependiente de ADP de <i>Nanohaloarquea</i>	23
4.1.2 Cuantificación de proteínas.....	24
4.1.3 Electroforesis en gel.....	24
4.1.4 Identificación de proteínas por mapeo peptídico.....	25
4.1.5 Medición de actividad fosfofructoquinasa (PFK).....	25
4.1.6 Ensayos discontinuos actividad PFK.....	26
4.1.7 Determinación de parámetros cinéticos.....	26
4.1.8 Caracterización de actividad enzimática.....	27
4.1.9 Medición de actividad glucoquinasa.....	28
4.2 Análisis bioinformático.....	28
4.2.1 Construcción de modelo por homología y evaluación.....	28
4.2.2 Análisis de las adaptaciones estructurales por herramientas de bioinformáticas.....	31
4.2.2.1 Distribución de residuos según exposición al solvente.....	31
4.2.2.2 Volumen de la capa interna.....	33
4.2.2.3 Potencial electrostático de superficie y carga neta.....	33
4.2.2.4 Controles de modelos por homología.....	33
5. Resultados.....	36

5.1 Objetivo específico 1.....	36
5.1.1 Expresión recombinante y purificación de la quinasa dependiente de ADP de <i>Nanohaloarquea</i> a partir de <i>H. volcanii</i>	36
5.1.2 Caracterización bioquímica de la actividad PFK y determinación de los parámetros cinéticos de la quinasa dependiente de ADP de <i>Nanohaloarquea</i>	38
5.2. Objetivo específico 2.....	44
5.2.1 Construcción de un modelo por homología de la quinasa dependiente de ADP de <i>Nanohaloarquea</i>	44
5.2.2 Análisis de las adaptaciones estructurales mediante herramientas bioinformáticas.....	48
6. Discusión	61
6.1 Caracterización cinética y determinación de parámetros cinéticos....	61
6.2 Modelos por homología y adaptaciones estructurales asociadas a halofilicidad.....	68
7. Conclusiones.....	78
9. Bibliografía	79
9. Anexos	91

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de organismos halófilos en los tres dominios de la vida...	3
Figura 2. Rasgos halófilos de modelos por homología PFK/GK-ADP de <i>Halobacteria</i> y <i>Methanosarcinales</i> halófilos.....	10
Figura 3. Resumen de posiciones filogenéticas propuestas para <i>Nanohaloarquea</i>	17
Figura 4. Purificación de la quinasa dependiente de ADP de <i>Nanohaloarquea</i> .	37
Figura 5. Curva de progreso actividad PFK.....	39
Figura 6. Curva de saturación de la actividad PFK para F6P y ADP.....	40
Figura 7. Actividad PFK en distintas condiciones.....	43
Figura 8. Modelos estructurales de a quinasa dependientes de ADP de <i>Nanohaloarquea archaeon SW 4_43_9</i>	45
Figura 9. Distribución de residuos totales según su exposición y volumen de la capa interna.....	50
Figura 10. Distribución de residuos de la capa interna.....	52
Figura 11. Distribución de residuos de la capa externa.....	54
Figura 12. Potencial electroestático superficial de quinastas dependientes de ADP.....	56
Figura 13. Carga neta.....	57

Índice de Tablas

Tabla 1. Motivos involucrados en la unión de azúcares.....	13
Tabla 2. Motivos involucrados en la unión de azúcares y su especificidad.....	13
Tabla 3. Reactivos.....	21
Tabla 4. Tampones de pH usados para la caracterización enzimática.....	28
Tabla 5. Secuencias usadas en el análisis estructural de modelos por homología.....	32
Tabla 6. Tabla de purificación de la PFK de <i>Nanohaloarquea</i>	38
Tabla 7. Comparación de ambos ajustes con criterio de Akaike.....	41
Tabla 8. Parámetros cinéticos para la actividad PFK	41
Tabla 9. Estadísticas del gráfico de Ramachandran para ambos modelos.....	46
Tabla 10. Evaluación de los modelos por servidores online.....	46
Tabla 11. Resumen de las variaciones en distribución de aminoácidos en <i>Halobacteria</i> , <i>Methanosarcinales</i> halófilos y <i>Nanohaloarquea</i>	58
Tabla 12. Control 1: Distribución de aminoácidos en modelos de la quinasa de <i>N. archaeon</i> SW 4_43_9 hechos con un templado de menos identidad.....	60
Tabla 13. Control 2: Distribución de residuos de la estructura original 6C8Z y modelos hechos con Phyre2 y Modeller para la misma secuencia.....	60

Lista de abreviaturas

F6P	Fructosa 6-fosfato
PFK	Fosfofructoquinasa
GK	Glucoquinasa
PFK/GK-ADP	Enzima bifuncional dependiente de ADP
k_{cat}	Constante catalítica
k_{cat}/K_M	Eficiencia catalítica
K_M	Constante de Michaelis-Menten
V_{max}	Velocidad máxima
OD	Densidad óptica

Resumen

Los ambientes con un alto porcentaje de salinidad están habitados por una gran diversidad de organismos: bacterias, eucariontes y principalmente arqueas. Para sobrevivir y prosperar en estas condiciones extremas estos organismos han adaptado su fisiología, desarrollando mecanismos que evitan la pérdida de agua por medio de la acumulación de iones inorgánicos o moléculas orgánicas dentro de la célula. La acumulación de iones inorgánicos dentro de la célula requiere que las proteínas de estos organismos modifiquen su estructura para ser estables y funcionales en una alta concentración de iones. Estas adaptaciones estructurales se han estudiado principalmente en las arqueas de la clase *Halobacteria* y más recientemente en el orden *Methanosarcinales*, encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos filogenéticos. En *Halobacteria* destaca el aumento de residuos negativos en la superficie, junto con una disminución del número de lisinas y residuos hidrofóbicos voluminosos, mientras que en *Methanosarcinales* se observa un aumento en el número de lisinas y residuos negativos, sin una disminución de los residuos hidrofóbicos voluminosos.

Las *Nanohaloarquea* son una nueva clase de arqueas halófilas cuya posición dentro del dominio Arquea aún es tema de debate. En cuanto a su adaptación a las altas concentraciones de sal, mediante análisis genómicos se ha visto que las proteínas de algunos de estos organismos tienen características

que podrían indicar que las *Nanohaloarquea* utilizan la estrategia de *salt-in* para su haloadaptación y que comparten las adaptaciones estructurales vistas para *Halobacteria*. Sin embargo, a la fecha no existen estudios sobre estos organismos o sus proteínas, en particular, como éstas se adaptan a altas concentraciones de sal.

Para determinar el mecanismo de haloadaptación de las proteínas de *Nanohaloarquea* utilizamos una quinasa de azúcares dependiente de ADP no caracterizada. La proteína se expresó en la arquea halófila *Haloferax volcanii* y se determinaron sus parámetros cinéticos (V_{\max} , k_{cat} y K_M) y el efecto de la sal sobre la actividad enzimática. Según estos análisis la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea* es específica para fructosa-6-fosfato y alcanza su máxima actividad en concentraciones molares de KCl. Además, se construyó un modelo por homología de esta proteína y se analizaron las adaptaciones estructurales asociadas a halofilicidad. Se determinó que en esta proteína hay un aumento de aminoácidos ácidos en la superficie, sin embargo, no hay una reducción en el número de lisinas en la superficie ni del tamaño del centro hidrofóbico. Estas características sugieren que la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea* se adapta a las altas concentraciones de sal por un mecanismo de haloadaptación, distinto al descrito para *Halobacteria*.

Abstract

Environments with a high percentage of salinity are inhabited by a great diversity of organisms: bacteria, eukaryotes and mainly archaea. To survive and thrive in these extreme conditions, these organisms have adapted their physiology by developing mechanisms that prevent the loss of water from the cell through the accumulation of inorganic ions or organic molecules within the cytoplasm. The accumulation of inorganic ions within the cell requires the proteins of these organisms to modify their structure to be stable and functional in a high concentration of ions. These structural adaptations have been studied mainly in the class *Halobacteria* and, more recently, in the order *Methanosarcinales*, finding significant differences between both phylogenetic groups. In *Halobacteria* the increase in negative surface residues, along with a decrease in the number of lysine and bulky hydrophobic residues, are the most characteristic features. In *Methanosarcinales*, however, an increase in the number of lysine, negative residues and bulky hydrophobic residues is observed.

Nanohaloarchaea are a new class of halophilic archaea whose position within the *Archaea* domain is still a matter of debate. Regarding its adaptation to high salt concentrations, genomic analysis has shown that the proteins of some of these organisms have characteristics that indicate *Nanohaloarchaea* use the salt-in strategy for their haloadaptation and share the structural adaptations seen

for *Halobacteria*. However, to date there are no studies on these organisms or their proteins, or how they adapt to high concentrations of salt.

To determine the haloadaptation mechanism of the *Nanohaloarchaea* proteins, we used an uncharacterized ADP-dependent sugar kinase. The protein was expressed in the halophilic archaea *Haloferax volcanii* and we determined its kinetic parameters (V_{max} , k_{cat} and K_M) and the effect of salt on enzymatic activity. According to these analyzes, the ADP-dependent kinase of *Nanohaloarchaea* is specific for fructose-6-phosphate being its maximum activity reach at molar concentrations of KCl. Also, by homology modeling, we analyzed the structural adaptations associated with halophilicity. These adaptations included an increase of acidic amino acids on the surface, no reduction in the number of lysine on the surface, or the size of the hydrophobic core. These characteristics suggest that the ADP-dependent kinase of *Nanohaloarchaea* adapts to high salt concentrations by a haloadaptation mechanism different from that described for *Halobacteria*.

1. Introducción

1.1 Microorganismos halófilos

Los extremófilos son organismos que viven en condiciones que se consideran extremas para la vida como nosotros la conocemos, tales como altas temperaturas, pH ácidos o alcalinos, radiación o una alta concentración de sales. Desde su descubrimiento, su estudio cada vez toma más fuerza, tanto por su particular fisiología como por su gran potencial biotecnológico (Gomes & Steiner, 2004; Littlechild, 2015).

Los organismos halófilos son extremófilos que viven en ambientes con altas concentraciones de sal, como lagos salado, depósitos de sal, entre otros (DasSarma & DasSarma, 2015). Si bien no existen criterios unánimes que definan el grado de halofilicidad de un organismo, hay consenso en que estos pueden clasificarse como (Ollivier et al. 1994):

- Halófilos extremos: crecimiento óptimo en medios que contienen 20-30% (p/v) de NaCl (3,4 -5,1 M)
- Halófilos moderados: crecimiento óptimo en medios que contienen 5-20% de NaCl (0,9- 3,4 M)
- Halófilos leves: crecimiento óptimo en medios que contienen 2-5% de NaCl (0,3 a 0,9 M)

Los ambientes salinos e hipersalinos son altamente diversos en sus propiedades y por ende, las comunidades que los habitan también son diversas, tanto a nivel fisiológico como filogenético (Oren, 2002). Los organismos halófilos están presentes en los tres dominios de la vida: Bacteria, Arquea y Eucariota (Figura 1), sin embargo, en los hábitats hipersalinos, las arqueas suelen ser el dominio más abundante (Emerson et al. 2011), representadas por tres grupos filogenéticos distintos: *Halobacteria*, *Methanosarcinales* (Oren, 2008) y una nueva clase de arqueas halófilas denominadas *Nanohaloarquea* (Emerson et al. 2011) cuyos genomas han sido obtenidos a partir de ambientes con distintos porcentajes de salinidad (19, 29 y 35%) (Emerson et al. 2011; Ferna, Ventosa, & Rodri, 2011; Finstad et al. 2017).

La clase *Halobacteria* es uno de los grupos más grandes dentro del dominio Arquea. Esta clase está compuesta por 6 familias, de las cuales todos sus miembros se caracterizan por requerir una concentración de al menos 1.0 M de NaCl para crecer, mientras que la mayoría de ellos crecen óptimamente entre 3,5-4,5 M NaCl (Oren, Ventosa, & Kamekura, 2017). Por otra parte, en la clase *Methanomicrobia*, están los *Methanosarcinales*, que son un orden de arqueas metanógenas donde se pueden encontrar organismos no halófilos hasta halófilos extremos. Los organismos halófilos pertenecen a 4 de los 7 géneros de este orden y corresponden a: *Methanohalobium*, *Methanosalsum*, *Methanohalophilus* y *Methanosarcina* (Liu, 2010). En el dominio Bacteria también se han encontrado organismos halófilos pertenecientes a los filos

Cyanobacteria, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, entre otros (Oren, 2008). En general, los organismos halófilos del dominio Bacteria, son halófilos moderados, con la excepción de algunos halófilos extremos (Oren, 2002). Dentro del dominio Eucariota los organismos halófilos son escasos, siendo uno de los más estudiados el alga verde *Dunaliella*, la cual puede crecer hasta concentraciones relativamente bajas de sal (1M) (Oren, 2002).

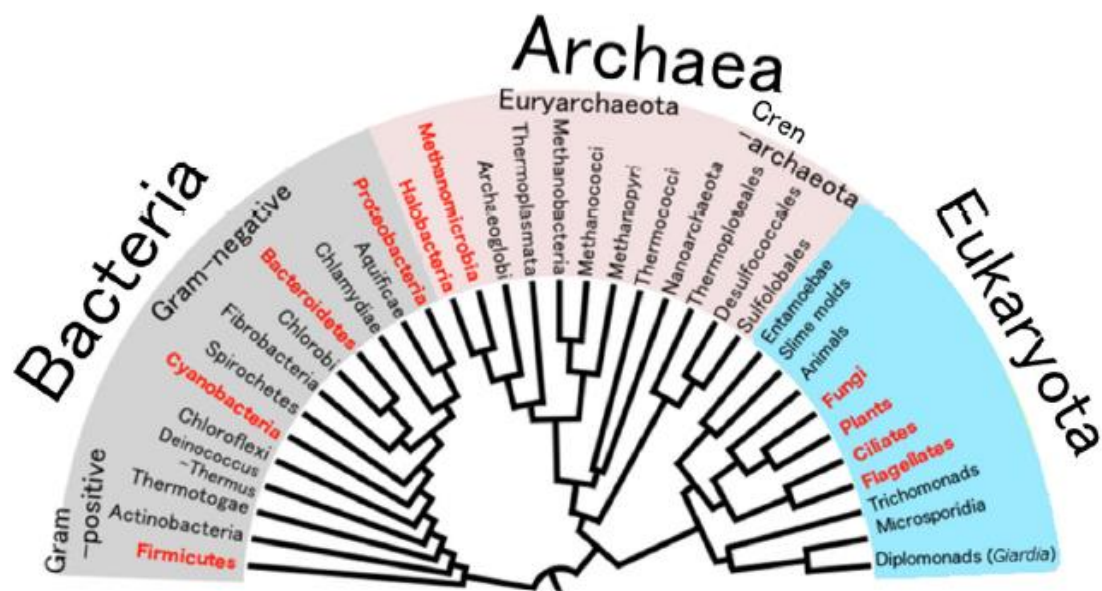


Figura 1. Distribución de organismos halófilos en los tres dominios de la vida. Grupos en rojo tienen por lo menos un organismo halófilo. Figura extraída de Edbeib et al. 2016.

1.2 Mecanismos de adaptación a sal

La salinidad del ambiente es un factor determinante en la composición de las comunidades microbianas y ejerce una alta presión de selección evolutiva (Lozupone & Knight, 2007). En los medios altamente salinos la principal dificultad es la poca disponibilidad de agua como consecuencia de las condiciones hipertónicas del medio, las cuales inducen un gradiente osmótico que disminuye el contenido relativo de agua de las células (Brown, 1976; Lenton et al. 2016). En los organismos halófilos se han descrito dos mecanismos de adaptación, los cuales tienen como objetivo mantener el citoplasma isoosmótico con respecto al medio y evitar la pérdida de agua desde la célula (Brown, 1976).

(I) La estrategia de *salt-in* involucra la acumulación de concentraciones molares de iones dentro de la célula. Potasio (K^+) y cloruro (Cl^-) son los iones más abundantes (hasta 4 M) (Oren, 2008), mientras otros iones como el sodio (Na^+), magnesio (Mg^{+2}) y fosfato (PO_4^{-3}) se acumulan en concentraciones mucho menores (Matheson et al. 1976). Para lograr estos gradientes a través de la membrana se requieren mecanismos de transporte dependientes de energía, principalmente bombas de protones, que usan como energía el gradiente de protones de la membrana generado por el transporte respiratorio de electrones o por la proteína bacteriorodopsina (Gunde-Cimerman, Plemenitaš, & Oren, 2018). El uso de este mecanismo requiere de la adaptación de la maquinaria celular a las altas concentraciones de iones, por lo que las proteínas de estos organismos tienen una composición aminoacídica particular que les permite mantenerse

estables y funcionales en dichas condiciones (Lanyi, 1974). La estrategia de *salt-in* es usada principalmente por arqueas halófilas extremas de la clase *Halobacteria* y algunas bacterias (Averhoff & Müller, 2010; Roy et al. 2018).

(II) La segunda estrategia de haloadaptación, *salt-out*, consiste en la acumulación intracelular de compuestos orgánicos, llamados solutos compatibles. Estos pueden ser sintetizados o captados desde el medio y son de naturaleza química variada, la mayoría corresponden a variaciones de aminoácidos o azúcares, los cuales suelen ser no cargados o zwitteriónicos, de pequeño tamaño y altamente solubles (Averhoff & Müller, 2010; Oren, 2008). En este caso, la presencia de dichos solutos no tiene gran impacto en el plegamiento y funcionamiento de las enzimas (Brown, 1976), por lo que el proteoma de estos organismos no requiere de adaptaciones. Esta estrategia, sin embargo, tiene un costo energético mayor a la estrategia de *salt-in* (Oren, 1999). La acumulación de solutos compatibles es común y conservada en los tres dominios de la vida: Eucarionte, Bacteria y Arquea (principalmente metanógenos) (Averhoff & Müller, 2010; Oren, 2002; Roberts, 2005). Los microorganismos que acumulan solutos compatibles generalmente se adaptan con mayor facilidad a la dilución o al aumento repentino de la salinidad del medio (Gunde-Cimerman et al. 2018).

La existencia de ambos mecanismos no es excluyente. Se ha reportado que hay microorganismos que además de sintetizar solutos compatibles, simultáneamente acumulan altas concentraciones de K^+ (Lai et al. 1991; M. Lai & Hong, 2000; Oren, 2002). También se han descrito algunos organismos

capaces de acumular distintos solutos compatibles dependiendo de la salinidad del medio o la fase de crecimiento en la que se encuentren e incluso se ha reportado que algunos halófilos son capaces de alternar entre la acumulación de KCl o solutos compatibles dependiendo de las condiciones ambientales (Deole & Hoff, 2020; Desmarais et al. 1997; Galinski & Herzog, 1990; Lai & Gunsalus, 1992; Littlechild, 2015; Saum & Müller, 2007, 2008)

1.3 Adaptaciones estructurales de las proteínas halófilas

Los organismos que utilizan la estrategia *salt-in* deben adaptar su maquinaria celular, y particularmente sus proteínas, para que éstas funcionen a altas concentraciones de sal. Estas modificaciones estructurales se han estudiado principalmente en la clase *Halobacteria* y se pueden resumir en tres rasgos principales (Fukuchi et al. 2003; Nath, 2016; Paul et al. 2008):

I) Superficie cargada negativamente: Esto es resultado de un aumento en los residuos ácidos, Asp y Glu, además de una disminución en el contenido de Lys.

II) Disminución de la superficie hidrofóbica expuesta al solvente: Este rasgo es generado por la disminución en el contenido de Lys en la superficie.

III) Reducción del centro hidrofóbico: Producto de una disminución de los residuos apolares voluminosos como Ile, Leu, Phe y Met, y el aumento de los residuos hidrofóbicos de menor tamaño como Ala y Val.

Si bien los rasgos estructurales de las proteínas halófilas han sido ampliamente estudiados, aún no hay una interpretación clara del mecanismo molecular por el cual algunas de estas modificaciones permiten que las proteínas halófilas sean estables y funcionales a una alta concentración de sal.

El efecto hidrofóbico es la principal fuerza que dirige el plegamiento de las proteínas. A altas concentraciones de sal las interacciones hidrofóbicas se ven favorecidas (Ghosh, Kalra, & Garde, 2005). por lo tanto, es de gran importancia encontrar un balance entre estabilidad y flexibilidad que sea compatible con la función de la proteína. La disminución del tamaño del centro hidrofóbico de las proteínas halófila evitaría las conformaciones plegadas demasiado rígidas que impidan la función de la enzima, principalmente su actividad catalítica (Lanyi, 1974; Lenton et al. 2016). Por otro lado, la disminución de la superficie hidrofóbica expuesta a solvente evitaría la agregación de proteínas debido a los parches hidrofóbicos expuestos en la superficie (Lenton et al. 2016).

Una de las principales interrogantes es el rol de los residuos ácidos en la superficie. La teoría más aceptada actualmente es la teoría de “solvatación-estabilización”, la cual plantea que estos aminoácidos formarían interacciones electroestáticas estabilizadoras con iones hidratados, formando una capa de solvatación con una alta concentración de iones en la superficie de la proteína, la cual permitiría que ésta se mantenga soluble (Madern et al. 2000; Ortega et al. 2015; Zaccai et al. 1989). Sin embargo, solo en algunos estudios se ha

identificado la presencia de iones en estas capas de hidratación (Britton et al. 2006; Lenton et al. 2016; Qvist et al. 2012).

La contribución de estos residuos a la estabilidad de proteínas halófilas es aún tópicamente de discusión. Algunos autores han propuesto que el rasgo más importante en la haloadaptación no sería la carga negativa en la superficie, sino que la disminución del área accesible al solvente, dada principalmente por la disminución en el contenido de lisina en la superficie de la proteína (Britton et al. 2006; Tadeo et al. 2009). Este residuo tiene una cadena alifática de gran tamaño y su presencia en la superficie de la proteína resulta desfavorable, ya que el agua se estructura de forma ordenada alrededor de esta (Talon et al. 2014). Además, esta cadena también es altamente móvil, por lo que su presencia en la superficie dificultaría la formación de una capa de solvatación estable (Britton et al. 2006). En este contexto algunos autores explican la preferencia de los residuos ácidos en la superficie de las proteínas halófilas en base a que éstos tienen cadenas laterales cortas, a diferencia de los residuos con carga positiva los cuales tienen cadenas laterales voluminosas. Estas cadenas cortas se pueden organizar de mejor manera en la superficie y permiten disminuir la interacción de la superficie de la proteína con el solvente, lo cual es favorable en condiciones donde el agua es limitada. (Britton et al. 2006, Tadeo et al. 2009)

Estos tres rasgos característicos de las proteínas halófilas se han descrito en múltiples proteínas de organismos halófilos de la clase *Halobacteria*, sin embargo, aún no está claro si estos son mecanismos generales de adaptación o

si son específicos para cada organismo o grupo filogenético. Un estudio comparativo realizado con quinasas dependientes de ADP provenientes de tres grupos filogenéticos distintos, *Halobacteria*, *Methanosarcinales* y *Eucarionte*, determinó que las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos se adaptan a la alta concentración de sal través de una estrategia no canónica, diferente a la estrategia descrita para *Halobacteria* (Gonzalez-Ordenes et al. 2018).

En ese estudio se determinó que en las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos hay un aumento en el contenido de isoleucina en la capa interna de las proteínas, siendo este aumento de un 97% en comparación con organismos eucariontes y en oposición a lo descrito para *Halobacteria*, donde hay una disminución de los residuos hidrofóbicos voluminosos (Ile, Met, Phe etc.) y un aumento en los residuos hidrofóbicos pequeños (Ala y Val). De igual forma, en las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos no se ve un aumento de los residuos hidrofóbicos pequeños y se puede observar que el centro hidrofóbico de estas proteínas es más grande que el de las proteínas de *Halobacteria* (Figura 2).

Por otro lado, en las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos se ve un aumento considerable en el contenido de ácido aspártico, en comparación a *Eucarionte*. Este aumento en ácido aspártico también se ve en las proteínas de organismos halófilos de la clase *Halobacteria*, aunque más intensamente. Al comparar las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos con las de la clase *Halobacteria*, la diferencia más significativa se ve en el contenido de lisina en la

capa externa; en las *Halobacteria* no se ve casi ninguna lisina mientras que en los *Methanosarcinales* este residuo aumenta casi al doble con respecto a los organismos eucariontes y siete veces con respecto a *Halobacteria*.

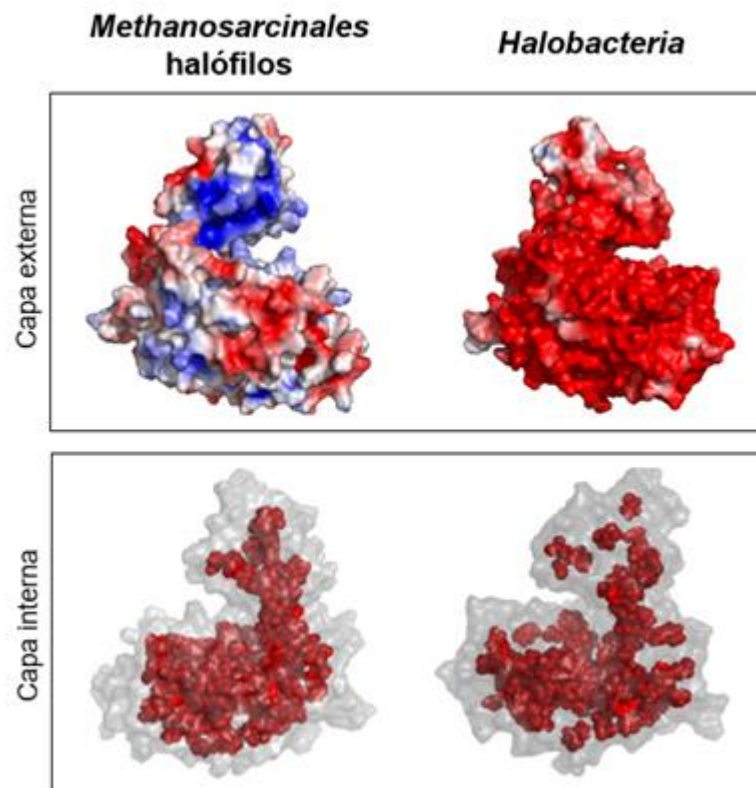


Figura 2. Rasgos halófilos de modelos por homología de PFK/GK-ADP de *Halobacteria* y *Methanosarcinales* halófilos. En la parte superior se muestra el potencial electrostático de superficie, azul corresponde a carga positiva y rojo a carga negativa ($\pm 3 k_B T/e$). En la parte inferior se muestran los residuos de la capa interna, usando un criterio de exposición superficial de residuos menor a 5 \AA^2 . Se presenta un modelo representativo de cada grupo *Natronorubrum bangense* (*Halobacteria*) y *Methanohalobium evestigatum* (*Methanosarcinales* halófilo). Figura modificada de Gonzalez-Ordenes et al. 2018.

Esto resulta relevante ya que previamente se había postulado que la disminución del contenido de lisina tenía un rol fundamental en la estabilización de las proteínas halófilas (Britton et al. 2006; Tadeo et al. 2009). El aumento de lisinas con respecto a los organismos eucariontes otorga una carga positiva en la superficie de la proteína de *Methanosarcinales*, contrario a lo observado para las proteínas de *Halobacteria*, cuya carga superficial es altamente negativa (Figura 2). En conjunto, estos resultados indican que las proteínas de *Methanosarcinales* no comparten los rasgos estructurales usualmente asociados a la halofilicidad. (Gonzalez-Ordenes et al. 2018).

1.4 Quinasas dependientes de ADP

La vía de Embden-Meyerhof es la vía metabólica más utilizada para la degradación de la glucosa (Bräsen et al. 2014). Las arqueas se caracterizan por poseer modificaciones de esta vía metabólica, siendo una de las principales variaciones la presencia de quinasas dependientes de ADP, en vez de las clásicas quinasas dependientes de ATP (Glucoquinasas y Fosfofructoquinasas) (Guixé & Merino, 2009). Las quinasas dependientes de ADP se plantean como buenos candidatos para estudiar las adaptaciones estructurales que permiten el funcionamiento de las proteínas a alta concentración de sal ya que están conservadas en el dominio Arquea y existen múltiples estudios sobre sus características bioquímicas, biofísicas y estructurales (Bräsen et al. 2014; Guixé & Merino, 2009; Ito et al. 2003; Koga et al. 2000), siendo además el modelo

utilizado en la elucidación del mecanismo de adaptación halófila de los *Methanosarcinales* (Gonzalez-Ordenes et al. 2018).

Las quinasas dependientes de ADP han sido descritas principalmente en los órdenes *Thermococcales*, *Methanosarcinales*, *Halobacteria* y *Methanococcales* (Castro-Fernandez et al. 2017; Zamora et al. 2017) así como en algunos eucariontes y bacterias (Bräsen et al. 2014). Estas quinasas son homólogas entre si pero cuando fueron descritas no fue posible atribuir homología por secuencia con las enzimas dependientes de ATP, constituyéndose como una nueva familia de enzimas. Gracias a estudios estructurales posteriores estas fueron clasificadas como miembros de la superfamilia riboquinasa (Ito et al. 2001). Los miembros de esta familia de quinasas dependientes de ADP poseen dos tipos de actividades; fosfofructoquinasa (PFK) y glucoquinasa (GK), ambas de gran importancia en la vía glicolítica. Además de enzimas específicas para fructosa-6-fosfato o glucosa, en esta familia existen enzimas bifuncionales, capaces de realizar ambas actividades. Estructuralmente, están compuestas por dos dominios: uno con un plegamiento de tipo Rossman, con una lámina beta central compuesta de hebras paralelas y 8 α hélices a su alrededor, el cual se conoce como el dominio mayor, y un dominio más pequeño compuesto de 4-5 hebras y hélices, el cual cumpliría la función de tapa del sitio activo (Guixé & Merino, 2009).

Alineamientos de secuencias basado en comparaciones de estructuras tridimensionales revelaron motivos estructuralmente conservados en la familia

de las quinasas dependientes de ADP. El motivo GXGD, posee un residuo de ácido aspártico (D) altamente conservado, el cual actúa como la base catalítica que remueve el protón del grupo hidroxilo del sustrato azúcar, activándola para el ataque nucleofílico (Zamora et al. 2017). El motivo NXXE y HXE, están involucrados en la coordinación del catión metálico y finalmente el motivo NXNXD, el cual es fundamental para la unión del azúcar durante la formación del complejo ternario (Abarca-Lagunas et al. 2015; Zamora et al. 2017). Adicionalmente, estudios hechos con información estructural y cinética de las quinasas de azúcar dependientes de ADP de *Thermococcales*, *Methanococcales* y *Methanosarcinales* permitieron identificar nuevos motivos conservados involucrados en la interacción con azúcares (Zamora et al. 2017). Estos motivos permiten clasificar a estas quinasas como específicas o bifuncionales según su especificidad por el azúcar que utilicen como sustrato. Según el número de secuencia de la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *M. burtonii* estos motivos se indican en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Motivos involucrados en la unión de azúcares

Motivo 1	⁸⁶ G-X-(P/A/G)-X-(E/A) ⁹⁰
Motivo 2	¹⁷⁹ (I/V)-(N/H)180-X-(I/V)-X-(E/D) ¹⁸⁴
Motivo 3	²⁰⁵ R-X-I-X-X-X-(R/D) ²¹¹

Tabla 2. Motivos involucrados en la unión de azúcares y su especificidad

Motivo	Específico glucosa	Específico F6P	Bifuncional
1	G-X-(P/A/G)-X-E	G-X-(P/A/G)-X-A	G-X-(P/A/G)-X-E
2	(I/V)-H-X-(I/V)-X-(E/D)	(I/V)-N-X-(I/V)-X-(E/D)	(I/V)-N-X-(I/V)-X-(E/D)
3	R-X-I-X-X-X-D	R-X-I-X-X-X-R	R-X-I-X-X-X-R

1.5 Clase *Nanohaloarquea*

El uso de herramientas de secuenciación de genomas ha enriquecido profundamente nuestro conocimiento sobre la diversidad microbiológica. Estudios recientes reportaron la existencia de una nueva clase de arqueas halófilas extremas de pequeño tamaño, llamadas *Nanohaloarquea* (Emerson et al. 2011; Grant et al. 1999). La primera evidencia de estos organismos se obtuvo en 1999, a partir de una muestra ambiental de un lago en África (Grant et al. 1999), sin embargo, no fue hasta el año 2012 cuando se logró reconstruir casi por completo los genomas de dos miembros de este grupo: '*Candidatus Nanosalina*' (43.5% G+C) y '*Candidatus Nanosalinarum*' (56% G+C). El genoma de estos organismos se obtuvo a partir de muestras ambientales proveniente del lago Tyrrell, Australia, (salinidad 29%, pH 7) donde representan aproximadamente un 10-25% de la comunidad total de arquea (Emerson et al. 2011). Representantes de este nuevo grupo filogenético también se han encontrado en el desierto de Atacama y en una salina en España (Crits-Christoph et al. 2016; Finstad et al. 2017). En bases de datos públicas se han identificado secuencias provenientes de distintos continentes (África, Asia, América y Oceanía) con un alto porcentaje de identidad a las *Nanohaloarquea* (>85%) lo que sugiere que las *Nanohaloarquea* representan una fracción importante de la biomasa y diversidad en hábitats altamente salinos (Andrade et al. 2015; Crits-Christoph et al. 2016; Emerson et al. 2011; Finstad et al. 2017; Podell et al. 2013)

Este nuevo grupo presenta varias características que lo diferencian de otros halófilos extremos: su pequeño tamaño de aproximadamente de 0,6 μm de diámetro, la ausencia de genes asociados a las vesículas de gas Gvp (altamente conservados en halófilos) y el tamaño y contenido GC de su genoma, ambos significativamente menor al de otros microorganismos halófilos (Emerson et al. 2011). Metabólicamente, estos organismos serían predominantemente aeróbicos y heterotróficos, poseen las enzimas necesarias para llevar a cabo la glicólisis, síntesis y catabolismo de glicógeno y la vía de las pentosas (Emerson et al. 2011). La presencia de la vía de las pentosas completa no se había demostrado en ninguna arquea y se plantea que podría haber sido adquirida a través de transferencia horizontal de genes a partir de bacterias (Emerson et al. 2011), sin embargo, estos genes no se han encontrado en todas las *Nanohaloarquea* descritas hasta la fecha (Crits-Christoph et al. 2016). Estudios recientes hechos con una *Nanohaloarquea* antártica evidenciaron que las *Nanohaloarquea* han evolucionado como organismos simbioses que crecen asociadas a un hospedero y no sobreviven como organismos autónomos (Hamm et al. 2019). Esta observación se veía apoyada por la ausencia de genes asociados a vías biosintéticas de lípidos, aminoácidos, nucleótidos y co-factores, lo cual indica que si bien las *Nanohaloarquea* pueden metabolizar carbohidratos, tienen capacidades biosintéticas limitadas.

Localizar a las *Nanohaloarquea* dentro del árbol filogenético del dominio Arquea ha sido una tarea difícil ya que son organismos que evolucionan rápido

y, además, como consecuencia de su carácter extremófilo, tienen una composición aminoacídica atípica (Aouad et al. 2018; Emerson et al. 2011; Gribaldo & Philippe, 2002). Ambos factores pueden llevar a que secuencias que, en realidad son distantes, sean agrupadas filogenéticamente, en base a una similitud en la velocidad de su evolución o composición aminoacídica, más que a su señal filogenética (Aouad et al. 2018; Gribaldo & Philippe, 2002). Debido a esto, aún no se ha llegado a un consenso respecto a la posición filogenética de las *Nanohaloarquea* en el dominio Arquea (Figura 3).

Al momento de ser identificadas, mediante análisis de rRNA 16S y proteínas ribosomales fueron inicialmente propuestas como un grupo hermano, distantemente relacionados, a la clase *Halobacteria* (Emerson et al. 2011). Otros trabajos plantean que podrían pertenecer al superfilo DPANN (Rinke et al. 2013; Williams et al. 2017) el cual consiste en organismos de pequeño tamaño con genomas pequeños y de rápida evolución, sin embargo, la existencia de este superfilo ha sido cuestionada en múltiples ocasiones (Aouad et al. 2018; Gribaldo, 2014). Otros estudios han ubicado a las *Nanohaloarquea* y *Halobacteria* como dos líneas independientes que derivan desde dos linajes de metanógenos distintos pero relacionados, donde las *Nanohaloarquea* estarían relacionadas más próximamente con los *Methanocellales*, un orden de arqueas de la clase *Methanomicrobia* (Aouad et al. 2018).

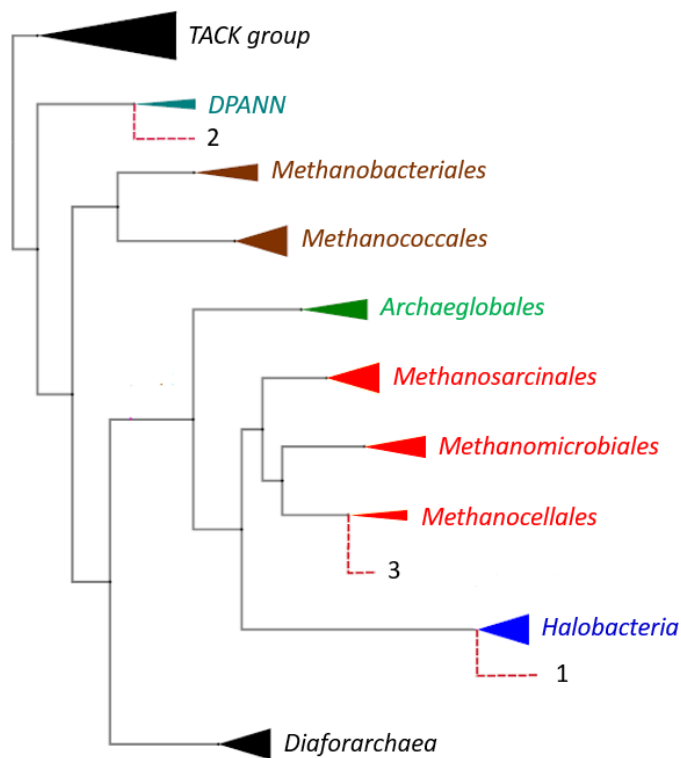


Figura 3. Resumen de las posiciones filogenéticas propuestas para *Nanohaloarquea*. Las líneas rojas punteadas corresponden a las posibles posiciones filogenéticas propuestas para *Nanohaloarquea*. Los números 1, 2 y 3 representan las posiciones propuestas por los trabajos de Emerson et al. 2011, Rinke et al. 2013 y Aouad et al. 2018, respectivamente. Modificado de Feng et al. 2019.

Los análisis del genoma de estos organismos indican que, al igual que los organismos halófilos ya conocidos, las *Nanohaloarquea* tienen una composición aminoacídica que les permite adaptarse a la vida en ambientes hipersalinos: el punto isoeléctrico predicho para las proteínas es bajo (Crits-Christoph et al. 2016) poseen un alto número de aminoácidos cargados negativamente (Asp y Glu) y tienen un bajo número de residuos con cadenas hidrofóbicas voluminosas (Trp, Phe, Leu, Ile) (Emerson et al. 2011). Estas características sugieren que las

Nanohaloarquea utilizarían la estrategia de *salt-in* para sobrevivir a las altas concentraciones de sal y que las adaptaciones estructurales de sus proteínas podrían ser similares a las descritas para la clase *Halobacteria*, sin embargo, a la fecha no se han reportado estudios *in vitro* sobre las proteínas de las *Nanohaloarquea* y su adaptación a altas concentraciones de sal.

En vista de las características que distinguen a la clase *Nanohaloarquea* de otras arqueas halófilas, y considerando la escasa información que existe sobre estos organismos, es interesante estudiar qué adaptaciones estructurales asociadas a la halofilicidad están presentes en las proteínas de *Nanohaloarquea*. Este estudio podría dar cuenta si su estrategia es similar a la descrita para la clase *Halobacteria*, para el orden *Methanosarcinales* o si poseen otra estrategia aún no descrita. Para realizar estas determinaciones se utilizará una proteína aún no caracterizada (Uniprot: A0A2P6W462) obtenida a partir del genoma de *Nanohaloarquea archaeon SW_4_43_9*. Este es un halófilo extremo (35% NaCl o 5,9 M) cuyo genoma se obtuvo a partir de un depósito de sal en el desierto de Atacama. Su genoma se encuentra secuenciado de manera parcial (0,661 Mb) y posee un contenido GC de 43.4%. Mediante análisis de la secuencia de esta quinasa putativa dependiente de ADP se determinó que posee los motivos conservados asociados a la familia de las quinasas dependientes de ADP (HXE, NXNXD y GXGD) y correspondería a una quinasa bifuncional dependiente de ADP.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

La quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea archaeon* SW_4_43_9 es activa a altas concentraciones de sal y su estrategia de haloadaptación es disminuir el contenido de lisina en la superficie de la proteína, reducir el volumen de su centro hidrofóbico y aumentar el número de aminoácidos ácidos en la superficie.

2.2 Objetivo general

Determinar el carácter halófilo y la estrategia de haloadaptación de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea archaeon* SW_4_43_9.

2.3 Objetivos específicos

1) Caracterización bioquímica de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*.

1.a Expresión recombinante y purificación de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea* a partir de *H. volcanii*.

1.b Caracterización de la actividad enzimática y determinación de los parámetros cinéticos de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*.

2) Análisis de las adaptaciones estructurales asociadas a halofilicidad de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*.

2.a Construcción de un modelo por homología de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*.

2.b Análisis de las adaptaciones estructurales mediante herramientas bioinformáticas.

3. Materiales

3.1 Reactivos

Tabla 3. Reactivos utilizados

Proveedor	Insumos	Código/grado
BioRad	Bradford	5000002
GE healthcare	HisTrap HP	175248
Merck	Peptona	107213
	Etanol	Para cromatografía, >99%
	NaCl	Para análisis, >99,5%
	KCl	Para análisis, >99,5%
	MgCl ₂	Para análisis, >99,5%
	MgSO ₄ *7H ₂ O	Para análisis, >99,5%
	Casaminoácidos	2240-OP
	L-Triptófano	108374
Sigma-Aldrich	2-mercaptoetanol	> 99%
	ADP	>95% (HPLC)
	NADH	>97% (HPLC)
	PIPES	>99% (Tritation)
	Fructosa-6-fosfato	>98%
	PEG-600	202401
Winkler	Extracto de levadura	>99%
	Glicina	>98,5%
	KCl	Para análisis, >99%
	Tris-Base	>99,5%
Maestrogen	AccuRuler RGB Prestained protein ladder	02101-250

3.2 Vectores y cepas

La secuencia del gen que codifica para la proteína de *Nanohaloarquea* (Uniprot: A0A2P6W462) se envió a sintetizar a la compañía GENSCRIPT (Piscataway, NJ, United States) inserta en el plasmidio pTA1392, con un segmento que codifica para un *tag* de 6 histidinas en el extremo amino terminal. Este plasmidio introduce un promotor inducible por L-triptófano y se usó para transformar la arquea *H. volcanii* cepa H1895 mediante el método de formación de esferoplastos mediado por PEG (Cline, Lam, Charlebois, Schalkwyk, & Doolittle, 1989).

3.3 Medios de cultivo

Las cepas recombinantes de *H. volcanii* se crecieron en los medios líquidos Hv-Ca⁺ y Hv-YPC a 45°C con agitación (Allers et al. 2004; Guy et al. 2006).

4. Metodología

4.1. Métodos de caracterización bioquímica

4.1.1 Expresión y purificación de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*

Los cultivos iniciales de las cepas recombinantes de *H. volcanii* se crecieron en el medio líquido Hv-Ca⁺ (50 ml) por aproximadamente 54 horas. Para escalar el volumen de los cultivos, 1 litro de medio Hv-YPC se inoculó con un cultivo saturado de Hv-Ca⁺, las células se crecieron hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5 y la expresión se indujo con 6 mM de L-triptófano por 16 horas. Terminada la inducción, el cultivo se centrifugó por 20 minutos a 6.000 rpm, las células se resuspendieron en 25 ml de amortiguador de lisis (2M KCl, 25 mM Tris pH 7,8, 40 mM imidazol, 5 mM 2-mercaptoetanol y 1mM PMSF) y se sonicaron a 4°C con 40% de amplitud, pulsos de 20 segundos y 1 minuto de descanso (Digital Sonifier 450, Branson). Posteriormente, se centrifugó el lisado celular a 18.000 rpm, 4°C por 40 minutos y el sobrenadante se filtró de modo consecutivo con filtros de 0,45 y 0,22 µm. El filtrado se cargó en una columna de afinidad de iones metálicos (Ni⁺²), HisTrap™ HP de 1 mL (GE Healthcare) previamente equilibrada con amortiguador de unión (40 mM imidazol, 2 M KCl, 25 mM Tris pH 7,8, 5 mM 2-mercaptoetanol, 5% glicerol), luego se lavó con 20 mL de este amortiguador y se eluyó con un gradiente lineal de imidazol de 40 mM a 350 mM (350 mM imidazol, 2 M KCl, 25 mM Tris pH 7,8, 5 mM 2-mercaptoetanol y 5% glicerol). Las

fracciones con actividad fosfofructoquinasa (PFK) se juntaron, se alicuotaron en 200 uL y se congelaron con nitrógeno líquido para almacenarlas a -80°C.

4.1.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), con el reactivo para ensayo de proteínas Coomassie G-250 (Bio-rad). Para realizar la curva de calibración se utilizaron estándares de diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA).

4.1.3 Electroforesis en gel

Para analizar la pureza de las proteínas se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%, en presencia de SDS. Las muestras de proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) para concentrarlas y disminuir la concentración de sal, luego se mezclaron con tampón de carga de proteínas (SDS 1%, glicerol 10%, Tris-HCl pH 6,8 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, y azul de bromofenol), y fueron sometidas a desnaturalización térmica por 5 min a aproximadamente 90 °C. La electroforesis se llevó a cabo por aproximadamente 2 horas a 120V, utilizando tampón Tris-glicina-SDS 1X final. Posteriormente, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 y se destiñó con una solución de metanol 30%, ácido acético 40% y agua. Como estándar de peso molecular se utilizó un marcador de proteínas preteñido con un rango de 245-11 kDa.

4.1.4 Identificación de la proteína de *Nanohaloarchaea* por mapeo peptídico

Las fracciones correspondientes al *peak* de elución de la cromatografía de afinidad se juntaron y se cargaron en un gel SDS-PAGE. La banda obtenida (con el peso molecular esperado para la proteína de *Nanohaloarquea*) se envió al instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay, para su análisis con espectrometría masas por la técnica de mapeo peptídico (MALDI-TOF/TOF). La muestra fue digerida con tripsina y como matriz se utilizó ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

4.1.5 Medición de la actividad fosfofructoquinasa (PFK)

La actividad PFK se midió según el protocolo reportado por Kengens et al. (1994) siguiendo la oxidación de NADH (nicotinamida dinucleótido reducido) a 340 nm en un ensayo acoplado con las enzimas auxiliares: Aldolasa (1,3 unidades), triosafosfato isomerasa (50 unidades) y α -glicerofosfato deshidrogenasa (5 unidades), todas de músculo de conejo (Sigma-Aldrich). Las mediciones con las enzimas auxiliares se hicieron en un volumen final de 500 μ l a 25°C en amortiguador PIPES 25 mM pH 6,5 y 0,2 mM de NADH. Los valores de velocidad inicial se determinaron a partir de la variación de absorbancia a 340 nm. El cambio en la concentración de NADH se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 6220 M⁻¹cm⁻¹. Las mediciones de absorbancia se hicieron en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453. Para el cálculo de la actividad enzimática a partir de la velocidad inicial, se consideró una unidad enzimática (U), como la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto.

4.1.6 Ensayos discontinuos actividad PFK

Para medir la actividad PFK en altas concentraciones de sal se utilizaron ensayos discontinuos (Thomas & Kruger, 1994). Las reacciones se realizaron en un volumen de 200 μ l y se detuvieron con 11 μ l de ácido perclórico 97% (para obtener una concentración final de 3,7%), se dejaron en hielo por 5 minutos y luego se neutralizaron con 120 μ l de bicarbonato de sodio 1,5 M y se centrifugaron a 4°C por 10 minutos a 13.000 rpm. El pellet fue descartado y el sobrenadante se almacenó a 4°C para posteriormente realizar la cuantificación del producto de la reacción, fructosa-1,6-bifosfato, con las enzimas auxiliares descritas en la sección anterior (Medición de la actividad fosfofructoquinasa).

4.1.7 Determinación de parámetros cinéticos

Se hicieron curvas de saturación para los sustratos ADP-Mg y F6P mediante ensayos discontinuos. Previo a la determinación de parámetros cinéticos se hicieron curvas de progreso a concentraciones saturantes de ambos sustratos (15 mM de F6P y ADP-Mg) y no saturantes (2 mM F6P y 3 mM de ADP-Mg). Para ambas condiciones la reacción se realizó a 40°C en presencia de PIPES 25 mM pH 6,5, 2 M KCl y tiempos variables.

Para la curva de saturación de F6P se utilizaron distintas concentraciones de F6P y concentraciones fijas y equimolares de ADP y MgCl₂ (15 mM ADP-Mg). Para la curva de ADP-Mg se utilizaron distintas concentraciones de ADP-Mg y una concentración fija de F6P (30 mM). Para ambas curvas, la reacción se incubó 10 minutos a 40°C con PIPES 25 mM pH 6,5 y 2 M KCl y luego se detuvo con el

protocolo mencionado anteriormente. La ecuación de Michaelis-Menten y la ecuación de Hill se ajustaron a las velocidades iniciales determinadas. Ambos ajustes se compararon usando el criterio estadístico de Akaike (Akaike, 1994) con el software GRAPHPAD PRISMA versión 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para el cálculo de k_{cat} se utilizó el valor de V_{max} determinado para para cada uno de los sustratos y el peso molecular teórico calculado mediante el servidor ProtParam de Expasy (Gasteiger et al. 2005).

4.1.8 Caracterización de la actividad enzimática

Para caracterizar bioquímicamente la actividad PFK se hicieron ensayos a distintas concentraciones de sal, temperatura y pH. Estos ensayos se realizaron en condiciones saturantes (15 mM de F6P y ADP-Mg), y también no saturante de sustratos (ADP-Mg 3 mM y F6P 2 mM) en el caso de las distintas concentraciones de sal. En todos los casos, las incubaciones fueron de 30 minutos a 40°C, en PIPES 25 mM pH 6,5 y 2 M KCl (a menos que se indique que la condición es variable). Los tampones usados para las mediciones a distinto pH se indican en la tabla 4, los que se usaron a una concentración de 100 mM. La actividad en cada condición se graficó como actividad relativa considerando como 100% la actividad máxima obtenida en cada condición.

Tabla 4. Tampones de pH usados para la caracterización enzimática

Intervalo de pH	Tampón
1 - 2,5	Glicina-HCl
3 - 5,5	Acetato de Sodio
6,0 - 7,5	PIPES
8	HEPES
8,5 - 9,0	Glicina

4.1.9 Medición de la actividad glucoquinasa

La actividad GK-ADP se midió con un ensayo acoplado utilizando la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides*. Este ensayo se basa en la medición de la reducción de NAD⁺ (nicotinamida dinucleótido oxidado) a 340 nm y se realizó en un volumen de 0,2 mL que contenía NAD⁺ 0,5 mM, 5 mM de ADP-Mg (equimolar), 10 mM de glucosa y 2 M KCl. Los ensayos se hicieron a distintos pH: 7,8 (amortiguador HEPES 25 mM) y 6,5 (amortiguador PIPES 25 mM). La reacción se incubó a 37°C por 5 horas en un lector de placas (Synergy 2, Biotek).

4.2 Análisis bioinformáticos

4.2.1 Construcción y evaluación de los modelos por homología.

Se hicieron dos modelos por homología de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea archaeon* SW_4_43_9. Uno de los modelos se hizo con el

programa Modeller (Sali & Blundell, 1994) utilizando un perfil evolutivo de la familia de las quinasas dependientes ADP (119 secuencias). Como templado se usó la estructura del último ancestro en común de los *Methanosarcinales* (PDB 6C8Z), el que tiene un 29% de identidad con la secuencia de interés. Se hicieron 100 modelos y se seleccionó el modelo con el menor puntaje DOPE. El otro modelo fue generado con el servidor online Phyre2 (Kelley, Lawrence A. Stefans Mezulis, 2016) y también se usó como templado la estructura 6C8Z. Además, se hicieron modelos por homología de dos quinasas putativas dependientes de ADP de los organismos *Nanohaloarquea archaeon* SG9 y *Nanohaloarquea archaeon* SW_7_46_7. Estos modelos se hicieron con el programa Modeller utilizando como templado la estructura 6C8Z, la que posee un 29% de identidad con ambas secuencias. Para ambos casos, se generaron 100 modelos y se eligió el modelo con menor puntaje DOPE.

Todos los modelos fueron refinados con el servidor online GalaxyWeb, con la herramienta GalaxyRefine (Heo et al. 2013), y fueron evaluados con el servidor SAVES, que reúne las herramientas Verify3D (Eisenberg et al. 1997), ERRAT (Colovos & Yeates, 1993), PROVE (Pontius et al. 1996) y PROCHECK (Laskowski et al. 1993).

Verify3D analiza la compatibilidad entre el modelo atómico y la secuencia aminoacídica: cada posición espacial está asociada a un ambiente y la preferencia estadística de un aminoácido por cierta posición espacial se llama *score* 3D-1D, el que es calculado usando estadísticas colectadas de estructuras

depositadas en PDB. Si un aminoácido tiene un score 3D1D de más de 0,2 va a ser probable que ese aminoácido se encuentre en esa posición. El porcentaje que se reporta en los resultados es el porcentaje de aminoácidos de la proteína que tiene un score 3D1D superior a 0,2.

ERRAT analiza las interacciones no enlazantes en una ventana de 9 aminoácidos. El valor que el programa entrega es el error que hay al comparar las estadísticas de interacciones no enlazantes del modelo predicho, con las estadísticas de estructuras altamente refinadas. El valor que se reporta en los resultados es el porcentaje de la proteína para la cual el valor de error calculado está dentro del límite de confianza del 95%.

PROVE analiza el volumen atómico del modelo. A partir de estructuras depositadas en el PDB, calcula un rango de volumen atómico estándar y luego calcula el volumen atómico del modelo predicho; las desviaciones del modelo con respecto al rango de volumen atómico estándar se asocian a errores en el modelo. El porcentaje reportado en los resultados corresponde al porcentaje de átomos *outliers* con respecto al rango de volumen atómico estándar.

PROCHECK analiza múltiples parámetros estereoquímicos. En este caso, se utilizó para analizar las estadísticas del gráfico de Ramachandran.

4.2.2 Análisis de las adaptaciones estructurales por herramientas bioinformáticas

Se analizaron 18 modelos estructurales de quinasas de azúcar dependientes de ADP de 4 grupos filogenéticos distintos (Tabla 5); 6 de *Halobacteria*, 6 de *Eucarionte*, 3 de *Methanosarcinales* halófilos y 3 de *Nanohaloarquea*. Los modelos de *Halobacteria*, *Eucarionte* y *Methanosarcinales* se obtuvieron del trabajo de González-Ordenes et al. (2018) y los de *Nanohaloarquea* son trabajo de esta tesis.

4.2.2.1 Distribución de residuos por grado de exposición al solvente

Para analizar las características estructurales asociadas a la halofilicidad, se utilizó la herramienta de cálculo de área molecular expuesta, del servidor WHAT IF (Vriend, 1990). Los residuos con más 5 Å² de área molecular accesible se consideraron como residuos de la capa externa y los residuos con menos 5 Å² de área molecular accesible se consideraron como residuos de la capa interna. Para cada grupo filogenético se calculó el promedio de residuos en la capa externa e interna tomando como 100% el total de aminoácidos de cada modelo estructural. Posteriormente, se cuantificó el tipo y número de residuos en cada capa. Para cada grupo filogenético, *Halobacteria*, *Methanosarcinales*, *Nanohaloarquea* y *Eucarionte*, se calculó el promedio de cada aminoácido, donde el 100% corresponde al total de aminoácidos de la capa externa o interna.

Tabla 5. Secuencias usadas en el análisis estructural de modelos por homología.

Código UNIPROT	Organismo	Actividad	*Rango de sal M (NaCl)	Óptimo
F7XKY4	<i>Methanosalsum zhiliane</i>	PFK-GK	0,2-2,5	0,6
D7E8P3	<i>Methanohalobium evestigatum</i>	PFK-GK	1,7-5,1	4,3
D5E7K4	<i>Methanohalophilus mahii</i>	PFK-GK	0,4-3,5	2
M0CSP0	<i>Haloterrigena limicola</i>	PFK	1,7 – 5,1	3,1
M0LRE6	<i>Halobiforma lacisalsi</i>	PFK	> 1,7	2,6-4,3
L9XHX4	<i>Natronococcus Jeotgali</i>	PFK	1,3 – 5,1	4,1
L9WMF7	<i>Natronorubrum bangense</i>	PFK	2,1 – 4,3	3,9
L9XEP3	<i>Natronococcus amylolyticus</i>	PFK	1,4 – 5,2	3,1
L0IBN8	<i>Halovivax ruber</i>	PFK	> 2,5	3,4
Q8VDL4	<i>Mus musculus</i>	GK	-	-
F7DTI9	<i>Xenopus tropicalis</i>	GK	-	-
A0JML7	<i>Danio rerio</i>	GK	-	-
Q9VUB9	<i>D. melanogaster</i>	GK	-	-
Q9BRR6	<i>Homo sapiens</i>	GK	-	-
Q86S40	<i>C. elegans</i>	GK	-	-
A0A1D8M RE6	<i>Nanohaloarquea archaeon SG9</i>	-	-	-
A0A2P6W 674	<i>Nanohaloarquea archaeon SW_7_46_7</i>	-	-	-
A0A2P6W 462	<i>Nanohaloarquea archaeon SW_4_43_9</i>	-	-	-

*Se refiere al intervalo de concentración de sal en el cual hay crecimiento del organismo.

4.2.2.2 Volumen de la capa interna

Se estimó el volumen total sumando el volumen de todos los aminoácidos de la capa interna de la proteína. El volumen de cada residuo se obtuvo del trabajo de Perkins (1986) y para cada grupo se calculó el promedio de volumen de la capa interna en Å³.

4.2.2.3 Potencial electrostático de superficie y carga neta

Se calculó el potencial electrostático utilizando la herramienta APBS (Solucionador adaptativo de la ecuación de Poisson-Boltzman) (Baker et al. 2001) del programa Pymol. Se utilizó una constante dieléctrica interior de 2 y una exterior de 77, correspondiente al solvente. Los potenciales electrostáticos se calcularon en un intervalo de $-5 k_B T/e$ (rojo, negativo,) y $+5 k_B T/e$ (azul, positivo). Se calculó el potencial electrostático de dos quinasas de azúcar dependiente de ADP de cada grupo filogenético. Para calcular la carga neta de cada modelo se utilizó el servidor H⁺⁺ (Gordon et al. 2005) considerando un pH de 7, salinidad de 0,2 M y una constante dieléctrica interna y externa de 2 y 77, respectivamente.

4.2.2.4 Controles de modelos por homología

A modo de control se hicieron 2 modelos por homología de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohalaorquea* utilizando como templado una secuencia de menor identidad. Uno de los modelos se hizo con el programa Phyre2 y el otro con Modeller (control 1). En Modeller, se utilizó el mismo alineamiento de secuencias de quinasas de azúcar dependientes de ADP

mencionado en la sección 4.2.1. y se generaron 100 modelos, de los cuales se seleccionó el modelo con menor puntaje DOPE. En ambos programas se utilizó como templado la estructura cristalográfica de la glucoquinasa de ratón (PDB: 5CCF) que tiene un menor porcentaje de identidad (23%). Luego para ambos modelos se calculó el porcentaje de lisinas e isoleucinas en la capa externa e interna, respectivamente y se calculó la desviación estándar de estos valores, considerando los modelos hechos con los templados de 23 y 29% de identidad. Como control también se hicieron modelos por homología de la estructura cristalográfica 6C8Z, utilizando secuencias con una identidad menor al 40%, con el fin de calcular el porcentaje de error de los modelos por homología con respecto a la estructura experimental (control 2). En este caso también se hicieron 2 modelos, uno con Modeller y otro con la herramienta “One to one threading” de Phyre2, que permite elegir el modelo a utilizar como templado. En Modeller, se utilizó el mismo alineamiento de secuencias de quinasas de azúcar dependientes de ADP mencionado en la sección 4.2.1 y se generaron 100 modelos de los cuales se seleccionó el modelo con el menor puntaje DOPE. En ambos programas se usó como templado la estructura cristalográfica de la glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis* (PDB: 4B8R), que tiene un 36% de identidad con la secuencia del último ancestro en común de los *Methanosarcinales*. Ambos modelos fueron refinados con el servidor online GalaxyWeb, con la herramienta GalaxyRefine (Heo et al. 2013) y se calculó el porcentaje de lisinas e isoleucinas en la capa externa e interna, respectivamente.

Finalmente, se calculó el error del porcentaje de los residuos de los modelos por homología usando el templado 4B8R, con respecto a la estructura cristalográfica de 6C8Z.

5.Resultados

5.1 Objetivo específico 1

5.1.1 Expresión recombinante y purificación de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea* a partir de *H. volcanii*

La quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea* se expresó en la cepa H1895 de *H. volcanii*, de acuerdo con lo señalado en la sección de metodología. La enzima tiene un *tag* de histidina en el extremo amino terminal por lo que fue purificada en una columna de afinidad de iones metálicos (Ni^{2+}) (Figura 4A). En el gel de poliacrilamida (Figura 4B) se pueden ver los distintos pasos de la purificación y la proteína luego de ser eluida. En el carril 1 se ve la sobreexpresión de la proteína (48 kDa) en el lisado celular, sin embargo, tras la purificación se obtuvieron solo 1,6 mg de proteína por litro de cultivo. Para confirmar que la proteína purificada corresponde a la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*, una banda del gel correspondiente a la proteína purificada se analizó mediante mapeo peptídico por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) y se determinó que la muestra correspondía a la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea archaeon* SW_4_43_9 (Anexo 9.1).

Tras la purificación se logró un enriquecimiento de la actividad PFK y la proteína se purificó alrededor de 250 veces con respecto al lisado celular (Tabla 6). En la tabla de purificación se puede ver que se obtuvo un rendimiento del 100%, ya que la actividad total es mayor en la proteína pura que en el lisado total. Esto es poco común y puede deberse a una

subestimación de la actividad en el lisado debido a la presencia de algún inhibidor o interferente que dificulte la medición de actividad en esta muestra. El porcentaje de pureza de la proteína final fue de aproximadamente 90%, valor calculado a partir del análisis del gel con el programa ImageJ.

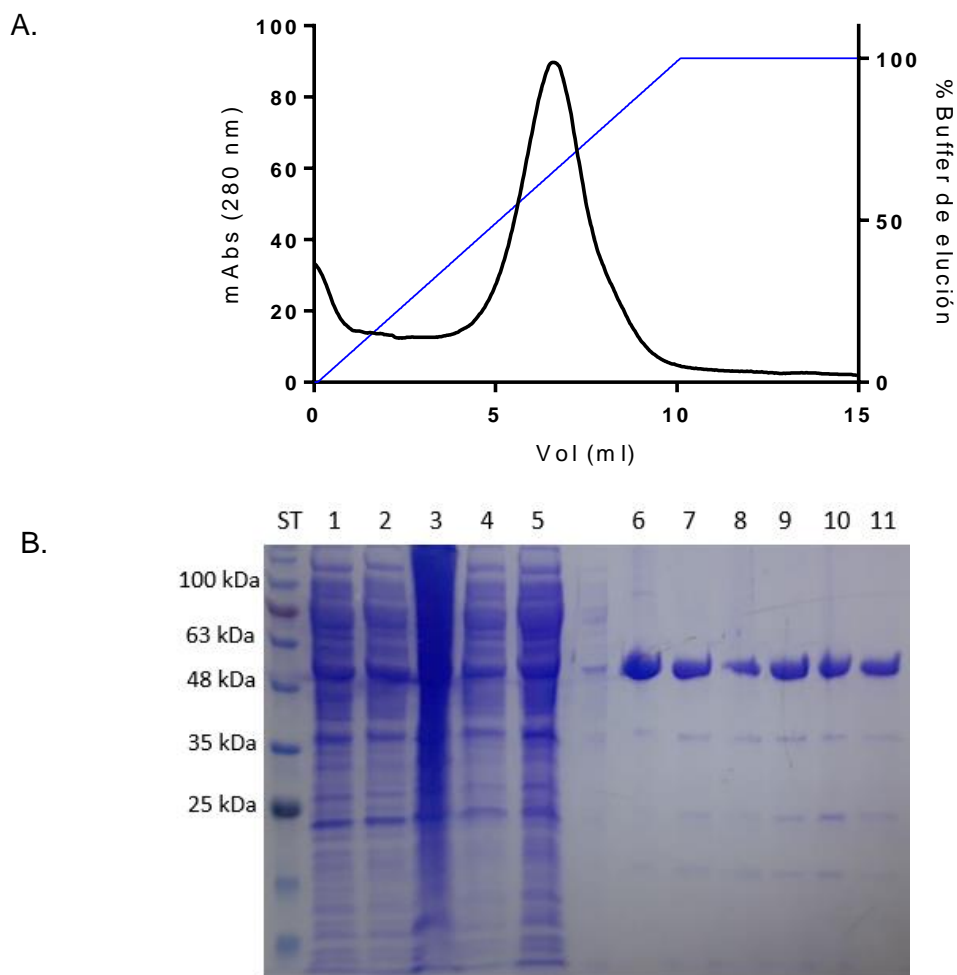


Figura 4. Purificación de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*. **A)** Cromatograma obtenido de la purificación usando una columna de afinidad Ni-NTA de 1 ml. **B)** Gel de poliacrilamida al 12%. En el carril 1: lisado celular, 2: sobrenadante, 3: pellet, 4: frente de purificación, 5: lavado, carril 6-11: fracciones eluidas.

Tabla 6. Tabla de purificación de la PFK de *Nanohaloarquea*

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Lisado celular	870	39,2	0,05	1	100
Frente de purificación	725	0,0	0,0	0	0
Lavado de la columna	150	0,0	0,0	0	0
Proteína purificada	3,2	40,4	12,6	252	100

5.1.2 Caracterización de la actividad y determinación de los parámetros cinéticos de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*

Una vez purificada la proteína, se realizó su caracterización cinética. Se realizaron mediciones de la actividad GK y PFK probando distintas concentraciones de sustrato, pH y temperatura. Finalmente, la caracterización se hizo solo con respecto a la actividad PFK ya que no se encontraron valores significativos de actividad GK (Anexo 9.2). La casi nula actividad GK fue un hecho inesperado, ya que, mediante el análisis bioinformático inicial, se habían identificado los motivos de secuencia asociados a la bifuncionalidad descritos para esta familia de enzimas.

Para medir la actividad PFK se usó un ensayo acoplado basado en la oxidación de NADH (medición a 340 nm), con las enzimas aldolasa, triosa-fosfato-isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa. Estas enzimas no son funcionales a una alta concentración de sal, por lo que la actividad PFK fue cuantificada de manera discontinua. En este tipo de ensayos no se puede ver directamente el progreso de la reacción, por lo tanto, previo a hacer la caracterización cinética se realizó una curva de progreso para determinar el tiempo de incubación donde hay una formación lineal de producto con respecto al tiempo (Figura 5). De esta forma se determinó un tiempo de incubación de 10 minutos para las curvas de saturación y 30 minutos para los ensayos en distintas condiciones de temperatura, pH y concentración de sal.

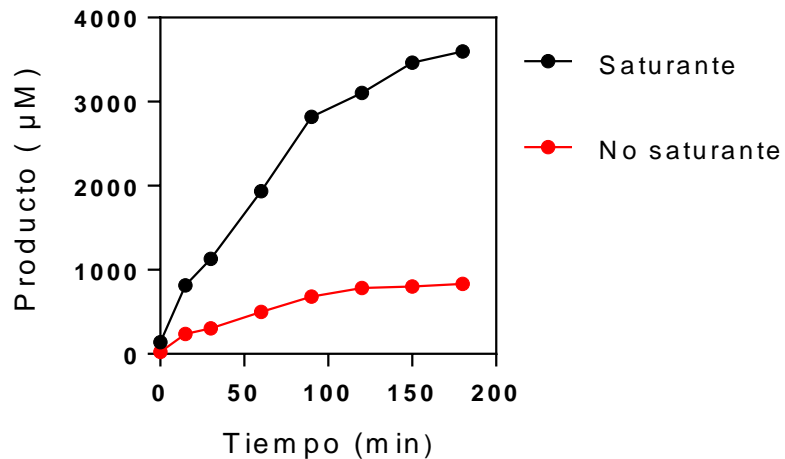


Figura 5. Curvas de progreso actividad PFK. Concentraciones saturantes de 15 mM de F6P y ADP-Mg, concentraciones no saturantes de 2 mM de F6P y 3 mM de ADP-Mg. Ambos ensayos se realizaron en presencia de 2 M KCl.

Se realizaron curvas de saturación para los dos sustratos, ADP-Mg y fructosa-6-fosfato (F6P). A los valores de velocidad inicial se les ajustó la ecuación de Michaelis-Menten y la ecuación de Hill (Anexo 9.3 y 9.4), con el fin de evaluar qué modelo describe mejor los datos experimentales. Ambos ajustes se compararon usando el criterio estadístico de Akaike (Tabla 7) y para ambos casos el mejor ajuste se obtuvo con la ecuación de Michaelis-Menten, por lo tanto, esta fue la ecuación utilizada para el cálculo de los parámetros cinéticos (Tabla 8). Las curvas de saturación para ambos sustratos se muestran en la Figura 6 y los parámetros cinéticos en la Tabla 8. La K_M para ambos sustratos se encuentra en el rango milimolar de concentración y los valores de k_{cat} para ambos sustratos alcanzaron valores cercanos a 5 s^{-1} . A partir de estos valores se calcularon las eficiencias catalíticas, ambas en el mismo orden de magnitud de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

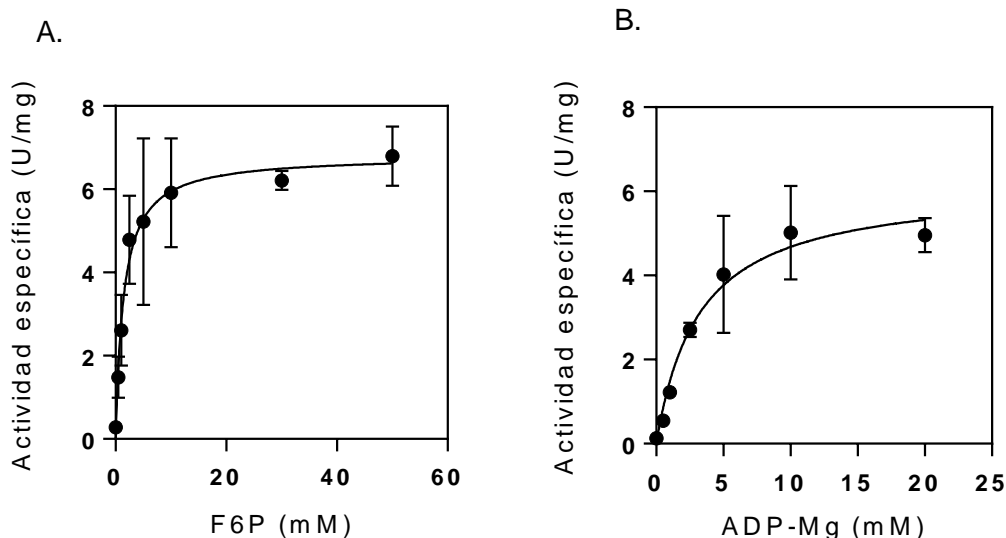


Figura 6. Curvas de saturación de la actividad PFK para F6P (A) y ADP (B). A) Se utilizó una concentración fija de 15 mM de ADP-Mg y concentraciones variables de F6P. B) Se utilizó una concentración fija de 30 mM F6P y concentraciones variables de ADP-Mg. Para ambos sustratos, los ensayos se realizaron en 2 M KCl.

Tabla 7. Comparación de ambos ajustes con criterio de Akaike

Comparación de modelos	F6P	ADP-Mg
Modelo más simple	Michaelis-Menten	Michaelis-Menten
Probabilidad que esté correcto	77,09%	51,11%
Modelo alternativo	Sigmoide	Sigmoide
Probabilidad que este correcto	22,91%	48,89%
Razón de probabilidad	3,37	1,05
Modelo preferido	Michaelis-Menten	Michaelis-Menten
Diferencia en AICc	-2,427	-0,08886

Tabla 8. Parámetros cinéticos para la actividad PFK

Sustrato	K_M (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s⁻¹)	k_{cat}/K_M (M⁻¹s⁻¹)
F6P	1,4 ± 0,4	6,8 ± 0,4	5,4 ± 0,3	3,8 x10 ³ ± 521
ADP-Mg	3,2 ± 0,8	6,2 ± 0,5	4,9 ± 0,6	1,5x10 ³ ± 417

Para caracterizar bioquímicamente la actividad PFK de esta quinasa, se realizaron ensayos a distintas temperatura, pH y concentraciones de KCl (Figura 7). Los ensayos a distinta concentración de sal se realizaron en condiciones saturantes (F6P 15 mM y ADP-Mg 15 mM) y no saturante (ADP-Mg de 3 mM y F6P 2 mM). En todos los casos las incubaciones fueron de 30 minutos.

La temperatura donde se alcanza la máxima actividad es de aproximadamente 50°C, la que se pierde abruptamente al aumentar la temperatura (Figura 7A). Por otra parte, la mayor actividad se obtiene alrededor de pH 5 (Figura 7B). Finalmente, en el gráfico de actividad a distintas concentraciones de sal, se ve un aumento de la actividad enzimática a medida que aumenta la concentración de la sal, demostrando el carácter halófilo de esta enzima. En el caso de las condiciones saturantes de sustrato, la actividad máxima se obtiene a concentraciones menores de sal (1,5 M de KCl) y en condiciones no saturantes de sustrato se obtiene a mayores concentraciones (3 M KCl) (Figura 7C).

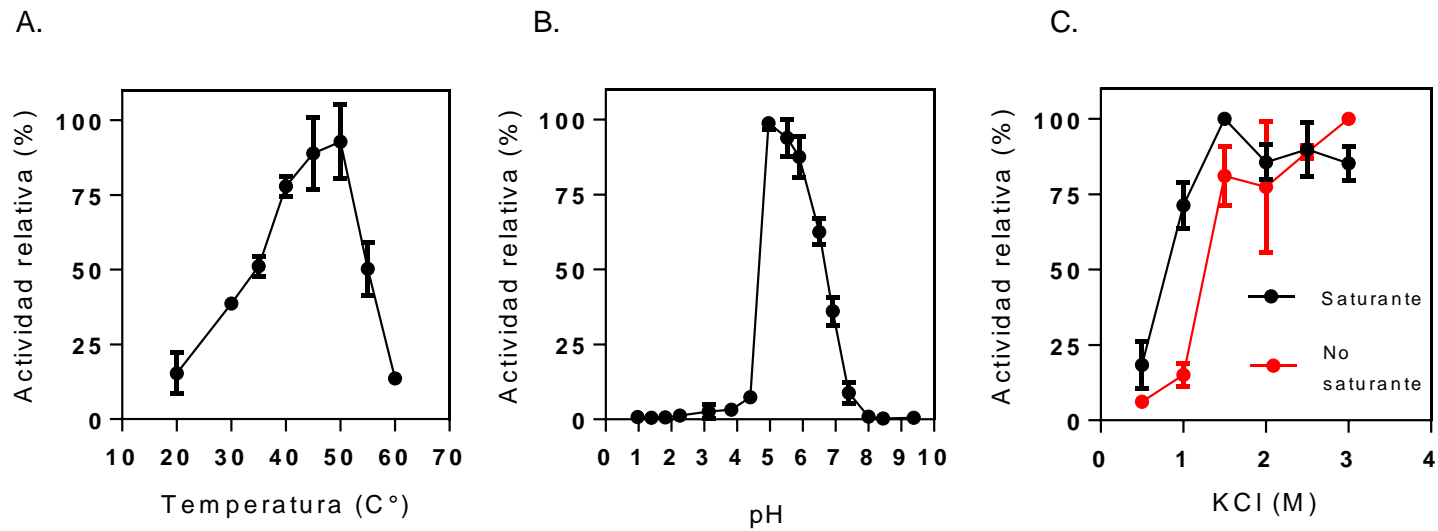


Figura 7. Actividad PFK en distintas condiciones. **A)** Actividad relativa a distintas temperaturas. Los ensayos se realizaron a concentraciones saturantes de ambos sustratos en 2 M KCl, PIPES 25 mM pH 6,5. **B)** Actividad relativa a distintos pH. Los ensayos se realizaron a concentraciones saturantes de ambos sustratos en 2 M KCl, 40°C y 100 mM de cada amortiguador. **C)** Actividad relativa a distintas concentraciones de KCl. Los ensayos se realizaron a concentraciones saturantes (negro) y no saturantes (rojo) de sustrato en PIPES 25 mM pH 6,5 y 40°C. El 100% corresponde a la actividad más alta obtenida en cada condición.

5.2 Objetivo específico 2

5.2.1 Construcción de un modelo por homología de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*

Las proteínas halófilas más estudiadas son las proteínas de los organismos de la clase *Halobacteria*. Actualmente, los rasgos observados en estas proteínas se consideran una característica universal para proteínas halófilas, sin embargo, un estudio realizado con proteínas halófilas del orden *Methanosarcinales*, demostró que no todas las proteínas halófilas tienen las mismas características. Para determinar cuál de estas estrategias de haloadaptación está presente en la quinasa de azúcares dependiente de ADP de *Nanohaloarquea archaeon* SW 4_43_9, se estudiaron sus adaptaciones estructurales mediante herramientas bioinformáticas.

Para esto, se hicieron dos modelos por homología de esta proteína (Figura 8); un modelo fue construido con el programa Modeller, usando como templado la estructura cristalográfica del último ancestro común de las fosfofructoquinasa dependientes de ADP de *Methanosarcinales* (PDB:6C8Z) y el otro modelo fue construido con el programa online Phyre2, usando como templado la misma estructura cristalográfica, pero con algoritmos distintos de alineamiento y de construcción del modelo. La calidad de los modelos resultantes fue evaluada con el servidor online SAVES, mediante las herramientas Verify3D, PROVE, ERRAT y PROCHECK (Tabla 9 y 10).

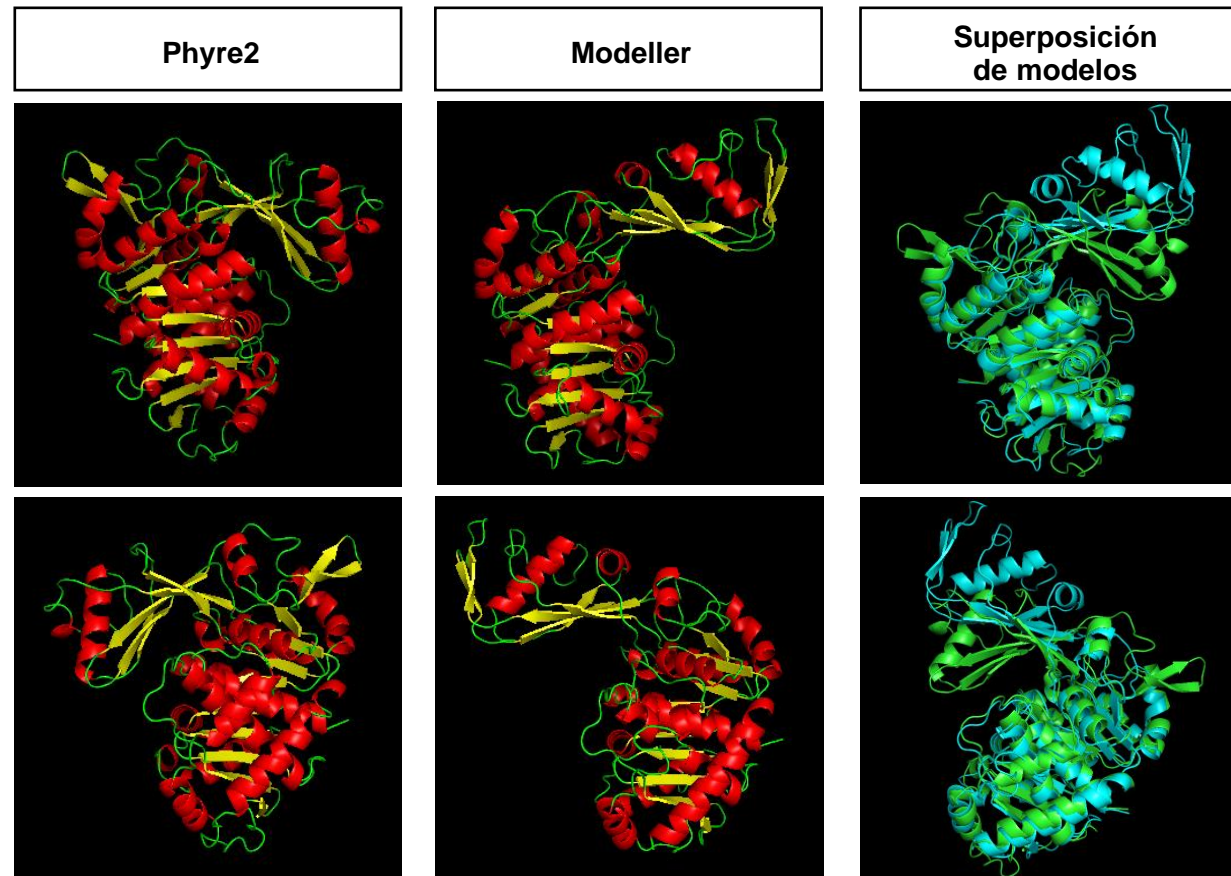


Figura 8. Modelos estructurales de la quinasa dependiente de ADP de *Nanoarchaeon SW_4_43_9*. Modelos por homología generados con Phyre2 (primera columna) y Modeller (segunda columna). La tercera columna corresponde a una superposición estructural de los modelos hechos con Modeller (celeste) y Phyre2 (verde). Para cada modelo se muestra una vista frontal y posterior (fila superior e inferior, respectivamente).

Tabla 9. Estadísticas del gráfico de Ramachandran para ambos modelos

Estadísticas del gráfico de Ramachandran	Modelo Modeller	Modelo Phyre2
Residuos en regiones más favorecidas	337 (91,8%)	343 (93,50%)
Residuos en regiones permitidas adicionales	22 (6,00%)	18 (4,9%)
Residuos en regiones generosamente permitidas	2 (0,5%)	4 (1,1%)
Residuos en regiones no permitidas	6 (1,6%)	2 (0,5%)

Tabla 10. Evaluación de los modelos por servidores online

Servidor	Puntaje	
	Modelo Modeller	Modelo Phyre2
Verify3D	78,22%	84,36%
Errat	86,89	91,11
Prove	6,90%	6,60%

Verify3D, analiza la compatibilidad del modelo estructural con la secuencia aminoacídica. Si el modelo tiene un porcentaje mayor al 80%, se considera que el modelo es compatible con la secuencia aminoacídica. En nuestro caso, solo el modelo de Phyre2 cumpliría con esta condición. ERRAT analiza las interacciones no enlazantes. En las estructuras altamente refinadas, un 95% de la proteína tiene un error que cae por debajo del valor del rechazo y en este caso, ambos modelos presentan porcentajes cercanos a 90, lo que es un valor aceptable considerando que son modelos por homología y no estructuras cristalográficas. PROVE analiza el volumen atómico del modelo y se estima que un modelo es de alta calidad cuando tiene menos de un 1% de átomos *outliers*. En este caso, ambos modelos tienen un porcentaje de *outliers* entre 6,5 y 7%. PROCHECK analiza múltiples parámetros estereoquímicos y en este caso se analizaron las estadísticas del gráfico de Ramachandran, donde se espera que un modelo de buena calidad tenga por lo menos un 90% de los residuos estén en la zona más favorecida, criterio que se cumple en ambos modelos.

Al comparar las estadísticas de ambos modelos, el modelo hecho con Phyre2 tiene una mejor evaluación en cuanto a su geometría, interacciones no enlazantes y volumen atómico, por lo tanto, este fue el modelo que se utilizó para los análisis posteriores.

5.2.2 Análisis de las adaptaciones estructurales mediante herramientas bioinformáticas

Las proteínas halófilas de *Halobacteria* se caracterizan por tener un aumento en el número de residuos ácidos en la superficie, disminuir el volumen de su centro hidrofóbico y disminuir el número de lisinas en la superficie. Estas adaptaciones estructurales se estudiaron en 18 modelos por homología de proteínas PFK-GK dependientes de ADP, agrupados en 4 grupos filogenéticos distintos: *Methanosarcinales* halófilos, *Halobacteria*, *Eucarionte* y *Nanohaloarquea*. Para el grupo *Nanohaloarquea* se tomó el modelo realizado con Phyre2 del objetivo anterior y dos modelos por homología de quinasas putativas dependientes de ADP, de los organismos *Nanohaloarquea archaeon* SG9 y *Nanohaloarquea archaeon* SW_7_46_7 los cuales fueron construidos según el protocolo indicado en la sección de metodología. Los modelos de *Methanosarcinales*, *Halobacteria* y *Eucarionte* se obtuvieron del trabajo de Gonzales-Ordenes et al. (2018). En todos los modelos se analizó la distribución de residuos en la capa externa e interna, el volumen de la capa interna, el potencial electrostático superficial y la carga neta.

Primero, todos los modelos se analizaron con el servidor WHAT IF para calcular el área molecular accesible de cada residuo y determinar qué porcentaje de ellos se encuentra en la capa interior ($<5 \text{ \AA}^2$ de área molecular accesible) o capa exterior ($>5 \text{ \AA}^2$ de área molecular accesible). En la Figura 9A se grafica la distribución de residuos totales según su exposición al solvente. Se observa que las proteínas de *Nanohaloarquea* y *Eucarionte*

tienen un mayor número de aminoácidos en la capa interior, en comparación a los grupos halófilos de *Methanosarcinales* y *Halobacteria*, siendo este último grupo el que tiene el menor porcentaje de aminoácidos en su capa interna. Posteriormente, se estimó el volumen del centro hidrofóbico considerando el volumen de todos los residuos en la capa interna. En la figura 9B se observa que el volumen de la capa interna de las proteínas de *Nanohaloarquea*, *Eucarionte* y *Methanosarcinales* es bastante similar entre sí. La principal diferencia se ve en el volumen de la capa interna de *Halobacteria*, la cual tiene el menor valor de los 4 grupos analizados, esto coincide con los resultados del análisis de distribución de residuos según su exposición, donde las *Halobacteria* tienen el menor porcentaje de sus residuos en la capa interna.

■ *Methanosarcinales* halófilos
 ■ *Halobacteria*
 ■ *Eucarionte*
 ■ *Nanohaloarquea*

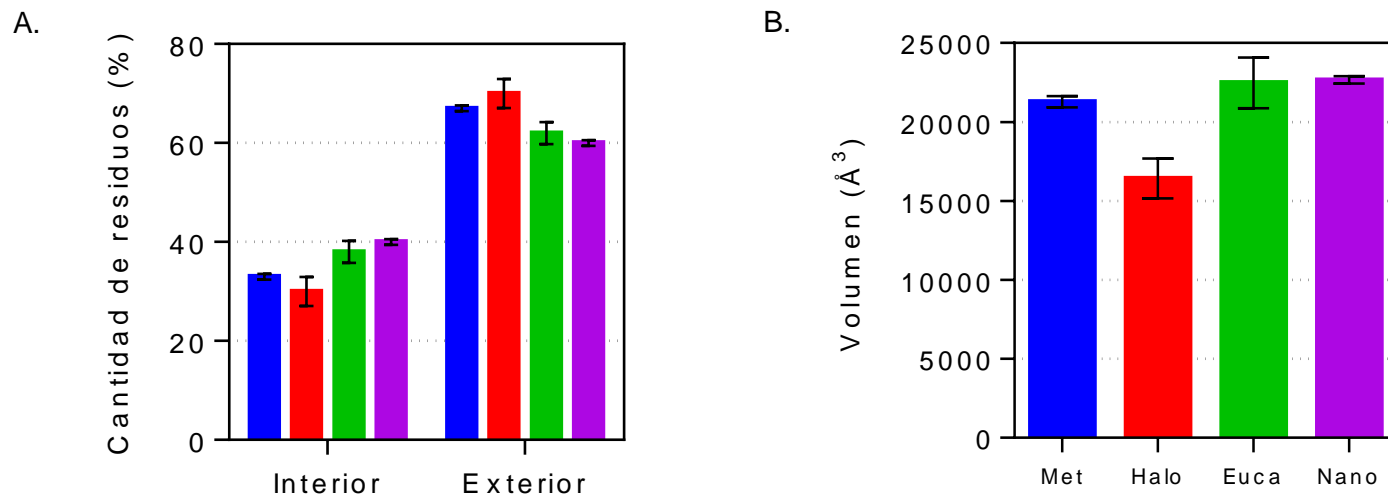


Figura 9. Distribución de residuos totales según su exposición (A) y volumen de la capa interna (B). **A)** El 100% corresponde a los residuos totales de cada proteína. Los datos corresponden al promedio de los modelos analizados para cada grupo. **B)** Los datos corresponden al promedio del volumen de la capa interna de las proteínas de los 4 grupos filogenéticos: *Methanosarcinales* halófilos (Met), *Halobacteria* (Halo), *Eucarionte* (Euca) y *Nanohaloarquea* (Nano). Las barras corresponden a la desviación estándar.

También se determinó el número y tipo de residuo presente en la capa interior y capa exterior de los distintos grupos filogenéticos. En la capa interna de *Nanohaloarqueas* (Figura 10) el cambio más significativo es la disminución en el contenido de aminoácidos hidrofóbicos pequeños, como Ala y Val, y el aumento en el contenido de aminoácidos voluminosos, Phe e Ile, con respecto a *Halobacteria* y *Eucarionte*. Una tendencia similar se ve en las proteínas de *Methanosarcinales*, excepto por el aumento en Phe. Estos resultados se contraponen lo observado en *Halobacteria*, donde hay un aumento en el porcentaje de Ala y Val y una disminución en el porcentaje de Ile, Phe y Leu con respecto a *Eucarionte*.

De acuerdo con estos resultados, la capa interna de las proteínas de *Nanohaloarquea* es más similar a las proteínas de *Eucarionte* y *Methanosarcinales* en cuanto al volumen y distribución de residuos, respectivamente. En consecuencia, las proteínas de *Nanohaloarquea* no tendrían, en su capa interna, los rasgos clásicos asociados a halofiliidad reportados en la literatura, donde la disminución del centro hidrofóbico se ha descrito como un rasgo altamente conservado en las proteínas halófilas (Kastritis et al. 2007; Paul et al. 2008).

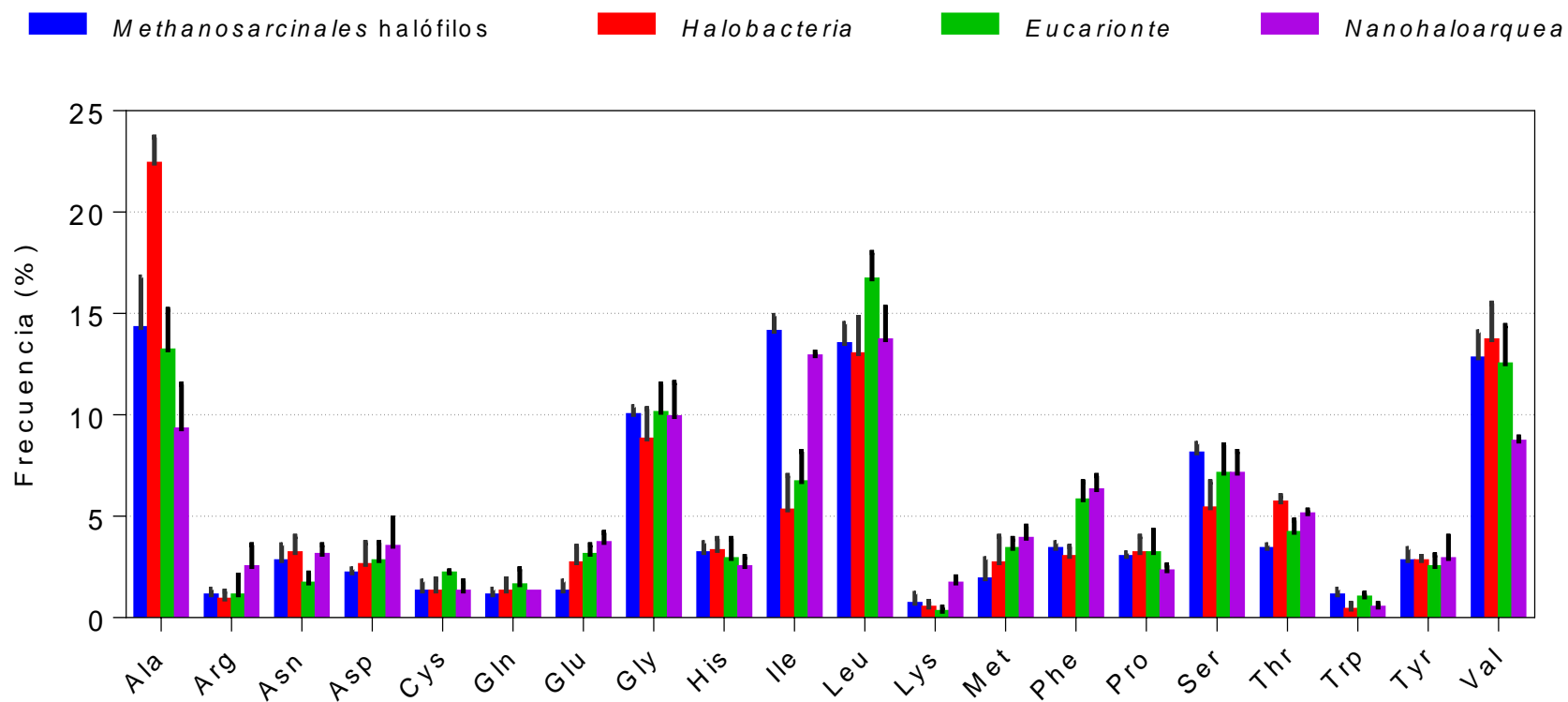


Figura 10. Distribución de residuos de la capa interna. Cantidad y tipo de residuos presentes en la capa interior de la proteína (<5 Å² de área molecular accesible). El 100% corresponde a los residuos totales de la capa interna. Los datos corresponden al promedio de los modelos analizados para cada grupo. Las barras corresponden a la desviación estándar.

Por otro lado, en la capa externa (Figura 11), se ve que los tres grupos halófilos presentan un aumento en los aminoácidos negativos, Asp y Glu, en comparación a *Eucarionte*. Esto coincide con lo reportado en la literatura, donde el aumento en los aminoácidos cargados negativamente en la superficie se considera como uno de los rasgos más característicos de las proteínas halófilas, asociando estos residuos a una mayor estabilidad y solubilidad en condiciones de alta salinidad. (Kastritis et al. 2007; Paul et al. 2008; Trevino et al. 2007)

Otro rasgo de la capa externa asociado a halofilicidad es la disminución en el número de lisinas. En las proteínas de *Halobacteria*, se observa que el número de este residuo disminuye casi a la mitad de lo observado para *Eucarionte*. En las proteínas de *Nanohaloarquea*, sin embargo, se ve un aumento en el número de lisinas en comparación a *Halobacteria* y *Eucarionte*. Esta tendencia se ha reportado previamente en las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos y se repite en las de *Nanohaloarquea*. Un alto número de lisinas en la superficie de las proteínas halófilas es una característica interesante, puesto que algunos autores han propuesto que la disminución del número de lisinas en la superficie, podría ser el rasgo más importante en la haloadaptación de proteínas (Britton et al. 2006; Tadeo et al. 2009).

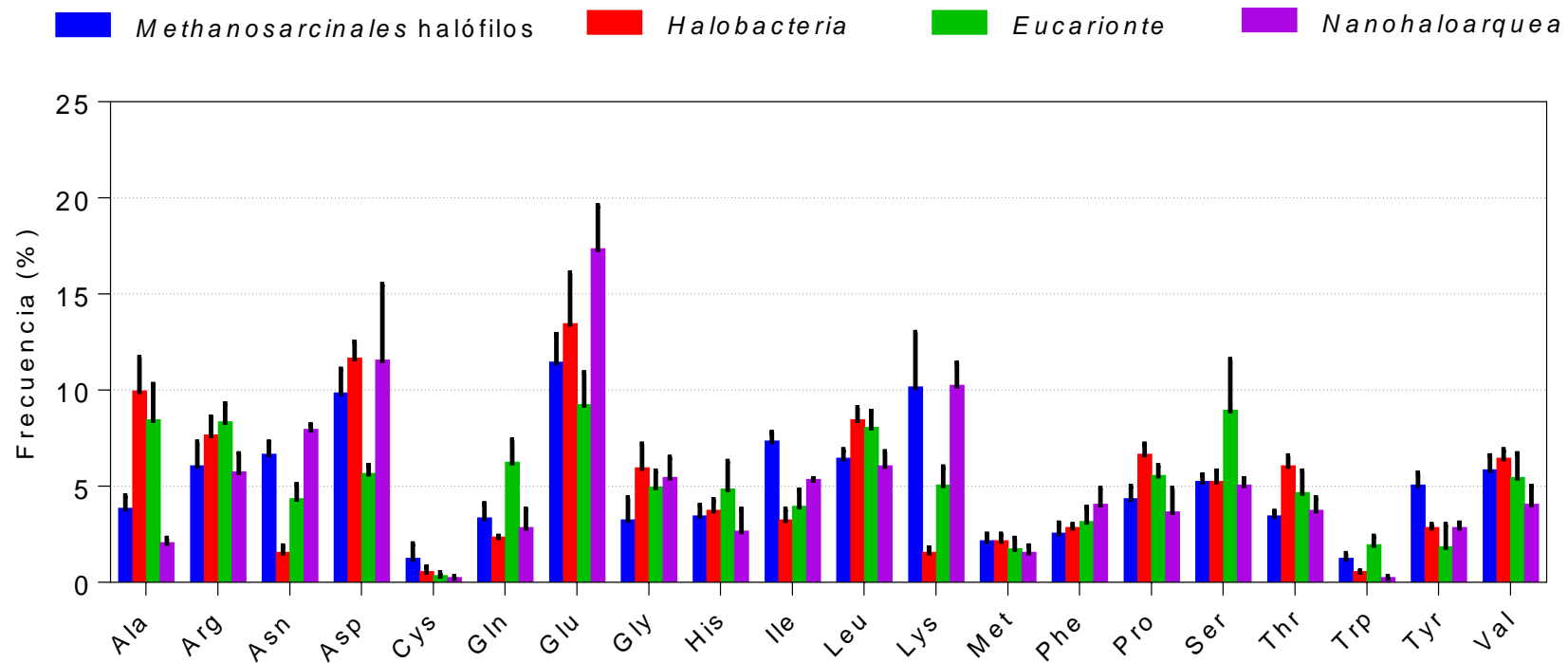


Figura 11. Distribución de residuos de la capa externa. Cantidad y tipo de residuo que se encuentra en la capa externa de la proteína (>5 Å² de área molecular accesible). El 100% corresponde a los residuos totales de la capa externa. Los datos corresponden al promedio de los modelos analizados para cada grupo. Las barras corresponden a la desviación estándar.

Finalmente se calculó el potencial electrostático de superficie de la PFK de *Nanohaloarquea archaeon SW_4_43_9* y el de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea archaeon SG9* y se compararon con dos quinasas dependientes de ADP de cada grupo: *Halobacteria*, *Methanosarcinales* halófilos y *Eucarionte* (Figura 12). Las proteínas de *Nanohaloarquea*, *Methanosarcinales* y *Eucarionte* tienen una superficie con cargas tanto positivas como negativas, las tres con una leve tendencia a las cargas negativas que se hace más evidente en las proteínas de *Nanohaloarquea*. Las proteínas de *Halobacteria* en cambio, tienen una superficie cargada negativamente, casi sin cargas positivas, lo cual concuerda con lo reportado previamente en la literatura. Esta diferencia en el potencial electrostático superficial se puede cuantificar al analizar la carga neta de las proteínas de estos cuatro grupos filogenéticos (Figura 13). Se puede observar que, si bien todas estas proteínas tienen carga negativa, las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos y *Nanohaloarquea*, tienen una carga neta negativa de menor magnitud que las proteínas de *Halobacteria*, pero aun así en promedio más negativa que las proteínas de *Eucarionte*. Las proteínas de *Eucariontes* presentan una gran dispersión en la carga neta ya que dos proteínas de este grupo tenían carga positiva y todas las demás carga negativa.

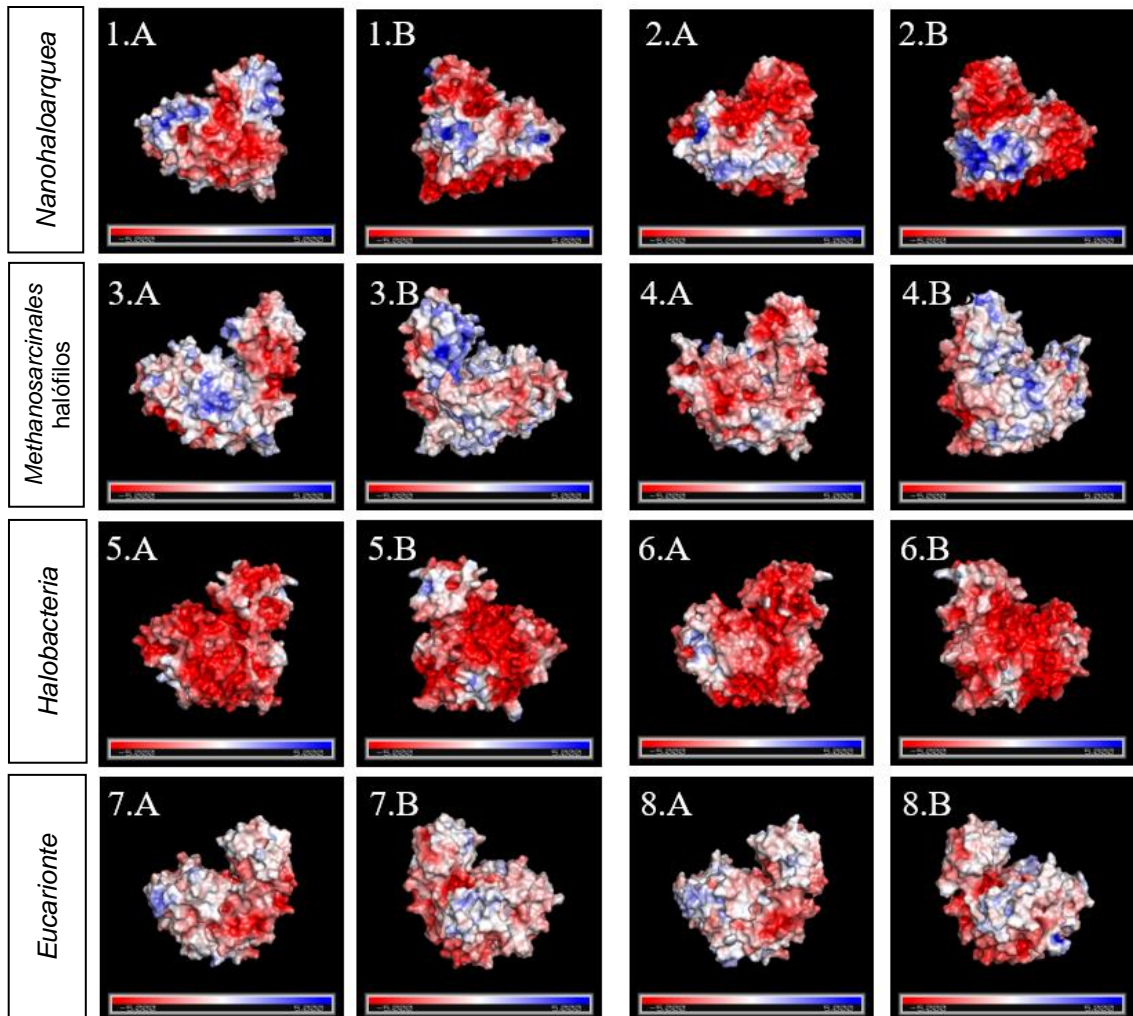


Figura 12. Potencial electrostático de superficie de quinasas dependientes de ADP. Los potenciales electrostáticos se muestran con un gradiente de color: rojo (negativo, $-5 \text{ k}_B\text{T}/e$) y azul (positivo, $+5 \text{ k}_B\text{T}/e$) Para cada proteína se muestra una imagen frontal y una posterior (A y B).

- 1) *Nanohaloarquea archaeon SW_4_43_9*, 2) *Nanohaloarquea archaeon SG9*
- 3) *Methanohalobium evestigatum* 4) *Methanohalophilus zhilinaea*
- 5) *Natronococcus Jeotgali*, 6) *Halobiforma lacisalsi*
- 7) *Mus musculus* , 8) *Homo sapiens*

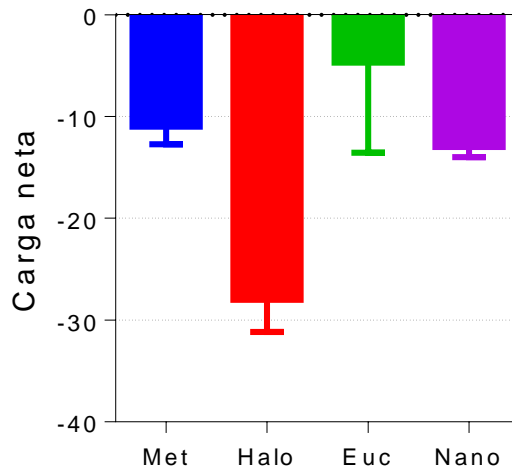


Figura 13. Carga neta. Cada barra corresponde al promedio de la carga neta de las proteínas de cada grupo filogenético: *Methanosarcinales* halófilos (Met), *Halobacteria* (Halo), *Eucarionte* (Euca) y *Nanohaloarquea* (Nano). Las barras corresponden a la desviación estándar.

En la Tabla 11 se resumen los cambios en la distribución de aminoácidos en la capa interna y en la capa externa de las proteínas halófilas estudiadas en este trabajo. Se observa que la única característica compartida entre las proteínas de *Nanohaloarquea* y *Halobacteria* es el aumento de aminoácidos ácidos en la superficie de la proteína, y que las características de la *Nanohaloarquea* concordarían mejor con el mecanismo no canónico de adaptación reportado para las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos.

Tabla 11. Resumen de las variaciones en distribución de aminoácidos en *Halobacteria*, *Methanosarcinales* halófilos y *Nanohaloarquea*

Distribución	<i>Halobacteria</i>	<i>Methanosarcinales</i> halófilos	<i>Nanohaloarquea</i>
Capa interna	↑ Ala ↑ Val ↓ Phe ↓ ile	↑ Ile ↓ Ala ↓ Phe	↑ Ile = Phe ↓ Ala ↓ Val
Capa externa	↑ Asp ↑ Glu ↓ Lys	↑ Asp ↑ Glu ↑ Lys	↑ Asp ↑ Glu ↑ Lys

Las flechas indican aumento o disminución respecto a proteínas de *Eucariote*. En rojo se muestran los **cambios que no concuerdan con lo observado para las proteínas de *Halobacteria***.

A modo de control, se estudió el efecto de la calidad del modelo sobre los parámetros estudiados. Para esto se hicieron dos controles: el control 1 (Tabla 12) corresponde a dos modelos de la quinasa de *N. archaeon* SW_4_43_9 generados con Phyre2 y Modeller utilizando como templado la estructura de la glucoquinasa de ratón (PDB: 5CCF) que tiene un menor porcentaje de identidad (23%) y peor evaluación en el servidor SAVES, es decir un modelo con mayor error (Anexo 9.6 y 9.7). Para estos modelos se cuantificó el porcentaje de isoleucina en la capa interna y lisina en la capa externa y se comparó al valor obtenido para los modelos hechos con Modeller y Phyre2 con el templado 6C8Z, (identidad 29%), ambos con mejor evaluación según los mismos servidores. Para el control 2 (Tabla 13) se calculó el porcentaje de isoleucina en la capa interna y el de lisina en la capa externa de la estructura cristalográfica del último ancestro en común de los *Methanosarcinales* (PDB:6C8Z) y se comparó con los porcentajes obtenidos

para un modelo de esta misma secuencia generado con Phyre2 y Modeller, utilizando como templado la estructura de la glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis* (PDB: 4B8R), con un 36% de identidad.

Para el control 1 se calculó la desviación estándar para el porcentaje de isoleucina en la capa exterior y lisina en la capa exterior, la cual fue de 1,3 y 0,9 respectivamente. Estos valores nos indican que no hay diferencias significativas en la distribución de estos aminoácidos al realizar estos análisis con el modelo hecho con 29% o 23% de identidad, indicando que los posibles errores en los modelos analizados no influyen significativamente en los resultados obtenidos.

Para el control 2 se calculó el porcentaje de error al comparar el porcentaje de lisinas e isoleucinas de la estructura experimental con el porcentaje de las estructuras modeladas con Phyre2 y Modeller utilizando como templado la estructura 4B8R. En el porcentaje de lisinas, ambos programas tienen un error del 9,8%. El porcentaje de isoleucinas tiene un error del 8,2% y 1,6% en Modeller y Phyre2, respectivamente. Estos resultados indican que los cambios en los porcentajes obtenidos con los modelos son robustos, y por lo tanto validan los resultados de distribución de residuos obtenidos para los modelos por homología.

Tabla 12. Control 1. Distribución de aminoácidos en modelos de la quinasa de *N. archaeon* SW 4_43_9 hechos con un templado de menor identidad (23%).

Residuo	Phyre2 6C8Z	Modeller 6C8Z	Phyre2 5CCF	Modeller 5CCF
Isoleucina capa interior	12,4%	10,9%	12,7%	10,4%
Lisina capa exterior	8,7%	8,1%	9,1%	7,4%

Tabla 13. Control 2. Distribución de residuos de la estructura original 6C8Z y modelos hechos con Phyre2 y Modeller para la misma secuencia.

Residuo	6C8Z original	Modelo 6C8Z Modeller con 4B8R	Modelo 6C8Z Phyre2 con 4B8R
Isoleucina capa interior	17,4%	15,9%	17,6%
Lisina capa exterior	15,3%	13,8%	13,8%

6. Discusión

6.1 Caracterización de la actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos

De acuerdo con la caracterización de la actividad enzimática, la quinasa de *Nanohaloarquea* tiene actividad PFK, pero no se detectaron valores significativos de actividad GK. Este resultado es inesperado ya que mediante ensayos bioinformáticos se había determinado que esta enzima tenía los motivos de secuencia asociados a la bifuncionalidad (Zamora et al. 2017). Las enzimas bifuncionales tienen dos actividades catalíticas fisiológicamente relevantes, en el caso de esta familia de enzimas, actividad glucoquinasa y fosfofructoquinasa. Este tipo de enzimas bifuncionales se ha identificado principalmente en arqueas metanógenas (orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales*), donde la glicólisis probablemente ocurre como una vía metabólica secundaria a la metanogénesis, que es la principal vía de obtención de energía (Castro-Fernandez et al. 2017; Zamora et al. 2017). La presencia de una segunda actividad catalítica, sin relevancia fisiológica, se define como promiscuidad. En el caso de la quinasa de *Nanohaloarquea*, la actividad glucoquinasa detectada fue muy baja y no fue posible determinar los parámetros cinéticos. Según estas definiciones la actividad GK detectada en la quinasa de *Nanohaloarquea* podría ser un remanente evolutivo de bifuncionalidad, que en esta enzima se manifiesta como una mínima promiscuidad. La ausencia de una quinasa bifuncional no implica que esta *Nanohaloarquea* no tenga actividad GK, ya que esta actividad podría estar

presente en otro gen con actividad específica para glucosa, como sucede en el caso de los *Thermococcales*, donde se ha reportado la presencia de dos quinazas específicas (PFK y GK) dependientes de ADP, codificadas por dos genes distintos (Koga et al. 2000; Tuininga et al. 1999). A la fecha, en la *Nanohaloarquea archaeon* SW_4_43_9 solo se ha identificado esta quinasa dependiente de ADP, sin embargo, su genoma no está completamente secuenciado, por lo que es posible que posea otra enzima con actividad GK.

La ausencia de actividad GK fisiológicamente relevante en esta proteína indica que es necesario reevaluar los motivos usados para clasificar esta familia de enzimas según su especificidad de sustrato, ya que probablemente hay determinantes estructurales que aún no se han identificado.

Metabólicamente, la evidencia bioinformática apunta a que las *Nanohaloarquea* son organismos heterotróficos con capacidades biosintéticas limitadas debido a su estilo de vida como organismos simbiotes (Hamm et al. 2019). En otras arqueas heterotróficas, como las del orden *Thermococcales*, la vía glicolítica juega un papel fundamental en la producción de energía y poder reductor, por lo que la presencia de enzimas glicolíticas en algunas de las *Nanohaloarquea* estudiadas a la fecha, sugiere que esta también podría ser una vía metabólica de importancia en estos organismos (Crits-Christoph et al. 2016; Emerson et al. 2011).

En cuanto a los parámetros cinéticos obtenidos para esta enzima (Tabla 8), el valor de k_{cat} para ambos sustratos está en el mismo orden de magnitud de lo reportado para otras quinasas dependientes de ADP. Sin embargo, la K_M para ambos sustratos es mayor a la reportada para otras enzimas de esta familia, la cual suele estar en el rango micro molar. Este alto valor de K_M se traduce en una eficiencia catalítica 1 o 2 órdenes de magnitud más baja de lo reportado para otras enzimas de la familia (Castro-Fernandez et al. 2017; Gonzalez-Ordenes et al. 2018; Zamora et al. 2017). Aun cuando se desconoce la concentración citosólica de F6P y ADP en *Nanohaloaquea*, estos valores se estudiaron en el organismo halófilo *M. acetivorans* del orden *Methanosarcinales* y se determinó que la concentración de ambos sustratos se encontraba en el rango milimolar (Santiago-Martínez et al. 2016). Suponiendo que en el citoplasma de las *Nanohaloarquea* hay concentraciones similares de estos sustratos, la K_M para la actividad PFK de esta enzima sí se correlacionaría con las condiciones fisiológicas.

Las enzimas provenientes de organismos halófilos se caracterizan por ser estables y funcionales a altas concentraciones de sal, sin embargo, sus requerimientos de sal son variados. Algunas proteínas alcanzan su máxima actividad cuando la concentración de sal llega a niveles molares (1-4M) (Rao et al. 2009; Shirodkar et al. 2020; Wang et al. 2019), mientras que otras alcanzan su máximo de actividad a concentraciones menores a 1 M de sal (Miyashita et al. 2017). En los gráficos de actividad a distinta concentración de sal (Figura 7C)

vemos que la actividad PFK de esta enzima depende fuertemente de la concentración de sal y que en condiciones saturante y no saturante de sustratos la actividad aumenta significativamente al aumentar la concentración de sal en el medio de reacción. En condiciones saturantes de sustratos, el máximo de actividad se alcanza a 1,5 M de KCl y al seguir aumentando la concentración de sal, la proteína retiene aproximadamente un 80% de su actividad. En el caso de la condición no saturante, la actividad máxima se alcanza a los 3 M de KCl, que fue la máxima concentración evaluada. Estos resultados evidencian que la sal tiene un efecto activador sobre la actividad PFK de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea*, y que éste depende de la concentración de sustrato.

El efecto de la sal en la actividad enzimática se ha estudiado en otras enzimas de esta familia que no provienen de organismos halófilos, como la glucoquinasa de *Thermococcus litoralis*. En este caso, la actividad enzimática disminuye al aumentar la concentración de sal, sin embargo, la enzima mantiene aproximadamente un 60% de su actividad a concentraciones molares de sal (Seminario de título Nicolas Fuentes Ugarte). La enzima de *T. litoralis* es hipertermófila por lo que es posible que los rasgos que le permiten ser termoestable, como el aumento de los residuos cargados, también le permitan mantener su actividad a concentraciones molares de sal. Si bien la glucoquinasa de *T. litoralis* no se inactiva con las altas concentraciones de KCl, la sal claramente no tiene el efecto activador que sí se observa en la quinasa de *Nanohaloarquea*. Esto nos sugiere que la resistencia a las altas concentraciones

de sal no sería una característica de esta familia de enzimas, sino que estaría dada por el carácter halófilo del organismo estudiado. De igual forma, hace falta más evidencia para confirmar estas observaciones.

La sal puede afectar la actividad enzimática en múltiples formas; en gran parte de las enzimas halófilas descritas, la inactivación a bajas concentraciones de sal se explica por el desplegamiento ya sea parcial o completo de la enzima (Bandyopadhyay & Sonawat, 2000; Pundakk & Eisenberg, 1981; Souza et al. 2012). En nuestro caso, no se puede determinar si el desplegamiento completo o parcial es la causa de la baja de actividad a bajas concentraciones de sal, ya que no se hicieron análisis estructurales a distintas concentraciones de sal. Estudios de dicroísmo circular o fluorescencia intrínseca de triptófano a distintas concentraciones de sal, podrían dar cuenta del efecto de la sal en la estructura de esta quinasa.

El efecto activador de la sal y su dependencia con la concentración de sustratos en la actividad PFK de esta enzima, también pueden estar explicados por una variación de los parámetros cinéticos (Hecht et al. 1989; Ryu et al. 1994; Souza et al. 2012; Wright et al. 2002). La diferencia en la concentración de sal a la que la enzima alcanza la máxima actividad en los gráficos a distinta concentración de sal (en la condición saturante y no saturante) (Figura 7C) puede indicar que la sal no solo afecta la catálisis enzimática, sino también la unión de los sustratos a la enzima. En condiciones saturantes de sustrato solo se ve el efecto de la sal en la catálisis, ya que cualquier cambio en la afinidad de la enzima

no sería visible debido a la alta concentración de ambos sustratos. Por otra parte, la curva a concentraciones no saturantes de sustrato permite ver el efecto de la sal en la catálisis y también en la unión de los sustratos. En el caso de que la sal no afectara la unión de los sustratos a la enzima, la actividad máxima se alcanzaría en ambos casos en la misma concentración de sal y las curvas de actividad relativa a distinta concentración de sal se superpondrían. Para determinar el efecto de la sal en los parámetros cinéticos (k_{cat} y K_M) es necesario hacer curvas de saturación de sustrato a distintas concentraciones de sal. Según lo reportado en la literatura, no es posible establecer un patrón general de comportamiento para la dependencia de los parámetros cinéticos a distintas concentraciones de sal (Madern et al. 2000). Se ha reportado que en algunas enzimas el aumento en la concentración de sal genera un aumento en la K_M (Hecht et al. 1989; Muriana et al. 1991), mientras que en otras este parámetro disminuye (Ryu et al. 1994; Souza et al. 2012) o se mantiene constante (Liebermanf & Lanyi, 1972; Okamoto et al. 2009), lo mismo sucede con la k_{cat} .

Finalmente, un aspecto escasamente estudiado de la haloadaptación en enzimas es la unión específica de iones a la proteína. En el caso de la malato deshidrogenasa de *Haloarcula marismortui* se identificaron sitios de unión a Cl^- en la interfaz de unión entre dímeros y entre monómeros, lo cuales estabilizarían la estructura tetramérica de la enzima a 4 M de sal (Irimia et al. 2003). Otro caso es la glucosa deshidrogenasa de *Haloferox mediterranei*, donde uno de los sustratos (NADP) se localiza en un bolsillo formado por las cadenas laterales de

aminoácidos altamente conservados (argininas) y dos iones de potasio (Britton et al. 2006). Este tipo de interacción es más compleja de estudiar, sin embargo, es posible hacerlo mediante estructuras cristalográficas de la proteína de interés.

En la Figura 7C también podemos observar que la enzima retiene un 18% de su actividad a 0,5 M de KCl, la menor concentración de sal ensayada. La inactivación en ausencia de sal no es un requisito de las enzimas halófilas, si bien la mayoría de ellas se inactivan en ausencia de sal, también se han reportado casos donde la actividad se retiene a pesar de la ausencia de sal (Madern & Zaccai, 2004, Ishibashi et al. 2001, Hutcheon et al. 2005). En este caso, habría que hacer ensayos enzimáticos en ausencia de sal para determinar si ésta es indispensable o no para la actividad PFK. Cabe mencionar que las mediciones a distinta temperatura, concentración de sal y pH (Figura 7) se realizaron luego de una incubación de 30 minutos y, como no tenemos conocimiento sobre la cinética de desplegamiento de esta proteína, no existe certeza de que en este tiempo se haya alcanzado el equilibrio. Es posible que el 18% de actividad retenido a 0,5 M de KCl sea consecuencia del tiempo de incubación insuficiente para desplegar la proteína. Teniendo esto en consideración sería útil realizar estas mismas mediciones (distinto pH, temperatura y concentración de sal) pero con un tiempo de incubación mayor para asegurar que se haya alcanzado el equilibrio.

Al analizar la actividad enzimática a distintas temperaturas (Figura 7A) se observa que el máximo se encuentra alrededor de los 50°C y que ésta disminuye abruptamente a medida que aumenta la temperatura. En cuanto a los ensayos

de pH (Figura 7B), se ve que el máximo de actividad se alcanza entre pH 5-6, y que la enzima se inactiva casi completamente al bajar el pH de 5. Según estas mediciones la enzima quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea* no sería resistente a condiciones extremas de pH ni temperatura. El genoma de este organismo se obtuvo a partir de un depósito de sal en el salar Llamara, en el desierto de Atacama, donde la temperatura ambiental máxima alcanza aproximadamente 40°C y un mínimo de -6°, por lo tanto, en este ambiente la alta termoestabilidad no sería un requisito.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea* es específica para F6P y su actividad máxima se alcanza a concentraciones molares de KCl.

6.2 Modelos por homología y adaptaciones estructurales asociadas a halofilicidad

La calidad de un modelo por homología es un factor importante para evaluar las conclusiones que se pueden derivar de él. En este trabajo, la estructura con mayor identidad de secuencia con las tres proteínas de interés fue la del último ancestro en común de los *Methanosarcinales* (PDB: 6C8Z), la cual tiene un 29% de identidad con las tres quinasas dependientes de ADP de *Nanohaloarquea*. Cuando la identidad entre el templado y la secuencia objetivo es menor al 40%, la exactitud del alineamiento es el factor más importante que afecta la calidad del modelo (Rigden, 2017). En este trabajo, para obtener el mejor alineamiento

posible, los modelos hechos con Modeller se hicieron con un perfil evolutivo de 119 secuencias de quinasas de azúcares dependientes de ADP. De esta forma, es posible obtener un alineamiento más robusto entre la proteína de interés y el templado. En el caso de Phyre2, este servidor utiliza la metodología de comparación perfil-perfil (*profile-profile matching/comparison*) para buscar homólogos y alinear el templado a la secuencia de la proteína de interés. El perfil de una secuencia (construido a partir de un alineamiento múltiple de secuencias homólogas) entrega más información sobre la familia de proteínas que una sola secuencia, lo que se traduce en mayor sensibilidad al buscar secuencias homólogas (se encuentran homólogos remotos) y mayor exactitud al hacer los alineamientos (Eddy, 1998; Söding, 2005).

En nuestro caso, hicimos análisis estructurales generales sobre el tipo y número de residuos en la proteína, por lo tanto, errores en el empacamiento de cadenas laterales o en la conformación de los *loop*, no afectarían mayormente las conclusiones obtenidas a partir de estos análisis. Esto fue comprobado con los controles que se muestran en la sección 5.2.2, donde se comprueba que el bajo porcentaje de identidad no influye mayormente en los resultados de distribución aminoacídica.

Los análisis de distribución de residuos, carga neta y volumen del centro hidrofóbico evidencian que las quinasas dependientes de ADP de *Nanohaloarquea* se adaptan a la alta concentración de sal mediante un mecanismo alternativo, distinto al reportado para las proteínas *Halobacteria*. En

estos análisis se puede ver que las quinasas dependientes de ADP de *Halobacteria* conservan los tres rasgos clásicamente asociados a halofilicidad: aumento de los residuos negativamente cargados en la superficie, disminución del tamaño del centro hidrofóbico y disminución de las lisinas en la superficie, mientras que en *Methanosarcinales* y *Nanohaloarquea* el único rasgo halófilo conservado es el aumento de residuos cargados negativamente en la superficie.

Los análisis de la capa interna indican que las proteínas de *Nanohaloarquea* no reducen el tamaño de su centro hidrofóbico, de hecho, este tiene un valor similar al valor observado para *Eucarionte* y *Methanosarcinales* halófilos y es 1,4 veces mayor a lo visto para *Halobacteria* (Figura 9B). Este aumento en el volumen se explica porque un mayor porcentaje de sus aminoácidos totales se encuentra en el interior de la proteína (Figura 9A) y un alto porcentaje de éstos son residuos hidrofóbicos voluminosos como isoleucina y fenilalanina (Figura 10). El principal razonamiento tras la reducción del centro hidrofóbico en las proteínas halófilas, visto clásicamente en *Halobacteria*, es evitar que la conformación plegada de la enzima sea demasiado rígida, ya que las interacciones hidrofóbicas de la capa interna se ven intensificadas por la alta concentración de sal (Ghosh et al. 2005). Los resultados obtenidos con los modelos de *Nanohaloarquea* nos indican que la reducción del centro hidrofóbico no sería un requisito para la haloadaptación y que proteínas con un centro hidrofóbico de tamaño similar a las proteínas mesófilas también pueden ser funcionales a altas concentraciones de sal. Tomando esto en consideración, la disminución del centro hidrofóbico visto

en las proteínas de *Halobacteria* podría ser una variación permitida en los entornos de alta salinidad, donde un centro hidrofóbico de menor tamaño sería suficiente para promover el plegamiento de la proteína.

En cuanto a la capa externa, se observa que las quininas de *Nanohaloarquea* tienen 7,2 veces más lisinas que las quininas de *Halobacteria* y 2 veces más de lo observado para los *Eucarionte* (Figura 11). La disminución de lisinas en la superficie de las proteínas halófilas está asociada principalmente a una disminución de la superficie hidrofóbica expuesta a solvente (Britton et al. 2006; Tadeo et al. 2009), la cual sería beneficiosa en un ambiente donde la disponibilidad de agua es limitada. En el caso de la quinina de *Nanohaloarquea* el número de lisinas en la superficie es más similar al de las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos.

Las proteínas de organismos halófilos también se caracterizan por tener una carga neta altamente negativa, debido a su alto número de aminoácidos ácidos. Las proteínas de *Nanohaloarquea* tienen un porcentaje de aminoácidos ácidos comparable a lo visto para *Halobacteria* (Figura 11). Sin embargo, la carga neta en este caso es menos negativa que la encontrada en las proteínas de *Halobacteria* (Figura 12 y 13). Esta disminución en la carga negativa se podría explicar por el aumento en el porcentaje de lisina, que compensaría las cargas negativas del ácido aspártico y ácido glutámico.

Estas diferencias en la distribución de aminoácidos en la capa interna y externa reflejan que estos tres grupos filogenéticos, *Methanosarcinales*,

Halobacteria y *Nanohaloarquea*, han desarrollado distintas estrategias para adaptarse a las altas concentraciones de sal. Al comparar las características estructurales de estos tres grupos, se puede observar que las proteínas de *Nanohaloarquea* tienen más rasgos en común con las proteínas de *Methanosarcinales* halófilos que con las proteínas de *Halobacteria*. Los *Methanosarcinales* halófilos en su mayoría han sido descritos como organismos que utilizan la estrategia de solutos compatibles. En este contexto, una superficie con carga heterogénea y un centro hidrofóbico y área hidrofóbica expuesta al solvente similar a las proteínas de *Eucarionte* tendría sentido, ya que en estos organismos no hay altas concentraciones de sal en el citoplasma. Efectivamente, se ha reportado que algunas de las proteínas de estos organismos se inactivan al aumentar la concentración de sal (Gonzalez-Ordenes et al. 2018). Esta tendencia en la distribución de residuos, donde no se ve una adaptación a nivel de centro hidrofóbico o carga superficial, se ha observado también en otras proteínas de organismos halófilos que usan la estrategia de *salt-out* (Siglioccolo et al. 2011).

Los estudios realizados hasta ahora con las *Nanohaloarquea* no han determinado experimentalmente si estos organismos utilizan la estrategia de *salt-in* o de solutos compatibles, sin embargo, la evidencia bioinformática apunta a que estos organismos utilizarían la estrategia de *salt-in*. En el caso de la quinasa de *Nanohaloarquea* estudiada en este trabajo, se puede observar que el aumento en la concentración de sal produce un aumento de la actividad enzimática (Figura

7C), lo que apoyaría la hipótesis de que estos organismos utilizan la estrategia de *salt-in* y a la vez, pone en evidencia que esta enzima es funcional a altas concentraciones de sal, a pesar de no tener las características clásicamente asociadas a halofilicidad: carga superficial altamente negativa y reducción del tamaño de su centro hidrofóbico y área hidrofóbica expuesta a solvente. Esto contrasta fuertemente con lo descrito en la literatura, donde estos rasgos estructurales se consideran requisitos para la estabilización de las proteínas halófilas a una alta concentración de sal, y apoya la idea de que podría existir más de un mecanismo de haloadaptación. En la literatura es posible encontrar otros ejemplos, aunque escasos, de proteínas halófilas que tampoco poseen las características estructurales asociadas a halofilicidad. En el orden *Halanaerobium* de bacterias halófilas se ha demostrado la acumulación de KCl en el citoplasma. Sin embargo, al analizar su genoma las enzimas no presentan un contenido alto de aminoácidos negativos ni un bajo número de aminoácidos hidrofóbicos, a pesar de ser activas en altas concentraciones de sal (Bardavid & Oren, 2012).

La idea de que existe más de un mecanismo para lograr la adaptación a condiciones extremas ha sido explorada principalmente en las proteínas termófilas, las proteínas extremófilas más ampliamente estudiadas. Estudios hechos con reconstrucción de proteínas termófilas ancestrales, reportaron que si bien la estabilidad es el principal factor que dirige la evolución de las proteínas,

éstas pueden explorar distintas secuencias y mecanismos de estabilización, generando diversidad biofísica y nuevas vías evolutivas (Hart et al. 2014). Efectivamente, en estas proteínas no se ha identificado un mecanismo general único para la adaptación a altas temperaturas, en cambio, se ha descrito que existen distintos factores que contribuyen a la termoestabilidad (aumento en puentes salinos, contactos hidrofóbicos, puentes de hidrogeno, entre otros) y que las proteínas termófilas ocupan diferentes combinaciones de estos mecanismos para adaptarse a las altas temperaturas. Considerando esto, algunos autores han propuesto que las diferencias observadas en las estrategias de estabilización podrían ser explicadas por las distintas historias evolutivas de los organismos. El 2005, Berezovsky y colaboradores describieron que proteínas de organismos que se originaron en ambientes hipertermófilos comparten ciertas características (son más compactas e hidrofóbicas), mientras que proteínas de organismos que evolucionaron como mesófilos, pero luego recolonizaron ambientes de alta temperatura, comparten otras características (aumento de puentes salinos). De igual forma, el 2006 Mizuguchi y colaboradores determinaron que la distribución aminoacídica en proteínas termófilas de arquea y de bacteria, a pesar de tener ciertas similitudes, era distinta para ambos grupos filogenéticos. Los resultados de esta tesis nos indican que, al igual que la termoadaptación, la haloadaptación en proteínas podría lograrse mediante más de una estrategia.

En términos de distribución aminoacídica, la estrategia de haloadaptación de las proteínas de *Nanohaloarquea* consistiría principalmente en un alto número

de aminoácidos cargados en la superficie: Asp, Glu y Lys, sin embargo, las bases moleculares por las cuales estos residuos otorgarían resistencia a la salinidad en esta quinasa son una interrogante. Según la teoría de solvatación-estabilización, el ácido aspártico y el ácido glutámico serían capaces de formar interacciones electroestáticas estabilizadoras con iones hidratados, sin embargo, aún no hay suficiente evidencia experimental que avale esta teoría. Otros estudios también plantean la importancia de los residuos negativos en la formación de puentes salinos (Dym et al. 1995), unión de moléculas de agua con más fuerza (Lenton et al. 2016), prevenir la agregación de las proteínas (Lenton et al. 2016) y favorecer la estabilidad (Trevino et al. 2007) y solubilidad (Kramer et al. 2012) en condiciones de alta salinidad. Si bien el rol de los residuos negativos en la superficie no está claro, la conservación de este rasgo en *Halobacteria*, *Methanosarcinales* y *Nanohalobaquea* indica que esta podría ser una característica importante en la haloadaptación.

Por otro lado, en múltiples ocasiones se ha reportado que en las proteínas halófilas el número de lisinas en la superficie es muy reducido en comparación a *Eucarionte*. El rol de este residuo no ha sido extensamente estudiado, no obstante, algunos estudios indican que no contribuye a la estabilidad de proteínas con carga neta negativa (Trevino et al. 2007) y que une moléculas de agua débilmente (Collins, 1997; Kramer et al. 2012). Según esta evidencia, un aumento en el porcentaje de este residuo no sería favorable en las proteínas

halófilas, por lo que su rol en el mecanismo de haloadaptación de esta proteína debe ser estudiado.

La existencia de más de un mecanismo de adaptación es un concepto nuevo dentro del estudio de proteínas halófilas, ya que prácticamente todas las proteínas descritas a la fecha compartían las mismas adaptaciones estructurales. El hecho que no existan más reportes sobre proteínas halófilas con otras características estructurales podría explicarse, en primer lugar, por la limitada diversidad de los grupos filogenéticos que han sido estudiados, de los cuales un gran porcentaje pertenece a la clase *Halobacteria* y, en segundo lugar, porque estos mecanismos alternativos podrían ser menos conservados y estar acotados a un grupo reducido de organismos. En este contexto, ganar conocimiento sobre la diversidad de microorganismos que habita los ambientes extremos es un elemento muy importante a la hora de profundizar nuestros conocimientos sobre la haloadaptación, como ha sido demostrado en este caso con las *Nanohaloarquea*.

Si bien este trabajo constituye parte inicial para la evidencia de que existen mecanismos alternativos de haloadaptación, son necesarios más estudios, con mayor número y diversidad de secuencias, para confirmar estas observaciones.

Actualmente la relación filogenética de las *Nanohaloarqueas* con las *Halobacteria* y *Methanosarcinales* aún es tema de debate. Las características

conservadas entre estos tres grupos filogenéticos podrían atribuirse tanto a procesos de divergencia evolutiva, en caso de que estos tres organismos tuvieran un ancestro en común, como a procesos de convergencia evolutiva, si las *Nanohaloarquea* no tuvieran un ancestro en común con las *Halobacteria* y *Methanosarcinales*, lo que ha sido propuesto por diversos autores.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que no todas las proteínas halófilas (activas a altas concentración de sal) tienen las características estructurales descritas en la literatura como requisitos para la haloadaptación. En vista de esto, resulta necesario reevaluar los rasgos estructurales asociados a halofilicidad y considerar que puede existir más de un mecanismo por el cual las proteínas halófilas se adaptan a la alta concentración de sal, el cual puede variar según el grupo filogenético que se estudie. Por otro lado, este trabajo también destaca la importancia de analizar secuencias de proteínas de distintos grupos filogenéticos, para así explorar sin sesgos las características estructurales de estas proteínas y entender de mejor manera la adaptación a altas concentraciones de sal.

7. Conclusiones

- 1) De acuerdo con la caracterización de su actividad enzimática, la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea* es una enzima halófila, activa a concentraciones molares de KCl y, aun cuando tiene los motivos asociados a la bifuncionalidad, es específica para F6P.
- 2) Los análisis de los modelos por homología indican que en esta quinasa hay un aumento de los residuos Asp, Glu y Lys en la superficie, mientras que en la capa interna hay un aumento en Phe, Ile y una disminución en Val y Ala (en comparación a *Halobacteria*).
- 3) La distribución aminoacídica observada indica que esta proteína se adaptaría a las altas concentraciones de sal mediante una estrategia que consiste en un aumento de aminoácidos positivos y negativos en la superficie, distinta a la descrita para *Halobacteria*.
- 4) Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que es necesario redefinir los determinantes estructurales asociados a halofilicidad descritos en literatura hasta la fecha y reevaluar el concepto de que existiría un mecanismo estructural único de haloadaptación.

8. Bibliografía

- Abarca-Lagunas, M. J., Rivas-pPardo, J. A., Ramírez-Sarmiento, C. A., & Guixé, V. (2015). Dissecting the functional roles of the conserved NXXE and HXE motifs of the ADP-dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis*. *Febs Letters*, 589, 3271–3276. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.013>
- Akaike, H. (1994). Information Theory and an Extension of The Maxilum Likelihood Principle. *Breakthroughs in Statisticss*, 1, 610–624.
- Allers, T., Ngo, H., Mevarech, M., & Lloyd, R. G. (2004). Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.943>
- Andrade, K., Logemann, J., Heidelberg, K. B., Emerson, J. B., Comolli, L. R., Hug, L. A., Banfield, J. F. (2015). Metagenomic and lipid analyses reveal a diel cycle in a hypersaline microbial ecosystem. *ISME Journal*, 9(12), 2697–2711. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.66>
- Aouad, M., Taib, N., Oudart, A., Lecocq, M., Gouy, M., & Brochier-Armanet, C. (2018). Extreme halophilic archaea derive from two distinct methanogen Class II lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127(April), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.011>
- Averhoff, B., & Müller, V. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: Recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Research in Microbiology*, 161(6), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.006>
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., & McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10037–10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>
- Bandyopadhyay, A. K., & Sonawat, H. M. (2000). Salt dependent stability and unfolding of [FE2-S2] ferredoxin of *Halobacterium salinarum*: Spectroscopic investigations. *Biophysical Journal*, 79(1), 501–510. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76312-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76312-0)
- Bardavid, R. E., & Oren, A. (2012). The amino acid composition of proteins from anaerobic halophilic bacteria of the order Halanaerobiales. *Extremophiles*, 16(3), 567–572. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0455-y>

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B., & Siebers, B. (2014). Carbohydrate Metabolism in Archaea : Current Insights into Unusual Enzymes and Pathways and Their Regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 78(1), 89–175. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-13>
- Britton, K. L., Baker, P. J., Fisher, M., Ruzheinikov, S., Gilmour, D. J., Ferrer, J., Rice, D. W. (2006). Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Brown, A. D. (1976). Microbial Water Stress. *Bacteriol Rev.*, 40(4), 803–846.
- Castro-Fernandez, V., Herrera-Morande, A., Zamora, R., Merino, F., Gonzalez-Ordenes, F., Padilla-Salinas, F., Guixe, V. (2017). Reconstructed ancestral enzymes reveal that negative selection drove the evolution of substrate specificity in ADP-dependent kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 292(38), 15598–15610. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790865>
- Cline, S. W., Lam, W. L., Charlebois, R. L., Schalkwyk, L. C., & Doolittle, W. F. (1989). Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 35(1), 148–152. <https://doi.org/10.1139/m89-022>
- Collins, K. D. (1997). Charge Density-Dependent Strength. *Biophysical Journal*, 72(January), 65–76.
- Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, 2(9), 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>
- Crits-Christoph, A., Gelsinger, D. R., Ma, B., Wierzchos, J., Ravel, J., Davila, A., DiRuggiero, J. (2016). Functional interactions of archaea, bacteria and viruses in a hypersaline endolithic community. *Environmental Microbiology*, 18(6), 2064–2077. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13259>
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>

- Deole, R., & Hoff, W. D. (2020). A potassium chloride to glycine betaine osmoprotectant switch in the extreme halophile *Halorhodospira halophila*. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59231-9>
- Desmarais, D., Jablonski, P. E., Fedarko, N. S., & Roberts, M. F. (1997). 2-Sulfotrehalose, a Novel Osmolyte in Haloalkaliphilic Archaea. *Journal of Bacteriology*, *179*(10), 3146–3153. <https://doi.org/10.1128/jb.179.10.3146-3153.1997>
- Dym, O., Mevarech, M., & Sussman, J. L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaebacterium. *Science*, *267*(5202), 1344–1346. <https://doi.org/10.1126/science.267.5202.1344>
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(8), 135.
- Eddy, S. R. (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*, *14*(9), 755–763. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.755>
- Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U. (1997). VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, *277*(April), 396–404. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)77022-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)77022-8)
- Emerson, J. B., Brocks, J. J., Heidelberg, K. B., Banfield, J. F., & Allen, E. E. (2011). De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *ISME J.*, *6*, 81–93. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.78>
- Feng, Y., Neri, U., Gosselin, S., Louyakis, A. S., Papke, R. T., Gophna, U., & Gogarten, J. P. (2019). Reconstructing the evolutionary origins of extreme halophilic Archaeal lineages. *bioRxiv*.
- Ferna, A. B., Ventosa, A., & Rodri, F. (2011). New Abundant Microbial Groups in Aquatic Hypersaline Environments. *Sci. Rep.*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep00135>
- Finstad, K. M., Probst, A. J., Thomas, B. C., Andersen, G. L., Demergasso, C., Echeverría, A., ... Banfield, J. F. (2017). Microbial Community Structure and the Persistence of Cyanobacterial Populations in Salt Crusts of the Hyperarid Atacama Desert from Genome-Resolved Metagenomics. *Front Microbiol.*, *8*(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01435>

- Fukuchi, S., Yoshimune, K., Wakayama, M., Moriguchi, M., & Nishikawa, K. (2003). Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 327(2), 347–357. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00150-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00150-5)
- Galinski, E. A., & Herzog, R. M. (1990). The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Archives of Microbiology*, 153(6), 607–613. <https://doi.org/10.1007/BF00245273>
- Ghosh, T., Kalra, A., & Garde, S. (2005). On the salt-induced stabilization of pair and many-body hydrophobic interactions. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(1), 642–651. <https://doi.org/10.1021/jp0475638>
- Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 223–235.
- Gonzalez-Ordenes, F., Cea, P. A., Fuentes-Ugarte, N., Muñoz, S. M., Zamora, R. A., Leonardo, D., Guixé, V. (2018). ADP-dependent kinases from the archaeal order Methanosarcinales adapt to salt by a non-canonical evolutionarily conserved strategy. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01305>
- Gordon, J. C., Myers, J. B., Folta, T., Shoja, V., Heath, L. S., & Onufriev, A. (2005). H++: A server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 368–371. <https://doi.org/10.1093/nar/gki464>
- Grant, S., Grant, W. D., Jones, B. E., Kato, C., & Li, L. (1999). Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles*.
- Gribaldo, S. (2014). Global Phylogenomic Analysis Disentangles the Complex Evolutionary History of DNA Replication in Archaea. *Genome Biol Evol.*, 6(1), 192–212. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu004>
- Gribaldo, S., & Philippe, H. (2002). Ancient Phylogenetic Relationships. *Theoretical Population Biology*, 61(4), 391–408. <https://doi.org/10.1006/tpbi.2002.1593>
- Guixé, V., & Merino, F. (2009). The ADP-dependent sugar kinase family: Kinetic and evolutionary aspects. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.217>
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>

- Guy, C. P., Haldenby, S., Brindley, A., Walsh, D. A., Briggs, G. S., Warren, M. J., Bolt, E. L. (2006). Interactions of RadB, a DNA repair protein in archaea, with DNA and ATP. *Journal of Molecular Biology*, 358(1), 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.010>
- Hamm, J. N., Erdmann, S., Eloë-Fadrosch, E. A., Angeloni, A., Zhong, L., Brownlee, C., Cavicchioli, R. (2019). Unexpected host dependency of Antarctic Nanoarchaeota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(29), 14661–14670. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905179116>
- Hart, K. M., Harms, M. J., Schmidt, B. H., Elya, C., Thornton, J. W., & Marqusee, S. (2014). Thermodynamic System Drift in Protein Evolution. *PLoS Biology*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001994>
- Hecht, K., Wrba, A., & Jaenike, R. (1989). Catalytic properties of thermophilic lactate dehydrogenase and halophilic malate dehydrogenase at high temperature and low water activity. *European Journal of Biochemistry*, 183(1), 69–74. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14897.x>
- Heo, L., Park, H., & Seok, C. (2013). GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), 384–388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>
- Hutcheon, G. W., Vasisht, N., & Bolhuis, A. (2005). Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*, 9(6), 487-495.
- Irimia, A., Ebel, C., Madern, D., Richard, S. B., Cosenza, L. W., Zaccai, G., & Vellieux, F. M. D. (2003). The oligomeric states of *Haloarcula marismortui* malate dehydrogenase are modulated by solvent components as shown by crystallographic and biochemical studies. *Journal of Molecular Biology*, 326(3), 859–873. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01450-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01450-X)
- Ishibashi, M., Tokunaga, H., Hiratsuka, K., Yonezawa, Y., Tsurumaru, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2001). NaCl-activated nucleoside diphosphate kinase from extremely halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum*, maintains native conformation without salt. *FEBS letters*, 493(2-3), 134-138.
- Ito, S., Fushinobu, S., Jeong, J. J., Yoshioka, I., Koga, S., Shoun, H., & Wakagi, T. (2003). Crystal structure of an ADP-dependent glucokinase from *Pyrococcus furiosus*: Implications for a sugar-induced conformational change in ADP-dependent kinase. *Journal of Molecular Biology*, 331(4), 871–883. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00792-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00792-7)

- Ito, S., Fushinobu, S., Yoshioka, I., Wakagi, T., & Adp-dependent, T. (2001). Structural Basis for the ADP-Specificity of a Novel Glucokinase from a Hyperthermophilic Archaeon. *Structure.*, 9(01), 205–214.
- Kastritis, P. L., Papandreou, N. C., & Hamodrakas, S. J. (2007). Haloadaptation: Insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(4), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.06.005>
- Kelley, Lawrence A. Stefans Mezulis, C. M. . Y. (2016). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
- Kengens, S. W. M., Bok, F. A. M. De, Loo, N. Van, Dijkema, C., & Vos, W. M. De. (1994). Evidence for the Operation of a Novel Embden-Meyerhof Pathway That Involves ADP-dependent Kinases during Sugar Fermentation by *Pyrococcus furiosus* ". *J Biol Chem.*, 269(26), 17537–17541.
- Koga, S., Takahashi, M., Sakasegawa, S., Shimizu, S., & Ohshinia, T. (2000). Biochemical Characterization , Cloning , and Sequencing of ADP- Dependent (AMP-Forming) Glucokinase from Two Hyperthermophilic Archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *J Biochem.*, 1085, 1079–1085.
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (2012). Toward a molecular understanding of protein solubility: Increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical Journal*, 102(8), 1907–1915. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.060>
- Lai, M. C., & Gunsalus, R. P. (1992). Glycine betaine and potassium ion are the major compatible solutes in the extremely halophilic methanogen *Methanohalophilus* strain Z7302. *Journal of Bacteriology*, 174(22), 7474–7477. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7474-7477.1992>
- Lai, M. C., Sowers, K. R., Robertson, D. E., Roberts, M. F., & Gunsalus, R. P. (1991). Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology*, 173(17), 5352–5358. <https://doi.org/10.1128/jb.173.17.5352-5358.1991>
- Lai, M., & Hong, T. (2000). Glycine Betaine Transport in the Obligate Halophilic Archaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 5020–5024.

- Lanyi, J. K. (1974). Salt dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 38(3), 272–290. <https://doi.org/10.1128/membr.38.3.272-290.1974>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291. <https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>
- Lenton, S., Walsh, D. L., Rhys, N. H., Soper, K., & Dougan, L. (2016). Structural evidence for solvent-stabilisation by aspartic acid as a mechanism for halophilic protein stability in high salt concentrations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(June), 18054–18062. <https://doi.org/10.1039/C6CP02684B>
- Liebermanf, M. M., & Lanyi, J. K. (1972). Threonine Deaminase from Extremely Halophilic Bacteria. Cooperative Substrate Kinetics and Salt Dependence. *Biochemistry*, 11(2), 211–216. <https://doi.org/10.1021/bi00752a011>
- Littlechild, J. A. (2015). Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(October), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00161>
- Liu, Y. (2010). Methanosarcinales. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 596–602). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4>
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11436–11440. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611525104>
- Madern, D., Ebel, C., & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*. <https://doi.org/10.1007/s007920050142>
- Madern, D., & Zaccai, G. (2004). Molecular adaptation: The malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein. *Biochimie*, 86(4–5), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.04.004>
- Matheson, A. T., Sprott, G. D., McDonald, I. J., & Tessier, H. (1976). Some properties of an unidentified halophile: growth characteristics, internal salt concentration, and morphology. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(6), 780–786. <https://doi.org/10.1139/m76-114>

- Miyashita, Y., Ohmae, E., Ikura, T., Nakasone, K., & Katayanagi, K. (2017). Halophilic mechanism of the enzymatic function of a moderately halophilic dihydrofolate reductase from *Haloarcula japonica* strain TR-1. *Extremophiles*, 21(3), 591–602. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0928-0>
- Muriana, F. J. G., Alvarez-Ossorio, M. C., & Relimpio, A. M. (1991). Purification and characterization of nitrate reductase from the halophile archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. *Biochemical Journal*, 278(1), 149–154. <https://doi.org/10.1042/bj2780149>
- Nath, A. (2016). Insights into the sequence parameters for halophilic adaptation. *Amino Acids*, 48(3), 751–762. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2123-x>
- Okamoto, D. N., Kondo, M. Y., Santos, J. A. N., Nakajima, S., Hiraga, K., Oda, K., Gouvea, I. E. (2009). Kinetic analysis of salting activation of a subtilisin-like halophilic protease. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(2), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.017>
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J., & Mah, R. A. (1994). Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments. *Microbiol Rev.*, 58(1), 27–38.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments , phylogeny , physiology , and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 28, 56–63.
- Oren, Aharon. (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 63(2), 334–348.
- Oren, Aharon. (2008). Microbial life at high salt concentrations : phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems.*, 13, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
- Oren, Aharon, Ventosa, A., & Kamekura, M. (2017). Halobacteria. *Bergey's Manual Trust*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00026.pub2>.
- Ortega, G., Diercks, T., & Millet, O. (2015). Halophilic Protein Adaptation Results from Synergistic Residue-Ion Interactions in the Folded and Unfolded States. *Chemistry and Biology*, 22(12), 1597–1607. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.10.010>
- Paul, S., Bag, S. K., Das, S., Harvill, E. T., & Dutta, C. (2008). Molecular signature of hypersaline adaptation: Insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r70>

- Perkins, S. J. (1986). Protein volumes and hydration effects. *Eur. J. Biochem.*, 157, 169–180. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09653.x>
- Podell, S., Ugalde, J. A., Narasingarao, P., Banfield, J. F., Heidelberg, K. B., & Allen, E. E. (2013). Assembly-Driven Community Genomics of a Hypersaline Microbial Ecosystem. *PLoS One.*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061692>
- Pontius, J., Richelle, J., & Wodak, S. J. (1996). Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures. *Journal of Molecular Biology*, 264, 121–136.
- Pundakk, S., & Eisenberg, H. (1981). Structure and Activity of Malate Dehydrogenase from the Extreme Halophilic Bacteria of the Dead Sea: 1. Conformation and interaction with Water and Salt between 5 M and 1 M NaCl Concentration. *European Journal of Biochemistry*, 118(3), 463–470. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05542.x>
- Qvist, J., Ortega, G., Tadeo, X., Millet, O., & Halle, B. (2012). Hydration Dynamics of a Halophilic Protein in Folded and Unfolded States. *J Phys Chem B*. <https://doi.org/10.1021/jp3000569>
- Rao, L., Zhao, X., Pan, F., Li, Y., Xue, Y., Ma, Y., & Lu, J. R. (2009). Solution behavior and activity of a halophilic esterase under high salt concentration. *PLoS ONE*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006980>
- Rigden, D. J. (2017). *From protein structure to function with bioinformatics: Second Edition. From Protein Structure to Function with Bioinformatics: Second Edition.* <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1069-3>
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J., Woyke, T. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459), 431–437. <https://doi.org/10.1038/nature12352>
- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems.*, 30, 1–30. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>
- Roy, C., Ghosh, W., Mancinelli, R. L., Mormile, M. R., & McMullan, G. (2018). NaCl-saturated brines are thermodynamically moderate, rather than extreme, microbial habitats. *FEMS Microbiol Rev.*, (June). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy026/5035817>

- Ryu, K., Kim, J., & Dordick, J. S. (1994). Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(4), 266–275. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90165-1)
- Sali, A., & Blundell, T. (1994). Sali, A. & Blundell, T. L. Comparative modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>
- Santiago-Martínez, M. G., Encalada, R., Lira-Silva, E., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Reyes-García, M. A., Jasso-Chávez, R. (2016). The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. *FEBS Journal*, 283(10), 1979–1999. <https://doi.org/10.1111/febs.13717>
- Saum, S. H., & Müller, V. (2007). Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: Glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 6968–6975. <https://doi.org/10.1128/JB.00775-07>
- Saum, S. H., & Müller, V. (2008). Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: Ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environmental Microbiology*, 10(3), 716–726. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01494.x>
- Shirodkar, P. V, Muraleedharan, U. D., Damare, S., & Raghukumar, S. (2020). A Mesohaline Thraustochytrid Produces Extremely Halophilic Alpha-Amylases. *Marine Biotechnology*, (Raghukumar 2008). <https://doi.org/10.1007/s10126-020-09960-9>
- Sigliocco, A., Paiardini, A., Piscitelli, M., & Pascarella, S. (2011). Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology*, 11(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-11-50>
- Söding, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 21(7), 951–960. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti125>
- Souza, T. A. C. B., Okamoto, D. N., Ruiz, D. M., Oliveira, L. C. G., Kondo, M. Y., Tersario, I. L. S., Murakami, M. T. (2012). Correlation between catalysis and tertiary structure arrangement in an archaeal halophilic subtilase. *Biochimie*, 94(3), 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.11.011>

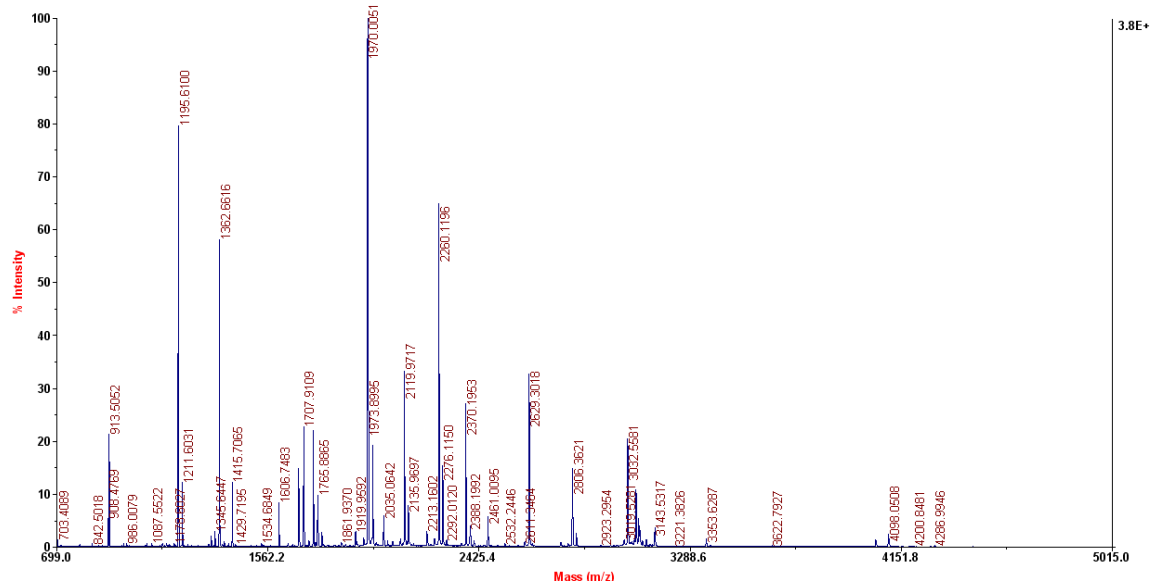
- Tadeo, X., López-Méndez, B., Trigueros, T., Laín, A., Castaño, D., & Millet, O. (2009). Structural basis for the aminoacid composition of proteins from halophilic archea. *PLoS Biology*, 7(12), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000257>
- Talon, R., Coquelle, N., Madern, D., & Girard, E. (2014). An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins. *Frontiers in Microbiology*, 5(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00066>
- Thomas, S., & Kruger, N. J. (1994). Source of apparent ADP-dependent phosphofructokinase activity in plant extracts. *Plant Science*, 95(2), 133–139. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90087-6)
- Trevino, S. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2007). Amino Acid Contribution to Protein Solubility: Asp, Glu, and Ser Contribute more Favorably than the other Hydrophilic Amino Acids in RNase Sa. *Journal of Molecular Biology*, 366(2), 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.026>
- Tuininga, J. E., Verhees, C. H., Van Der Oost, J., Kengen, S. W. M., Stams, A. J. M., & De Vos, W. M. (1999). Molecular and biochemical characterization of the ADP-dependent phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 21023–21028. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21023>
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *Journal of Molecular Graphics*, 8(1), 52–56. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(90\)80070-V](https://doi.org/10.1016/0263-7855(90)80070-V)
- Wang, G., Luo, M., Lin, J., Lin, Y., Yan, R., Streit, W. R., & Ye, X. (2019). A new extremely halophilic, calcium-independent and surfactant-resistant alpha-amylase from alkalibacterium sp. SL3. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 765–775. <https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01038>
- Williams, T. A., Szöllosi, G. J., Spang, A., Foster, P. G., Heaps, S. E., Boussau, B., Martin Embley, T. (2017). Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(23), E4602–E4611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618463114>
- Wright, D. B., Banks, D. D., Lohman, J. R., Hilsenbeck, J. L., & Gloss, L. M. (2002). The effect of salts on the activity and stability of *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii* dihydrofolate reductases. *Journal of Molecular Biology*, 323(2), 327–344. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00916-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00916-6)

- Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., Borochoy, N., & Eisenberg, H. (1989). Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology*, 208(3), 491–500. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90512-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90512-3)
- Zamora, R. A., Ordenes, F. G., Castro-fern, V., & Guixe, V. (2017). ADP-dependent phosphofructokinases from the archaeal order Methanosarcinales display redundant glucokinase activity. *Arch Biochem Biophys.*, 633. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.09.008>

9. Anexos

9.1 Espectro de masa de la muestra de la quinasa dependiente de ADP de *Nanohaloarquea archaeon* SW_4_43_9.

TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7=>MC=>MC[BP = 1971.0, 38208]



9.2 Actividad glucoquinasa a distintos pH

pH	Actividad especifica (U/mg)
7,8	0,022 ± 0,007
6,5	0,018 ± 0,004
Control sin glucosa (pH 7,8)	-0,0011 ± 0,0004

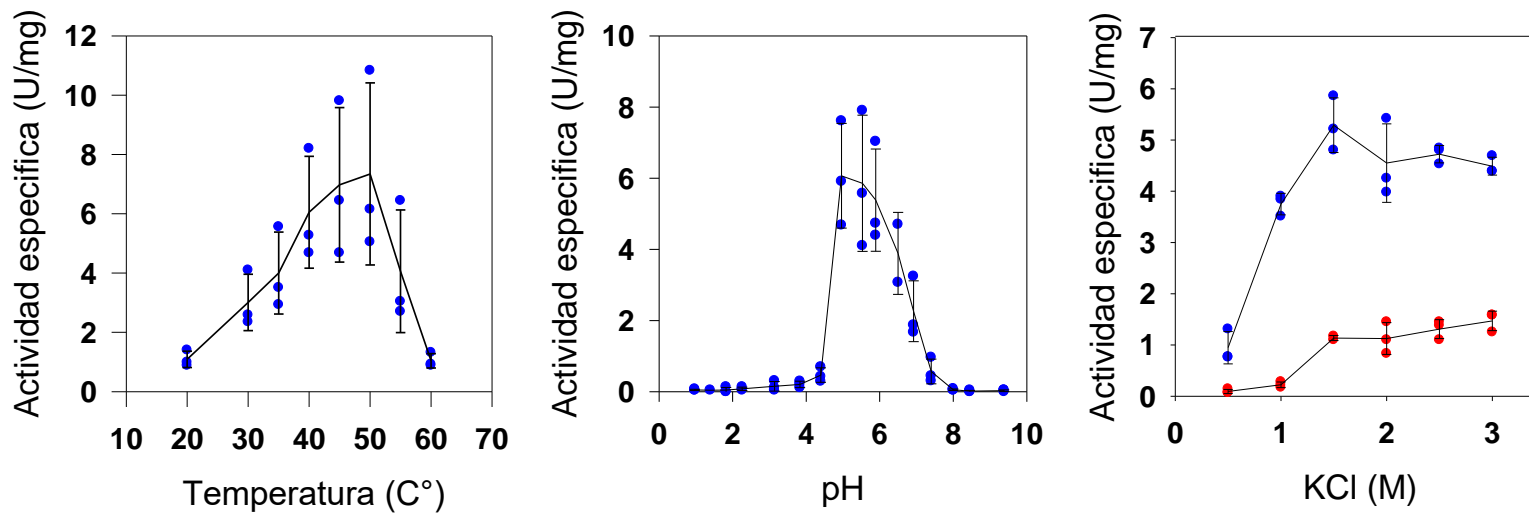
La actividad es el promedio de la medición en triplicado.

9.3 Valores de ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

Michaelis-Menten	F6P	ADP-Mg
V _{max} (U/mg)	6,8 ± 0,4	6,2 ± 0,5
K _M (mM)	1,4 ± 0,4	3,2 ± 0,8

9.4 Valores de ajuste a la ecuación sigmoide.

Sigmoide	F6P	ADP-Mg
V _{max} (U/mg)	6,6 ± 0,4	5,3 ± 0,5
Coeficiente de Hill	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,4
K _M (mM)	1,3 ± 0,3	2,3 ± 0,5



9.5 Actividad PFK en distintas condiciones. A) Actividad específica a distintas temperaturas. Los ensayos se realizaron a concentraciones saturantes de ambos sustratos en 2M KCl, PIPES 25 mM pH 6,5. **B)** Actividad específica a distintos pH. Los ensayos se realizaron a concentraciones saturantes de ambos sustratos en 2M KCl, 40°C y 100 mM de cada amortiguador. **C)** Actividad específica a distintas concentraciones de KCl. Los ensayos se realizaron a concentraciones saturantes (azul) y no saturantes (rojo) de sustrato en PIPES 25 mM pH 6,5 y 40°C. Los puntos azules y rojos representan las mediciones en triplicado para condición y la línea negra corresponde al promedio de cada triplicado. La barra de error muestra la desviación estándar.

9.6 Evaluación de los modelos por homología de los controles 1 y 2

Servidor	Phyre2 5CCF	Modeller 5CCF	Modelo 6C8Z Modeller con 4B8R	Modelo 6C8Z Phyre2 con 4B8R
Verify3D	59,4 %	55,7 %	85,3 %	83,4 %
Errat	40,6 %	73,9 %	86 %	93,8 %
Prove	12,6 %	6,2 %	5,3 %	5,6 %

9.7 Evaluación de los modelos por homología de los controles 1 y 2

Estadísticas del gráfico de Ramachandran	Phyre2 5CCF	Modeller 5CCF	Modelo 6C8Z Modeller con 4B8R	Modelo 6C8Z Phyre2 con 4B8R
Residuos en regiones más favorecidas	294 (88,4%)	338 (92,1%)	404 (91,2%)	409 (93%)
Residuos en regiones permitidas adicionales	34 (10,1%)	25 (6,8%)	29 (6,5%)	26 (5,9%)
Residuos en regiones generosamente permitidas	3 (0,9%)	3 (0,8%)	5 (1,1%)	1 (0,2%)
Residuos en regiones no permitidas	2 (0,6%)	1 (0,3%)	5 (1,1%)	4 (0,9%)

