

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile



**Mecanismo y evolución de la activación por AMP en quinasas
de azúcares dependientes de ADP de *Archaea***

GABRIEL FELIPE VALLEJOS BACCELLIERE

Santiago de Chile

Mayo 2020

**MECANISMO Y EVOLUCIÓN DE LA
ACTIVACIÓN POR AMP EN QUINASAS DE
AZÚCARES DEPENDIENTES DE ADP DE
*ARCHAEA***

Tesis Entregada A La Universidad De Chile En Cumplimiento Parcial De
Los Requisitos Para Optar Al Grado De

**Doctor en Ciencias, Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Gabriel Felipe Vallejos Baccelliere

Mayo, 2020

Directora de Tesis

Dra. Victoria Guixé Leguía

Codirector de Tesis

Dr. Víctor Castro Fernández

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Gabriel Felipe Vallejos Baccelliere

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias, Mención en Biología Molecular, Celular u Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Directora de Tesis:

Dra. Victoria Guixé Leguía

Codirector de Tesis:

Dr. Víctor Castro Fernández

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ana Preller Simmons

Dr. Juan Carlos Slebe Tajmich

Dr. Christian A.M. Wilson Moya

Dr. Ricardo Cabrera Paucar

A mis Nonnos

Lucia Moles y Rocco Baccelliere

A mis padres

María Cristina Baccelliere y Felipe Vallejos

Biografía



Nací en Santiago en 1988, aunque a los pocos días me fui a vivir a Rancagua, donde pasé toda mi infancia y adolescencia. Terminé el colegio el año 2005 sin saber qué estudiar. Después de un año en ingeniería y descubrir que no era lo mío, sin saber muy bien por qué, el 2007 entré a estudiar Bioquímica en la Universidad de Chile.

Tempranamente me di cuenta de que había tomado la decisión correcta. Entrar a bioquímica fue un amor a primera vista. Llegué incluso a ser presidente del centro de estudiantes de la carrera (2008). Fue Durante esos años que descubrí mi amor por la físicoquímica y decidí que quería aplicar dicha ciencia a la biología.

El año 2008, en un congreso de la Asociación Nacional de Estudiantes de Bioquímica, conocí al profesor Jorge Babul, quién dio una charla sobre los problemas de la ciencia en Chile. Resultó ser que este profesor no solo era un activista por la ciencia, sino que además su trabajo científico consistía precisamente en una aplicación directa de la físicoquímica a problemas biológicos. Fue así que el año 2009, sin siquiera haber cursado alguna asignatura de Bioquímica, comencé a asistir al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, lugar donde he estado trabajando hasta entonces, donde he conocido a grandes personas y excelentes amigos. Ahí también conocí al profesor Tito Ureta, quien tuvo una gran influencia en mí, fomentándome a estudiar la filosofía de las ciencias (a la vez que alertándome de sus peligrosos encantos).

Mi tesis de pregrado y Magister en Bioquímica la hice en el mismo laboratorio con el profesor Jorge Babul y la co-tutoría del Dr. Mauricio Baez en temas relacionados con el plegamiento de proteínas.

El año 2015 ingresé al Doctorado, donde comencé a trabajar con la Dra. Victoria Guixé, quién se convertiría en mi maestra y tutora de tesis junto con el Dr. Víctor Castro. Así fue como comencé a adentrarme en la enzimología, un tema que siempre me ha apasionado. Durante la realización de esta tesis también tuve la oportunidad de ir a Buenos Aires al laboratorio del Dr. Sergio Kaufman, lugar donde perfeccioné mis conocimientos de cinética enzimática y análisis de datos.

Durante mi estadía en el doctorado también cursé diversos cursos de la Licenciatura en Matemáticas, llegando a obtener una formación equivalente a haber cursado segundo año de dicha carrera (la que algún día espero finalizar).

En forma paralela al doctorado comencé a desarrollar en profundidad mi afición por la filosofía de las ciencias, lo que poco a poco comenzó a transformarse en un trabajo. Entre 2017 y 2020 fui coinvestigador de un FONDECYT del área de filosofía de la biología bajo la dirección del Dr. Maurizio Esposito, y la colaboración de los Dres. Davide Vecchi y Lorenzo Baravalle. Gracias a esto tuve la oportunidad de mostrar mi trabajo filosófico no solo en Chile, sino que también en los congresos más importantes de filosofía de la biología y de la química a nivel internacional. Junto con esto, desde el 2019 en adelante me he desempeñado como profesor en el programa de Magister en Filosofía de las Ciencias de la Universidad de Santiago.

Ahora que ya obtuve mi grado de doctor, espero lograr compatibilizar mis dos áreas del conocimiento y lograr desarrollar tanto la enzimología como la filosofía de las ciencias en el país.

Agradecimientos

Son muchas las personas que estuvieron conmigo durante la realización de este doctorado y que jugaron algún rol en hacerlo posible.

Primero que todo agradezco a mis tutores Dra. Victoria Guixé y Dr. Víctor Castro por su guía, dedicación, disponibilidad y, sobre todo, por su paciencia. Sin su apoyo esto no habría sido posible.

Agradezco también a Sixto Morales por su colaboración, algunos resultados suyos se muestran en esta tesis, sobre todo en la parte de evolución. A Pablo Maturana y Pablo Cea por su ayuda y colaboración en la realización de este trabajo, además de su inestimable amistad. A Alejandra Herrera, con quién colaboré en su proyecto de postdoctorado en algunos asuntos de cinética enzimática.

A todos mis compañeros y compañeras, miembros, exmiembros y cuasimiembros del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, con quienes hemos vivido (y seguiremos viviendo) tantas aventuras durante todos estos años. Más que un grupo de trabajo, somos una comunidad llena de compañerismo y amistad que hemos forjado a través de los años; espíritu que se ha transmitido de generación en generación. A Pablo Maturana, Pablo Cea, Alonso Carvajal, Diego Quiroga, Pablo Villalobos, Sixto Morales, Víctor Castro, Ricardo Zamora, Alejandra Herrera, Felipe González, Roberto Espinoza, Andrés Rivas, Jorge Soto y Don Rene Jofré. A los miembros del grupo VGL&VCF, Amparo Núñez, Nicolás Fuentes, Sebastián Muñoz, Gíssela Araya, Claudia Mella, Consuelo Badilla y Leslie Hernández por tantas discusiones interesantes y por el compañerismo en el trabajo. A los miembros del grupo JBC, a Stephanie Tamarín, Isabel Asela, Ricardo Coñuecar, Exequiel Medina. A los académicos del laboratorio, Dr. Ricardo Cabrera y Dra. Ana Preller. Mención especial al Dr. Jorge Babul, quien fue el que me llevó por primera vez al laboratorio por el año 2009, cuando ni siquiera había cursado algún ramo de bioquímica.

A los profesores del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Conicet / Universidad de Buenos Aires. A Sergio Kaufman por haberme permitido visitar su laboratorio y adquirir conocimientos sin los cuales esta tesis no hubiese sido posible. A Rodolfo González Lebrero (Lolo) y Luis Gonzalez Flecha por su inestimable ayuda intelectual y sus enseñanzas.

A Maurizio Esposito, con quien colaboré como investigador en filosofía de la biología, por todas las oportunidades que me brindó, llegando a ser coinvestigador en el proyecto FONDECYT 1171017. Gracias a esto pude asistir a diversos congresos internacionales de filosofía de la biología y de la química a mostrar mi trabajo filosófico, lo que me permitió conocer a mucha gente, generar bastantes contactos y aprender muchísimo. Agradezco también a los coinvestigadores del proyecto FONDECYT 1171017: A Lorenzo Baravalle y a Davide Vecchi, con quién he colaborado recientemente en temas de filosofía de las proteínas.

A mis amigos filosóficos Carlo Apablaza y Miguel Álvarez por las discusiones, las enseñanzas, las enriquecedoras conversaciones y todos los buenos momentos. A Rolando Núñez, de la UdeC, por los buenos ratos, las conversaciones filosóficas (y las otras) y las aventuras post-congreso. A

María José Gallardo por su buena onda y por confiar en mí para hacerle clases de filosofía a estudiantes de bioquímica. A Christian Wilson por su apoyo, por las discusiones bioquímicas y por haberme invitado a enseñar filosofía a estudiantes de doctorado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. A Sebastián Castillo, quién me introdujo por primera vez al mundo de la lógica matemática y por ser, por lejos, uno de los mejores profesores de matemáticas que he conocido.

A los profesores Wilfredo Quezada y Marcelo Díaz por haber confiado en mí al haberme pedido que me hiciera cargo de algunas cátedras y tesis en el Magister en Filosofía de las Ciencias de la Universidad de Santiago de Chile. Agradezco también a mis estudiantes de filosofía de las ciencias en la USACH.

A los profesores Yves Martin, Gonzalo Robledo, Camilo Quezada, Eduardo Friedman y Sebastián Castillo por permitirme tomar sus cursos de matemáticas y haber podido así enriquecer mis conocimientos. A Sebastián Rivera, gran persona, excelente ayudante, gran matemático y talentoso bartender. Agradezco también a varios compañeros y compañeras que tuve en los ramos matemáticos, quienes más de una vez me salvaron cuando me perdía o no entendía las materias.

A mi madre María Cristina Baccelliere y a mi padre Felipe Vallejos por ser los mejores padres, por haberme dado una excelente educación y haberme impulsado desde pequeño la lectura, la disciplina y el amor por el conocimiento. A mis hermanos Magdalena, Pablo y Trinidad Vallejos Baccelliere por su compañía, apoyo, cariño y por aguantarme cuando ha sido necesario. A mis nonnos Lucia Moles y Rocco Baccelliere por su infinito cariño y apoyo en todo aspecto desde siempre. A mis padrinos Samuel Escalante y Rosanna Baccelliere, a mis abuelos Juan Vallejos y Elizabeth Ulloa, a todos mis tíos y tías, primos y primas.

A mis amigos de toda la vida. A Ignacio Quinzacara por ser como un hermano durante tantos años. A Tomás Soto, Valentina Jiménez, Ricardo Fredes, Daniela Navarro, Camilo Iturra, Jaime Castillo, Gabriel Dintrans, Jorge Álvarez, Cristian Troncoso, Andrés Bustamante y Stefania Ianuzzi por tantos buenos momentos, por brindarme su valiosa amistad y por siempre estar ahí conmigo, sin ustedes todo este camino habría sido más difícil.

A mi polola Catalina Araya por todo su apoyo, cariño y por su inestimable compañía.

Publicaciones

Área Científica

- Castro-Fernandez V., Zamora R., Herrera-Morande A., **Vallejos G.**, Gonzalez-Ordenes F. & Guixé V. (2017) "Evolution, Metabolism and Molecular Mechanisms Underlying Extreme Adaptation of Euryarchaeota and Its Biotechnological Potential" En: Sghaier H., Najjari A. & Ghedira K. (eds.) *Archaea - New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications*, IntechOpen
- Cea P., Araya G., **Vallejos G.**, Recabarren R., Alzate-Morales J., Babul J., Guixé V. & Castro-Fernandez V. (2020) "Characterization of hydroxymethylpyrimidine phosphate kinase from mesophilic and thermophilic bacteria and structural insights into their differential thermal stability". *Arch Biochem Biophys* 688: 108389.

Área Filosófica

- Esposito M., **Vallejos G.** (2020) "Performative Epistemology and the Philosophy of Experimental Biology: A Synoptic Overview". En: Baravalle L. & Zaterka L. (eds.) *Life and Evolution. History, Philosophy and Theory of the Life Sciences*, vol 26. Springer, Cham.
- Santos G., **Vallejos G.** & Vecchi D. (2020) "A relational-constructionist account of protein macrostructure and function. *Found Chem*". <https://doi.org/10.1007/s10698-020-09373-5>

Premios

- Mejor exposición oral, II Jornadas de Biocatálisis, 22-24 de enero 2020.

Financiamiento

Beca CONICYT de doctorado nacional N° 21150993

Proyecto FONDECYT regular N° 1150460

Proyecto FONDECYT regular N° 1191321

Índice de contenidos

Financiamiento.....	i
Índice de contenidos.....	viii
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras.....	xii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xviii
1 Introducción.....	1
1.1 Metabolismo de Archaea.....	1
1.2 Glicólisis.....	3
1.3 Regulación de la glicólisis canónica y su evolución.....	10
1.4 Regulación de la Glicólisis en Archaea.....	14
1.5 Evolución de la familia de quinasas dependientes de ADP y de su regulación. ...	16
1.6 Activación enzimática y mecanismos cinéticos.	21
2 Materiales y Métodos.....	27
2.1 Materiales.	27
2.1.1 Cepas.....	27
2.1.2 Medios de cultivo (LB, LB-agar).....	27
2.1.3 Reactivos químicos.....	27
2.1.4 Soluciones.....	28
2.2 Métodos.....	29
2.2.1 Aislamiento de plásmidos.....	29
2.2.2 Expresión y purificación de MmPFK/GK.....	29
2.2.3 Generación de proteínas ancestrales.	30
2.2.4 Determinación de la concentración de proteínas.....	31
2.2.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes.....	31

2.2.6	Preparación, cuantificación y control de calidad del ADP.	32
2.2.7	Medición de actividad enzimática.	33
2.2.8	Ensayos cinéticos en placas de 96 pocillos	35
2.2.9	Análisis de resultados de cinética en estado estacionario	36
2.2.10	Ajustes no lineales y determinación del error en la estimación de parámetros	38
2.2.11	Estudios termodinámicos de unión de ligandos.	39
2.2.12	Modificación química con AzidoAMP	40
3	Resultados.....	42
3.1	Caracterización preliminar de MmPFK/GK	42
3.1.1	Expresión, purificación y almacenamiento de MmPFK/GK	42
3.1.2	Curvas de saturación para MmPFK/GK.....	42
3.1.3	MmPFK/GK es activada por AMP.....	46
3.2	Especificidad del efecto activador: Efecto de distintos nucleótidos, nucleósidos y fosfato en actividad de MmPFK/GK	49
3.3	Mecanismo cinético y mecanismo de activación por AMP de MmPFK/GK.....	56
3.3.1	Mecanismo cinético de MmPFK/GK.....	59
3.3.1.1	Deducción de ecuaciones para modelos de mecanismos cinéticos	59
3.3.1.2	Actividad GK. Determinación del mecanismo cinético y del mecanismo de inhibición por glucosa.....	66
3.3.1.2.1	Determinación del tipo de mecanismo cinético	69
3.3.1.2.2	Determinación del mecanismo de inhibición por glucosa	69
3.3.1.2.3	Corroboración del orden de disociación de productos mediante inhibición por GMP	90
3.3.1.3	Actividad PFK. Determinación del mecanismo cinético y mecanismo de inhibición por F6P.....	95
3.3.1.3.1	Determinación del tipo de mecanismo cinético	97
3.3.1.3.2	Determinación del mecanismo de inhibición por F6P.....	98
3.3.2	Determinación del mecanismo de activación por AMP en MmPFK/GK.....	114

3.3.2.1	Modelo de modificador general de la actividad enzimática	115
3.3.2.2	Análisis de la activación por AMP en la actividad GK.....	120
3.3.2.2.1	Análisis de los parámetros cinéticos para glucosa	120
3.3.2.2.2	Análisis de los parámetros cinéticos para MgADP	129
3.3.2.3	Análisis de la activación por AMP en la actividad PFK.....	133
3.3.2.3.1	Análisis de los parámetros cinéticos para F6P.....	134
3.3.2.3.2	Análisis de los parámetros cinéticos para MgADP	138
3.3.3	Conclusiones y comparación de los mecanismos obtenidos para las actividades GK y PFK.....	143
3.4	Estudios de unión de ligandos	145
3.5	Estudios de modificación química.....	152
3.6	Evolución de la activación por AMP en la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP de Archaea.....	159
4	Discusión	170
4.1	Aspectos estructurales de la regulación	171
4.2	Aspectos cinéticos de la regulación por AMP y del mecanismo cinético de MmPFK/GK	177
4.3	Unión de ligandos y fluorescencia.	190
4.4	Evolución.....	192
4.5	Relevancia metabólica	198
5	Apéndice: Ecuaciones generales.....	202
6	Bibliografía.....	205

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros cinéticos para MmPFKGK.....	45
Tabla 2. Valores de AIC para distintos ajustes de K_i^{glu} en función de MgADP.....	76
Tabla 3. Valores de AIC para los ajustes globales sobre los datos cinéticos de la actividad GK.....	85
Tabla 4. Valores de AIC para distintos ajustes de K_i^{F6P} en función de MgADP.	100
Tabla 5. Valores de AIC para distintos ajustes de V_m^{MgADP} en función de F6P.....	105
Tabla 6. Valores de AIC para los ajustes globales para los datos cinéticos de la actividad PFK.....	109
Tabla 7. Valores de la constante de activación obtenidas a distintas concentraciones de MgADP.....	127
Tabla 8. Parámetros cinéticos K_m y k_{cat} de MmPFK/GK y de la mutante N203W	146

Índice de figuras

Figura 1. Esquema comparativo de la glicólisis canónica (vía Embden-Meyerhof) y glicólisis de Archaea.	5
Figura 2 Topología y mecanismos cinéticos en quinasas dependientes de ADP y de ATP de la superfamilia Riboquinasa.	11
Figura 3. Árbol filogenético de la familia de quinasas dependientes de ADP de Archaea.	18
Figura 4. Pureza y estabilidad de MmPFK/GK seguida mediante actividad específica. ...	43
Figura 5 Caracterización cinética preliminar de MmPFK/GK.	45
Figura 6. Activación de MmPFK/GK por AMP.	47
Figura 7. Efecto de distintos nucleótidos y nucleósidos en las actividades GK y PFK de MmPFK/GK.	50
Figura 8. Efecto de distintos nucleótidos y nucleósidos en la actividad GK de MmPFK/GK a distintas concentraciones de sustrato.	52
Figura 9. Efecto de fosfato en actividad GK.	55
Figura 10. Curvas de saturación para glucosa obtenidas a distintas concentraciones de AMP y de MgADP.	67
Figura 11. Gráficos secundarios para los parámetros cinéticos de glucosa en función de MgADP.	68
Figura 12. Posibles mecanismos de inhibición por glucosa mediante formación de complejos de punto muerto en un mecanismo secuencial-ordenado.	72
Figura 13. Curvas para MgADP obtenidas a distintas concentraciones de AMP y de glucosa.	78
Figura 14. Gráficos secundarios para los parámetros cinéticos de MgADP en función de glucosa.	82
Figura 15. Comparación de los análisis de ajustes globales y ajustes por partes.	87
Figura 16. Comparación de los modelos “E-Glu” y “E-Glu & E-AMP-Glu” en los gráficos de K_i^{glu} en función de la concentración de MgADP.	89
Figura 17. Curvas de Glucosa y MgADP a distintas concentraciones de GMP.	92
Figura 18. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos para glucosa y MgADP en función de GMP.	94
Figura 19. Curvas de saturación para F6P obtenidas a distintas concentraciones de AMP y de MgADP.	96
Figura 20. Gráficos secundarios para los parámetros cinéticos de F6P en función de MgADP.	99

Figura 21. Curvas de saturación para MgADP obtenidas a distintas concentraciones de AMP y de F6P.	103
Figura 22. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos para MgADP en función de F6P.....	104
Figura 23. Comparación de los análisis de ajustes globales y ajustes por partes.....	111
Figura 24. Modelos para el mecanismo cinético de cada actividad de MmPFK/GK.....	113
Figura 25. Modelo de modificador general de la actividad enzimática.....	116
Figura 26. Gráficos secundarios para los parámetro cinéticos de glucosa en función de AMP a distintas concentraciones fijas de MgADP.	121
Figura 27. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos de MgADP en función de AMP a distintas concentraciones fijas de glucosa.	130
Figura 28. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos de F6P en función de AMP a concentraciones fijas de MgADP.....	136
Figura 29. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos de MgADP en función de AMP a concentraciones fijas de F6P.	139
Figura 30. Parámetros de activación por AMP en MmPFK/GK.....	142
Figura 31. Activación por AMP de la mutante N203W de MmPFK/GK.	146
Figura 32. Espectros de emisión fluorescencia intrínseca de la mutante N203W de MmPFK/GK.....	148
Figura 33. Efecto de AMP en los parámetros de unión de F6P calculados mediante fluorescencia intrínseca.	149
Figura 34. Efecto de la modificación química por 8-Azido-AMP en MmPFK/GK.....	154
Figura 35. Efecto de 8-Azido-AMP en la actividad GK de MmPFK/GK.....	156
Figura 36. Efecto de la modificación química por 8-Azido-AMP sobre la activación por AMP en MmPFK/GK.	158
Figura 37. Efecto de AMP en distintas proteínas actuales de la familia de quinasas dependientes de ADP de archaea.	162
Figura 38. Efecto de AMP en distintos ancestros reconstruidos de la familia de quinasas dependientes de ADP de archaea.....	163
Figura 39. Efecto de AMP sobre la actividad enzimática de ancMT, ancM, ancT y PhPFK a distintas concentraciones de sustratos.....	166
Figura 40. Efecto de AMP en la actividad de la mutante E72A de ancMT.....	169

Abreviaturas

ADP	Adenosina bifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CMP	citidina monofosfato;
DTT	Ditiotreitol
F1,6bP	Fructosa-1,6-bifosfato
F2,6bP	Fructosa-2,6-bifosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
G6P	Glucosa 6 fosfato
GAPDH	Gliceraldehido-3-Fosfato deshidrogenasa
GAPN	Gliceraldehido-3-Fosfato deshidrogenasa no fosforilante
GAPOR	Gliceraldehido-3-Fosfato ferredoxina oxidoreductasa
GK	Glucoquinasa
GMP	guanisina monofosfato;
HEPES	Acido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetanosulfonico
IMP	Inosina monofosfato;
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
MgADP	Complejo Magnesio-ADP
MmPFK/GK	Fosfofructoquinasa/glucoquina de <i>Methanococcus maripaludis</i>
MzPFK/GK	Fosfofructoquinasa/glucoquina de <i>Methanosarcina mazei</i>
NAD ⁺	Forma oxidada de Nicotinamida dinucleotido
NADH	Forma reducida de Nicotinamida dinucleotido
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK	Fosfofructoquinasa
PhPFK	Fosfofructoquinasa de <i>Pyrococcus horikoshii</i>
PIPES	Ácido piperazina-N,N'-bis (2-etanosulfonico)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TIGK	Glucoquinasa de <i>Thermococcus litoralis</i>
TMP	timidina monofosfato.
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UMP	uridina monofosfato;
UV	Ultra violeta

Resumen

Las enzimas que fosforilan glucosa y fructosa-6-fosfato (F6P) en la glicólisis de la mayoría de los organismos del phylum Euryarchaeota de *Archaea* utilizan ADP en lugar de ATP como dador de fosforilo. Estas enzimas están emparentadas filogenéticamente y pertenecen a la Superfamilia Riboquinasa y han sido descritas como no reguladas alostéricamente. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la enzima bifuncional de *Methanococcus maripaludis*, perteneciente al orden de los *Methanococcales*, es activada por AMP, rasgo que estaría ausente en las enzimas PFK y GK de *Thermococcales*, que son específicas por glucosa o por F6P.

A partir de este hallazgo surgen dos interrogantes. Por un lado, acerca del mecanismo mediante el cual esta activación ocurre. Por otro lado, acerca de si se trata de un rasgo ancestral o de una novedad evolutiva. Ambas cuestiones fueron abordadas experimentalmente. Para esto, el trabajo de tesis se dividió en dos partes. Por un lado, se estudió el mecanismo de activación por AMP usando como ejemplar la enzima bifuncional de *Methanococcus maripaludis* (MmPFK/GK). Para realizar una caracterización fisicoquímica de esta activación se realizaron estudios de cinética enzimática en estado estacionario. Previo a la caracterización de la activación por AMP se procedió a determinar el mecanismo cinético de la enzima. Esto se hizo para distintas concentraciones de AMP para ambas actividades enzimáticas. Se obtuvo que la enzima posee un mecanismo secuencial ordenado para ambas actividades, donde MgADP es el

primer sustrato en unirse a la enzima y AMP el último producto en disociarse. Además, en ambas actividades existe inhibición por el sustrato azúcar, la que ocurre mediante la formación de dos complejos de punto muerto E-Azúcar y E-AMP-Azúcar. Sin embargo, en la actividad PFK el posible AMP alostérico produce que el segundo complejo deje de formarse.

La activación por AMP ocurre principalmente mediante un aumento en la afinidad por el sustrato azúcar, efecto que es mayor en la actividad GK que en PFK. En ambas actividades esto además causa un aumento en el efecto inhibitorio del azúcar debido a que también aumenta la afinidad por azúcar en especies no productivas catalíticamente, como la enzima libre y el complejo E-AMP.

Estas conclusiones fueron reforzadas mediante estudios de unión de ligando realizados mediante ensayos de fluorescencia intrínseca, además de experimentos de modificación química utilizando un análogo de AMP fotoactivable.

La segunda parte de este trabajo consistió caracterizar evolutivamente la activación por AMP. Para ello se realizó un estudio cinético comparativo entre distintas enzimas actuales de esta familia, cada una representando diversas ramas tales como PFKs específicas de *Thermococcales*, GKs específicas de *Thermococcales* y bifuncionales de *Methanococcales* y *Methanosarcinales*. Además, para caracterizar la ruta evolutiva de la aparición o conservación de la activación por AMP, se analizó la presencia de este rasgo en diversas proteínas ancestrales inferidas en esta familia de enzimas. Se obtuvo que la activación por AMP es un rasgo ancestral que se correlaciona evolutivamente con

la bifuncionalidad, pero que desapareció en conjunto con la especificación de estas enzimas por la actividad GK o PFK.

Este trabajo corresponde a la primera caracterización cinética en detalle de una enzima bifuncional PFK/GK dependiente de ADP. Además, consiste en la primera caracterización a nivel mecanístico y evolutivo de un rasgo regulatorio conservado propio de esta familia de proteínas de *Archaea*.

Abstract

The enzymes that phosphorylate glucose and F6P in *Archaeal* glycolysis use ADP instead of F6P as phosphoryl donor. These enzymes are phylogenetically related and belong to the Ribokinase Superfamily. They have been described as non-regulated allosterically. However, it has recently been described that the bifunctional enzyme of *Methanococcus maripaludis*, belonging to the order of the *Methanococcales*, is activated by AMP, a trait that seems to be absent in the PFK and GK enzymes from *Thermococcales*, which are specific for glucose or F6P.

Two questions arise from this finding. On the one hand, about the mechanism by which this activation occurs. On the other hand, about whether it is an ancestral trait or an evolutionary novelty. Both questions were experimentally addressed. For this reason, the thesis was divided into two parts. On the one hand, the mechanism of activation by AMP was addressed by using the bifunctional enzyme from *Methanococcus maripaludis* (MmPFK / GK) as an exemplar. In order to perform a physicochemical characterization of this activation, steady state kinetic studies were performed. Prior to the characterization of AMP activation, the kinetic mechanism of the enzyme was determined. This was done at different concentrations of AMP for both enzymatic activities. The enzyme was found to have an ordered sequential mechanism for both activities, where MgADP is the first substrate to bind to the enzyme and AMP the last product to dissociate. In addition, in both activities there is inhibition by the sugar substrate, which occurs through the

formation of two dead-end complexes, E-Sugar and E-AMP-Sugar. However, in PFK activity AMP causes the second complex to stop forming.

The activation by AMP occurs mainly through an increase in sugar substrate affinity, this effect is greater in GK activity than in PFK. In both activities this also causes an increase in the inhibitory effect of the sugar due to an increase of sugar affinity in non-productive species, such as the free enzyme and the E-AMP complex.

These conclusions were reinforced by ligand binding studies performed using intrinsic fluorescence. Also, chemical modification experiments using a photoexcitable AMP analog were performed for that purpose.

The second part of this work consisted in the evolutionary characterization of the activation by AMP. This was done by a comparative kinetic study between different current enzymes of this family, each representing different evolutive branches such as PFKs from *Thermococcales*, GKs from *Thermococcales* and bifunctionals from *Methanococcales* and *Methanosarcinales*. Furthermore, in order to characterize the evolutionary route of the appearance or the maintenance of AMP activation, the presence of this trait was analyzed in various reconstructed common ancestors of this family of enzymes. Activation by AMP was found to be an ancestral trait that is evolutionarily correlated with bifunctionality but disappeared in conjunction with the specification of these enzymes by GK or PFK activity.

This job is the first time a bifunctional PFK/GK ADP-dependent enzyme gets kinetically characterized in detail. Moreover, is the first time that a regulatory property,

only present in this family of enzymes gets characterized at mechanistic and evolutive level.

1 Introducción

1.1 Metabolismo de *Archaea*

Uno de los procesos fundamentales del metabolismo de todos los seres vivos es la oxidación de moléculas provenientes del ambiente, con la consecuente reducción de moléculas del organismo. De esta forma, los electrones provenientes del ambiente ingresan a una larga y compleja red de reacciones de óxido-reducción, donde son dirigidos a dos posibles destinos: a la reducción de moléculas que formarán parte de estructuras biológicas y que finalmente constituirán la biomasa, o a la reducción de un aceptor final que será excretado al ambiente. Este último proceso se encuentra acoplado a la producción de la energía necesaria para llevar a cabo todos procesos metabólicos del organismo. En la gran mayoría de los seres vivos, los azúcares juegan un rol fundamental en el metabolismo, siendo estas moléculas las que con mayor frecuencia son utilizadas como nutrientes. A partir de su degradación los organismos son capaces de producir tanto energía como una gran cantidad de intermediarios y precursores para la síntesis de estructuras celulares y de biomasa en general.

El metabolismo de los organismos pertenecientes al dominio *Archaea* presenta grandes diferencias tanto respecto a los de bacterias como a los de *Eucarya*, principalmente debido a la variedad de ambientes donde estos organismos habitan, dentro de los que se incluyen condiciones tales como altas y bajas temperaturas, altas concentraciones de sal, pHs extremos, etc. Más aún, dentro del dominio *Archaea* existen

considerables variaciones entre los distintos grupos filogenéticos que lo componen. Hasta ahora, los órdenes de *Archaea* más estudiados desde el punto de vista metabólico son los *Thermococcales* (*P. furiosus* (Khatibi et al. 2017; Lee et al. 2006), *T. Kodakarensis* (Atomi & Reeve 2019)), los *Methanococcales* (*M. janaschii* (Selkov et al. 1997), *M. maripaludis* (Goyal et al. 2016)) y los *Methanosarcinales* (*M. acetivorans* (Santiago-Martínez et al. 2016)). Los primeros son organismos heterótrofos capaces de crecer en presencia de una gran variedad de azúcares, polisacáridos y péptidos (Schut et al. 2003; VanFossen et al. 2008). Generalmente, utilizan azufre elemental o protones como aceptores finales de electrones, produciendo ácido sulfhídrico como producto final en el primer caso e hidrógeno molecular en el segundo (Schut et al. 2007). En cambio, los *Methanococcales* y los *Methanosarcinales* son organismos autótrofos incapaces de asimilar moléculas de más de tres carbonos. Esto se debe, entre otras cosas, a que carecen de transportadores de azúcares de más de tres carbonos y de otras moléculas de similar tamaño (Castro-Fernandez et al. 2017; Hendrickson et al. 2004). Tanto los organismos del orden *Methanococcales* como los del orden *Methanosarcinales* son capaces de crecer en presencia de metanol, CO₂, CO, metilamina o acetato (Costa & Leigh 2014). Éstos utilizan carbono como aceptor final de electrones, generando metano como producto final del metabolismo. La metanogénesis presente en los *Methanococcales* se conoce como hidrogenotrófica (Thauer 2012). En este proceso se genera CH₄ a partir de CO₂ mediante una serie de pasos en donde se oxidan cofactores (Ferredoxina y factor F420) y además se genera un gradiente de sodio en la membrana

plasmática, el que posteriormente será disipado en un proceso acoplado a la producción de ATP mediante una ATP-sintasa propia de estos organismos (Deppenmeier & Müller 2008; Grüber et al. 2014). De más está decir que su capacidad de producir metano a partir de otros componentes tales como CO y CO₂ los hace candidatos interesantes para una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas (Enzmann et al. 2018) amigables con el medio ambiente, por lo que cualquier contribución al entendimiento de su metabolismo puede considerarse un aporte, directo o indirecto, en este camino. En el caso de los *Methanosarcinales*, también existe un tipo distinto de metanogénesis ausente en los *Methanococcales*. Ésta se llama acetoclástica y consiste en la producción de una molécula de metano y una de CO₂ a partir de una molécula de Acetato (Costa & Leigh 2014; Welte & Deppenmeier 2014). Esta última molécula puede ser dirigida hacia la producción de biomasa mediante la fijación de carbono en un ciclo reductivo de Acetil-CoA, el que está presente tanto en *Methanococcales* como en *Methanosarcinales* (Castro-Fernandez et al. 2017).

1.2 Glicólisis

Dentro de los azúcares, glucosa es uno de los más ubicuos en los seres vivos, siendo la principal y más inmediata fuente de carbono y poder reductor en la mayor parte de los organismos conocidos. A través de las vías de degradación de esta molécula los organismos son capaces de generar tanto ATP como poder reductor, además de diversos precursores que son destinados a una gran variedad de procesos, tales como el

ciclo de Krebs, la síntesis de aminoácidos, de nucleótidos, de otros azúcares, etc. La principal vía de degradación de la glucosa es la vía de Embden-Meyerhof o glicólisis canónica (**Figura 1**), siendo la más frecuente en Eucarya y bacterias (Voet & Voet). Por otro lado, algunos organismos procariontes utilizan también la ruta de *Entner-Doudoroff* (Ahmed et al. 2004), en la que se produce piruvato y gliceraldehido-3-fosfato a partir de glucosa-6-fosfato, en una serie de reacciones distintas a las de la glicólisis.

La vía de *Embden-Meyerhof* involucra dos etapas de fosforilación de azúcares; la primera consiste en la fosforilación de glucosa para generar glucosa-6-fosfato (actividad Glucoquinasa, GK de ahora en adelante), reacción que es compartida con la ruta de *Entner-Doudoroff* y otras vías metabólicas, como la síntesis de glicógeno a partir de glucosa y la vía de las pentosas fosfato. La segunda, corresponde a la fosforilación de fructosa-6-fosfato para formar fructosa-1,6-bifosfato (actividad fosfofructoquinasa, PFK de ahora en adelante) y corresponde a la primera reacción exclusiva de la vía de *Embden-Meyerhof*. En general, para ambas actividades el cosustrato dador de fosforilo es ATP, generándose ADP como producto. Las enzimas que realizan la actividad GK en Eucarya usualmente presentan promiscuidad, siendo capaces de fosforilar varios sustratos hexosa además de glucosa (Cárdenas et al. 1998; Kawai et al. 2005; Traut 2008). En bacterias, en cambio, son bastante específicas y se encuentran clasificadas dentro de la familia ROK (Romero-Rodríguez et al. 2015).

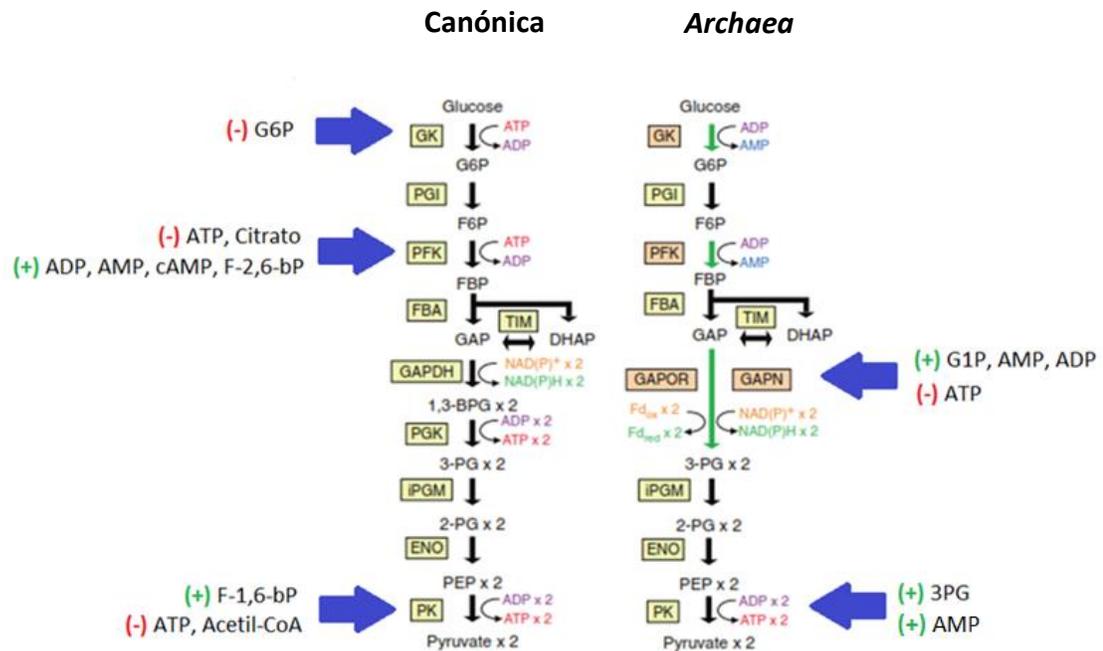


Figura 1. Esquema comparativo de la glicólisis canónica (vía Embden-Meyerhof) y glicólisis de *Archaea*.

Se destacan las modificaciones presentes en esta última mostrando a la enzima con fondo más oscuro. Además, se indican los distintos efectores alostéricos descritos para cada una de estas vías. Modificado de Ye et al. 2012. Actividades enzimáticas: GK, Glucoquinasa; PGI, Fosfoglucoasa isomerasa; PFK, Fosfofructoquinasa; FBA, Fructosa-bifosfato aldolasa; TIM, Triosafofosfato isomerasa; GAPDH, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; PGK, Fosfoglicerato quinasa; iPGM, Fosfoglicerato quinasa; ENO, Enolasa; PK, Piruvato quinasa; GAPOR, Gliceraldehido-3-fosfato ferredoxina oxidoreductasa; GAPN, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante. Actividades: G6P, GLucosa-6-fosfato; F6P, Fructosa-6-fosfato; FBP, F-2,6-bP, Fructosa-1,6-bifosfato; GAP, Gliceraldehido-3-fosfato; DHAP, Dihidroxiacetona fosfato; 1,3-BPG, 1,3 bifosfoglicerato; 3-PG, 3-fosfoglicerato; PEP, Fosfoenolpiruvato; ATP, Adenosina trifosfato; ADP, Adenosina bifosfato; AMP, Adenosina monofosfato; cAMP, AMP cíclico; G1P, Glucosa-1-fosfato;

Por otro lado, todas las enzimas que realizan la actividad PFK tanto en bacterias como en Eucarya se encuentran emparentadas filogenéticamente. Durante la evolución, el gen que codifica para esta enzima habría sufrido eventos de duplicación-fusión y divergencia funcional de los sitios activos, lo que habría llevado a la aparición de sitios regulatorios y a la divergencia de los ya existentes (Kemp & Gunasekera 2002; Li et al. 1999; McNae et al. 2009; Poorman et al. 1984). Por otro lado, *E. coli* posee una isoenzima, denominada PFK-2, que no posee homología con las PFK de bacteria (Babul 1978; Cabrera et al. 2008) o Eucarya (de ahora en adelante, a menos que se indique, cuando se hable de enzimas específicas nos referiremos como “PFK” a las de la familia PFK1 de bacterias y Eucarya)

Si bien en los organismos pertenecientes al dominio *Archaea* el metabolismo es en muchos aspectos sustancialmente distinto al de bacterias y Eucarya (Castro-Fernandez et al. 2017), la glicólisis también se encuentra presente. Sin embargo, ésta presenta importantes modificaciones tanto a nivel de las actividades enzimáticas que la componen como en su función en el metabolismo, la que no es la misma en todos los organismos de este dominio. En los *Thermococcales*, que son organismos heterótrofos, la vía glicolítica juega un rol fundamental en la producción de energía y de poder reductor, siendo una de las vías más importantes donde se produce ATP por fosforilación a nivel de sustrato (Bräsen et al. 2014). En los *Methanococcales* y *Methanosarcinales*, en cambio, no está claro el rol de esta ruta metabólica y la evidencia apunta a que se trataría de una vía secundaria de recuperación ante la escasez de nutrientes. Como se

mencionó, estos organismos son incapaces de asimilar glucosa al carecer de transportadores para el azúcar. Sin embargo, durante la fase de crecimiento y en abundancia de nutrientes, la ruta gluconeogénica se encuentra activa. Actualmente se sabe que estos organismos son capaces de acumular glicógeno (Yu 1994; Goyal et al 2016), por lo que se ha postulado que la función de la gluconeogénesis es la producción de reservas nutricionales. Es así que, en organismos como *Methanococcus maripaludis* (*Methanococcales*) (Goyal et al. 2016) y *Methanosarcina acetivorans* (*Methanosarcinales*) (Santiago-Martínez et al. 2016), se ha observado que ante el estrés por carencia de nutrientes la glicólisis es activada, con la consecuente inhibición de la gluconeogénesis, para así poder generar intermediarios para la metanogénesis y otros procesos necesarios para la sobrevivencia del organismo en esas condiciones.

En la glicólisis de *Archaea* existen cambios importantes respecto a la ruta metabólica homóloga presente en bacterias y Eucarya, por ejemplo, a nivel de actividades enzimáticas tales como Glucoquinasa, Fosfofructoquinasa y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En *Archaea*, estas actividades son llevadas a cabo por enzimas que carecen de homología con las enzimas presentes en Bacteria y Eucarya, las que además utilizan cosustratos diferentes y presentan mecanismos catalíticos distintos, lo que tiene consecuencias metabólicas importantes. Por ejemplo, en algunos casos, la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ha sido reemplazada por una GAPDH no fosforilante (GAPN) y en otros por una GAP:ferredoxina oxidoreductasa (GAPOR) (Bräsen et al. 2014). Esto es consistente con el hecho de que en

Archaea el poder reductor está localizado en moléculas distintas NAD(P)H, como ferredoxina y coenzimas propias de este dominio de la vida (Castro-Fernandez et al. 2017). Por otro lado, las enzimas que catalizan las reacciones de fosforilación de glucosa y de F6P utilizan ADP como dador de fosforilo en lugar de ATP, con la correspondiente producción de AMP como producto (Kengen et al. 1994; Guixé & Merino 2009).

Dentro de las quinasas de azúcares dependientes de ADP de *Archaea* existen enzimas específicas por glucosa, específicas por F6P y bifuncionales. Éstas últimas fueron caracterizadas en los organismos del orden *Methanococcales*, donde solo existe una enzima bifuncional (GK/PFK) capaz de fosforilar ambos azúcares en un mismo sitio activo (Sakuraba et al. 2002; Castro-Fernandez et al. 2014). Todas estas quinasas dependientes de ADP se encuentran emparentadas filogenéticamente, formando una familia de proteínas homólogas (Guixé & Merino 2009) que no presentan homología con ninguna de las enzimas canónicas dependientes de ATP que realizan las mismas actividades (GK o PFK) en bacterias y *Eucarya*. Inicialmente, se las propuso como una nueva familia de proteínas, aunque posteriormente, en base en su semejanza estructural, fueron clasificadas como miembros de la Superfamilia Riboquinasa (Guixé & Merino 2009). Interesantemente, la enzima PFK-2 de *E. coli* también pertenece a esta superfamilia (Bork et al. 1993). Además de *Archaea*, también se han descrito glucoquinasas de azúcares dependientes de ADP en *Eucarya*, aunque su función en estos organismos no es clara (Ronimus & Morgan 2004; Richter et al. 2012). También se ha descrito una glucoquinasa dependientes de ADP en bacteria (Qian et al. 2013).

Estructuralmente, las quinasas dependientes de ADP poseen una arquitectura similar a todas las enzimas de la Superfamilia Riboquinasa. La parte común a todas las proteínas de esta superfamilia consiste en un dominio que posee un plegamiento tipo Rossman con ocho hojas beta rodeadas de hélices alfa, llamado dominio mayor (Currie et al. 2009). Dentro de las enzimas de esta superfamilia, algunas presentan un dominio menor consistente en inserciones de estructura secundaria, principalmente hojas beta. Este dominio menor presenta una topología reentrante en su conexión con el dominio mayor y puede tener diversos tamaños. A diferencia de las otras proteínas de esta Superfamilia, las quinasas dependientes de ADP presentan un dominio menor más de mayor tamaño con la presencia de inserciones de alfa-hélices. Éstas últimas han sido descritas como monoméricas, a diferencia de las enzimas de la familia riboquinasa (otra familia de la Superfamilia Riboquinasa), donde existen enzimas que dimerizan a través del dominio menor (Sigrell et al. 1999; Cabrera et al. 2011). Por otro lado, las enzimas dependientes de ADP de Archaea caracterizadas hasta la fecha presentan un mecanismo cinético secuencial-ordenado donde el primer sustrato en unirse a la enzima es MgADP, a diferencia de las enzimas de la familia riboquinasa donde el azúcar es el primer sustrato en unirse (Rivas-Pardo et al. 2013). Estos mecanismos se representan en la **Figura 2**. Recientemente, se ha propuesto que esta diferencia en el mecanismo cinético se debería a la topología del dominio mayor de las proteínas. Específicamente, estaría relacionada con la presencia de una permutación en el extremo C-terminal de las quinasas dependientes de ADP (figura 2) (Herrera-Morande et al. 2018). Interesantemente, al

introducir la topología de las enzimas dependientes de ATP en la enzima GK dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis* mediante una permutación artificial en el gen codificante, su mecanismo cinético se ve modificado, conservando su carácter secuencial-ordenado, pero pasando a ser glucosa el primer sustrato en unirse, y no MgADP como en la enzima silvestre (Herrera-Morande et al. 2018).

1.3 Regulación de la glicólisis canónica y su evolución

La glicólisis canónica es una vía altamente regulada en todos los organismos que la poseen. Dependiendo del estado metabólico puede ser necesario mantener su funcionamiento o detenerlo. Esta regulación se realiza principalmente mediante la modificación en la actividad catalítica de las enzimas que realizan las actividades de la ruta, lo que se efectúa mediante la acción alostérica de una gran variedad de efectores. En este escenario, tanto en *Eucarya* como en bacterias, GK y PFK son las dos etapas que presentan la mayor regulación en la gran mayoría de los casos conocidos (Voet & Voet 2011). Para ambas actividades se han descrito varios efectores alostéricos. Por ejemplo, en mamíferos la actividad GK es inhibida por su producto G6P; además, una de las isoformas (Hexoquinasa C) es inhibida por exceso de glucosa (Cárdenas et al. 1998; Sebastian et al. 1999). Por otro lado, las enzimas PFK son activadas por su producto ADP, siendo éste un rasgo común de todas las enzimas que realizan esta actividad, tanto en bacterias y *Eucarya* (Kemp & Gunasekera 2002; Kemp & Krebs 1967; Poorman et al. 1984).

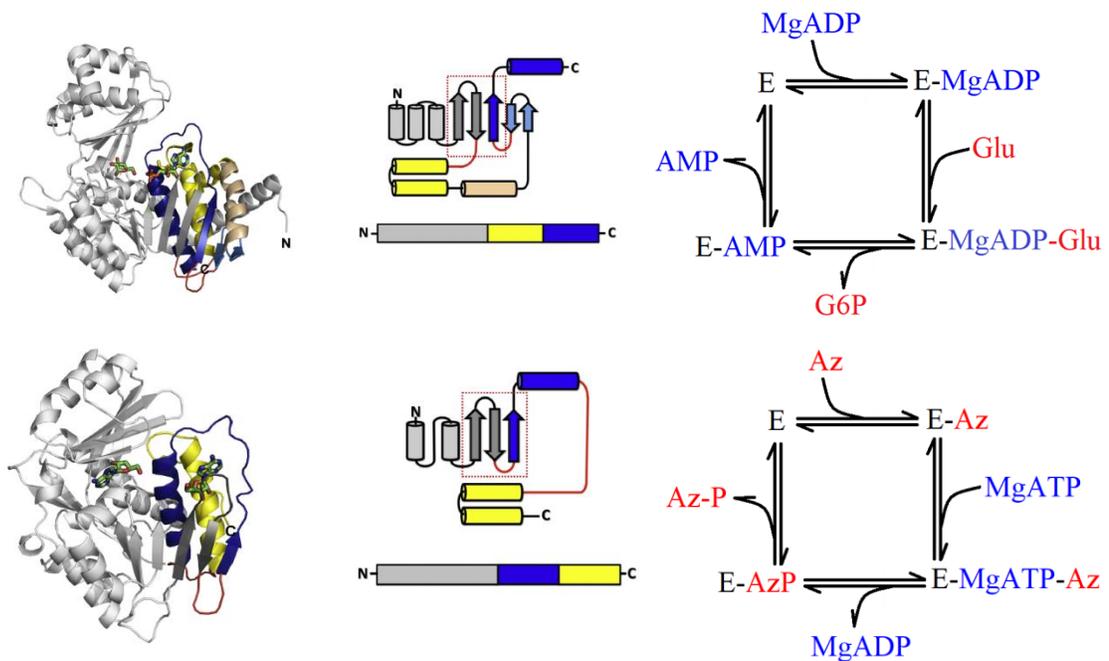


Figura 2 Topología y mecanismos cinéticos en quinasas dependientes de ADP y de ATP de la superfamilia Riboquinasa.

A) Estructura de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* (TIGK) en presencia de glucosa y AMP (PDB 4B8S). B) Estructura de la adenosina quinasa humana (dependiente de ATP) perteneciente a la familia Riboquinasa, en presencia de dos adenosinas (PDB 4B8S). En ambas estructuras, el subdominio que contiene el sitio de unión para el nucleótido se muestra en colores. Para ambas se muestra un diagrama topológico de este subdominio, donde en amarillo y azul se muestran la localización de los mismos elementos estructurales que se destacan con esos colores en las estructuras. Figura extraída de Herrera-Morande et al. 2018. Para cada caso se muestra además el mecanismo cinético determinado para cada una de estas familias de proteínas. A) Mecanismo secuencial-ordenado donde MgADP es el primer sustrato en unirse a la enzima y AMP el último producto en disociarse, correspondiente a las Quinasas dependientes de ADP. B) mecanismo secuencial-ordenado correspondiente a las quinasas dependientes de ATP, donde el aceptor de fosforilo es el primer sustrato en unirse y el sustrato fosforilado el último producto en disociarse. “Az” representa el aceptor de fosforilo.

Además, en bacterias, la actividad PFK es inhibida por Fosfoenol-Piruvato (PEP), rasgo que no está presente en las enzimas de Eucarya (Poorman et al. 1984). En las PFK Eucarya se ha observado activación por AMP y AMP cíclico (cAMP); junto con esto, Fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6bP) también es un activador. Esta última característica es parte de un importante mecanismo regulatorio en mamíferos, ya que esta molécula, además de activar la enzima PFK, también es un inhibidor de la Fructosa bifosfatasa (FBPasa), por lo que juega un rol esencial en el paso de un metabolismo gluconeogénico a uno glicolítico (Hers et al. 1982). Además, estas enzimas también son inhibidas por citrato y por su sustrato ATP (Baptiste et al. 2003), siendo esto último un rasgo común en las PFK de Eucarya y las de bacterias (la acción de estos efectores se resume en la **Figura 1**. Es interesante apreciar que es usual que los inhibidores sean intermediarios y productos que se encuentran río abajo de la ruta glicolítica, por lo que la regulación cumple la función de evitar la acumulación de ATP, poder reductor y otros productos finales de la vía. Por otro lado, la regulación de la glicólisis es importante cuando se favorece un metabolismo gluconeogénico, donde es necesario que se encuentre inhibida. Gran parte de las actividades enzimáticas de la gluconeogénesis son llevadas a cabo por enzimas que también participan en la glicólisis, pero catalizando la reacción en la dirección reversa. Por esto, es necesaria la existencia etapas irreversibles, realizadas por enzimas únicas para cada ruta, que aseguren la dirección del flujo metabólico, ya sea en dirección glicolítica o gluconeogénica. En el caso de las actividades GK y PFK, la reacción reversa en sentido gluconeogénico es catalizada por enzimas distintas a la

glicólisis, que son propias de esta vía: Glucosa-6-fosfatasa y Fructosa-1,6-bifosfatasa, respectivamente. Si ambas vías estuviesen activas en un mismo momento se produciría un ciclo fútil con la consecuente hidrólisis neta de ATP, lo que podría tener graves consecuencias para el organismo. Es por esto que la regulación de GK y PFK es un proceso de gran importancia para la supervivencia de los organismos.

En el caso de las PFK canónicas, tanto de bacterias como de Eucarya, se ha estudiado en profundidad la evolución de su regulación alostérica. Como se ha señalado, todas las enzimas que realizan esta actividad en ambos dominios de la vida son homólogas. La PFK de bacterias es un homotetrámero en su forma activa, en el que cada subunidad posee un sitio activo independiente, donde se alojan los sustratos F6P y ATP. Además, posee sitios alostéricos para PEP y ADP ubicados en la interface de dos subunidades (Kemp & Gunasekera 2002; Li et al. 1999). Las PFK de Eucarya se habrían originado a partir de un evento de duplicación y posterior fusión en tándem de un gen ancestral de una PFK procarionte (Poorman et al. 1984). En este proceso, se habría generado una nueva proteína con dos grandes dominios, cada uno estructuralmente homólogo a una subunidad de la proteína procarionte. En uno de estos dominios se conservó el sitio activo ancestral, mientras que el otro este sitio divergió hasta transformarse un sitio alostérico para los activadores alostéricos F2,6bP y AMP/ADP. A su vez, el sitio alostérico ancestral para PEP (inhibidor) y ADP (activador) dio origen a los dos sitios inhibidores para ATP y citrato de la enzima Eucarya (Kemp & Gunasekera 2002; Li et al. 1999).

1.4 Regulación de la Glicólisis en *Archaea*

El metabolismo de las Archaea, su evolución y regulación, son fenómenos cuya descripción es escasa. En este contexto, conocer la evolución y la regulación de la glicólisis en los organismos de este dominio constituye un aporte importante al conocimiento de su metabolismo. Actualmente, la regulación metabólica en Archaea es un fenómeno bastante desconocido y, dentro de esto, la regulación a través de efectores alostéricos parece ser, hasta ahora, un fenómeno poco frecuente (Bräsen et al. 2014). En este contexto la glicólisis no parece ser una excepción, habiéndose llegado a especular que la regulación alostérica sería prácticamente inexistente y que la estrategia regulatoria estaría realizada solo a nivel de la modificación en la disponibilidad de enzimas mediante control transcripcional, como puede verse en las revisiones más recientes y amplias del tema (Bräsen et al. 2014). Hasta ahora solo se ha descrito regulación alostérica a nivel de la GAPN de *Thermoproteus tenax*, la que es activada por glucosa-1-fosfato, AMP y ADP, además de ser inhibida por ATP (Brunner et al. 1998) y la piruvato quinasa de *Pyrobaculum aerophilum*, la que es activada por 3-fosfoglicerato (Solomons et al. 2013), como se resume en la **Figura 1**. Estos fenómenos alostéricos constituyen casos aislados y se desconoce su relevancia a nivel metabólico. Sin embargo, recientemente también se ha reportado que varias Piruvatoquinasas de *Archaea* pertenecientes al filo *Euryarchaeota* son activadas por AMP en un mecanismo conservado evolutivamente (Johnsen et al. 2019). A diferencia de lo que ocurre en bacterias y *Eucarya*, antes del inicio de esta tesis doctoral no se había descrito regulación

alostérica en *Archaea* a nivel de GK y PFK, ya sea por efectores clásicos o por otras moléculas (Tuininga et al. 1999; Ronimus et al. 1999; Ronimus et al. 2001; Verhees et al. 2002; Dörr et al. 2003). Desde que se descubrieron las quinasas dependientes de ADP de *Archaea*, las enzimas más estudiadas han sido las del orden *Thermococcales*.

En algunas enzimas de esta familia se ha detectado inhibición por alguno de los sustratos (Castro-Fernandez et al. 2017; Rivas-Pardo et al. 2013; Zamora et al. 2017), pero este fenómeno no ha sido explorado en profundidad y hasta ahora no se ha descrito en términos de mecanismos. Sin embargo, debido a sus características, parece no ser metabólicamente relevante, dado que solo es notorio a muy altas concentraciones de sustrato

Por otra parte, los cationes divalentes, como Mg^{2+} , tienen distintos efectos sobre la actividad de las enzimas dependientes de ADP de *Archaea*. Primero que todo, es conocido que en las enzimas que fosforilan sustratos utilizando nucleótidos los cationes divalentes coordinan las cargas negativas de los fosfatos del nucleótido (ADP en este caso), formando parte del verdadero sustrato de la enzima, lo que permite que la molécula se una al sitio activo y se realice la catálisis. Por otro lado, se conoce que todas las enzimas de la superfamilia Riboquinasa son reguladas por Mg^{2+} y otros cationes divalentes en un proceso debido a la unión de una segunda molécula de Mg^{2+} (Parducci et al. 2006; Rivas-Pardo et al. 2011; Navarro et al. 2013; Quiroga-Roger et al. 2015) donde participa un motivo de secuencia conservado (NXXE). En particular, esta característica también se encuentra presente en las quinasas dependientes de ADP de *Archaea*

(Merino et al. 2012; Abarca-Lagunas et al. 2015) y, en la mayoría de los casos descritos, el Mg^{2+} libre se comporta como un inhibidor.

Sin embargo, recientemente en nuestro laboratorio se ha descubierto que las enzimas bifuncionales de *Methanococcus maripaludis* (MmPFK/GK) y de *Methanococcus janaschii* (MjPFK/GK), pertenecientes al orden *Methanococcales*, **son activadas por AMP** (Castro-Fernandez et al. 2014; Herrera-Morande 2015) en lo que parece ser un efecto alostérico. Además, al parecer este sería un rasgo común en las enzimas de este grupo filogenético, pero estaría ausente en las enzimas de grupo de los *Thermococcales* (Tuininga et al. 1999; Verhees et al. 2002; Dörr et al. 2003) (en estas enzimas incluso se han realizado estudios de inhibición por producto no habiéndose observado activación por AMP (Rivas-Pardo et al. 2013)). Estos resultados muestran por primera vez evidencia de regulación alostérica conservada en esta etapa de la glicólisis de *Archaea*. Este hallazgo plantea interesantes desafíos, como por ejemplo entender el mecanismo mediante el cual ocurre esta activación.

1.5 Evolución de la familia de quinasas dependientes de ADP y de su regulación.

Hasta antes de comenzar este trabajo, la activación por AMP solo se había reportado en enzimas bifuncionales (Castro-Fernandez et al. 2014; Herrera-Morande 2015) y aparentemente no se encontraba presente en las enzimas específicas por F6P o por glucosa de la rama de los *Thermococcales* (Tuininga et al. 1999; Verhees et al. 2002;

Dörr et al. 2003; Rivas-Pardo et al. 2013). Esto apunta a que ambos rasgos, la bifuncionalidad y la activación por AMP, podrían estar correlacionados evolutivamente. Para responder esta pregunta es necesario analizar la evolución de esta familia y determinar en qué punto de su historia evolutiva surgió y/o se perdió la activación por AMP.

Dentro de las quinasas de azúcares dependientes de ADP existen enzimas específicas por glucosa, específicas por F6P y también enzimas bifuncionales capaces de fosforilar ambos azúcares en un mismo sitio activo. Estudios realizados mediante la técnica de reconstrucción de enzimas ancestrales han permitido rastrear la historia evolutiva de la especificidad de sustratos de esta familia. Esta técnica consiste en la inferencia de las secuencias más probables de los ancestros comunes de un conjunto de proteínas homólogas. Estas proteínas ancestrales reconstruídas pueden ser expresadas recombinantemente, purificadas y caracterizadas. De esta forma es posible inferir la historia evolutiva para algún rasgo específico dentro de una familia de proteínas. En este caso, utilizando esta técnica se determinó que la bifuncionalidad sería un rasgo ancestral dentro de la familia de quinasas dependientes de ADP de *Archaea*. En Castro-Fernandez 2015 y Castro-Fernandez et al. 2017, se reconstruyeron las secuencias de los últimos ancestros comunes de las enzimas PFK específicas de *Thermococcales* (ancT), de las enzimas bifuncionales de *Methanococcales* (ancM), del último ancestro común entre estos dos grupos (ancMT) y del ancestro común entre éstos y las enzimas bifuncionales de *Methanosarcinales* (ancMMT). En la **Figura 3** se puede observar la posición de estos

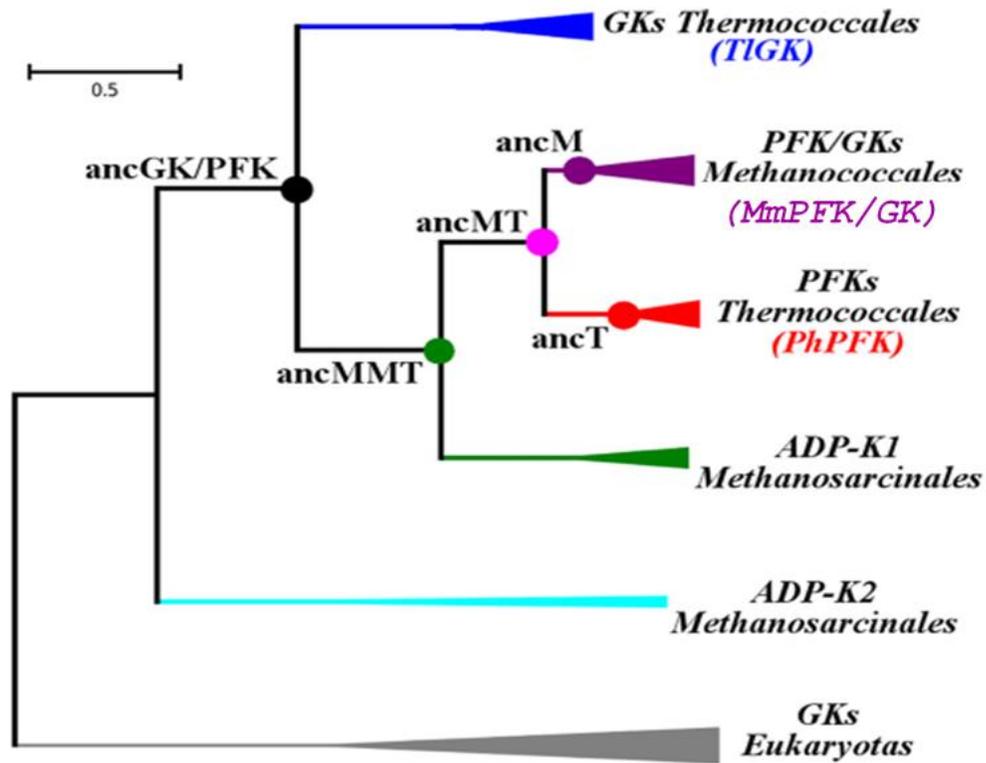


Figura 3. Árbol filogenético de la familia de quinasas dependientes de ADP de *Archaea*.

Árbol filogenético consenso fue obtenido mediante inferencia bayesiana usando secuencias de proteínas. Los nodos correspondientes a las enzimas ancestrales reconstruidas se encuentran indicados por círculos coloreados: **ancGK/PFK**, **ancMMT**, **ancMT**, **ancM** y **ancT**. Las siguientes enzimas actuales se muestran como ejemplos de sus respectivo grupos: GK-específica de *T. litoralis* (**TIGK**), PFK-específica de *P. horikoshii* (**PhPFK**) y bifuncional de *M. maripaludis* (**MmPFK/GK**). Modificado de Castro y cols. 2017.

ancestros en el árbol filogenético de esta familia de proteínas. En este estudio se determinó que la bifuncionalidad ya habría estado presente en los ancestros más antiguos de esta familia, como el ancestro común entre las enzimas PFK de *Thermococcales*, las bifuncionales de *Methanococcales* y las bifuncionales de *Methanosarcinales* (ancMMT) (**Figura 3**). Este rasgo se habría perdido en la rama de las GK de *Thermococcales*, pero se habría conservado en el ancestro común entre las enzimas bifuncionales de *Methanococcales* y las PFK específicas de *Thermococcales* (ancMT). Finalmente, se habría conservado solo en las enzimas actuales de la rama de los *Methanococcales*, habiéndose perdido en la transición desde ancMT a la rama de las PFK de *Thermococcales*, siendo el ancestro de esta rama (ancT) específico por F6P. El cambio más importante en esta transición evolutiva entre la bifuncionalidad y la especificidad por F6P, habría sido el reemplazo de un residuo glutámico conservado del sitio activo del ancestro ancMT por una alanina. Este cambio habría provocado la pérdida de la capacidad de fosforilar glucosa en la transición entre el ancestro MT y el ancestro ancT, siendo la causa de la especificidad por F6P de las PFK de *Thermococcales* (Castro-Fernandez 2015). Evidencia directa de esto es que, si al ancestro ancMT se le realiza una mutación por alanina en el residuo E72, éste pierde la capacidad de unir glucosa y, por lo tanto, de actividad GK.

Junto con esto, actualmente también se sabe que las enzimas PFK pertenecientes a los *Methanosarcinales* son bifuncionales (Zamora et al. 2017), por lo que este rasgo también se habría conservado en las enzimas actuales de ese linaje. Sin embargo, hasta

antes de empezar esta tesis no se había analizado la activación por AMP en esta rama de enzimas.

La pregunta evolutiva que surge frente a la existencia de la activación por AMP es si esta propiedad regulatoria es un rasgo ancestral o una novedad evolutiva. Además, en el caso de que sea una novedad, cabe preguntarse en qué momento de la evolución surgió, en qué ramas filogenéticas se ha mantenido y en cuales se ha perdido; o, de ser ancestral, en qué momento de la evolución se perdió y en cuales ramas se conservó.

Por otro lado, surge la pregunta acerca de si existe una correlación entre la activación por AMP y la bifuncionalidad. En caso de que efectivamente exista una coevolución de la activación por AMP y la bifuncionalidad, cabe preguntarse si ésta es producto de una misma causa a nivel de la estructura de las proteínas, vale decir, si el determinante de la pérdida de la bifuncionalidad es el mismo que de la pérdida (o no aparición) de la activación por AMP. O si, por el contrario, se trata de dos rasgos que co-evolucionaron en forma independiente de acuerdo con el ambiente metabólico donde las enzimas realizan su función. Dado que las enzimas bifuncionales se encuentran en organismos metanogénicos autótrofos (*Methanococcales* y *Methanosarcinales*), a diferencia de las específicas que están presentes en organismos heterótrofos (*Thermococcales*) con metabolismo diferente a los primeros, es posible que sea esta diferencia metabólica la causante de que se haya seleccionado o descartado el rasgo regulatorio, el que podría estar presente independientemente de si la enzima es bifuncional.

1.6 Activación enzimática y mecanismos cinéticos.

Si observamos el sitio activo de las enzimas, podemos ver que éste ocupa tan solo una pequeña parte de toda su estructura. En todo el resto de su estructura podrían ser capaces de interactuar con una gran cantidad de moléculas y unir una gran cantidad de ligandos. Esto no es un hecho casual de la evolución, dado que las enzimas llevan a cabo sus actividades en un contexto fisiológico, por lo que, además de catalizar reacciones en forma altamente específica y efectiva, para realizar sus funciones deben interactuar con otras estructuras celulares, unir otros ligandos y, más importante aún, deben ser capaces de regular su actividad ante estímulos externos, ya que de esto depende muchas veces el correcto funcionamiento del metabolismo del organismo. En este último aspecto, la regulación alostérica, que consiste en la modificación de la actividad enzimática producto de la unión de un ligando en un sitio de unión diferente al sitio activo, cumple un rol fundamental en la mayoría de los sistemas biológicos. Esta modificación puede ocurrir mediante la transmisión de alteraciones estructurales desde el sitio alostérico a lo largo de toda la estructura o mediante efectos entrópicos globales en la dinámica estructural de la proteína (Changeux 2013).

En el caso de la activación enzimática, ésta puede ocurrir mediante tres mecanismos. Una posibilidad es que al unirse a la enzima el efector alostérico modifique la afinidad por algún sustrato (activación vía afinidad). Otra posibilidad es que la unión del ligando produzca una modificación en la velocidad de la catálisis de la reacción (activación vía catálisis). Finalmente, una tercera opción es que el ligando modifique

ambas propiedades, lo que consistiría en un mecanismo mixto de activación. El modelo matemático que permite representar estos efectos y distinguirlos es el modelo general de modificación de la actividad enzimática (que se explicará en detalle en la sección de resultados). Éste nos permite distinguir el tipo de activación que está presente mediante el análisis de los parámetros cinéticos de la enzima en función del activador.

Sin embargo, en nuestro caso el sistema estudiado presenta algunas complejidades. Primero, además de ser un activador, AMP es el producto de la reacción catalizada, por lo que además produce inhibición. Esto representa una dificultad a la hora de caracterizar un mecanismo de activación para la proteína, ya que se hace necesario entender el mecanismo mediante el cual el producto realiza su inhibición, lo que se traduce en entender si AMP es el primero o el segundo de los productos en disociarse de la enzima en el ciclo catalítico. Por otro lado, al tratarse de una reacción bisustrato, se hace necesario conocer el efecto de AMP sobre cada uno de los sustratos por separado. Además, se sabe que algunas enzimas de esta familia presentan inhibición por algún sustrato (Rivas-Pardo et al. 2013; Víctor Castro-Fernandez et al. 2017; Zamora et al. 2017), por lo que, además de analizar la presencia de inhibición por sustrato, también se hace necesario evaluar si ésta es afectada por AMP. Por lo tanto, para poder caracterizar la activación por AMP, además se debe estudiar en detalle el mecanismo cinético de la enzima, vale decir, el orden de unión de sustratos y de disociación de productos.

Como se mencionó anteriormente, se han descrito los mecanismos cinéticos de

algunas enzimas de la familia de quinasas dependientes de ADP de *Archaea*. Hasta ahora solo se ha estudiado este aspecto de las enzimas pertenecientes a la rama de las GKs de *Thermococcales* (Rivas-Pardo et al. 2013); las que presentan un mecanismo secuencial ordenado donde MgADP es el primer sustrato en unirse al sitio activo y AMP el último productor en disociarse (Rivas-Pardo et al. 2013; Herrera-Morande et al. 2018). Sin embargo, el mecanismo cinético para enzimas bifuncionales de *Methanococcales* se desconoce.

Este trabajo de tesis se divide en dos partes. Por un lado, se estudió el mecanismo de activación por AMP **usando como ejemplar la enzima bifuncional de *Methanococcus maripaludis* (MmPFK/GK)**. Se eligió esta enzima porque fue la primera donde fue detectada la activación por AMP y, además, actualmente el organismo al que pertenece está en la mira de las aplicaciones biotecnológicas para la producción de metano (Enzmann et al. 2018). En este contexto, la comprensión de su metabolismo y su regulación se hace especialmente relevante. Para realizar una caracterización fisicoquímica de esta activación, primero fue necesario caracterizar el mecanismo cinético de la enzima. Junto con esto, dado que se detectó inhibición por el sustrato azúcar y que AMP produce un incremento en este efecto, también se caracterizó en detalle el mecanismo de inhibición por sustrato. Por otro lado, era necesario determinar si AMP, además de activar la enzima, modificaba su mecanismo cinético. Para realizar dicha caracterización se realizaron experimentos de cinética enzimática en estado estacionario para las dos actividades de la enzima (GK y PFK) variando tanto las

concentraciones de Glucosa o F6P, de MgADP y de AMP. De esta forma se obtuvieron modelos matemáticos basados en datos para explicar tanto el mecanismo cinético de la enzima como el mecanismo de activación por AMP. Las conclusiones de estos resultados fueron reforzadas mediante estudios de unión de ligando donde se determinó de qué forma AMP afecta los parámetros de unión de F6P a la enzima. Además, para corroborar las conclusiones obtenidas de esta forma, se realizaron estudios de modificación química utilizando el análogo de AMP fotoactivable 8-Azido-AMP.

La segunda parte de este trabajo consistió en rastrear evolutivamente la activación por AMP. Para ello se realizó un estudio cinético comparativo entre distintas enzimas de esta familia, cada una representando diversas ramas tales como PFKs de *Thermococcales*, GKs de *Thermococcales*, bifuncionales de *Methanococcales* y *Methanosarcinales*. Además, para caracterizar la ruta evolutiva de la aparición o conservación de la activación por AMP, se analizó la presencia de este rasgo en diversos ancestros reconstruidos de esta familia de enzima, específicamente ancM, ancT, ancMT y ancMMT (**Figura 3**).

Hipótesis

La activación por AMP en MmPFK/GK ocurre a través de un sitio alostérico mediante un cambio de afinidad por sustratos. La activación por AMP es un rasgo ancestral asociado a la bifuncionalidad, la que se habría perdido en las PFK de *Thermococcales* conjuntamente con la especialización de estas enzimas por F6P.

Objetivo general

Determinar el mecanismo cinético y de activación por AMP de MmPfk/GK. Estudiar la evolución de la activación por AMP en la familia de quinasas dependientes de ADP de *Archaea*.

Objetivos específicos

Caracterizar la activación por AMP de las actividades glucoquinasa y fosfofructoquinasa de MmPFK/GK.

- Determinar mecanismo cinético de MmPFK/GK.
- Determinar el mecanismo cinético de activación por AMP de MmPFK/GK.
- Determinar el efecto de AMP en los parámetros de unión de ligandos de MmPFK/GK.
- Determinar la existencia de un sitio alostérico mediante evidencia independiente de modelos.

Estudiar la evolución de la regulación por AMP en la familia de las quinasas dependientes de ADP de *Archaea*.

- Estudiar comparativamente la regulación por AMP en proteínas bifuncionales de los ordenes *Methanococcales* (MmPFK/GK) y *Methanosarcinales* (MzPFK/GK), y de GK y PFK específicas de *Thermococcales* (TIGK y PhPFK).
- Estudiar la evolución de la regulación por AMP mediante la caracterización de proteínas ancestrales reconstruídas de la familia de quinasas dependientes de ADP (ancM, ancT, ancMT y ancMMT).

2 Materiales y Métodos

2.1 Materiales.

2.1.1 Cepas

Para recircularizar y almacenar plásmidos se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α , que tiene un genotipo F-80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1. Para expresión de proteínas se utilizó la cepa *E. coli* BL21(DE3), cuyo genotipo es fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ nin5. Esta última cepa contiene el gen de la polimerasa del fago en su genoma, bajo el control de un operador *lac*, por lo que es inducible utilizando IPTG.

2.1.2 Medios de cultivo (LB, LB-agar)

El medio Luria-Bertani (*LB*) se preparó utilizando 10 gr/L de triptona o peptona, 5 gr/L de NaCl y 5 gr/L de extracto de levadura. Se autoclavó para dejarlo en condiciones de esterilidad.

Las placas LB-agar se prepararon utilizando medio LB al que se le agregó 15 gr/L de agar (obtenido en Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, Estados Unidos)). Éste se autoclavó y, estando aún líquido a una temperatura de 40-50 °C, se agregó el antibiótico Kanamicina para luego dejar solidificar en una placa Petri estéril.

2.1.3 Reactivos químicos

Los reactivos tales como glucosa, F6P, AMP, NAD, NADH, nucleótidos, buffers,

etc. Se adquirieron a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, Estados Unidos).

El ADP utilizado también se adquirió a Sigma-Aldrich, cuyo código es A2754. El reactivo

8-azido-AMP fue adquirido a Jena Bioscience (Jena Bioscience, Jena, Alemania).

2.1.4 Soluciones

Soluciones para purificación de proteínas:

Buffer A: Tris-HCl pH 7,8 50 mM; NaCl 0,5 M; MgCl₂ 5 mM; β-mercapto 2 mM; Imidazol 20 mM.

Buffer B: Tris-HCl pH 7,8 50 mM; NaCl 0,5 M; MgCl₂ 5 mM; β-mercapto 2 mM; Imidazol 0,5 M.

Buffer TG-SDS10X: Se preparó utilizando 30,2g de Tris, 144 g de glicina y 10 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) en un litro, ajustando a pH 8,4.

2.2 Métodos

2.2.1 Aislamiento de plásmidos

Los plásmidos fueron purificados utilizando un kit comercial (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II; Omega Bio-Tek, Norcross, GA, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2 Expresión y purificación de MmPFK/GK

El gen con la secuencia codificante de la proteína se encuentra subclonado en un vector de expresión pET-TEV (pET-28a modificado) con un *tag* de histidina en el extremo N-terminal. Este *tag* se encuentra separado del resto de la proteína por un sitio de corte para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV).

El plásmido que posee el gen de la proteína fue incorporado en una cepa de expresión BL21 (DE3) mediante quimiotransformación. Las bacterias fueron seleccionadas mediante resistencia al antibiótico Kanamicina utilizando placas de LB-Agar que contenían dicho antibiótico a 35 µg/ml. En este plásmido, el gen (cDNA) de la proteína posee un promotor para la polimerasa del fago T7, por lo que al agregar IPTG en el medio la bacteria comenzará la expresión de la proteína de interés.

Para la expresión y purificación de la proteína, las bacterias transformadas se crecieron en medio LB a 37 °C hasta llegar a una OD entre 0,6 y 0,7. En ese momento se agregó IPTG 1 mM y se dejó induciendo la expresión de la proteína durante toda la noche a 30 ° C. Luego las bacterias fueron decantadas mediante centrifugación a 6.000 rpm por 20 minutos (Rotor F12-6x500lex, Thermo Scientific). El sedimento fue resuspendido en

50 ml de *Buffer A* y las bacterias lisadas en frío por sonicación utilizando un sonicador Digital Sonifier 450, Branson, con un total de 4 minutos totales de sonificado mediante pulsos de 20 segundos separados por pausas de 1 minuto. La parte soluble del extracto crudo se obtuvo mediante centrifugación a 18.000 rpm por 20 minutos (Rotor F21-8x50y, Thermo Scientific) descartando el sedimento. El extracto soluble fue cargado en una columna HisTrap (GE Healthcare) equilibrada previamente con *Buffer A* y luego lavada con 10 volúmenes de columna del mismo *buffer*. Posteriormente la proteína fue eluída mediante un gradiente de imidazol hasta llegar a 500 mM (de 0 a 100 % *Buffer B*) utilizando para ello un sistema Äkta (General Electric). La elución de la columna fue seguida mediante Abs. 280 nm y se colectó el pico cromatográfico de mayor área y con actividad GK.

La proteína fue almacenada en el mismo *Buffer* en que fue colectada después de la elución. Para corroborar su estabilidad se midió periódicamente la actividad específica (actividad GK en condiciones saturantes de sustrato, utilizando las siguientes condiciones: HEPES-NaOH pH 7,8 50 mM; glucosa 200 mM; ADP 20 mM; MgCl₂ libre 25 mM; NAD⁺ 0,2 mM) durante todo el tiempo que fue utilizada. Solo se utilizó la enzima que presentara una actividad específica de no menos de un 90 % de la que tenía cuando fue purificada.

2.2.3 Generación de proteínas ancestrales.

Las proteínas ancestrales utilizadas ya se han purificado y estudiado ampliamente en el laboratorio (Castro-Fernandez 2015). Su secuencia fue inferida utilizando un

método de análisis Bayesiano de acuerdo con lo reportado por Castro-Fernandez 2015 y Castro-Fernandez et al. 2017. Las proteínas se expresaron en *E. coli* BL21 y se purificaron de siguiendo el protocolo de purificación utilizado en Castro-Fernandez 2015 y Castro-Fernandez et al. 2017.

2.2.4 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford, empleando albúmina de suero de bovino como estándar.

2.2.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes.

Las muestras (con una masa total específica de proteína) se diluyeron en una solución que contenía Tris-HCl pH 7,6 60 mM, SDS 10%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol al 0.02% (*mix* de carga) y fueron calentadas a 95 °C por 5 minutos. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 12%, en presencia de la solución *TG-SDS* 1X, a un amperaje constante de 40 mA. Una vez finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Coomassie 0.1% y fueron desteñidos con una mezcla de metanol 40% y ácido acético 10% para luego ser lavados en agua.

Para determinar la pureza de una muestra de proteína, se cargaron 20 μ g de proteína total por cada carril de un gel. En los casos donde la concentración de proteína era demasiado baja como para cargar la cantidad deseada de muestra en el gel, se procedió a precipitar la proteína con ácido tricloroacético (TCA) 10% por 1 hora en hielo. Luego de esto la muestra se centrifugó a 18.000 g durante 20 minutos manteniendo la cadena de frío. Para eliminar el TCA se utilizó etanol 100 % (previamente enfriado a -80

°C), realizándose 4 lavados con 1 ml manteniendo siempre la cadena de frío. Posteriormente se dejó evaporar el resto del etanol a temperatura ambiente. El pellet de proteína fue disuelto con el *mix* de carga y calentado a 95 °C por 5 minutos para luego ser cargado en el gel y realizar la electroforesis.

2.2.6 Preparación, cuantificación y control de calidad del ADP.

Un gramo de reactivo ADP fue disuelto en aproximadamente 4 ml de buffer Tris-HCl pH 9,0 50 mM directamente en el envase que viene de fábrica, conservando una cadena de frío durante todo el proceso. Una vez disuelto se procedió inmediatamente a neutralizar la solución agregando NaOH 1 M hasta alcanzar un pH de alrededor de 7,0.

La cuantificación del reactivo se realizó mediante titulación enzimática utilizando una glucoquinasa dependiente de ADP, acoplado una reacción auxiliar de producción de NADH (ver más adelante medición de actividad enzimática), en donde ADP es el reactivo limitante. La especificidad de la reacción permite calcular en forma exacta la concentración de ADP presente en solución sin interferencia de contaminantes tales como ATP, AMP o Adenosina. Junto con esto, la concentración total de nucleótidos de adenina en solución (AMP, ADP, ATP y adenosina) se determinó midiendo la absorbancia a 259 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de $15,4 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (indicaciones de Sigma-Aldrich). Esto permite calcular el porcentaje total de los posibles contaminantes.

Para evaluar la pureza del reactivo ADP de forma independiente y evaluar cuantitativamente la presencia de AMP contaminante, se determinó el porcentaje de

cada componente en la solución (adenosina, AMP, ADP y ATP) mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Mono Q 5/10 (Pharmacia) de 1 ml acoplada a un sistema HPLC Waters 1525. La columna se equilibró con un buffer Tris-HCl pH 7,5 20 mM a temperatura ambiente. Una vez cargada la muestra (consistente en solución de ADP diluida 1.000 veces en agua nanopura) en la columna mediante un *loop* de 20 μ L, se procedió a realizar un gradiente de 10 ml hasta llegar a una concentración de NaCl de 1 M. Los picos cromatográficos fueron detectados midiendo absorbancia a 259 nm utilizando un detector Waters 2487. Para calcular el porcentaje de cada uno de los componentes de la solución se midió el área bajo la curva de cada uno de los picos cromatográficos, la que se normalizó por la suma de las áreas de todos los picos obtenidos. De esta forma se puede obtener con gran exactitud el porcentaje de cada uno de los contaminantes presentes en la solución. Usualmente no se encontró adenosina y el contenido de ATP fue siempre menor al 1%. Los experimentos se realizaron con soluciones que no contuviesen más de 5 % de AMP. Así mismo, la concentración de AMP obtenida mediante este método fue considerada a la hora de realizar las mediciones de actividad enzimática.

2.2.7 Medición de actividad enzimática.

Todas las mediciones de actividad enzimática realizadas se hicieron dejando fija la concentración de Mg^{2+} libre. Para esto se calculó dicha concentración del complejo MgADP en función del Magnesio total y el ADP total utilizado en cada ensayo, considerando una constante de disociación para MgADP de 676 mM (obtenida utilizando

NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes: Version 8.0). para esto se utilizó la siguiente fórmula:

$$[MgADP] = \frac{[ADP]_t + [Mg^{2+}]_t + K_d^{MgADP} - \sqrt{([ADP]_t + [Mg^{2+}]_t + K_d^{MgADP})^2 - 4[ADP]_t[Mg^{2+}]_t}}{2}$$

con lo que $[Mg^{2+}]_{libre} = [Mg^{2+}]_t - [MgADP]$

Ecuación 1

La actividad Glucoquinasa (GK) dependiente de ADP se midió mediante un ensayo continuo. La producción de glucosa-6-P se midió en el tiempo acoplándola a la producción de NADH usando la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* y se siguió espectrofotométricamente por el aumento de la absorbancia a 340 nm. Los ensayos enzimáticos se realizaron a pH 7,8 utilizando amortiguador HEPES-NaOH 50 mM, NAD⁺ 0,5 mM, Mg²⁺ libre 1 mM y concentraciones variables de glucosa, MgADP y AMP, además de otros nucleótidos cuando fue el caso.

La actividad fosfofructoquinasa (PFK) dependiente de ADP se midió utilizando un ensayo continuo. La producción de fructosa-1,6-bisP se midió en el tiempo acoplándola al consumo de NADH utilizando como enzimas auxiliares aldolasa, triosa-P isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa, todas de músculo de conejo. La reacción fue seguida espectrofotométricamente mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm en el tiempo. Los ensayos enzimáticos se realizaron a pH 6,5 utilizando amortiguador PIPES-NaOH 50 mM, además de NADH 0,2 mM, Mg²⁺ libre 1 mM (suplementado como sal de cloruro y calculado de igual forma que para la actividad GK) y concentraciones variables de F6P, MgADP y AMP, o de otros nucleótidos cuando fue el caso.

Para los ensayos de ambas actividades se utilizó un exceso de enzimas auxiliares de tal forma que no constituyeran la etapa limitante de la reacción. La velocidad inicial se obtuvo mediante el ajuste de una recta mediante regresión lineal sobre los datos de absorbancia a 340 nm en función del tiempo, obteniéndose la pendiente. Para el cálculo de las unidades enzimáticas se utilizó un coeficiente de extinción del NADH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y éstas se expresaron en $\mu\text{mol}/\text{min}$, a partir de lo que se calculó la actividad específica normalizando por los mg totales de proteína presentes en el ensayo.

La actividad enzimática fue medida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando un espectrofotómetro con arreglo de diodos HP 8453 o mediante ensayos en placas de 96 pocillos como se explicará en la siguiente sección.

2.2.8 Ensayos cinéticos en placas de 96 pocillos

Para realizar los ensayos cinéticos de estado estacionario a distintas concentraciones del sustrato azúcar, de MgADP y de AMP, se utilizaron placas de 96 pocillos fabricadas con un plástico que no absorbe radiación ultravioleta. La medición se realizó en un detector de placas (synergy 2, Biotek). Las condiciones de reacción se prepararon en cada pocillo de la placa utilizando los dispensadores del equipo. Cada placa contenía una concentración fija de MgADP; por otro lado, cada columna contenía una concentración fija del azúcar (F6P o glucosa) y cada fila una concentración fija de AMP. El porcentaje de AMP contaminante de las soluciones *stock* de ADP fue considerado para que las concentraciones de AMP en cada columna fuesen las mismas en cada placa.

En el caso de los ensayos de actividad PFK, en cada placa se realizó un control interno. Este consistió en una condición de reacción que fue repetida exactamente igual en cada placa que se ensayó. Todos los valores de actividad obtenidos para una placa se corrigieron utilizando el valor de actividad obtenido este control interno.

En cada caso la reacción fue comenzada dispensando 20 μL de solución de enzima en cada pocillo utilizando una pipeta multicanal de 12 puntas. Para cada ensayo se realizó un control no enzimático que se restó a cada medición de actividad, el que consistió en todos los reactivos del ensayo (incluyendo enzimas auxiliares) con excepción de MmPFK/GK.

Las pendientes de las curvas de progreso obtenidas fueron estimadas mediante regresión lineal utilizando el software del equipo (Gen5) y cada una fue corregida considerando un paso óptico de 1 cm.

2.2.9 Análisis de resultados de cinética en estado estacionario

Las actividades específicas fueron expresadas en función de la concentración del azúcar (glucosa o F6P), MgADP o AMP (u otro nucleótido) dejando fijas las concentraciones de los otros dos componentes.

Los parámetros cinéticos para cada sustrato se determinaron mediante ajustes no lineales utilizando una concentración específica y fija de cosustrato y de AMP. A cada curva de saturación obtenida se le ajustó un modelo Michaeliano, vale decir, una hipérbola que intersecta el origen (ecuación 2) o de inhibición por sustrato (ecuación 3) según fuese el caso. $[S]$ corresponde a la concentración del sustrato, V_m a la velocidad

máxima, K_m a la constante de Michaelis-Menten y K_i a la constante de inhibición por sustrato.

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Para los ensayos en que se midió el efecto de AMP u otro nucleótido o efector sobre la actividad enzimática, se dejó fija la concentración de ambos sustratos y los valores de actividad específica fueron normalizados por el valor de la actividad en ausencia de AMP o del efector ensayado, obteniéndose el porcentaje de actividad en función del efector. Las ecuaciones utilizadas para ajustar a los datos son las siguientes, donde A corresponde al efector que se está evaluando.

Si solo se observa inhibición, se ajusta una hipérbola decreciente que interseca el eje Y, con una asíntota en cero.

Ecuación 4

$$V = \frac{V_0 K_{0,5}}{K_{0,5} + [A]}$$

En esta ecuación, V_0 corresponde a la intersección con el eje Y (100 % o actividad en ausencia de efector).

Si solo se observa activación, se ajusta una hipérbola que interseca el eje Y con una asíntota distinta de cero.

$$V = \frac{V_0 K_{0,5} + V_m' [A]}{K_{0,5} + [A]} \quad \text{Ecuación 5}$$

En esta ecuación, V_0 corresponde a la intersección con el eje Y, y V_m' a la asíntota de la función cuando $[A]$ tiende a infinito.

Si se obtiene una curva que contiene un máximo y luego un decaimiento (vale decir, efecto activador e inhibidor por parte de A) se ajusta la siguiente ecuación fenomenológica.

$$V = \frac{V_0 K_{A'} + V_m' [A]}{K_{A'} + [A] + \frac{[A]^2}{K_I}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde V_0 corresponde a la intersección con el eje Y (100 % o actividad en ausencia de efector), V_m' a la actividad máxima si es que no existiera el componente inhibitorio, $K_{A'}$ a la $K_{0,5}$ de la curva si no existiese componente inhibitorio y K_I corresponde a la constante de inhibición observada (vale decir, la $K_{0,5}$ si es que no existiera el componente activador).

Para la realización de ajustes globales, se determinaron las ecuaciones de velocidad inicial en función de ambos sustratos para distintos mecanismos y se ajustaron a los datos de velocidad inicial obtenidos a distintas concentraciones de ambos sustratos. La deducción de las ecuaciones se presentará en la sección de resultados.

2.2.10 Ajustes no lineales y determinación del error en la estimación de parámetros

Los ajustes de los modelos a los datos se realizaron utilizando programas comerciales como Sigma Plot, Graphpad prism o el complemento Solver de Microsoft Excel. Cuando se usaron los dos primeros, el error de ajuste se obtuvo directamente de

lo reportado por los programas. Cuando se utilizó Microsoft Excel los errores se calcularon como se detalla en Asúa et al. 2006, obteniéndose la matriz de covarianza del ajuste y, a partir de ésta, el error para cada parámetro.

Para discriminar entre modelos se utilizó el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Yamaoka et al. 1978) cuya fórmula es la siguiente:

$$AIC = nd * \ln\left(\frac{SRC}{nd}\right) + 2 \frac{nd(np + 1)}{nd - np - 2} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde nd corresponde al número de datos, np al número de parámetros de la ecuación ajustada y SRC a la suma de los residuales al cuadrado.

2.2.11 Estudios termodinámicos de unión de ligandos.

Debido a que MmPFK/GK no contiene triptófano, para realizar mediciones de fluorescencia intrínseca se utilizó la mutante N203W (Kern 2016), dado que en ésta es posible detectar unión de ligandos a la proteína mediante este método. Además, esta mutante no presenta alteración de parámetros cinéticos.

El efecto de AMP sobre los parámetros termodinámicos de la unión de F6P se determinó por experimentos de titulación con el azúcar siguiendo la señal de fluorescencia intrínseca.

Soluciones de 1,2 ml de proteína 0,3 mg/ml (en Buffer PIPES-NaOH pH 6,5 50 mM; NaCl 0,1 M; DTT 2 mM) en presencia de distintas concentraciones fijas de AMP se titularon con F6P. Para cada concentración de F6P se obtuvo un espectro de emisión entre 305 y 450 nm luego de una excitación a 295 nm utilizando un fluorímetro Jasco FP-8300. El área bajo la curva de cada espectro fue calculada utilizando el método de los

trapezios. Cada una de estas áreas fue corregida por la dilución producida por la titulación con F6P (que en ningún caso fue más del 5 % del volumen original) y se le restó un blanco consistente en una titulación realizada sobre una solución equivalente, pero en ausencia de proteína. A partir de estas áreas corregidas se calculó el porcentaje de apagamiento utilizando la siguiente fórmula

$$Q\% = 100 \frac{F_0 - F_{obs}}{F_0} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde F_0 es el área bajo la curva del espectro obtenido en ausencia de ligando y F_{obs} es el área bajo la curva corregida del espectro obtenida cada concentración específica de ligando.

2.2.12 Modificación química con AzidoAMP

Para estudiar las propiedades de los sitios activo y alostérico, además de la estequiometría de unión de AMP, se realizaron experimentos de modificación química con 8-Azido-AMP, un análogo de AMP que al ser expuesto a luz UV genera un intermediario altamente reactivo consistente en un grupo nitreno capaz de reaccionar con grupos amino, alquilo y enlaces dobles (ver por ejemplo Baruah et al. 2008 y Murale et al. 2017). Soluciones de 50 μ L de MmPFK/GK con una concentración de 0,1 mg/ml en presencia de de 8-Azido-AMP 5 mM y diversas combinaciones de ligando (Glucosa, F6P, MgADP y AMP) fueron expuestas a luz UV por distintos tiempos utilizando un transiluminador. En cada tiempo de exposición se extrajeron alícuotas a las que se les midió la actividad enzimática GK en concentraciones saturantes de sustratos. Junto con

esto, con las alícuotas se realizaron ensayos de activación por AMP midiendo la actividad GK a una concentración constante de sustratos cercanas a sus respectivas K_m (Glucosa 2 mM; MgADP 1 mM; Mg libre 5 mM) y variando la concentración de AMP.

Para determinar la estequiometría de la modificación se incubó una muestra en presencia de 8-Azido-AMP 5 mM en ausencia de otros ligandos (en Buffer HEPES-NaOH pH 7,8 50 mM; DTT 2 mM), la que se expuso a luz UV durante 15 minutos. Lo mismo se hizo con una muestra control en ausencia de Azido-AMP. A ambas muestras se les intercambió el buffer y extrajo el 8-Azido-AMP sin reaccionar pasándolas por una columna Micro Bio-Spin™ (Bio-Rad). Luego de esto a ambas se les determinó la concentración de proteína utilizando el método de Bradford y se les midió absorbancia a 280 nm y a 259 nm. Utilizando la concentración de proteína determinada mediante Bradford y el coeficiente de extinción de Adenosina a 259 nm se obtuvo la cantidad de 8-Azido-AMP que reaccionó por cada proteína.

3 Resultados

3.1 Caracterización preliminar de MmPFK/GK

3.1.1 Expresión, purificación y almacenamiento de MmPFK/GK

MmPFK/GK fue purificada según se describe en la sección de materiales y métodos. En todas las purificaciones se obtuvo una actividad específica de aproximadamente 15 U/mg a concentraciones saturantes de sustrato. El rendimiento fue de alrededor de 10 miligramos de proteína pura por litro de cultivo. En la **Figura 4A** se observa un gel donde se muestran las distintas etapas de purificación.

La proteína purificada se almacenó a 4 °C en las mismas condiciones en las que eluyó de la columna HisTrap, a una concentración de alrededor de 5 mg/ml. En estas condiciones, la enzima se mantuvo estable durante un intervalo de tiempo de más de dos meses, sin cambios en la actividad específica (**Figura 4B**) ni en la concentración total de proteína. Hasta los dos meses tampoco se observó aparición de algún precipitado en la solución.

3.1.2 Curvas de saturación para MmPFK/GK

Se realizó una caracterización previa de la cinética en estado estacionario de MmPFK/GK. Para esto se obtuvieron curvas de saturación para cada uno de los sustratos a una concentración fija y saturante de cosustratos para actividades enzimáticas. Esto se realizó a dos concentraciones extremas de AMP (0,1 mM y 20,3 mM para la actividad GK; 0,16 mM y 10 mM para la actividad PFK).

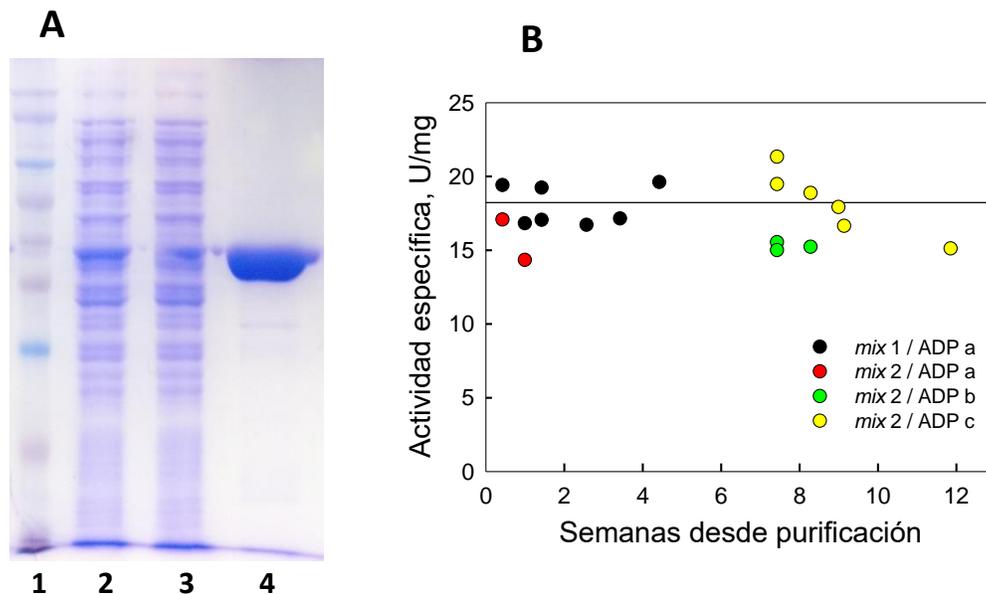


Figura 4. Pureza y estabilidad de MmPFK/GK seguida mediante actividad específica.

A) Gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS) 1. Estandar de peso molecular; 2. Extracto crudo; 3. Frente de la columna HisTrap; 4. Proteína purificada. En cada carril se cargaron 20 μg de proteína total. B) Se midió periódicamente la actividad específica glucoquinasa desde que la enzima fue purificada. Durante todo el tiempo la proteína estuvo almacenada a 4 °C en una solución que contenía Tris-HCl pH 7,8 50 mM; MgCl_2 5 mM; NaCl 0,5 M; β -mercapto 2 mM; Imidazol 0,25 M. La velocidad inicial se midió mediante un ensayo acoplado G6PDH, como se describe en la sección de materiales y métodos, a 25 °C en HEPES-NaOH 50 mM; MgCl_2 25 mM; ADP 20 mM; Glucosa 200 mM; NAD^+ 0,2 mM; pH 7,8. Mediante *mix 1* y *mix 2* se denotan dos preparaciones diferentes del mismo medio de reacción. Éste se preparó 5 veces concentrado y contenía todos los componentes previamente mencionados con excepción de ADP y de las enzimas auxiliares. Con “ADP a”, “ADP b” y “ADP c” se denotan tres preparaciones diferentes de ADP *stock*. La línea horizontal representa el promedio de las dos primeras mediciones de actividad realizadas el mismo día.

Como puede observarse en la **Figura 5**, para la actividad GK se obtuvo que las curvas de saturación para glucosa presentan inhibición por sustrato, en cambio, las curvas de saturación para MgADP presentaron un comportamiento Michaeliano. Algo análogo se observa para la actividad PFK, en donde las curvas de saturación para F6P presentaron inhibición por sustrato y las para MgADP un comportamiento Michaeliano. Por esta razón, a las curvas para el azúcar se les ajustó un modelo de inhibición por sustrato canónica (ecuación 3) y a las curvas de MgADP se les ajustó una hipérbola Michaeliana (Ecuación 2). Con estos ajustes se obtuvieron los parámetros cinéticos V_m , K_m y K_i para cada uno de los sustratos a las dos concentraciones de AMP ocupadas para cada una de las actividades enzimáticas, los que se observan en la **Tabla 1**.

Los valores de V_m para la actividad GK fueron levemente mayores que los obtenidos para la Actividad PFK tanto para el sustrato azúcar como para MgADP. Sin embargo, para la actividad PFK los valores de K_m para ambos sustratos fueron menores que para la actividad GK. Especialmente notable es el valor para K_m del sustrato azúcar, donde los valores para K_m^{F6P} fueron alrededor de tres ordenes de magnitud más bajos que los obtenidos para K_m^{Glu} . Así mismo, la inhibición por sustrato azúcar en la actividad PFK es mayor que en la actividad GK, obteniéndose valores de K_i^{F6P} de alrededor de dos ordenes de magnitud menores que los valores obtenidos para K_i^{Glu} .

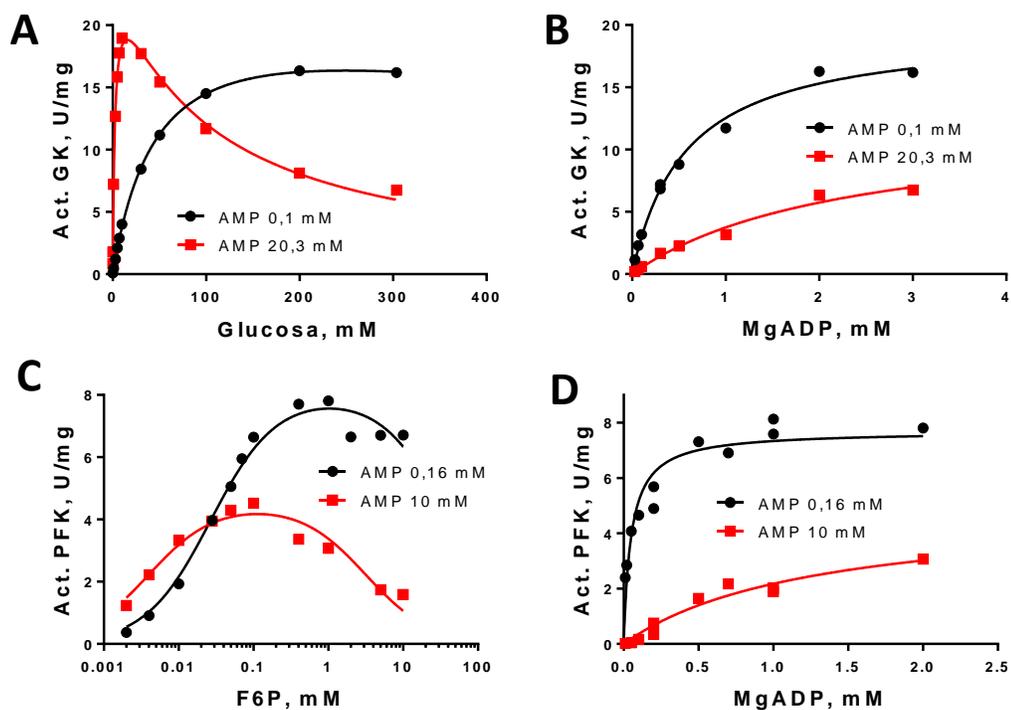


Figura 5 Caracterización cinética preliminar de MmPFK/GK.

Se realizaron curvas de saturación para cada sustrato de ambas actividades enzimáticas a dos concentraciones fijas de AMP (indicadas en la figura). A) curvas de saturación para glucosa a una concentración fija saturante de MgADP (3 mM). B) curvas de saturación para MgADP (act. GK) a una concentración fija saturante de glucosa (300 mM). C) curvas de saturación para F6P a una concentración fija saturante de MgADP (2 mM), el eje X se encuentra en escala logarítmica. D) curvas de saturación para MgADP (act. PFK) a una concentración fija saturante de F6P (1 mM).

	GK			PFK	
	AMP 0,1 mM	AMP 20,3 mM		AMP 0,16 mM	AMP 10 mM
V_m^{Glu} , U/mg	22,9 ± 0,5	24,9 ± 1,1	V_m^{F6P} , U/mg	8,0 ± 0,3	4,5 ± 0,2
K_m^{Glu} , mM	50,2 ± 2,0	2,5 ± 0,3	K_m^{F6P} , mM	0,027 ± 0,004	0,004 ± 0,001
K_i^{Glu} , mM	1.237 ± 152	95,8 ± 10,6	K_i^{F6P} , mM	30 ± 15	3,1 ± 0,8
V_m^{MgADP} , U/mg	19,7 ± 0,8	12,3 ± 1,9	V_m^{MgADP} , U/mg	7,7 ± 0,4	4,9 ± 1,0
K_m^{MgADP} , mM	0,57 ± 0,06	2,3 ± 0,7	K_m^{MgADP} , mM	0,049 ± 0,013	1,3 ± 0,5

Tabla 1 Parámetros cinéticos para MmPFK/GK.

Los parámetros cinético se obtuvieron a partir de los ajustes realizados sobre las curvas que se muestran en la **Figura 5**.

En la actividad GK AMP no produjo alteraciones considerables en V_m^{Glu} , sin embargo, produjo una pequeña disminución en V_m^{MgADP} . En ambas actividades la presencia de AMP produce una disminución considerable en la K_m para el sustrato azúcar, pero un leve incremento para la K_m de MgADP. Por otro lado, en ambas actividades, la inhibición por el sustrato azúcar presentó un aumento considerable en presencia de AMP, lo que se traduce en una disminución de alrededor de un orden de magnitud en K_i^{glu} y K_i^{F6P} dependiendo de la actividad considerada.

3.1.3 MmPFK/GK es activada por AMP

Como se observa en la **Figura 6A**, tanto la actividad GK como la actividad PFK de son activadas por AMP cuando los sustratos están en concentraciones cercanas a sus respectivas K_m . Al aumentar la concentración de AMP, ambas actividades aumentan hasta llegar a un máximo en alrededor de 5 mM de AMP para GK y 1 mM para PFK, para luego comenzar a disminuir, pero sin llegar a inhibirse la enzima en el intervalo de concentraciones de AMP ensayadas. En el caso de la actividad PFK, la activación es considerablemente menor que en la actividad GK. Mientras que la actividad PFK muestra un aumento de alrededor de 4 respecto a la actividad en ausencia de AMP, la actividad GK aumenta 7,5 veces. El descenso posterior al máximo de actividad es consecuencia del efecto inhibitorio de AMP como producto de la reacción. Por lo tanto, se espera que, si se aumenta la concentración de MgADP hasta llegar a saturación, este efecto inhibitorio se vea considerablemente disminuido. Dicho intuitivamente, al saturar con MgADP el sitio activo, AMP no podrá unirse y, por lo tanto, no podrá inhibir a la enzima.

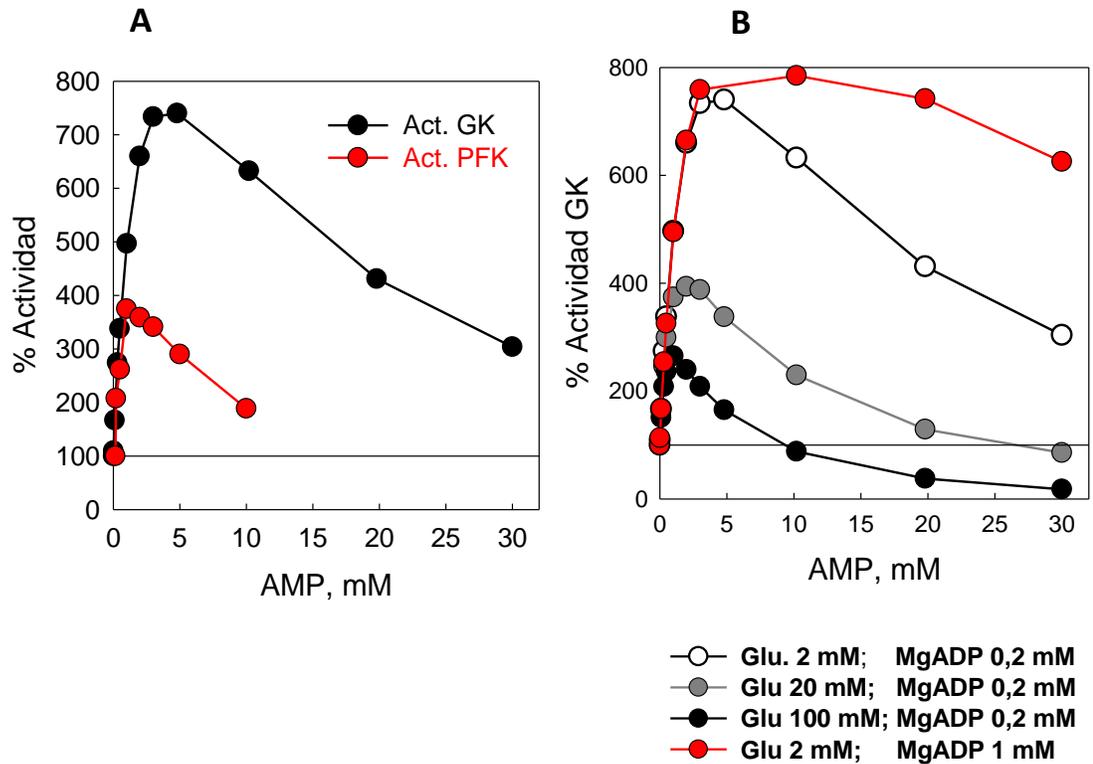


Figura 6. Activación de MmPFK/GK por AMP.

A) Efecto de AMP en la actividad enzimática de MmPFK/GK, actividades GK (●) y PFK (●). En ambos casos la actividad enzimática se midió variando solo la concentración de AMP a una concentración fija de sustratos. La actividad GK fue ensayada en Buffer HEPES-NaOH pH 7,8 50 mM, glucosa 2 mM, MgADP 0,2 mM y Mg^{2+} libre 1 mM, NAD^+ 0,2 mM. La actividad PFK fue ensayada en Buffer PIPES-NaOH pH 6,5 50 mM, F6P 0,01 mM, MgADP 0,1 mM y Mg^{2+} libre 1 mM, NADH 0,25 mM. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad enzimática en ausencia de AMP. B) Activación por AMP en la actividad GK, medida y expresada de igual forma que en (A), a distintas concentraciones de sustrato, las que se indican en la lista debajo de la figura. (Los datos de actividad para glucosa 2 mM, MgADP 0,2 mM son los mismos que se muestran para la actividad GK en (A)).

En la **Figura 6B** se muestran ensayos de activación por AMP para la actividad GK realizados a distintas concentraciones de sustratos. Puede observarse que en condiciones donde la concentración de MgADP es cercana a la K_m para ese sustrato (ver **Tabla 1**), un aumento en la concentración de glucosa provoca una activación por AMP cada vez menor, pasando de alrededor de 8 veces de activación a 3 veces. Además, el descenso de la actividad posterior al máximo se hace cada vez más pronunciado, lo que implica que la enzima se inhibe a concentraciones cada vez menores de AMP.

Contrariamente, en condiciones donde el sustrato glucosa se mantiene fijo y a concentraciones bajas, el aumento en la concentración de MgADP produce un leve aumento en la cantidad máxima de activación, y una considerable disminución en el efecto inhibitorio del AMP. Esto es esperable, dado que cuando MgADP se encuentra en una concentración saturante se evita la acción inhibitoria de AMP como producto, lo que tiene como consecuencia que el efecto activador sea dominante por sobre la inhibición.

Con los resultados obtenidos hasta ahora no es posible postular aún un mecanismo de activación. Sin embargo, son compatibles con un mecanismo en que AMP aumenta la afinidad por glucosa, ya que, al aumentar la concentración de este sustrato manteniendo fija la concentración de MgADP, se produce una disminución del efecto activador. En ese caso, esto se podría explicar dado que al saturar con glucosa los cambios en la afinidad por ese sustrato no afectarían la actividad. Si la activación ocurriese solo mediante un aumento en la catálisis, se esperaría que este efecto no disminuyese al aumentar la concentración de algún sustrato.

3.2 Especificidad del efecto activador: Efecto de distintos nucleótidos, nucleósidos y fosfato en actividad de MmPFK/GK

Para determinar la especificidad del putativo sitio alostérico para AMP de MmPFK/GK, se analizó el efecto de varios nucleótidos monofosfato y nucleósidos en la actividad GK y PFK de la enzima. Además de AMP se ensayaron los nucleótidos monofosfato desoxi-AMP, GMP, IMP, CMP, UMP y TMP, junto con los nucleósidos adenosina y desoxi-adenosina (estos últimos dos solo para la actividad GK). Adicionalmente, también se evaluó el efecto de fosfato en la actividad enzimática.

En la actividad GK (**Figura 7A**), desoxi-AMP tiene un efecto activador similar al de AMP. En el caso de las purinas monofosfato ensayadas se encontró que GMP tiene un efecto inhibitorio de más de un 80%; IMP produce una leve inhibición, aunque mucho menor que la producida por GMP. En el caso de las pirimidinas, no se observó un efecto activador ni inhibitorio para CMP; para Uracilo se observó una leve activación, pero despreciable si se compara con la producida por AMP. Interesantemente, TMP produce una activación considerable en comparación con los otros nucleótidos de pirimidinas, llegando a un máximo de tres veces la actividad en ausencia del nucleótido y sin provocar inhibición de la enzima en el intervalo de concentraciones ensayadas. Finalmente, adenosina y desoxi-adenosina solo tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima, siendo la inhibición por adenosina mayor que la de desoxi-adenosina, llegando a valores similares a lo observado para GMP.

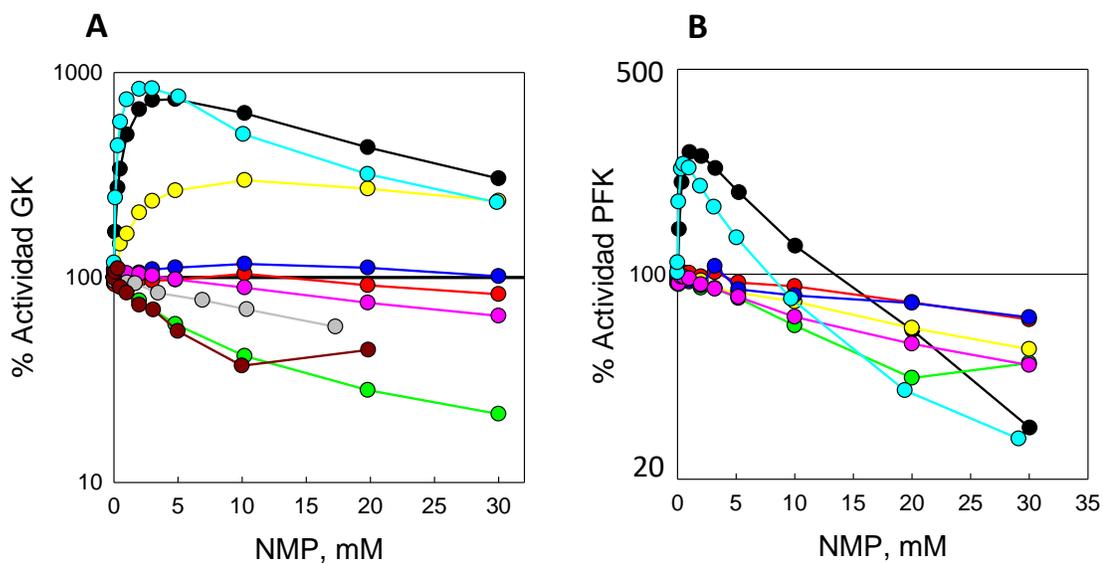


Figura 7. Efecto de distintos nucleótidos y nucleósidos en las actividades GK y PFK de MmPFK/GK.

A) actividad GK, B) actividad PFK. Los nucleótidos ensayados fueron ● AMP, ● desoxi-AMP, ● CMP, ● GMP, ● UMP, ● IMP, ● TMP, ● Adenosina, ● desoxi-Adenosina. Los ensayos fueron realizados a 25 °C en un lector de placas de 96 pocillos Synergy 2 (Biotek) variando solo la concentración de los efectores a una concentración fija de sustratos. La actividad GK fue ensayada en Buffer HEPES-NaOH pH 7,8 50 mM, glucosa 2 mM, MgADP 0,2 mM y Mg²⁺ libre 1 mM, NAD⁺ 0,2 mM. La actividad PFK fue ensayada en Buffer PIPES-NaOH pH 6,5 50 mM, F6P 0,07 mM, MgADP 1 mM y Mg²⁺ libre 5 mM, NADH 0,25 mM. Abreviaturas: CMP citidina monofosfato; GMP guanina monofosfato; UMP uridina monofosfato; IMP Inosina monofosfato; TMP timidina monofosfato.

Contrariamente a lo observado para la actividad GK, en la actividad PFK (**Figura 7B**), solo se encontró activación por desoxi-AMP, siendo ésta similar a la de AMP. Sin embargo, para todos los nucleótidos ensayados solo se observó inhibición, no encontrándose remanentes de activación para ninguno de ellos (**Figura 7B**). Además, en todos los casos esta inhibición fue menor que en el caso de las inhibiciones observadas para la actividad GK por parte de algún nucleótido.

Todos los experimentos mencionados hasta este punto fueron realizados en concentraciones de sustrato cercanas a sus respectivas K_m . Hasta ahora, sabemos que los nucleósidos y los nucleótidos de purina, salvo AMP y desoxi-AMP, solo producen inhibición y que los nucleótidos de pirimidina producen una leve activación o no tienen efecto en la actividad GK. Para analizar más a fondo el efecto de los distintos nucleótidos y nucleósidos sobre la actividad GK de esta enzima, se repitieron los ensayos para cada una de las moléculas, pero en presencia de distintas concentraciones de sustratos, de manera similar a lo realizado con AMP en la sección anterior (**Figura 6B**).

En la **Figura 8** se muestran los resultados de la actividad GK para los diferentes nucleótidos ensayados a distintas concentraciones de sustrato. Para desoxi-AMP (**Figura 8A**) el comportamiento fue similar al obtenido para AMP al variar la concentración de glucosa y MgADP (ver **Figura 6B**). Se observa una disminución del efecto inhibitor al aumentar la concentración de MgADP y un aumento considerable de este efecto cuando la concentración de glucosa es saturante y la concentración de MgADP es cercana a su K_m . En cambio, en presencia de IMP (**Figura 8B**) solo se observa una leve inhibición a

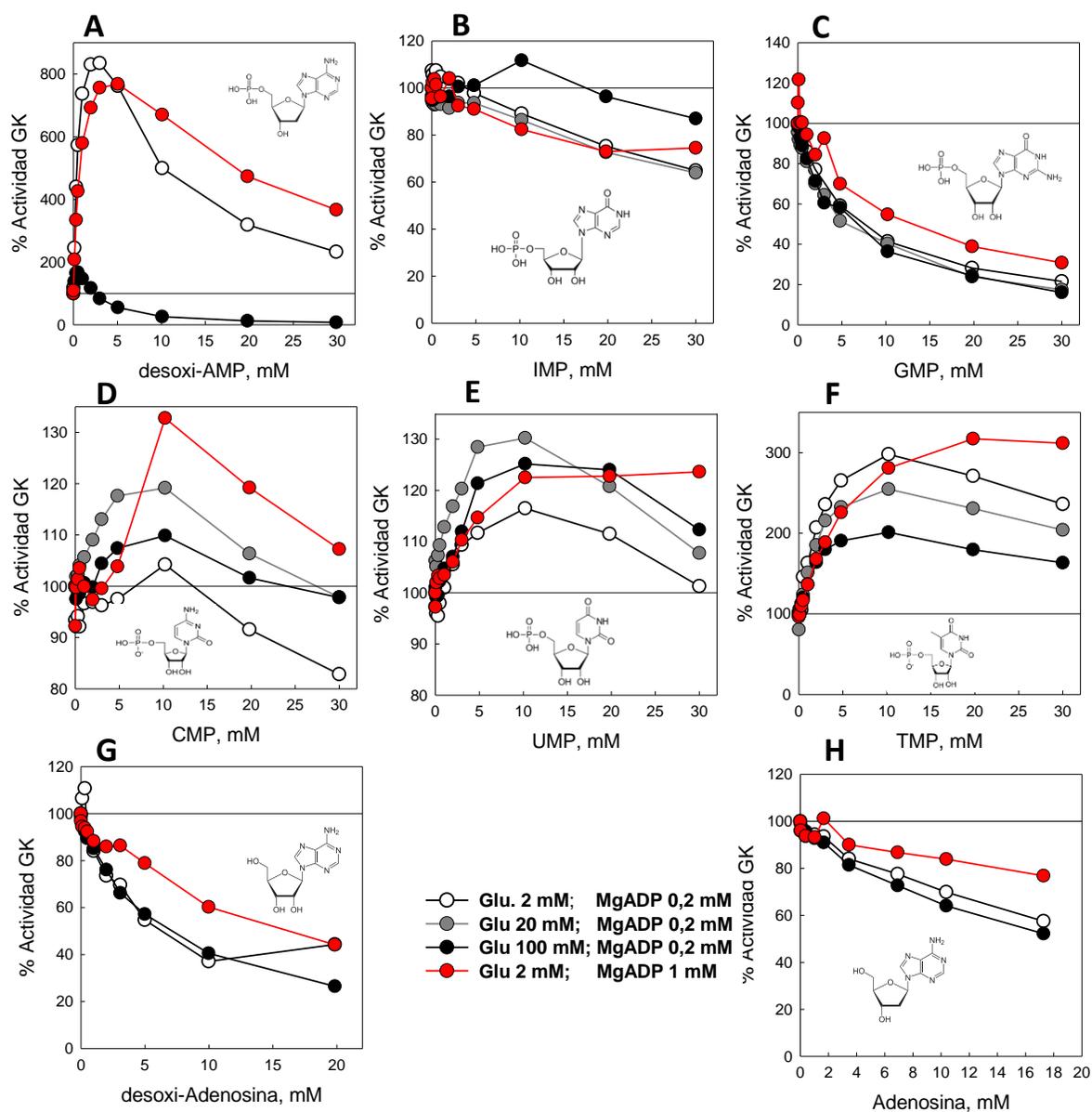


Figura 8. Efecto de distintos nucleótidos y nucleósidos en la actividad GK de MmPFK/GK a distintas concentraciones de sustrato.

Los efectores utilizados se indican en el eje X de cada figura; además, dentro de cada gráfico se muestra una representación molecular de la estructura de cada efector. Las concentraciones de sustrato se indican en la lista en la parte inferior de la figura. Los ensayos fueron realizados a 25 °C utilizando un ensayo acoplado G6PDH en Buffer HEPES-NaOH pH 7,8 50 mM, Mg libre 1 mM, NAD⁺ 0,2 mM a distintas concentraciones fijas de sustrato variando la concentración de cada uno de los efectores indicados. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad GK respecto a la actividad en ausencia de efector.

todas las concentraciones de sustrato utilizadas, no siendo mayor al 40 % en el intervalo de concentraciones de nucleótido ensayadas. Por otro lado, para GMP (**Figura 8C**) se observa un claro efecto inhibitorio a todas las concentraciones de sustrato utilizadas, el que no es afectado ante un cambio de la concentración de glucosa cuando MgADP se mantiene constante a bajas concentraciones. Sin embargo, al aumentar el MgADP a concentraciones saturantes, y manteniendo baja la concentración de glucosa, la inhibición se vuelve levemente menor.

En el caso de los nucleótidos monofosfato de pirimidinas, todos tuvieron un leve efecto activador. Para CMP (**Figura 8D**) y UMP (**Figura 8E**) se observaron leves variaciones en el efecto activador al variar las concentraciones de sustrato, sin embargo, éstas fueron de no más de un 20% de diferencia. Interesantemente, como se dijo anteriormente, en el caso de TMP (**Figura 8F**) se observa una activación considerablemente mayor que la observada para CMP y UMP, la que estuvo presente en todas las concentraciones de sustrato utilizadas, produciéndose una disminución del máximo de actividad a medida que se aumenta la concentración de glucosa. Sin embargo, a diferencia de AMP, TMP no llega a inhibir la enzima en el intervalo de concentraciones ensayadas, incluso a concentraciones saturantes de glucosa. Al saturar con MgADP el leve efecto inhibitorio del TMP se pierde, lo cual es consistente con lo que ocurre en el caso de AMP. Finalmente, tanto adenosina (**Figura 8G**) como desoxiadenosina (**Figura 8**) solo producen inhibición en la actividad GK, sin producirse cambios apreciables al aumentar la concentración de glucosa. Sin embargo, al aumentar

la concentración de MgADP este efecto disminuye levemente.

Además de todos los nucleótidos monofosfato mencionados, también se ensayó el efecto de fosfato en la actividad GK en concentraciones de sustratos cercanas a sus respectivas K_m , observándose solo inhibición con un IC 50% de 4,3 mM (**Figura 9**).

De estos resultados puede concluirse que el efecto alostérico posee una gran especificidad por AMP. En esta especificidad, el fosfato juega un rol importante en la unión del nucleótido, lo que se manifiesta en una pérdida total de activación cuando éste está ausente en la molécula, como se observa en los experimentos realizados con adenosina. Además, fosfato por si solo no tiene un efecto activador. Por otro lado, la estructura de la base nitrogenada es determinante para especificidad. En el caso de los nucleótidos de purina la presencia de la amina de la posición 6 del anillo de adenina es fundamental para la realización del efecto alostérico, su ausencia causa que el efecto activador no se produzca.

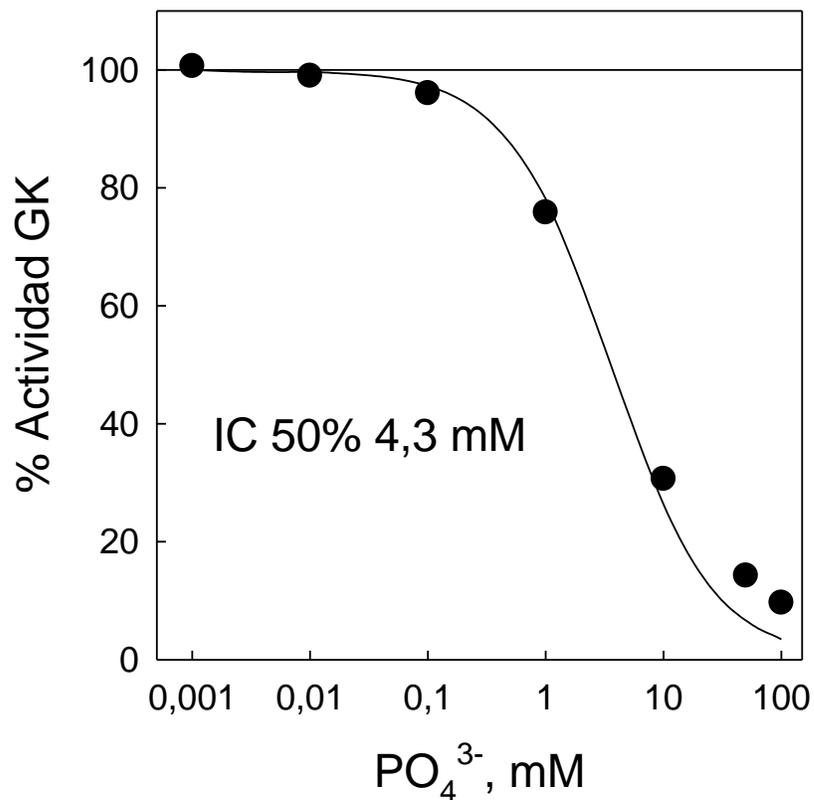


Figura 9. Efecto de fosfato en actividad GK.

Inhibición por Fosfato (como sal de sodio) en la actividad GK de MmPFK/GK, medida a una concentración fija de sustratos. Los ensayos se realizaron a 25 °C en un lector de placas Synergy 2 (Biotek) variando la concentración de Fosfato en Buffer Tris-HCl pH 7,8 50 mM; glucosa 2 mM, MgADP 0,2 mM; Mg libre 1 mM; NAD^+ 0,2 mM. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad GK medida respecto a la actividad en ausencia de efector. El eje X se encuentra en escala logarítmica. A los datos se ajustó una hipérbola descendente con asíntota en cero, a partir de esta se obtuvo el IC 50% que se observa en la figura.

3.3 Mecanismo cinético y mecanismo de activación por AMP de MmPFK/GK

MmPFK/GK es activada por AMP tanto en su actividad GK como PFK. Sin embargo, con la información disponible no es posible establecer el mecanismo mediante el cual esta activación ocurre. Para esto, se debe analizar el efecto que tiene AMP no solo en la actividad enzimática, sino que en los parámetros cinéticos de cada uno de los dos sustratos. Sin embargo, AMP es también el producto de la reacción, por lo que además de ser un activador, es también un inhibidor de la enzima. Entonces, para poder caracterizar en detalle la activación, primero hay que determinar el mecanismo de inhibición por producto. Esto se traduce en determinar el orden de unión de los sustratos y de disociación de los productos en el ciclo catalítico de la enzima, lo que permite caracterizar cual es el efecto inhibitorio que tiene AMP sobre cada uno de los dos sustratos.

Por otro lado, como se vio en la **Figura 5**, en esta enzima existe inhibición por el sustrato azúcar (tanto por glucosa como por F6P), efecto que es incrementado ante la presencia de AMP. Por lo que tenemos que AMP, además de producir activación enzimática e inhibición por producto, afecta la inhibición por el sustrato azúcar. Por esto, para tener una caracterización detallada del efecto de AMP en la enzima, primero se hace necesario realizar una descripción en detalle del mecanismo cinético y de inhibición por sustrato azúcar. Entre otras cosas, de esta forma podremos analizar si AMP, además de activar la enzima, produce modificaciones cualitativas del mecanismo cinético o de

inhibición por sustrato azúcar de la enzima.

En esta sección primero se procederá a determinar el mecanismo cinético de la enzima, vale decir, se determinará el orden de unión de los sustratos y de disociación de los productos para cada una de las actividades. Además, se determinará el mecanismo de inhibición por sustrato azúcar para ambas. Esto se hará a distintas concentraciones fijas de AMP. Finalmente, se procederá a determinar el mecanismo de activación por AMP para ambas actividades.

Para determinar todos estos mecanismos se realizaron estudios de cinética enzimática en estado estacionario en donde se midieron ambas actividades, PFK y GK, a distintas concentraciones del sustrato azúcar (glucosa o F6P), de MgADP y de AMP. De esta forma, dejando fija alguna de estas tres variables, es posible seleccionar conjuntos de datos que estén en función de solo las dos restantes. Mediante este método puede caracterizarse, por ejemplo, el efecto de un sustrato sobre su cosustrato (y viceversa) a concentraciones fijas de AMP, o el efecto de AMP sobre cada uno de los dos sustratos por separado, a concentraciones fijas del cosustrato respectivo. Mediante el análisis de distintos conjuntos de datos fue posible determinar tanto el mecanismo cinético y de inhibición por sustrato de la enzima a distintas concentraciones fijas de AMP, como también el mecanismo de activación por AMP sobre cada sustrato a concentraciones fijas de cosustrato.

En esta sección se analizarán ambas actividades, GK y PFK, por separado. Primero se procederá a describir la determinación del mecanismo cinético y de inhibición por

sustrato para cada una a distintas concentraciones fijas de AMP. Luego se procederá a determinar el mecanismo de inhibición por azúcar. Finalmente se procederá a determinar el mecanismo de activación por AMP para ambas.

3.3.1 Mecanismo cinético de MmPFK/GK

Para determinar el mecanismo cinético de la enzima, para ambas actividades enzimáticas se obtuvieron conjuntos de datos de velocidad inicial, en función de distintas concentraciones de ambos sustratos, a concentraciones fijas de AMP.

En ambas actividades primero se procedió a determinar si el mecanismo es de tipo Ping-Pong o secuencial-ordenado¹. Para esto, antes de realizar cualquier análisis de los datos, se dedujeron las ecuaciones de velocidad inicial en función de dos sustratos para cada uno de estos mecanismos sin considerar inhibición por sustrato. A partir de estas ecuaciones es posible deducir el comportamiento matemático de cada parámetro cinético para cada sustrato en función de su cosustrato respectivo. En principio, esto permite contrastar estos mecanismos con los parámetros cinéticos obtenidos experimentalmente para cada uno de los sustratos de la enzima. Sin embargo, en nuestro caso tenemos que existe inhibición por el sustrato azúcar, por lo que las ecuaciones para cada mecanismo debieron complejizarse agregándole posibles mecanismos e inhibición y deduciendo las ecuaciones para cada uno de estos casos.

3.3.1.1 Deducción de ecuaciones para modelos de mecanismos cinéticos

A continuación, se procede a explicar la deducción y análisis formal de las

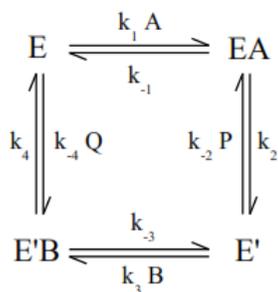
¹ Un mecanismo de tipo al azar solo se selecciona si es que ninguno de los dos anteriores, más parsimoniosos, se ajustan a los datos. Una posibilidad que permitiría sospechar de la presencia de un mecanismo al azar sería que, por ejemplo, se obtuviesen curvas no michaelianas para uno o los dos sustratos, y que este comportamiento desaparezca a medida que se aumenta la concentración del cosustrato. Sin embargo, en este caso, eso no es lo que ocurre. Este aspecto se retomará en la sección de discusiones.

ecuaciones de velocidad inicial para los mecanismos cinéticos Ping-Pong y secuencial-ordenado. Como se dijo anteriormente, en nuestro caso existe inhibición por uno de los sustratos, por lo que primero se procederá a deducir las ecuaciones para los modelos en ausencia de este efecto y, posteriormente, una vez determinado el tipo de mecanismo que está presente, se procederá a complejizar el modelo considerando todas las posibilidades en que un sustrato podría ser inhibidor.

Las ecuaciones correspondientes a los distintos modelos fueron deducidas directamente en forma manual o usando el programa Wolfram Mathematica.

Modelo Ping-Pong:

Para un modelo ping-pong se deduce la siguiente ecuación de velocidad inicial en función de dos sustratos A y B, suponiendo condiciones de estado estacionario y concentraciones de productos P y Q iguales a cero:



$$V = \frac{Nab [A][B]}{[A][B] + [A] Da + [B] Db}$$

Ecuación 8

$$\begin{aligned}
 Nab &= et k_2 k_4 / (k_2 + k_4) \\
 Da &= k_2 (k_3 + k_4) / (k_3 (k_2 + k_4)) \\
 Db &= k_4 (k_1 + k_2) / (k_1 (k_2 + k_4))
 \end{aligned}$$

Nab , Da y Db corresponden a los parámetros “observables” de la ecuación, los que son inferibles empíricamente mediante ajustes no lineales a los datos cinéticos. Éstos se obtienen agrupando las constantes intrínsecas del modelo utilizado para deducir la ecuación junto con la concentración total de enzima (et) proveniente del balance de

masas del sistema, como se aprecia en la ecuación 8. Esta ecuación puede reordenarse para expresar la velocidad inicial (V) en función de $[A]$ como una hipérbola Michaeliana, en la que los parámetros K_m^A y V_m^A , estará en función de $[B]$, como se muestra a continuación con cuadros rojos dentro de la ecuación.

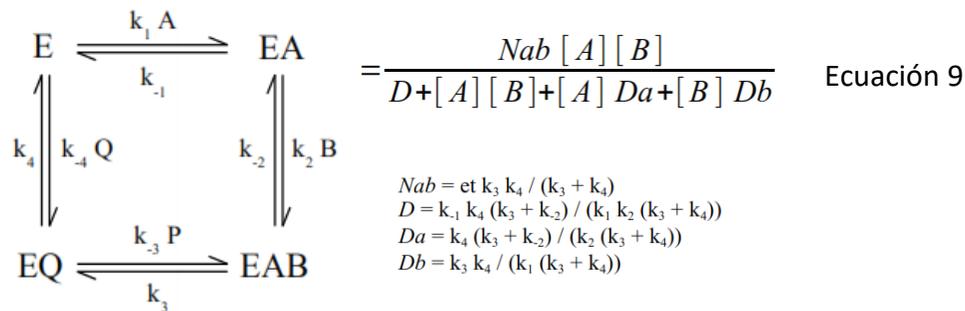
$$V = \frac{\frac{Nab[B]}{[B] + Da} [A]}{\frac{Db[B]}{[B] + Da} + [A]} \quad \text{Ecuación 8A}$$

Puede observarse que en este modelo tanto V_m^A como K_m^A tendrán un comportamiento hiperbólico Michaeliano en función de $[B]$. Es importante destacar que este comportamiento es independiente de cuál es el primer sustrato que se une a la enzima. Si se reordena la ecuación dejando V en función de $[B]$, cualitativamente se obtendrá el mismo comportamiento para los parámetros K_m^B y V_m^B , pero en función de $[A]$. Por lo tanto, mediante este tipo de ecuaciones solo es posible diferenciar el tipo de mecanismo, pero no el orden de unión de sustratos y disociación de productos.

Modelo Secuencial-Ordenado:

Del modelo secuencial-ordenado se deduce la siguiente ecuación de velocidad inicial suponiendo condiciones de estado estacionario y concentraciones de productos

iguales a cero:



Puede observarse que, a diferencia de la ecuación para el modelo Ping-Pong, ésta tiene un término libre (parámetro D) en el denominador. Esto produce que, al reordenar la ecuación de V como una hipérbola Michaeliana en función de $[A]$, el parámetro K_m^A en función de $[B]$ quede expresado como una hipérbola con intersección en el eje de las ordenadas, a diferencia de lo que se obtiene en el modelo ping-pong. Dependiendo del valor cada uno de los parámetros que la definen, esta hipérbola puede ser creciente (si $D/Da < Db$), decreciente (si $D/Da > Db$) o una función constante (si $D/Da = Db$).

$$V = \frac{\frac{Nab[B]}{[B] + Da} [A]}{\frac{D + Db[B]}{[B] + Da} + [A]} \quad \text{Ecuación 9A}$$

Nótese que, al igual que en el caso del modelo ping-pong, la dependencia de los parámetros cinéticos para cada sustrato en función de su cosustrato es independiente de cuál es el primer sustrato en unirse a la enzima. Si se reordena la ecuación dejando V en función de $[B]$, se obtendrá el mismo comportamiento para los parámetros K_m^B y V_m^B , pero en función de $[A]$.

Para determinar cuál es el mecanismo que está operando en la enzima estudiada,

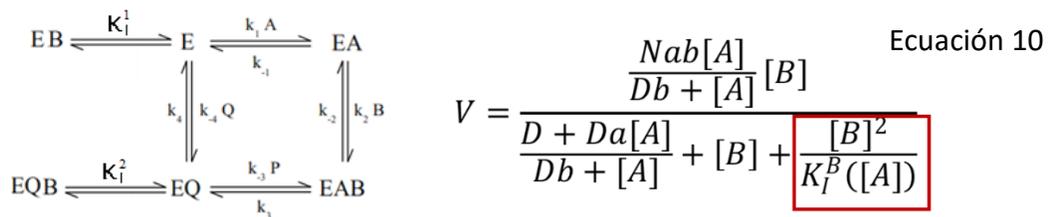
puede procederse de dos formas independientes. Por un lado, pueden obtenerse empíricamente los gráficos secundarios para los parámetros cinéticos V_m y K_m para un sustrato (por ejemplo, A) en función de su cosustrato (por ejemplo, B) a partir de curvas de saturación para el primero realizadas a distintas concentraciones del segundo. Luego, a estos gráficos secundarios se les ajustan las distintas ecuaciones deducidas para V_m y K_m en función del cosustrato obtenidas a partir de los dos tipos de mecanismos. Eligiendo el mejor ajuste es posible descartar uno de ellos (por ejemplo, si se obtiene que K_m se comporta como una hipérbola que intersecta el eje Y en un punto distinto de cero, se puede descartar un mecanismo Ping-Pong). A esta metodología en que se estiman los parámetros cinéticos para cada curva de saturación de ambos sustratos y luego se evalúan éstos en función del cosustrato por separado, se la denominará “**análisis de ajustes por partes**”.

Otra forma de análisis corresponde a la realización de **ajustes globales** de las ecuaciones de velocidad inicial en función de ambos sustratos sobre un conjunto de datos de velocidad inicial obtenidos experimentalmente en función de distintas concentraciones de ambos sustratos. Ambas estrategias son independientes y permiten confirmar el tipo de mecanismo que posee la enzima, analizando qué función es la que mejor se ajusta a los datos obtenidos experimentalmente.

Sin embargo, en nuestro caso existe además inhibición por uno de los sustratos, por lo que se hace necesario analizar si las ecuaciones obtenidas anteriormente son válidas para ese caso.

La inhibición por un sustrato no altera el comportamiento de K_m y V_m para éste en función del cosustrato:

Si a estos modelos se les agrega una inhibición por uno de los sustratos, por ejemplo, por B , los comportamientos cualitativos de los parámetros V_m^B y K_m^B en función del cosustrato A , no se verán alterados respecto a lo mostrado en los modelos anteriores. Sin embargo, en todos los casos ocurrirá la adición de un término cuadrático en el denominador, obteniéndose la ecuación canónica de inhibición por sustrato (ecuación 3), pero en donde el parámetro K_I^B estará en función de $[A]$. Por ejemplo, la siguiente ecuación corresponde a un modelo secuencial ordenado con una inhibición por sustrato mediante la unión de B a una forma no catalítica de enzima; dicho de otra forma, la formación de algún complejo de punto muerto.



El comportamiento cualitativo de K_I^B en función del cosustrato variará de acuerdo con el mecanismo de inhibición que posea la enzima, por lo que la obtención de este parámetro, a distintas concentraciones del cosustrato, nos permitirá confirmar el tipo de mecanismo que posee la enzima estudiada. Esto se detallará más adelante.

Por otro lado, es importante mencionar que el comportamiento de los

parámetros cinéticos para A (V_m^A y K_m^A) en función de de [B], siendo A el sustrato que no inhibe, sí se verá afectado respecto del caso en donde la inhibición no ocurre. Esta variación de comportamiento dependerá del tipo de inhibición que presente el sustrato B. Esto también nos permitirá inferir el tipo de mecanismo de inhibición por B a partir de los gráficos secundarios para los parámetros de A en función de la concentración de B, como se explicará en detalle más adelante.

3.3.1.2 Actividad GK. Determinación del mecanismo cinético y del mecanismo de inhibición por glucosa.

Para determinar el mecanismo cinético de la actividad GK se obtuvo un conjunto de datos de más de 700 mediciones de actividad enzimática a distintas concentraciones de glucosa, MgADP y AMP. A partir de estos datos se seleccionaron más de 60 curvas de saturación para glucosa a distintas concentraciones fijas tanto de MgADP, como de AMP. En todas estas curvas se observó inhibición por sustrato, por lo que a cada una de ellas se ajustó la ecuación 3 (modelo canónico de inhibición por sustrato). Estas curvas, con sus respectivos ajustes, se muestran en la **Figura 10**, donde se encuentran graficadas las curvas de saturación para glucosa, a distintas concentraciones de MgADP y a 7 concentraciones fijas de AMP.

A partir de los ajustes de la ecuación 3, realizados para cada curva de saturación para glucosa, se obtuvieron los gráficos secundarios de V_m^{glu} , K_m^{glu} , V_m^{glu}/K_m^{glu} y K_I^{glu} en función de MgADP para cada concentración fija de AMP (**Figura 11**). Con estos datos, se compararon los modelos para un mecanismo ping-pong o un secuencial-ordenado, analizando cual ecuación para V_m^{Glu} , K_m^{Glu} y V_m^{Glu}/K_m^{Glu} , obtenida según estos modelos, se ajusta mejor a los parámetros obtenidos empíricamente. Esto permite determinar el tipo de mecanismo, ya que, como se dijo, la presencia de una inhibición por glucosa no afecta el comportamiento de estos parámetros en función del cosustrato.

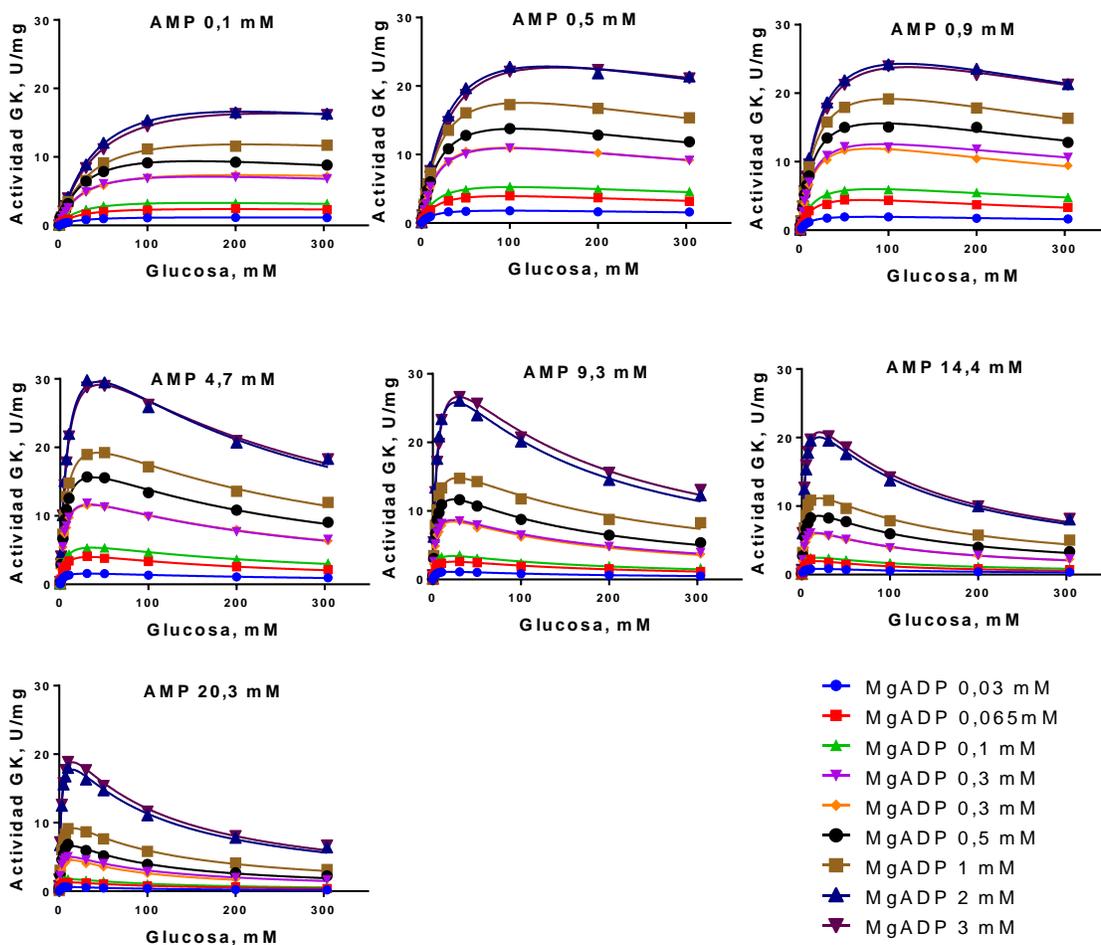


Figura 10. Curvas de saturación para glucosa obtenidas a distintas concentraciones de AMP y de MgADP.

En cada gráfico se agrupan distintas curvas de saturación para glucosa obtenidas a distintas concentraciones de MgADP (indicadas en la lista de la parte inferior derecha de la figura) y a una concentración fija de AMP (indicadas en cada gráfico). Los ensayos fueron realizados en un lector de placas Synergy 2 (Biotek) a 25 °C en HEPES-NaOH 50 mM pH 7,8; NAD⁺ 0,2 mM, variando la concentración de Glucosa, MgADP y AMP, manteniendo el Mg²⁺ libre a 1 mM. La actividad se siguió mediante un ensayo acoplado G6PDH mediante la producción de NADH siguiendo la absorbancia a 340 nm. A cada curva de saturación se le ajustó por separado un modelo de inhibición por sustrato (ecuación 3).

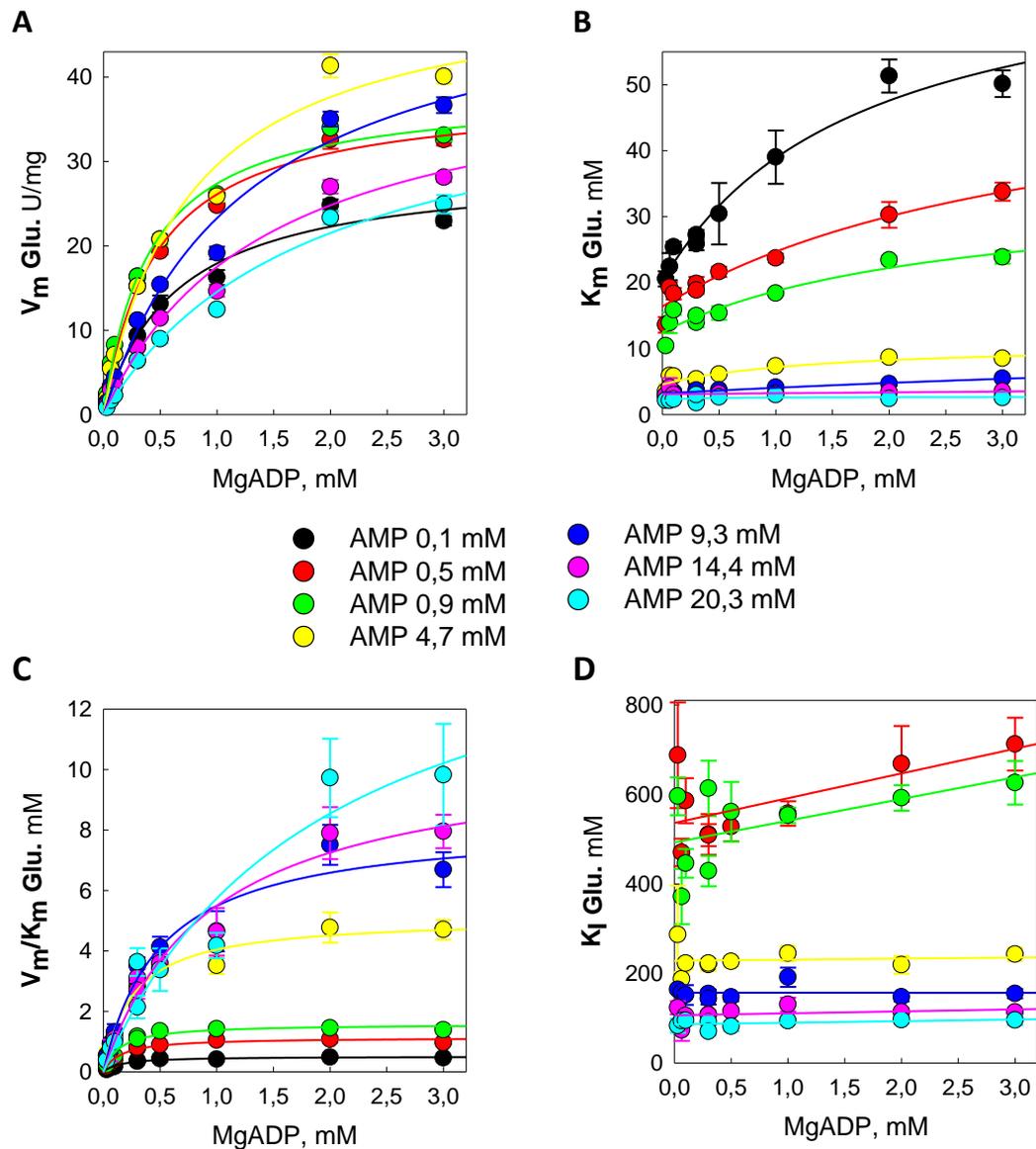


Figura 11. Gráficos secundarios para los parámetros cinéticos de glucosa en función de MgADP.

Se obtuvieron los parámetros V_m^{glu} (A), K_m^{glu} (B), V_m^{glu}/K_m^{glu} (C) y K_i^{glu} (D), en función de MgADP a distintas concentraciones fijas de AMP a partir de los ajustes de la ecuación 3 realizados sobre las curvas de saturación para glucosa que se muestran en la **Figura 10**. Las concentraciones de AMP de cada curva secundaria se indican en la lista en la parte central de la figura. El mejor ajuste para todas las curvas de V_m^{glu} fue una hipérbola centrada en el origen; para cada curva de K_m^{glu} , una hipérbola que intersecta el eje Y; para cada curva de V_m^{glu}/K_m^{glu} , una hipérbola centrada en el origen; para cada curva de K_i^{glu} , una recta. Los mejores ajustes se seleccionaron mediante el criterio de información de Akaike (AIC).

3.3.1.2.1 Determinación del tipo de mecanismo cinético

Para V_m^{glu} en función de MgADP el mejor ajuste fue una hipérbola centrada en el origen para todas las concentraciones fijas de AMP (**Figura 11A**); este comportamiento es común tanto para un modelo Ping-Pong como para uno secuencial ordenado. Sin embargo, para K_m^{glu} en función de MgADP, el mejor ajuste fue una hipérbola con intersección en el eje Y para cada concentración fija de AMP (**Figura 11B**). Como puede apreciarse en la ecuación 8, esto nos permite descartar un modelo Ping-Pong. Consistente con esta conclusión, es que el mejor ajuste para V_m^{glu}/K_m^{glu} fue una hipérbola centrada en el origen (**Figura 11C**), lo que es propio de un mecanismo secuencial-ordenado. Si se tratara de un mecanismo ping-pong, este último parámetro habría dado constante (esto ocurre debido a que, como se observa en la ecuación 8 reordenada, si se divide V_m por K_m , al tener ambos parámetros un denominador común, $([S] + Da)$, el resultado sería una constante, Nab/Db).

3.3.1.2.2 Determinación del mecanismo de inhibición por glucosa

Una vez determinado el tipo de mecanismo cinético, se procedió a realizar dos análisis independientes, uno de ajustes por partes y otro de ajustes globales, para cada uno de los conjuntos de datos obtenidos a concentraciones fijas de AMP, para determinar el mecanismo de inhibición por glucosa.

Primero se procedió a considerar todos los posibles modelos en donde glucosa puede inhibir a la enzima en un mecanismo secuencial-ordenado, los que se mostrarán en detalle a continuación. De cada uno de estos se dedujo su respectiva ecuación de

velocidad inicial y se determinó el comportamiento que tendría K_i^{glu} en función de MgADP en cada caso, el que luego se contrastó con los datos. Además, cómo se dijo anteriormente, el comportamiento de los parámetros cinéticos para MgADP, V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} , en función de glucosa sí cambiará dependiendo del tipo de mecanismo de inhibición por sustrato que se encuentre presente, por lo que los ajustes sobre estos parámetros también se utilizaron para evidenciar el mecanismo de inhibición por sustrato.

Por otro lado, además del análisis de ajustes por partes, también realizaron ajustes globales de las ecuaciones de velocidad inicial deducidas para cada posible mecanismo de inhibición por sustrato sobre cada conjunto de datos a una concentración fija de AMP. Estos son los que se muestran en cada gráfico de la **Figura 10**

Posibles mecanismos de inhibición por glucosa

Como sabemos que nos encontramos frente a un mecanismo secuencial ordenado, podemos determinar todos los posibles mecanismos por los cuales glucosa inhibe a la enzima mediante la formación de complejos de punto muerto. Para esto existen tres opciones, las que se resumen en la **Figura 12**: La primera, es que glucosa forme un complejo de punto muerto al unirse a la enzima libre (complejo E-Glu). Esto solo puede ocurrir si glucosa es el segundo sustrato en unirse a la enzima (por lo tanto, MgADP el primero). La formación de este complejo es compatible con cualquier orden de disociación de productos. A este modelo se le llamará **modelo "E-Glu"** de ahora en

adelante. La segunda opción es que glucosa forme un complejo de punto muerto donde uniéndose a un complejo E-AMP, formándose el complejo E-AMP-Glu. Este complejo solo puede formarse si AMP es el último producto en disociarse y lo que es compatible con cualquier orden de unión de sustratos. A este modelo se le llamará **modelo “E-AMP-Glu”**. Existe una tercera opción, que consiste en la formación de ambos complejos E-Glu y E-AMP-Glu a la vez, la que solo sería posible si MgADP es el primer sustrato en unirse y AMP el último producto en disociarse. A este modelo se le llamará **modelo “E-Glu & E-AMP-Glu”** de ahora en adelante.

Para cada uno de estos mecanismos posibles se dedujo su respectiva ecuación de velocidad inicial en función de ambos sustratos, las que se muestran a continuación.

Para el modelo “E-Glu” se obtiene la siguiente ecuación:

$$V = \frac{N[MgADP][Glu]}{D + D_A[MgADP] + D_g[Glu] + [MgADP][Glu] + D_{g^2}[Glu]^2} \quad \text{Ecuación 11}$$

Para el modelo “E-AMP-Glu” se obtiene la siguiente ecuación:

$$V = \frac{N[MgADP][Glu]}{D + D_A[MgADP] + D_g[Glu] + [MgADP][Glu] + D_{g^2_A}[MgADP][Glu]^2} \quad \text{Ecuación 12}$$

Para el modelo “E-Glu & E-AMP-Glu” se obtiene la siguiente ecuación:

$$V = \frac{N[MgADP][Glu]}{D + D_A[MgADP] + D_g[Glu] + [MgADP][Glu] + D_{g^2}[Glu]^2 + D_{g^2_A}[MgADP][Glu]^2} \quad \text{Ecuación 13}$$

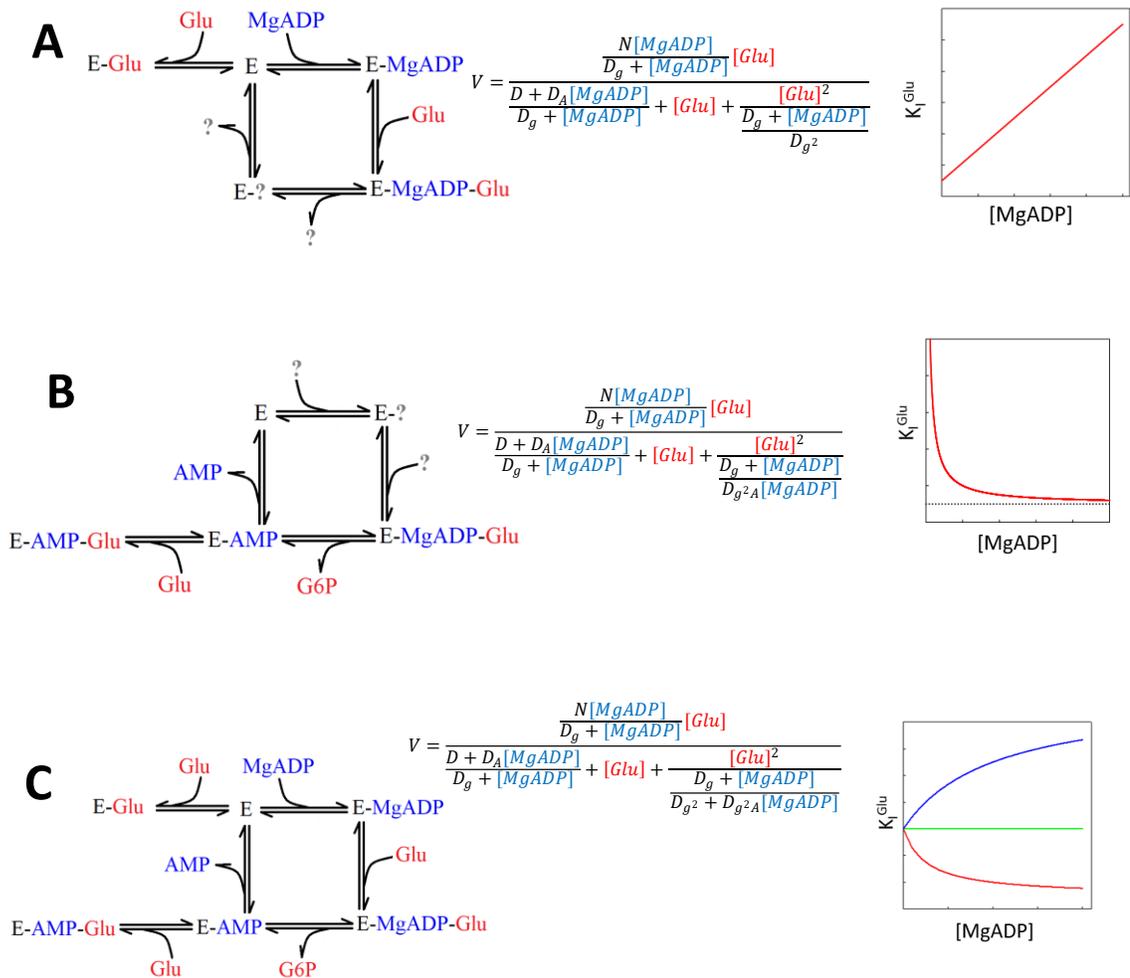


Figura 12. Posibles mecanismos de inhibición por glucosa mediante formación de complejos de punto muerto en un mecanismo secuencial-ordenado.

Para cada mecanismo se muestra su ecuación de velocidad inicial respectiva en función de ambos sustratos factorizada como una ecuación de inhibición por sustrato en función de la concentración de glucosa, donde V_m^{Glu} , K_m^{Glu} y K_I^{Glu} están en función de la concentración de MgADP. A) Modelo “E-Glu”: inhibición mediante la formación de un complejo de punto muerto E-Glu, lo que es compatible con cualquier orden de disociación de productos, representado por la ecuación 11. B) Modelo “E-AMP-Glu”: Inhibición mediante la formación de un complejo de punto muerto E-AMP-Glu, que es compatible con cualquier orden de unión de sustratos, representado por la ecuación 12. C) Modelo “E-Glu & E-AMP-Glu”: Formación de ambos complejos de punto muerto, que solo es compatible con que MgADP sea el primer sustrato en unirse y AMP el último producto en disociarse, representado por la ecuación 13. A la derecha se muestra la gráfica que tendría K_I^{Glu} en función de $[MgADP]$ para cada modelo.

Análisis de K_i^{glu} en función de MgADP.

Las tres ecuaciones obtenidas pueden reordenarse para obtener la velocidad inicial en función de glucosa en forma de la ecuación canónica de inhibición por sustrato (ecuación 3), con cada uno de los parámetros V_m^{glu} , K_m^{glu} y K_i^{glu} en función de MgADP.

Modelo "E-Glu":

$$V = \frac{\frac{N[MgADP]}{D_g + [MgADP]} [Glu]}{\frac{D + D_A[MgADP]}{D_g + [MgADP]} + [Glu] + \frac{[Glu]^2}{\frac{D_g + [MgADP]}{D_g^2}}} \quad \text{Ecuación 11A}$$

Modelo "E-AMP-Glu":

$$V = \frac{\frac{N[MgADP]}{D_g + [MgADP]} [Glu]}{\frac{D + D_A[MgADP]}{D_g + [MgADP]} + [Glu] + \frac{[Glu]^2}{\frac{D_g + [MgADP]}{D_g^2 A [MgADP]}}} \quad \text{Ecuación 12A}$$

Modelo "E-Glu & E-AMP-Glu":

$$V = \frac{\frac{N[MgADP]}{D_g + [MgADP]} [Glu]}{\frac{D + D_A[MgADP]}{D_g + [MgADP]} + [Glu] + \frac{[Glu]^2}{\frac{D_g + [MgADP]}{D_g^2 + D_g^2 A [MgADP]}}} \quad \text{Ecuación 13A}$$

Puede observarse que en todos los casos V_m^{glu} es una hipérbola Michaeliana y K_m^{glu} una hipérbola que intersecta el eje Y con asíntota distinta a cero, como es esperable para un mecanismo cinético secuencial-ordenado. Sin embargo, en cada uno de los tres casos, el comportamiento de K_i^{glu} en función de la concentración de MgADP es diferente y propio de cada mecanismo. En el caso del modelo "E-Glu", K_i^{glu} es una recta con

pendiente $1/D_{g2}$ e intersección D_g/D_{g2} en el eje Y:

$$K_I^{Glu} = \frac{D_g + [MgADP]}{D_{g2}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Es importante notar que esta recta tiene pendiente positiva, por lo que es una función monótonamente creciente. Por lo tanto, si para K_I^{glu} se obtiene un comportamiento decreciente, puede descartarse el modelo “E-Glu”.

En el caso del modelo “E-AMP-Glu”, la ecuación corresponde a una hipérbola rectangular decreciente con asíntota vertical en el eje Y, y asíntota horizontal $1/D_{g2A}$:

$$K_I^{Glu} = \frac{D_g + [MgADP]}{D_{g2A}[MgADP]} \quad \text{Ecuación 15}$$

Es importante notar que esta ecuación siempre tendrá un comportamiento monótonamente decreciente, por lo que, si el comportamiento obtenido para K_I^{glu} es creciente, puede descartarse el modelo “E-AMP-Glu”.

Finalmente, cuando la inhibición ocurre por la formación de ambos complejos de punto muerto (modelo “E-Glu & E-AMP-Glu”), K_I^{glu} en función MgADP es una hipérbola que interseca el eje Y en D_g/D_{g2} , y tiene asíntota horizontal en $1/D_{g2A}$.

$$K_I^{Glu} = \frac{D_g + [MgADP]}{D_{g2} + D_{g2A}[MgADP]} \quad \text{Ecuación 16}$$

Esta función puede ser creciente ($D_g/D_{g2} < 1/D_{g2A}$), decreciente ($D_g/D_{g2} > 1/D_{g2A}$), o constante ($D_g/D_{g2} = 1/D_{g2A}$).

Teniendo en cuenta estas ecuaciones, se analizaron los gráficos secundarios para K_I^{glu} en función de MgADP obtenidos empíricamente a cada concentración fija de AMP (**Figura 11D**). Como se observa en la figura, en todos los casos la dependencia de K_I^{glu} en

función de la concentración de MgADP es creciente o tendiente a una constante. Por lo tanto, puede descartarse que la inhibición ocurra mediante la sola formación de un complejo E-AMP-Glu, pues en ese caso se esperaría encontrar que K_i^{glu} decrece hipérbolicamente, como se ve en la ecuación 15. Por lo tanto, las dos opciones que nos quedan para este parámetro son una recta o una hipérbola que interseca el eje Y en función de la concentración de MgADP. De ambas funciones, la recta fue la que dio un mejor ajuste para todas las concentraciones de AMP ensayadas (**Tabla 2**). Esto a excepción de AMP 0,1 mM, en donde la inhibición por sustrato, al ser considerablemente baja, se obtienen valores de K_i^{glu} muy altos y con bastante error, por lo que solo pudo ser ajustada una hipérbola o una constante. Por esta razón, los resultados no se muestran en la **Figura 11D**. Estos resultados, considerados por separado, puede considerarse como evidencia de que la inhibición por glucosa se produce mediante la formación de un complejo de punto muerto E-Glu en todas las concentraciones de AMP.

Sin embargo, como se observa en la **Figura 11D**, para las concentraciones de AMP más altas el comportamiento de K_i^{glu} vs MgADP tiende a ser una constante. Como se ha mostrado (Ecuación 16), una constante puede ser interpretada como una hipérbola degenerada cuyo valor de intersección en el eje Y es igual a su valor cuando X tiende a infinito (en este caso, $D_{g2} = D_g * D_{g2A}$ en la ecuación 16).

A.I.C. K_1^{Glu}		
AMP, mM	recta	hipérbola
0,1	xx	130,01
0,5	110,4	117,2
0,9	72,3	78,3
4,7	56,4	61,3
9,3	46,6	53,2
14,4	47,7	53,3
20,3	36,9	43,6

Tabla 2. Valores de AIC para distintos ajustes de K_1^{Glu} en función de MgADP.

Valores de AIC para el ajuste de una recta y de una hipérbola que intersecta el eje Y a las curvas de K_1^{Glu} en función de la concentración de MgADP (las que se muestran en la **Figura 11**) obtenidas a distintas concentraciones de AMP. En negrita se destaca el menor valor de AIC para cada concentración de AMP (a excepción de AMP 0,1 mM donde no se pudo ajustar una recta).

Hasta ahora, tenemos que en las dos opciones posibles, modelo “E-Glu” y “E-Glu & E-AMP-Glu” (**Figura 12A** y **Figura 12C**), se estaría formando el complejo de punto muerto E-Glu. Para que este sea el caso, glucosa debe ser el segundo sustrato en unirse a la enzima, de lo contrario ni el modelo “E-Glu” ni “E-Glu & E-AMP-Glu” tendrían sentido. Por lo que, considerando la información que tenemos hasta el momento, los resultados muestran que MgADP sería el primer sustrato en unirse a la enzima y glucosa el segundo. Sin embargo, aún no podemos conocer cuál es el orden de disociación de los productos. Para poder discriminar entre ambos modelos posibles, es necesario evaluar los parámetros cinéticos de MgADP en función de glucosa.

Análisis de los parámetros cinéticos para MgADP.

Cada uno de los gráficos de la **Figura 10** puede reordenarse como curvas de MgADP a distintas concentraciones de glucosa. De esta forma se seleccionaron más de 70 curvas de saturación para MgADP a distintas concentraciones de glucosa y de AMP. En todas las curvas se observó un comportamiento hiperbólico, por lo que a cada una se le ajustó la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 2). Estas curvas, con sus respectivos ajustes, se muestran en la **Figura 13**, donde se encuentra graficada la velocidad inicial a distintas concentraciones de glucosa a 7 concentraciones fijas de AMP.

Para confirmar frente a cuál de los posibles mecanismos de inhibición por sustrato nos encontramos, se analizaron los comportamientos de los parámetros cinéticos para MgADP, V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} , en función de glucosa. El comportamiento de estos parámetros en función del cosustrato dependerá del mecanismo de inhibición.

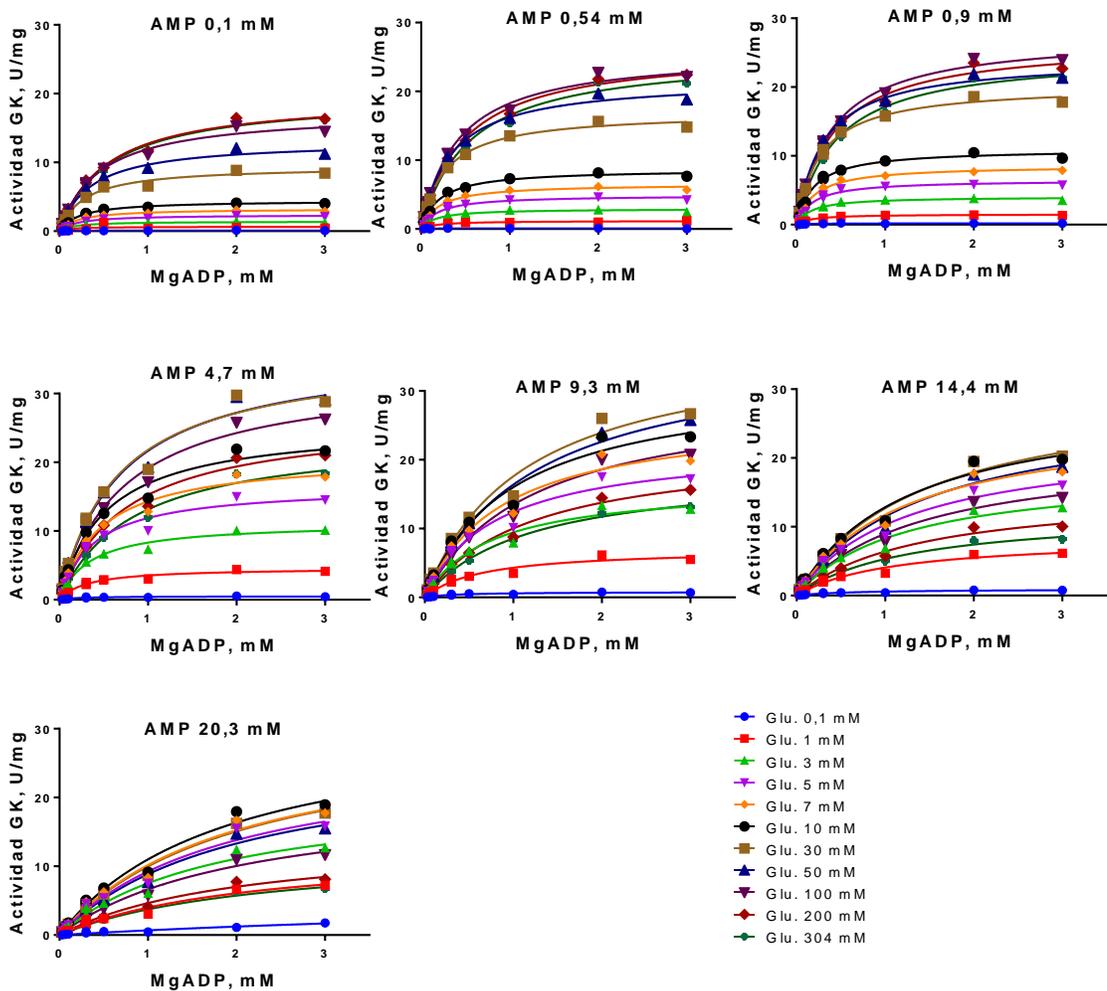


Figura 13. Curvas para MgADP obtenidas a distintas concentraciones de AMP y de glucosa.

En cada gráfico se agrupan distintas curvas de saturación para MgADP obtenidas a distintas concentraciones de glucosa (indicadas en la lista en la parte inferior derecha de la figura) y a una misma concentración fija de AMP (indicada arriba de cada gráfico). Los datos son los mismos que se muestran en la **Figura 10** pero reordenados de esta forma. Los ensayos fueron realizados en un lector de placas Synergy 2 (Biotek) a 25 °C en HEPES-NaOH 50 mM; NAD⁺ 0,2 mM, pH 7,8, variando la concentración de Glucosa, MgADP y AMP, manteniendo Mg²⁺ libre a 1 mM. La actividad se siguió mediante un ensayo acoplado G6PDH mediante la producción de NADH siguiendo la absorbancia a 340 nm. A cada una de las curvas se le ajustó un modelo Michaeliano (ecuación 2).

Para determinar el mecanismo, las ecuaciones de velocidad inicial en función de la concentración de ambos sustratos deben reordenarse para obtener la ecuación de Michaelis-Menten en función de la concentración de MgADP, con V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} como funciones de la concentración de glucosa.

Reordenando la ecuación 11 para el modelo “E-Glu”, se obtiene:

$$V = \frac{\frac{N[Glu]}{D_A + [Glu]} [MgADP]}{\frac{D + D_g [Glu] + D_{g^2} [Glu]^2}{D_A + [Glu]} + [MgADP]} \quad \text{Ecuación 11B}$$

Puede apreciarse que V_m^{MgADP} corresponde a una hipérbola Michaeliana en función de glucosa; en cambio, K_m^{MgADP} corresponde al cociente entre un polinomio cuadrático y uno de grado 1. Esta última curva tiene un comportamiento equivalente al de una recta sumada con una hipérbola que intersecta el eje Y en un punto distinto al origen. Dependiendo del valor de sus parámetros, esta función podrá tener un mínimo (ser cóncava) o ser monótonamente creciente. Por otro lado, cuando glucosa tiende a infinito, K_m^{MgADP} tiende a infinito con una pendiente constante.

Reordenando la ecuación 12 para el modelo “E-AMP-Glu”, se obtiene:

$$V = \frac{\frac{N[Glu]}{D_A + [Glu] + D_{g^2A} [Glu]^2} [MgADP]}{\frac{D + D_g [Glu]}{D_A + [Glu] + D_{g^2A} [Glu]^2} + [MgADP]} \quad \text{Ecuación 12B}$$

En este caso, V_m^{MgADP} tiene el comportamiento de una inhibición por sustrato canónica (es formalmente equivalente a la ecuación 3). En cambio, K_m^{MgADP} tiene un comportamiento formalmente equivalente a la ecuación 6, ya que intersecta el eje Y en

un punto distinto de cero. La cantidad de parámetros de esta ecuación produce que sea compatible con muchos comportamientos matemáticos. Sin embargo, a diferencia de la ecuación 11B, en este caso K_m^{MgADP} siempre tiene asíntota en cero cuando $[Glu]$ tiende a infinito.

Reordenando la ecuación 13 para el modelo “E-AMP-Glu & E-Glu”, se obtiene:

$$V = \frac{\frac{N[Glu]}{D_A + [Glu] + D_{g^2A}[Glu]^2} [MgADP]}{\frac{D + D_g[Glu] + D_{g^2}[Glu]^2}{D_A + [Glu] + D_{g^2A}[Glu]^2} + [MgADP]} \quad \text{Ecuación 13B}$$

En este caso, V_m^{MgADP} tiene el mismo comportamiento que en el caso anterior consistente en una inhibición por sustrato canónica (Ecuación 3). En cambio, K_m^{MgADP} corresponde a un cociente de polinomios cuadráticos. Esta función, al igual que las anteriores para el mismo parámetro, intersecta el eje Y en un punto distinto de cero.

Las ecuaciones para K_m^{MgADP} en función de la concentración de glucosa poseen muchos parámetros, por lo que son compatibles con varios comportamientos, muchos de ellos similares (vale decir, tienen gráficas compatibles). Por esto el analizar el comportamiento de K_m^{MgADP} en función de la concentración de glucosa no es tan informativo como el análisis del comportamiento de V_m^{MgADP} . Es importante destacar que solo en el modelo “E-Glu”, V_m^{MgADP} tiene un comportamiento Michaeliano en función de glucosa. En los otros dos casos (modelos “E-AMP-Glu” y “E-Glu & E-AMP-Glu”), el comportamiento corresponde al descrito por la ecuación de inhibición por sustrato (ecuación 3). Es por esto que, si se obtiene este último comportamiento en este parámetro, solo es posible descartar el modelo “E-Glu”, no confirmar alguno de los otros

dos; pero si se obtiene una hipérbola Michaeliana es posible confirmarlo. Sin embargo, con lo obtenido para el análisis del parámetro K_i^{glu} en función de MgADP (donde se obtuvieron comportamientos monótonamente crecientes en todos los casos) hemos descartado el modelo “E-AMP-Glu” para la inhibición por glucosa, por lo que, en nuestro caso, un comportamiento tipo inhibición por sustrato sí confirmaría un modelo “E-Glu & E-AMP-Glu”.

Los gráficos para V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} en función de la concentración de glucosa se muestran en la **Figura 14** para cada concentración fija de AMP. El mejor ajuste para V_m^{MgADP} en función de glucosa fue un modelo canónico de inhibición por sustrato (ecuación 3) para todos los casos (**Figura 14A**), salvo en la concentración más baja de AMP. En el caso de K_m^{MgADP} (**Figura 14B**), el mejor ajuste siempre fue el modelo que contenía la menor cantidad de parámetros. Es más, a este parámetro también fue posible ajustar una hipérbola que intersecta el eje Y con asíntota distinta de cero, lo que da un ajuste aún mejor, pese a no tener sentido físico en este contexto, dado que se trata de una función con aún menos parámetros. Por lo que es esperable que, al evaluar los ajustes usando AIC, el que tenga menor cantidad de parámetros siempre sea el con índice menor. Sin embargo, es importante notar que el comportamiento obtenido para K_m^{MgADP} en función de glucosa, permite descartar la ecuación 12B (Modelo “E-AMP-Glu”),

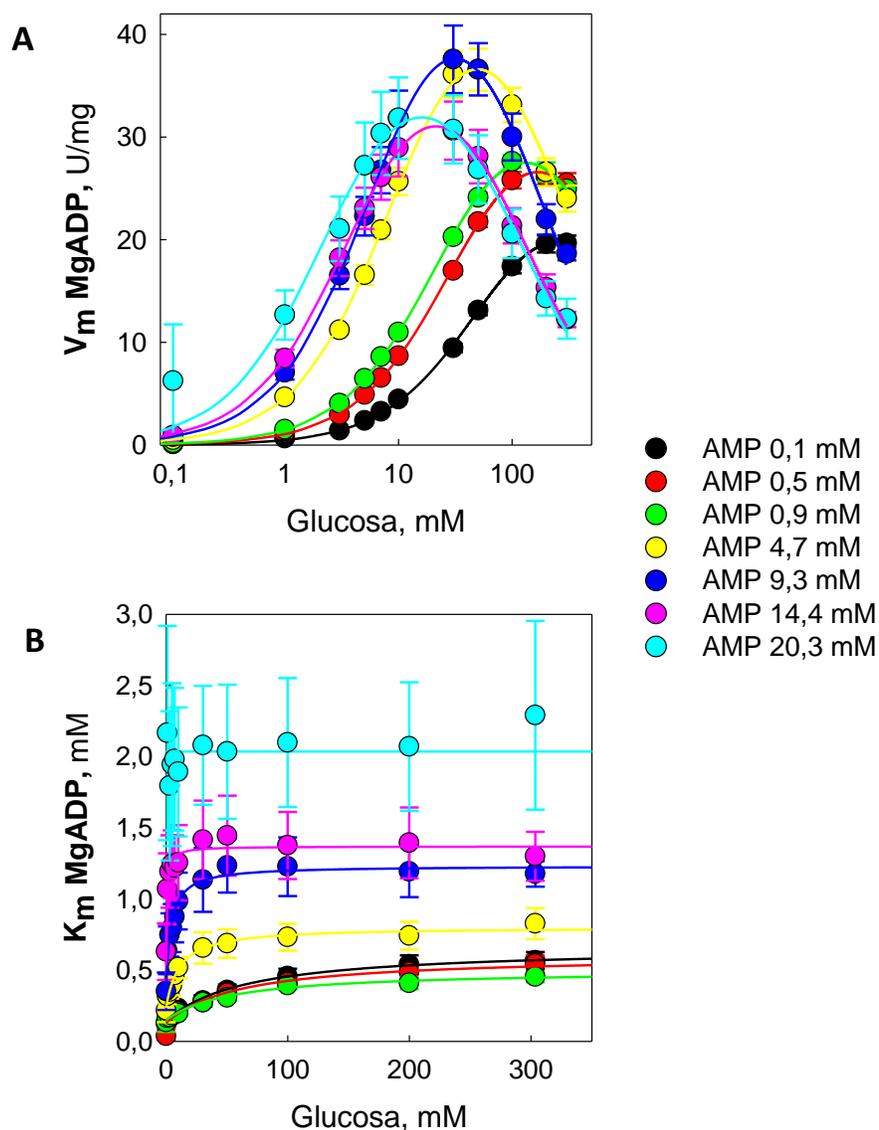


Figura 14. Gráficos secundarios para los parámetros cinéticos de MgADP en función de glucosa.

Se obtuvieron los parámetros V_m^{MgADP} (A) y K_m^{MgADP} (B) de la actividad GK en función de glucosa a distintas concentraciones fijas de AMP, las que se indican a la derecha de la figura. En A) el eje X se encuentra en escala logarítmica. Los valores de cada parámetro se estimaron a partir de los ajustes realizados sobre las curvas de saturación para MgADP que se muestran en la **Figura 13**. El mejor ajuste para todas las curvas de V_m^{MgADP} fue un modelo de inhibición por sustrato; para las de K_m^{MgADP} , una hipérbola que intersecta el eje Y (salvo para AMP 20,3 mM, donde se obtuvo una constante, lo que puede ser interpretado matemáticamente como una hipérbola que corta el eje Y con asíntota igual a su origen).

puesto que para todas las concentraciones de AMP posee un comportamiento monótonamente creciente, lo que es incompatible con la K_m^{MgADP} que figura en esa ecuación (esto es consistente con lo que se obtuvo al analizar los parámetros para glucosa, en donde se descartó ese modelo producto del comportamiento de K_i^{glu} en función de MgADP). Finalmente, para cada concentración de AMP, K_m^{MgADP} interseca el eje Y en un punto distinto de cero, lo que corrobora un mecanismo secuencial-ordenado.

Como se dijo más arriba, en este caso el comportamiento de K_m^{MgADP} en función de glucosa es menos informativo que el comportamiento de V_m^{MgADP} en función de ese cosustrato. Sin embargo, al ser un modelo de inhibición por sustrato el que mejor representa todas las curvas para este último parámetro, lo obtenido en esta sección es evidencia para un mecanismo de inhibición por sustrato mediante la formación de dos complejos de punto muerto (modelo "E-Glu & E-AMP-Glu"), lo que entra en contradicción con lo obtenido mediante el análisis de K_i^{glu} en función de MgADP en algunas concentraciones de AMP. Para poder determinar definitivamente el mecanismo de inhibición por sustrato se utilizará un análisis de ajustes globales.

Análisis de ajustes globales

Lo obtenido mediante el análisis de los valores de K_i^{glu} en función de MgADP entra en contradicción con lo obtenido mediante el análisis de los parámetros de MgADP en función de glucosa. En el primero, se obtuvo evidencia conducente a un mecanismo de inhibición por sustrato mediante la formación de un punto muerto E-Glu, mientras que en el segundo caso la evidencia apunta a la formación de dos complejos de punto

muerto, E-Glu y E-AMP-Glu. Evidentemente los ajustes realizados sobre V_m^{MgADP} son más robustos que los realizados sobre K_i^{glu} , pues en este último caso el error y la dispersión de los datos es considerablemente mayor que en el primero. Además, muchas curvas de K_i^{glu} en función de MgADP tienden a ser constantes. Por otro lado, con los datos disponibles es posible que los comportamientos observados para K_i^{glu} correspondan a hipérbolas y que esto no haya podido detectarse debido, por ejemplo, a la dispersión de los datos o a que no se llegó a saturación en el intervalo de concentraciones utilizadas. Sin embargo, con estos criterios aún no es posible determinar cuál de los dos modelos es el que mejor explica los datos obtenidos.

Para discriminar entre los dos modelos posibles de inhibición por sustrato, se utilizó una segunda estrategia de análisis de los datos, consistente en la realización de ajustes globales de las ecuaciones de velocidad inicial en función de ambos sustratos (para cada concentración fija de AMP) sobre cada conjunto de datos de velocidad inicial obtenido a una concentración fija de AMP. Ambas ecuaciones (11 y 14) fueron ajustadas a dichos conjuntos de datos y, para discriminar entre ambos, a cada uno de los ajustes se les calculó el criterio de información de Akaike (ecuación 7) y se eligió el que arrojó un menor valor para este indicador.

Como puede verse en la **Tabla 3**, en todos los conjuntos de datos evaluados siempre se obtuvo menor AIC para un modelo secuencial ordenado con un mecanismo de inhibición por sustrato a través de la formación de dos complejos de puntos muertos,

Valores A.I.C. Ajustes globales GK				
[AMP]	(A)	(B)	(C)	(D)
0,1 mM	-212,48	-220,49	-222,58	
0,5 mM	-153,87	-191,68	-186,77	
0,9 mM	-95,52	-162,78	-162,58	
4,7 mM	1,27	-33,72	-35,84	
9,3 mM	-3,06	-27,33	-29,51	
14,4 mM	-64,36	-84,13	-86,42	
20,3 mM	-64,36	-78,45	-80,72	-82,87

(A) Modelo "E-Glu".

(B) Modelo "E-Glu & E-AMP-Glu".

(C) Modelo "E-Glu & E-AMP-Glu"; K_i^{Glu} constante.

(D) Modelo "E-Glu & E-AMP-Glu"; K_i^{Glu} y K_m^{Glu} constantes.

Tabla 3. Valores de AIC para los ajustes globales sobre los datos cinéticos de la actividad GK.

En la tabla se muestran los valores de AIC para los ajustes globales de las ecuaciones de distintos modelos (que se muestran en la **Figura 12**) sobre conjuntos de datos de velocidad inicial en función de las concentraciones de glucosa y MgADP a una concentración fija de AMP (estos conjuntos de datos corresponden a cada uno de los gráficos que se muestran en la **Figura 10** y **Figura 13** para cada concentración fija de AMP). Las concentraciones de AMP se muestran en la primera columna de la tabla. Los modelos evaluados figura son: (A) modelo "E-Glu" (ecuación 11), (B) "E-Glu & E-AMP-Glu" (ecuación 13), (C) "E-Glu & E-AMP-Glu" en donde K_i^{Glu} es constante en función de MgADP (ecuación 13 con $D_{g2} = D_{g2A} * D_g$) y (D) "E-Glu & E-AMP-Glu" en donde K_i^{Glu} y K_m^{Glu} son constantes en función de MgADP (ecuación 13 con $D_{g2} = D_{g2A} * D_g$ y $D = D_A * D_g$). En negrita se destaca el menor valor de AIC para cada concentración de AMP.

vale decir el modelo “E-Glu & E-AMP-Glu”. Esto es consistente con lo observado para la dependencia de V_m^{MgADP} en función de glucosa y con el hecho de que en varias concentraciones de AMP, K_i^{glu} en función de MgADP haya tendido a ser constante. Al evaluar el mismo modelo, pero forzando a que K_i^{glu} sea constante (vale decir, ajustando la ecuación 13, pero forzando a que $D_{g2} = D_g * D_{g2A}$), se obtiene un AIC menor para este modelo para las concentraciones de AMP de entre 0,1 mM a 4,7 mM o mayores. Es más, para el conjunto de datos con la concentración fija de AMP más alta (20,3 mM) el mejor ajuste obtenido fue el de la ecuación 13, pero forzando a que K_i^{glu} y K_m^{glu} sean constantes ($D_{g2} = D_g * D_{g2A}$ y $D = D_A * D_g$), que corresponde al modelo “E-Glu & E-AMP-Glu”.

Para evaluar la coherencia de los dos análisis realizados (análisis de ajustes por partes y de ajustes globales) se simularon las curvas para V_m^{glu} , K_m^{glu} , y K_i^{glu} en función de MgADP, además de V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} en función de glucosa, utilizando los parámetros obtenidos mediante el ajuste global de la ecuación 13 (de acuerdo a donde se obtuvo un menor valor de AIC, como se observa en la **Tabla 3**) a cada conjunto de datos a una concentración fija de AMP. Estas simulaciones se contrastaron con los mejores ajustes para cada uno de estos parámetros en función del cosustrato obtenidos en el análisis de ajustes por partes (los que se muestran en las **Figura 11** y **Figura 14**). En la **Figura 15** puede verse que ambas curvas, la proveniente de la simulación y la proveniente de los ajustes por partes, coinciden prácticamente en todos los parámetros cinéticos en función de su cosustrato, a todas las concentraciones fijas de AMP. Donde se observan mayores divergencias es para K_i^{glu} , lo que es esperable, dado que en los ajustes por partes se

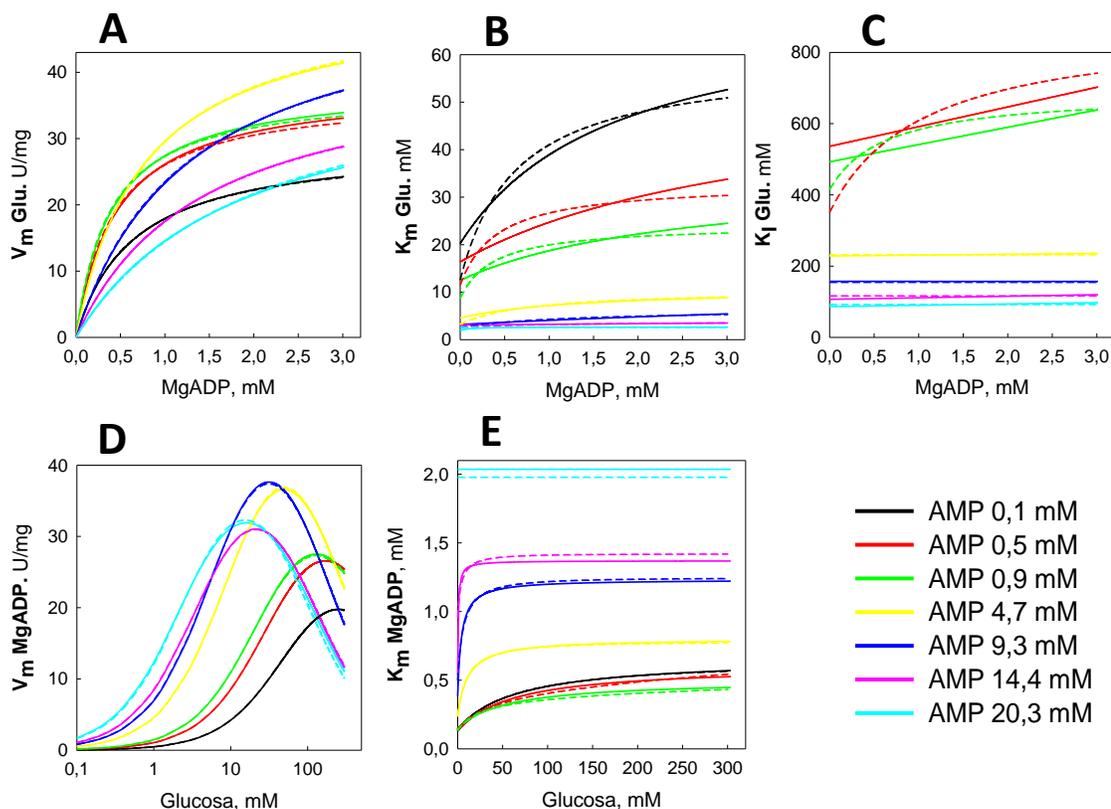


Figura 15. Comparación de los análisis de ajustes globales y ajustes por partes.

En cada gráfico, las líneas continuas corresponden a los mejores ajustes realizados sobre los parámetros cinéticos para cada sustrato en función de su cosustrato: A) V_m^{glu} , B) K_m^{glu} , C) K_f^{glu} , D) V_m^{MgADP} , E) K_m^{MgADP} . Estos ajustes son los mismos que se muestran en las **Figura 11** y **Figura 14** para cada parámetro. Las líneas discontinuas corresponden a curvas simuladas para cada parámetro cinético en función de su cosustrato a partir del mejor ajuste global (consistente en el que se obtuvo el menor valor de AIC, como se muestra en la **Tabla 3**) realizado sobre cada conjunto de datos a una concentración fija de AMP. Las concentraciones de AMP se muestran en la lista en la parte inferior derecha de la figura

obtuvo una recta y en los ajustes globales una hipérbola que intersecta el eje Y. Sin embargo, las curvas obtenidas a partir de ambos análisis igualmente coinciden respecto a la región que ocupan sus respectivas gráficas.

Para poder corroborar finalmente el mecanismo de inhibición por sustrato, se compararon las simulaciones de K_i^{glu} obtenidas a partir del ajuste de cada uno de los dos modelos (“E-Glu” y “E-Glu & E-AMP-Glu”) por separado. En la **Figura 16** se muestran los valores de K_i^{glu} obtenidos empíricamente en función de MgADP (que son los mismos datos que se muestran en la **Figura 11D**, pero una curva por cada gráfico), además del mejor ajuste realizado sobre cada uno de estos valores en función de MgADP a partir del análisis de ajustes por partes. A esto se suma las simulaciones de este parámetro obtenidas a partir del modelo “E-Glu & E-AMP-Glu” (ecuación 13), y a partir del modelo “E-Glu” (ecuación 11). Como se observa en la **Figura 16**, en todos los casos la simulación realizada a partir del modelo “E-Glu & E-AMP-Glu” se ajusta considerablemente a los datos empíricos de K_i^{glu} , a diferencia de las simulaciones a partir del modelo “E-Glu”, donde en todos los casos se obtuvieron rectas que y tienen un comportamiento muy diferente a la que mejor se ajusta a éstos. Con este resultado, la conclusión de que la inhibición por sustrato en la actividad GK ocurre mediante la formación de dos puntos muertos se vuelve mucho más robusta.

Con estos resultados podemos concluir que ambos análisis independientes realizados con los mismos conjuntos de datos cinéticos convergen en un mismo resultado. Esto nos permite concluir en forma robusta que MmPFK/GK, en su actividad

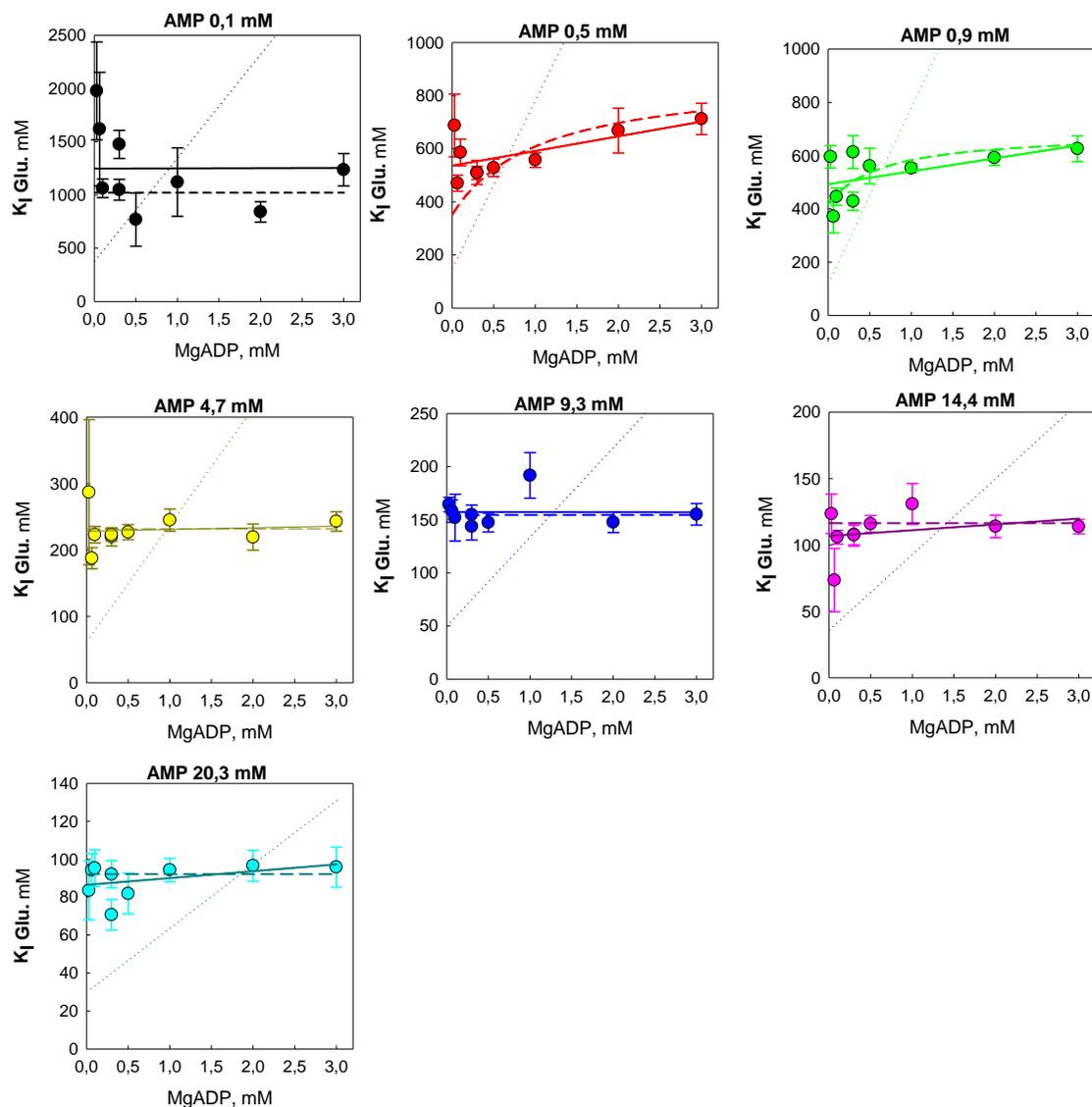


Figura 16. Comparación de los modelos “E-Glu” y “E-Glu & E-AMP-Glu” en los gráficos de K_i^{glu} en función de la concentración de MgADP.

Los datos de K_i^{glu} son los mismos que se muestran en la **Figura 11.D**; las líneas continuas corresponden a los mejores ajustes realizados sobre estos datos, que en cada caso correspondió a una recta. Las líneas discontinuas corresponden a curvas simuladas utilizando los parámetros obtenidos a partir del ajuste del modelo “E-Glu & E-AMP-Glu”, que fue mejor ajuste obtenido en el análisis de ajustes globales realizado sobre cada conjunto de datos a una concentración fija de AMP. Las líneas punteadas corresponden a rectas simuladas utilizando los parámetros obtenidos del ajuste global del modelo “E-Glu” para cada concentración fija de AMP. Las concentraciones de AMP se indican en cada gráfico.

GK, posee un mecanismo secuencial-ordenado con la formación de dos complejos de punto muerto, E-Glu y E-AMP-Glu.

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que AMP no produce modificaciones cualitativas en el mecanismo cinético de la actividad GK, pues se obtuvo el mismo mecanismo cinético y de inhibición por sustrato para todas las concentraciones ensayadas, a pesar de que AMP activa a la enzima y, además, aumenta en forma cuantitativa la inhibición por sustrato. Por otro lado, como se dijo anteriormente, el mecanismo de inhibición por glucosa que se ha determinado es evidencia indirecta de que MgADP es el primer sustrato en unirse a la enzima y AMP el último producto en disociarse, de lo contrario este mecanismo no tendría sentido. Sin embargo, hace falta corroborar el mecanismo propuesto, para lo cual se realizaron estudios de inhibición por un análogo de producto.

3.3.1.2.3 Corroboración del orden de disociación de productos mediante inhibición por GMP

Hasta ahora tenemos evidencia indirecta acerca del orden de unión de sustratos y disociación de productos. Un método directo para investigar este aspecto es la realización de estudios de inhibición por producto. Sin embargo, en nuestro caso, el producto glucosa-6P (G6P) es consumido en las reacciones auxiliares utilizadas para realizar los ensayos cinéticos, por lo que no es posible la realización de estudios de inhibición por este producto utilizando el mismo método. Por otro lado, como AMP, además de ser un inhibidor como producto de la reacción, también es un activador de la enzima, la realización de ensayos de inhibición en este caso requeriría la previa

suposición de un mecanismo de activación para poder interpretar de los datos. Además, como se mostró en secciones anteriores, la inhibición por AMP ocurre a altas concentraciones de este producto (**Figura 6**). Debido a estas dificultades metodológicas, para determinar el orden de disociación de los productos desde el sitio activo y para obtener evidencia independiente que nos permita corroborar cuál es el orden de unión de los sustratos, se realizaron estudios de inhibición utilizando un análogo de AMP. En este caso se escogió GMP, ya que, como se observa en la **Figura 7A**, es el único nucleótido monofosfato que solo presenta un efecto inhibitorio sobre la enzima, y ára el que es posible visualizar la saturación de este efecto en el intervalo de concentraciones usadas para los ensayos.

Para determinar el mecanismo de inhibición por GMP se obtuvieron tanto curvas de glucosa como de MgADP, a distintas concentraciones de GMP y a concentraciones fijas y saturantes de MgADP (1 mM) y de glucosa (100 mM) respectivamente (**Figura 17**). A cada curva de glucosa se ajustó un modelo de inhibición por sustrato (ecuación 3) y a cada curva de MgADP, una hipérbola michaeliana (ecuación 2). De estos ajustes se obtuvieron los parámetros V_m^{glu} , K_m^{glu} y K_i^{glu} , junto con V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} en función de GMP.

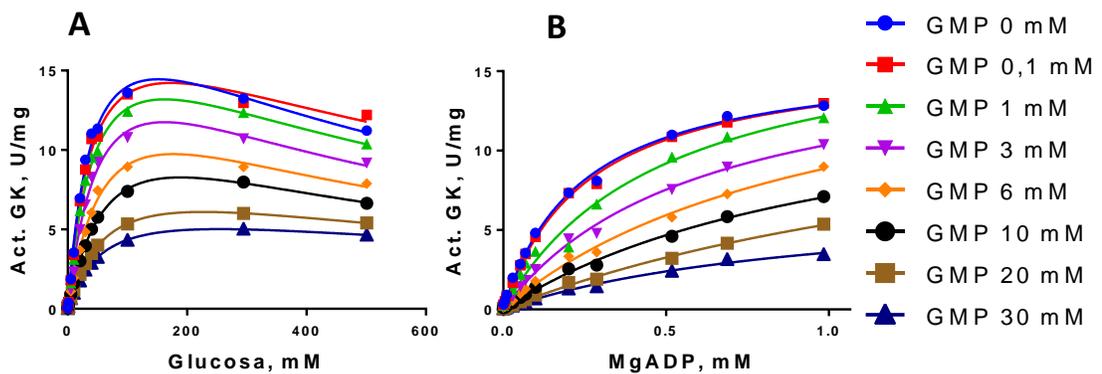


Figura 17. Curvas de Glucosa y MgADP a distintas concentraciones de GMP.

Curvas de Glucosa (A) y MgADP (B) obtenidas a distintas concentraciones de GMP, indicadas en la lista a la derecha de la figura. Cada conjunto de curvas fue obtenido a una concentración fija saturante de cosustrato, MgADP 1 mM para las curvas de glucosa y glucosa 100 mM para las de MgADP. A cada curva de glucosa se ajustó un modelo de inhibición por sustrato (ecuación 3) y a cada curvas de MgADP, un modelo Michaeliano (ecuación 2). Los ensayos fueron realizados en un lector de placas Synergy 2 (Biotek) a 25 °C en HEPES-NaOH 50 mM pH 7,8; NAD⁺ 0,2 mM variando la concentración de Glucosa, MgADP y GMP manteniendo el Mg²⁺ libre a 1 mM. La actividad se siguió a través de un ensayo acoplado G6PDH siguiendo la producción de NADH midiendo la absorbancia a 340 nm.

Como puede observarse en la **Figura 18**, para V_m^{glu} en función de la concentración de GMP, el mejor ajuste fue un decaimiento hiperbólico con asíntota en cero (**Figura 18A**) y para K_m^{glu} , una hipérbola ascendente que intersecta el eje Y en un punto distinto de cero (**Figura 18B**); en tanto que para K_i^{glu} , una constante (**Figura 18C**). Estos datos indican que GMP presenta una inhibición de tipo mixto respecto a glucosa y que, además, no afecta la inhibición por sustrato. Si se supone un mecanismo secuencial-ordenado, de estos resultados se puede concluir que glucosa no es el primer sustrato en unirse y/o AMP no es el último producto en disociarse.

Para V_m^{MgADP} , el mejor ajuste fue una constante en función de la concentración de GMP (**Figura 18D**), y para K_m^{MgADP} , una recta con pendiente positiva (**Figura 18E**). Esto muestra que GMP es un inhibidor competitivo con respecto a MgADP. A partir de estos resultados, y suponiendo un mecanismo que involucra un complejo ternario, es posible concluir que AMP es el último producto en disociarse del sitio activo y que MgADP es el primer sustrato en unirse, pues AMP, o GMP en este caso, compiten con MgADP por la unión a la misma forma de enzima, que corresponde a la enzima libre. Estos resultados nos entregan evidencia independiente respecto al mecanismo cinético que ya se había sugerido en la sección anterior, pudiéndose determinar directamente que AMP es el último producto en disociarse del sitio activo y MgADP el primer sustrato en ingresar. Este mecanismo es el que se muestra en la **Figura 12C**.

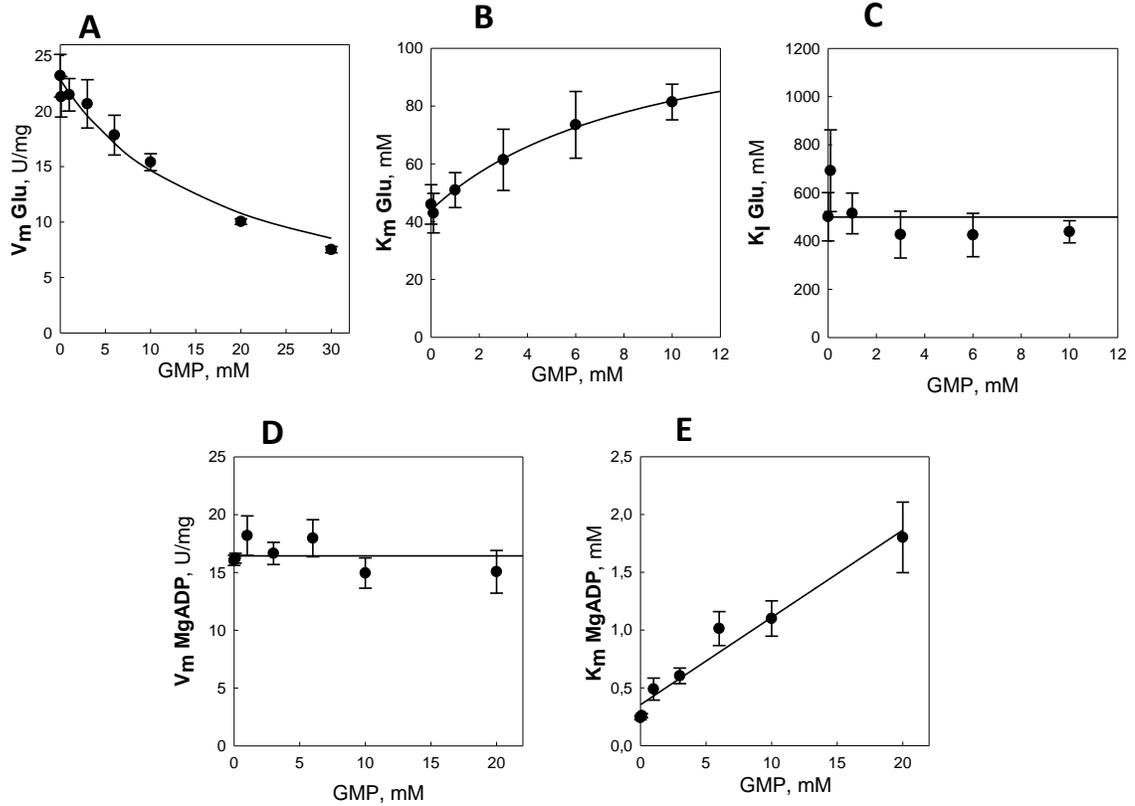


Figura 18. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos para glucosa y MgADP en función de GMP.

Los parámetros V_m^{glu} (A), K_m^{glu} (B) y K_i^{glu} (C), además de V_m^{MgADP} (D) y K_m^{MgADP} (E) en función de GMP se obtuvieron a partir de los ajustes realizados sobre los datos que se muestran en la **Figura 17**. El mejor ajuste para V_m^{glu} fue una hipérbola decreciente con asíntota en cero en función de GMP; para K_m^{glu} una hipérbola que intersecta el eje Y; para K_i^{glu} una constante; para V_m^{MgADP} una constante; para K_m^{MgADP} una recta con pendiente positiva.

3.3.1.3 Actividad PFK. Determinación del mecanismo cinético y mecanismo de inhibición por F6P

Para la actividad PFK se realizaron más de 800 mediciones de actividad enzimática variando las concentraciones de F6P, de MgADP y de AMP. A partir de estos datos se seleccionaron más de 70 curvas de saturación para F6P a distintas concentraciones de MgADP y de AMP (**Figura 19**), además de más de 80 curvas de saturación para MgADP a distintas concentraciones de F6P y de AMP (**Figura 21**). Como se observa en la **Figura 19**, en todas las curvas de saturación para F6P se observó inhibición por sustrato, por lo que a cada una de ellas se les ajustó el modelo canónico de inhibición por sustrato (ecuación 3). En las curvas de saturación para MgADP no se observó inhibición, por lo que a cada una se ajustó la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 2) (**Figura 21**). A partir de estos ajustes se obtuvieron los parámetros V_m^{F6P} , K_m^{F6P} y K_I^{F6P} a distintas concentraciones de MgADP y de AMP (**Figura 20**) y los parámetros V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} a distintas concentraciones de F6P y de AMP (**Figura 22**).

Para la descripción de esta actividad enzimática se procedió de la misma forma que se hizo con la actividad GK para determinar su mecanismo cinético y de inhibición por sustrato. Se realizaron los mismos análisis independientes de ajustes por partes y de ajustes globales, considerando los conjuntos de datos obtenidos a cada concentración de AMP.

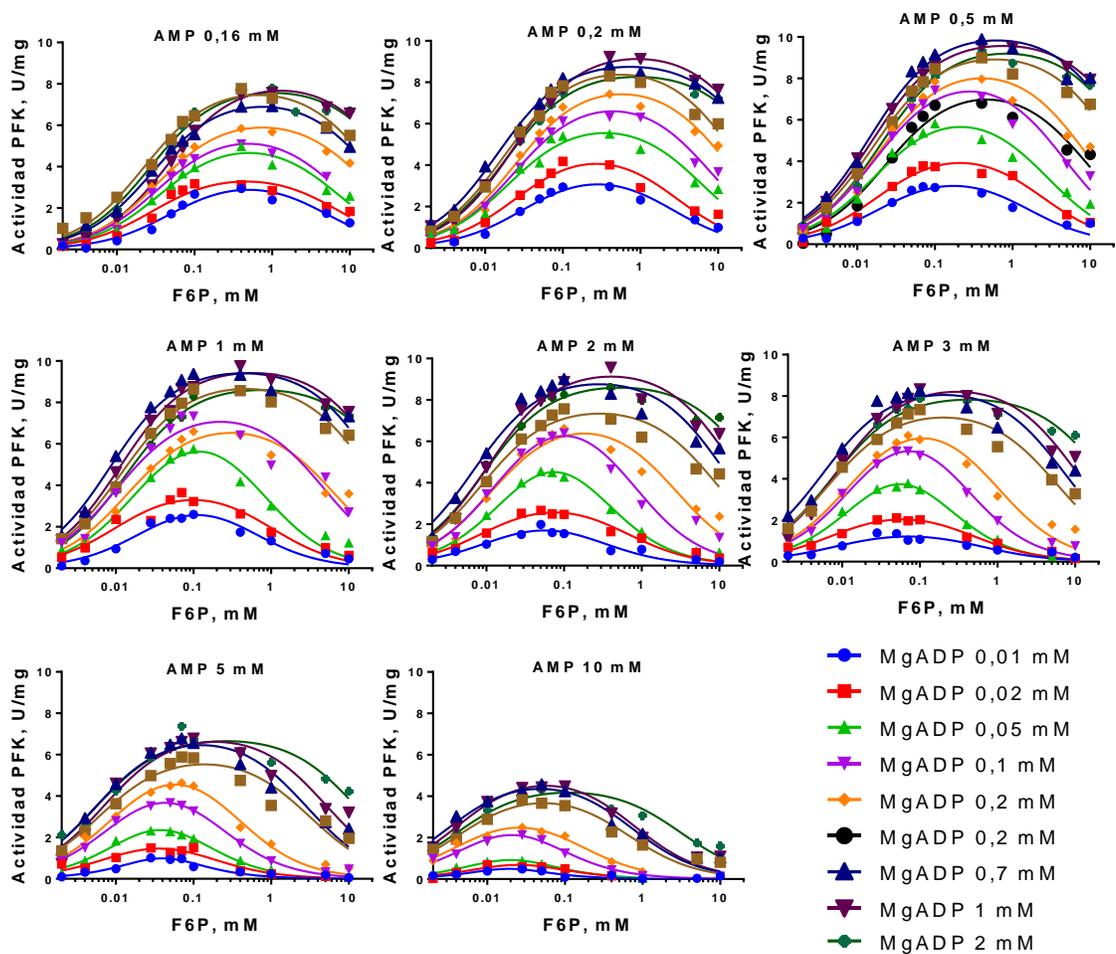


Figura 19. Curvas de saturación para F6P obtenidas a distintas concentraciones de AMP y de MgADP.

En cada gráfico se agrupan distintas curvas de saturación para F6P obtenidas a distintas concentraciones de MgADP (indicadas en la lista en la parte inferior derecha de la figura) y a una misma concentración fija de AMP (indicadas arriba de cada gráfico). Los ensayos fueron realizados en un lector de placas Synergy 2 (Biotek) a 25 °C en PIPES-NaOH 50 mM pH 6,5; NADH 0,2 mM, variando la concentración de F6P, MgADP y AMP, manteniendo el Mg^{2+} libre constante a 1 mM. La actividad se siguió mediante un ensayo acoplado GTA siguiendo la actividad enzimática mediante el consumo de NADH midiendo absorbancia a 340 nm en el tiempo. A todas las curvas se le ajustó por separado un modelo de inhibición por sustrato (ecuación 3). En cada gráfico el eje X se encuentra en escala logarítmica.

Cabe mencionar que en esta actividad enzimática los valores de K_m^{F6P} fueron mucho más pequeños que los obtenidos para K_m^{glu} , encontrándose en un orden de magnitud cercano a 10^{-2} mM. Debido a esto, la realización de los ensayos para la actividad PFK fue técnicamente más dificultosa que para la actividad GK, ya que para poder muestrear las curvas de saturación a concentraciones de F6P cercanas a K_m^{F6P} y por debajo de ésta, se debieron usar concentraciones de sustrato bajo los 10 μ M, cercanas al límite de detección de la metodología, lo que tiene como consecuencia dificultades en la estimación de la velocidad inicial. Junto con eso, las constantes de inhibición por sustrato también fueron más pequeñas, lo que tiene como consecuencia que los errores en la estimación de los tres parámetros, V_m^{F6P} , K_m^{F6P} y K_i^{F6P} , sean más grandes que en el caso de los parámetros de la reacción GK. Además, el efecto activador de AMP en la reacción PFK es de menor magnitud que en el caso de la reacción GK. Todos estos factores influyen en que los errores de estimación de parámetros en la determinación del mecanismo cinético, así como también en la activación por AMP sean mayores que en el caso de la actividad GK.

3.3.1.3.1 Determinación del tipo de mecanismo cinético

Al igual que para la actividad GK, primero se procedió al análisis de ajustes por parte de los parámetros cinéticos V_m^{F6P} y K_m^{F6P} con el fin de determinar el tipo de mecanismo cinético para esta actividad.

El mejor ajuste para V_m^{F6P} en función de la concentración de MgADP fue una hipérbola Michaeliana para todas las concentraciones fijas de AMP ensayadas (**Figura**

20A), lo que, como hemos visto, es esperable y común tanto para un mecanismo ping-pong como para uno secuencial-ordenado. Por otro lado, el menor ajuste para K_m^{F6P} fue una constante para todas las concentraciones de AMP ensayadas (**Figura 20B**). Como se dijo anteriormente, este comportamiento es compatible con una hipérbola cuyo punto de intersección en el eje Y es igual a su asíntota cuando la concentración de MgADP tiende a infinito. Los resultados obtenidos, tanto para V_m^{F6P} como para K_m^{F6P} , nos permiten establecer un mecanismo secuencial-ordenado para la actividad PFK.

3.3.1.3.2 Determinación del mecanismo de inhibición por F6P

Posibles mecanismos de inhibición por F6P

Debido a que se ha establecido un mecanismo secuencial-ordenado, con la actividad PFK puede procederse de la misma manera que para la actividad GK, considerando todos los mecanismos posibles de inhibición por sustrato mediante la formación de complejos de punto muerto. Estos serían los mismos que se muestran en la **Figura 12**, solo que reemplazando glucosa por F6P en todos los casos. Así mismo, las mismas ecuaciones que se dedujeron en el caso de la actividad GK para estos mecanismos (ecuaciones 11, 12, 13) son válidas para la actividad PFK, pero reemplazando [glucosa] por [F6P] en todos los casos. Consecuentemente, para esta actividad los modelos serán rebautizados como “E-F6P”, “E-AMP-F6P” y “E-F6P & E-AMP-F6P”.

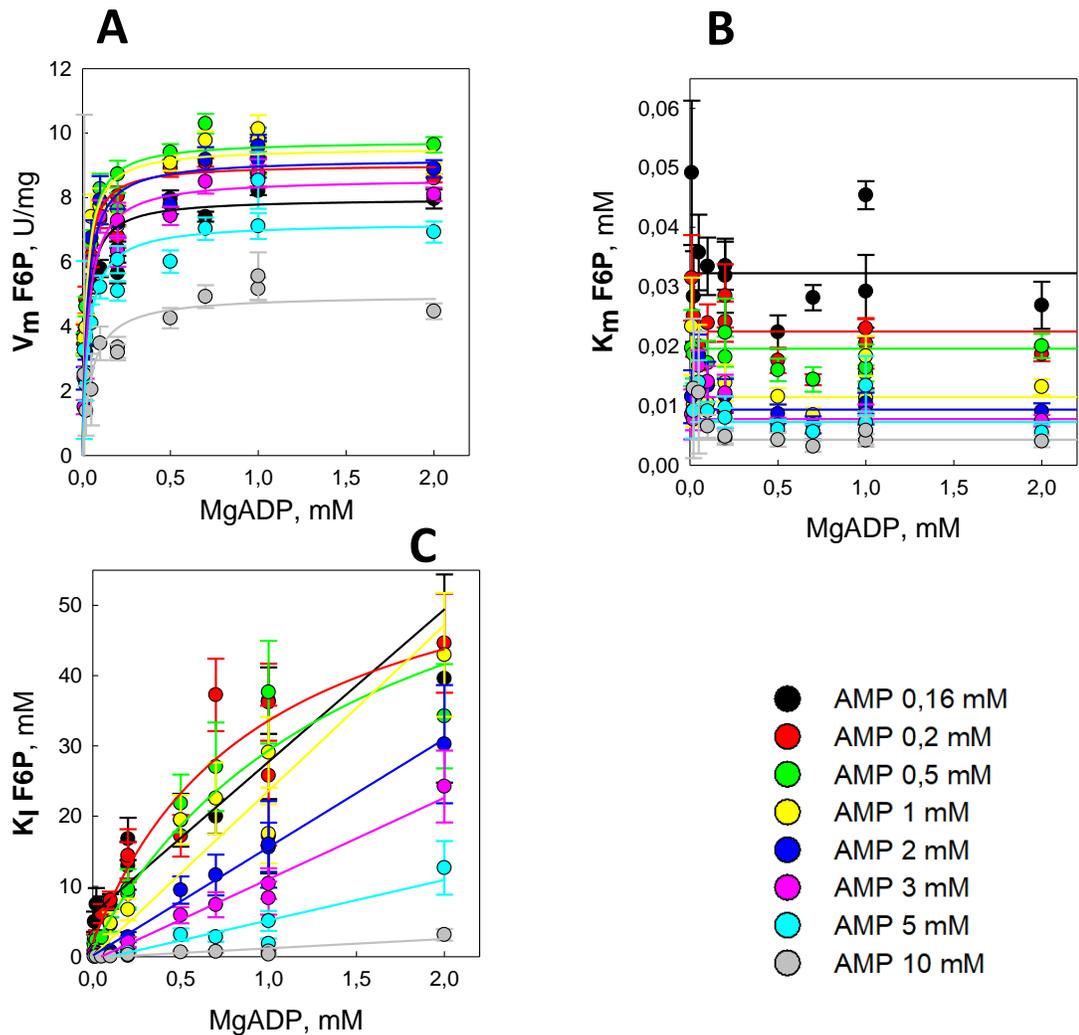


Figura 20. Gráficos secundarios para los parámetros cinéticos de F6P en función de MgADP.

Parámetros V_m^{F6P} (A), K_m^{F6P} (B) y K_i^{F6P} (C) para la actividad PFK en función de MgADP a distintas concentraciones fijas de AMP. Las concentraciones de AMP se indican en la parte inferior derecha. Los valores se estimaron a partir de los ajustes de la ecuación 3 realizados sobre los datos que se muestran en la **Figura 19**. El mejor ajuste para todas las curvas de V_m^{F6P} fue una hipérbola centrada en el origen en función de MgADP; para cada curva de K_m^{F6P} , una constante. En las curvas de K_i^{F6P} , para AMP 0,16 mM y desde AMP 1 mM en adelante, el mejor ajuste fue una recta; para AMP 0,2 y 0,5 mM, una hipérbola que intersecta el eje Y. Los mejores ajustes se determinaron utilizando A.I.C. (ver **Tabla 4** para K_i^{F6P}).

A.I.C. K_i^{F6P}		
AMP, mM	recta	hipérbola
0,16	12,78	16,39
0,2	18,9	12,88
0,5	13,75	6,601
1	18,15	24,13
2	22,41	28,87
3	25,04	32,16
5	17,33	22,69
10	15,74	20,96

Tabla 4. Valores de AIC para distintos ajustes de K_i^{F6P} en función de MgADP.

Valores de AIC calculados para el ajuste de una recta o de una hipérbola que intersecta el eje Y a los valores de K_i^{F6P} en función de la concentración de MgADP (**Figura 20C**) obtenidas a distintas concentraciones de AMP. En negrita se destaca el menor valor de AIC para cada concentración de AMP.

Análisis de K_i^{F6P} en función de MgADP

En esta actividad, al igual que en la actividad GK, para los valores de K_i^{F6P} en función de [MgADP] se obtuvieron comportamientos monótonamente crecientes en todas las concentraciones de AMP (**Figura 20C**). Tomando esto en cuenta, es posible descartar que el mecanismo de inhibición ocurra solo mediante la formación del complejo E-AMP-F6P pues, de ser así, se obtendrían decrecimientos hiperbólicos para K_i^{F6P} en función de MgADP, lo que se desprende de la ecuación 15 (reemplazando glucosa por F6P) para K_i^{F6P} según el modelo “E-AMP-F6P”.

En la **Tabla 4** se muestran los valores de AIC para el ajuste de una recta y de una hipérbola que intersecta el eje Y para K_i^{F6P} en función de MgADP a cada una de las concentraciones de AMP ensayadas. Para la concentración más baja de AMP (0,16 mM) el mejor ajuste resultó ser una recta; en tanto que para AMP 0,2 mM y 0,5 mM resultó ser una hipérbola con intersección en el eje Y distinta del origen. Para concentraciones de 1 mM o mayores, se obtuvieron rectas (**Figura 20C**). Una interpretación para este comportamiento sería que a bajas concentraciones de AMP la inhibición por sustrato ocurra mediante la formación de dos complejos de punto muerto, vale decir un modelo “E-F6P & E-AMP-F6P”; pero a altas concentraciones de AMP pasase a ser E-F6P el único complejo de punto muerto. Sin embargo, como ya vimos en el caso de la actividad GK, esto podría deberse a un artefacto de la dispersión de los datos para K_i^{F6P} , por lo que se hace necesario analizar los parámetros para MgADP y, junto con eso, realizar ajustes globales, para así poder llegar a una conclusión.

Análisis de las curvas de saturación para MgADP

A partir de los mismos resultados cinéticos que se muestran en la **Figura 19**, se seleccionaron más de 80 curvas de saturación para MgADP a distintas concentraciones fijas de F6P y de AMP, las que se observan en la **Figura 21**.

Como no se observó inhibición por sustrato, a cada una de estas curvas se le ajustó un modelo Michaeliano (Ecuación 2). A partir de estos ajustes se determinaron los parámetros cinéticos V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} en función de F6P, a distintas concentraciones fijas de AMP (**Figura 22**). Para V_m^{MgADP} se obtuvo que, para concentraciones de AMP de 1 mM o más bajas, el mejor ajuste corresponde a un modelo de inhibición por sustrato (Ecuación 3); sin embargo, para concentraciones de AMP 1 mM o mayores, el mejor ajuste es una hipérbola Michaeliana (**Figura 22A**). Esto puede verse en la **Tabla 5**, donde se muestran los valores de AIC para el ajuste de ambos modelos a las curvas de V_m^{MgADP} en función de F6P a concentraciones fijas de AMP (los datos de V_m^{MgADP} correspondientes a AMP 10 mM se obtuvieron errores y dispersiones considerables, por lo que no se muestran en la **Figura 22A**). Interesantemente, a grandes rasgos, lo obtenido mediante este análisis es consistente con lo obtenido para K_i^{F6P} , ya que también constituye evidencia de que al aumentar la concentración de AMP el mecanismo de inhibición por sustrato pasa de ser mediante la formación de dos complejos de punto muerto a un mecanismo en donde solo se forma el complejo no productivo E-F6P.

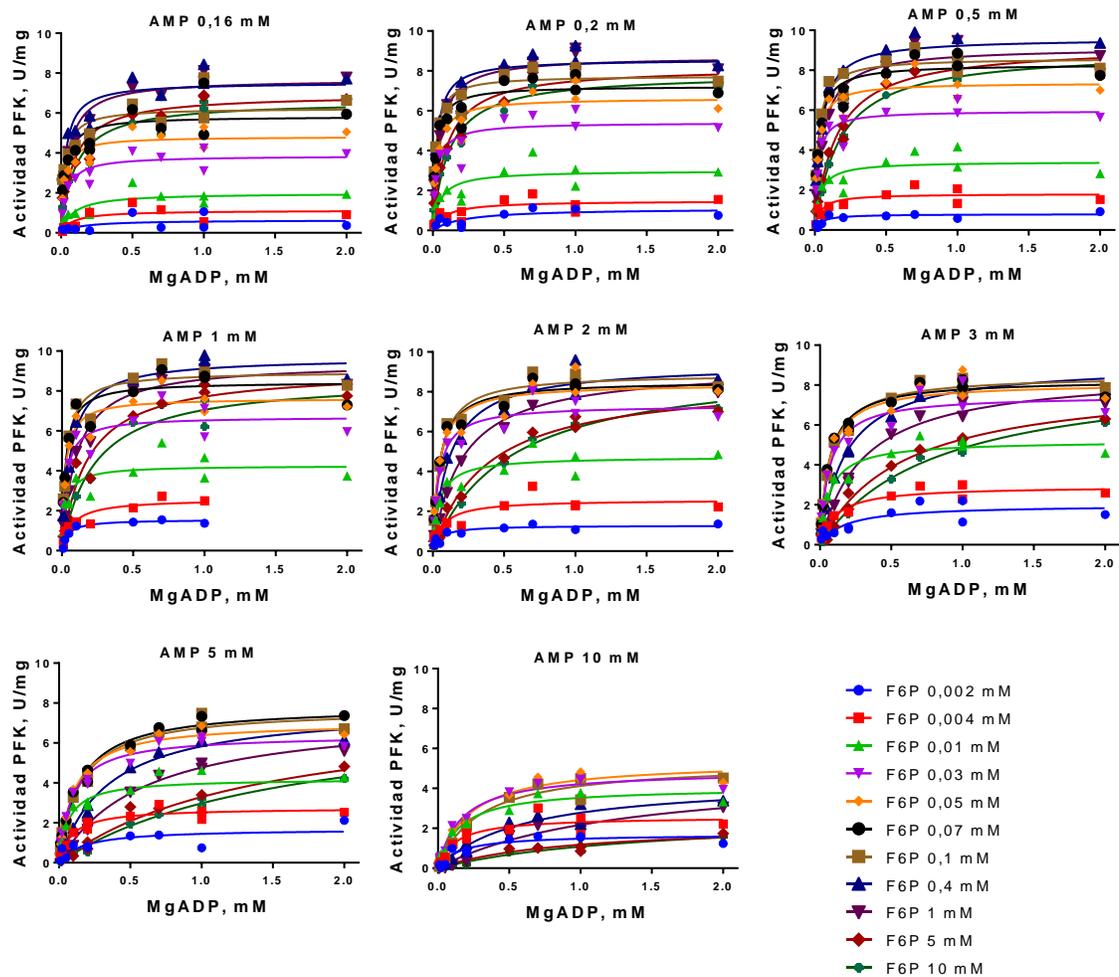


Figura 21. Curvas de saturación para MgADP obtenidas a distintas concentraciones de AMP y de F6P.

En cada gráfico se agrupan distintas curvas de saturación para MgADP obtenidas a distintas concentraciones de F6P (indicadas en la lista en la parte inferior derecha de la figura) y a una concentración fija de AMP (indicadas arriba de cada gráfico). Los ensayos fueron realizados en un lector de placas Synergy 2 (Biotek) a 25 °C en PIPES-NaOH 50 mM pH 6,5; NADH 0,2 mM, variando la concentración de F6P, MgADP y AMP, manteniendo el Mg^{2+} libre a 1 mM. La actividad PFK se siguió mediante un ensayo acoplado GTA mediante el consumo de NADH, siguiendo la absorbancia en el tiempo a 340 nm. A todas las curvas se le ajustó un modelo Michaeliano (ecuación 2). Los datos que se muestran en esta figura son los mismos de la **Figura 19**, pero reordenados de esta forma.

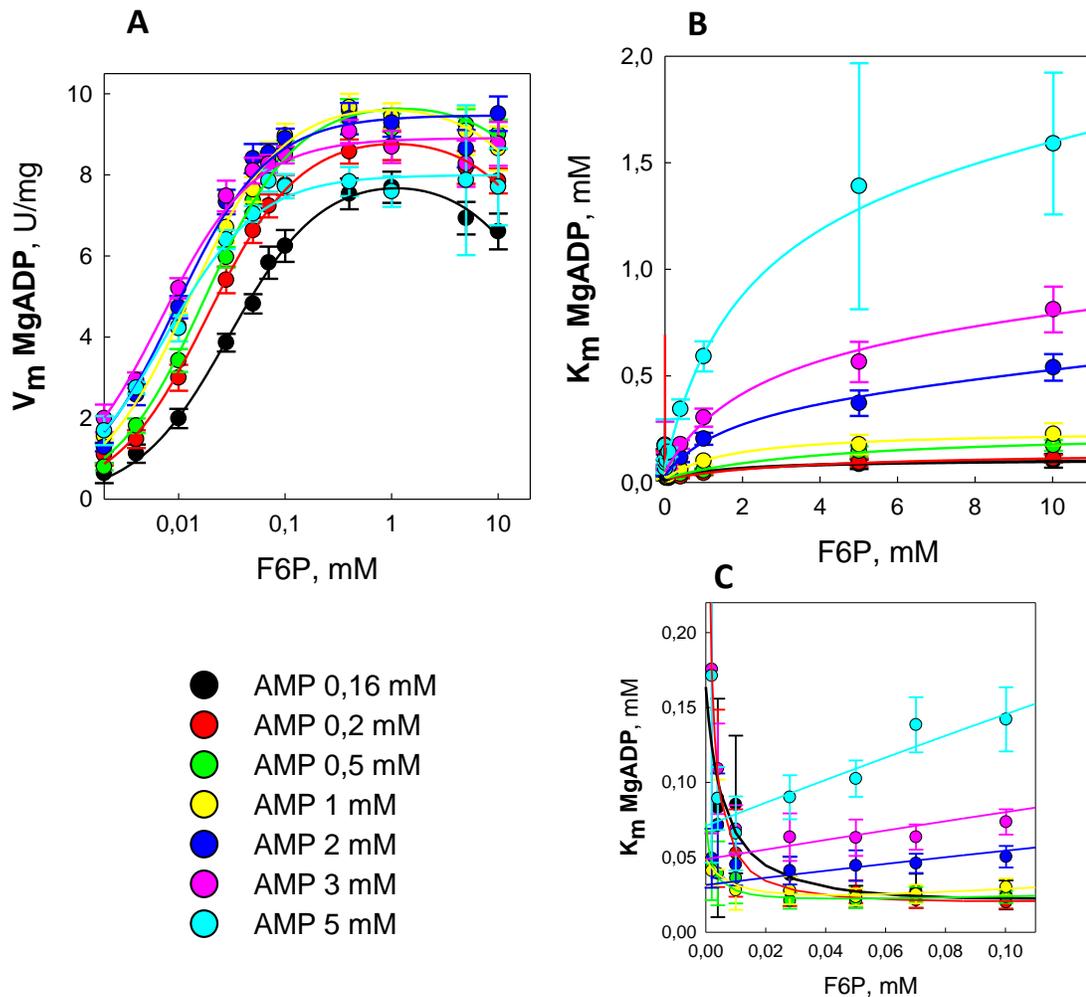


Figura 22. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos para MgADP en función de F6P.

V_m^{MgADP} (A) y K_m^{MgADP} (B) de la actividad PFK en función de glucosa a distintas concentraciones fijas de AMP, las que se indican en la parte inferior izquierda de la figura. En C se muestra el mismo gráfico de (B), pero con un acercamiento a valores bajos tanto de F6P como en el eje de las ordenadas, donde se observa que todos los ajustes intersecan el eje Y en un punto distinto de cero. Los valores de cada parámetro se estimaron a partir de los ajustes de la ecuación 2 realizados sobre datos que se muestran en la **Figura 21**. El mejor ajuste para todas las curvas de V_m^{MgADP} fue un modelo de inhibición por sustrato en función de F6P; para las de K_m^{MgADP} , cocientes de polinomios cuadráticos o una suma de una hipérbola más una recta para valores de AMP de 2 mM o superiores.

A.I.C. V_m^{MgADP}		
AMP, mM	Hipérbola Michaeliana	inh. por sustrato
0,16	8,911	-1,744
0,2	11,68	-5,148
0,5	15,59	12,86
1	6,524	5,084
2	12,06	14,72
3	2,434	3,252
5	5,148	9,015
10	23,41	7,938

Tabla 5. Valores de AIC para distintos ajustes de V_m^{MgADP} en función de F6P.

Valores de AIC para el ajuste de una hipérbola Michaeliana (ecuación 2) o modelo canónico de inhibición por sustrato (ecuación 3) a las curvas de V_m^{MgADP} en función de F6P (**Figura 22.A**) obtenidas a distintas concentraciones de AMP. En negrita se destaca el menor valor de AIC para cada concentración de AMP.

En cuanto a K_m^{MgADP} en función de F6P, como se muestra en la **Figura 22B** y 22C, en todos los casos se obtuvieron comportamientos en los cuales se intersecta el eje Y en un punto distinto de cero y que se vuelven monótonamente crecientes a medida que F6P tiende a infinito. Para la mayoría de las concentraciones de AMP, el mejor ajuste fue el de la ecuación con menos variables. Sin embargo, en algunos casos fue necesario ajustar la ecuación correspondiente a K_i de la ecuación 13A. Para la actividad PFK, el comportamiento de este parámetro fue bastante distinto a una hipérbola que intersecta el eje Y, sobre todo a concentraciones bajas de AMP, donde se obtuvieron curvas con un comportamiento decreciente a bajas concentraciones de cosustrato seguido de un crecimiento luego de haber alcanzado un mínimo. Este comportamiento es compatible con ambos modelos posibles de inhibición por sustrato. Sin embargo, debido al error que se presentó en la estimación de este parámetro y a la gran cantidad de comportamientos matemáticos compatibles con las distintas posibilidades de éste en función de F6P, no se puede extraer mucha información acerca del mecanismo cinético a partir del comportamiento de K_m^{MgADP} en función de F6P.

Análisis de ajustes globales

Para corroborar las conclusiones obtenidas mediante el análisis de ajustes por partes, se procedió a realizar un análisis independiente a través ajustes globales de cada una de las ecuaciones de velocidad inicial resueltas para cada uno de los dos posibles modelos de inhibición por sustrato (ecuaciones 11 y 13) al igual que como se hizo con la actividad GK. Estas ecuaciones se ajustaron a cada uno de los conjuntos de datos de

velocidad inicial en función de las concentraciones de MgADP y de F6P para cada concentración fija de AMP (éstos corresponden a cada gráfico de la **Figura 19 y Figura 21**).

En el análisis de ajustes por partes se obtuvo que K_m^{F6P} en función de MgADP es una constante en todas las concentraciones de AMP ensayadas. Teniendo esto en cuenta, además de ajustar globalmente las ecuaciones 11 y 13, correspondientes al modelo "E-F6P" y al modelo modelo "E-F6P & E-AMP-F6P" respectivamente, también se ajustaron esas mismas ecuaciones, pero forzando que K_m^{F6P} sea una constante en función de MgADP, vale decir forzando en ambas a que $D = D_a * D_g$ (de esta forma la intersección en el eje Y de la función hiperbólica que representa K_m^{F6P} en función de MgADP tendrá el mismo valor que cuando MgADP tiende a infinito, quedando como una constante). En resumen, se compararon cuatro modelos de inhibición por sustrato mediante ajustes globales: modelo "E-F6P", modelo "E-F6P" con K_m^{F6P} constante, modelo "E-F6P & E-AMP-F6P" y modelo "E-F6P & E-AMP-F6P" con K_m^{F6P} constante. Notar que al poner la restricción $D = D_a * D_g$, resulta en un modelo con un parámetro menos, vale decir, más parsimonioso.

Como se observa en la **Tabla 6**, el mejor ajuste para los conjuntos de datos, obtenidos a una concentración de AMP de 1 mM o menor, fue la ecuación 13 considerando $D = D_a * D_g$. Vale decir, el modelo "E-F6P & E-AMP-F6P" considerando K_m^{F6P} constante. Para los correspondientes a concentraciones de AMP de 2 mM o mayores, fue el de la ecuación 11 considerando $D = D_a * D_g$, es decir, el modelo "E-F6P" con K_m^{F6P}

constante.

Interesantemente, los resultados obtenidos mediante ajustes globales son similares a lo obtenido mediante el análisis de ajustes por partes, vale decir, el análisis de K_i^{F6P} en función de MgADP (Ver **Tabla 4**) y el de V_m^{MgADP} en función de F6P (ver **Tabla 5**). Si bien difieren respecto a la concentración de AMP en donde se produce la transición entre el modelo “E-F6P & E-AMP-F6P” y el modelo “E-F6P”, puede concluirse de forma robusta que existe un cambio de mecanismo de inhibición por F6P. Éste correspondería a la formación de dos puntos muertos a bajas concentraciones de AMP, pero cambiaría a uno donde solo se forma el complejo de punto muerto E-F6P a altas concentraciones de dicho efector.

Intuitivamente, que el complejo E-AMP-F6P deje de formarse al aumentar la concentración de AMP puede parecer paradójico, pues se esperaría que al aumentar la concentración de este producto, que sería el último en disociarse de la enzima, el complejo E-AMP-F6P aumente su concentración; pero en cambio sucede todo lo contrario. Vale decir, los resultados obtenidos hasta ahora muestran que en el incremento producido en la inhibición por el azúcar al aumentar la concentración por AMP, la formación del complejo E-AMP-F6P (o E-AMP-Glu) no sería el proceso más relevante. Esto es consistente con el hecho de que la K_i^{glu} no se vea afectada por la concentración de GMP (**Figura 18C**). Sin embargo, una explicación a esta aparente paradoja será otorgada más adelante, cuando se aborde el mecanismo de activación por AMP en esta enzima.

Valores A.I.C. Ajustes globales PFK				
[AMP]	(A)	(B)	(C)	(D)
0,16 mM	-124,46	-122,46	-126,70	-128,02
0,2 mM	-142,09	-138,93	-144,14	-144,38
0,5 mM	-139,77	-141,68	-138,12	-140,30
1 mM	-96,45	-98,67	-94,24	-96,48
2 mM	-118,95	-121,11	-116,70	-118,89
3 mM	-147,05	-148,90	-144,82	-146,70
5 mM	-167,32	-169,53	-165,08	-166,25
10 mM	-237,81	-239,97	-235,54	-237,74

(A) Modelo "E-F6P".

(B) Modelo "E-F6P"; K_m^{F6P} constante.

(C) Modelo "E-F6P & E-AMP-F6P".

(D) Modelo "E-F6P & E-AMP-F6P"; K_m^{F6P} constante.

Tabla 6. Valores de AIC para los ajustes globales para los datos cinéticos de la actividad PFK.

En la tabla se muestran los valores de AIC para los ajustes globales de distintos modelos sobre conjuntos de datos de velocidad inicial en función de las concentraciones de glucosa y MgADP a una concentración fija de AMP (las que se muestran en la primera columna de la tabla). (A) Modelo "E-F6P" (ecuación 11), (B) Modelo "E-F6P" con K_m^{F6P} constante (ecuación 11 con $D = D_A * D_g$), (C) Modelo "E-F6P & E-AMP-F6P" (ecuación 13) y (D) Modelo "E-F6P & E-AMP-F6P" con K_m^{F6P} constante (ecuación 13 con $D = D_A * D_g$). En negrita se destaca el menor valor de AIC para cada concentración de AMP.

Al igual como se realizó para la actividad GK, para la actividad PFK se analizó la convergencia de ambos análisis. Para esto se realizaron simulaciones de los parámetros cinéticos V_m^{F6P} , K_m^{F6P} y K_i^{F6P} en función de MgADP y de V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} en función de F6P a partir de los parámetros obtenidos mediante los mejores ajustes globales de las ecuaciones 11 o 13, en ambos casos considerando K_m^{F6P} como una constante en función de MgADP (considerando el menor valor de AIC, como se muestra en la **Tabla 6**). Estas simulaciones se compararon con los mejores ajustes obtenidos mediante el análisis de ajustes por parte, realizados sobre los valores de estos parámetros obtenidos empíricamente (los que se muestran en la **Figura 20** y **Figura 22**). Esta comparación se muestra en la **Figura 23**. Puede observarse que las mejores coincidencias se dan para V_m^{F6P} , K_m^{F6P} en función de MgADP y para V_m^{MgADP} en función de F6P (**Figura 23A**, **23B** y **23D** respectivamente). Para K_i^{F6P} en función de MgADP la coincidencia es algo menor (**Figura 23C**). Esto puede deberse principalmente al error que se obtuvo al estimar este parámetro. Sin embargo, a concentraciones bajas de MgADP se obtienen mejores coincidencias para la mayoría de las curvas. Además, cabe mencionar que un leve cambio en la pendiente puede ocasionar que dos rectas con un origen común se distancien considerablemente a medida que se avanza en el eje X, que es lo que parece ocurrir para la mayoría de los casos en los que se compararon rectas para K_i^{F6P} . Sin embargo, pese a las divergencias encontradas, globalmente el resultado obtenido es similar, obteniéndose comportamientos bastante robustos para cada una de las curvas para K_i^{F6P} a medida que se aumenta la concentración de AMP. Finalmente, K_m^{MgADP} fue el

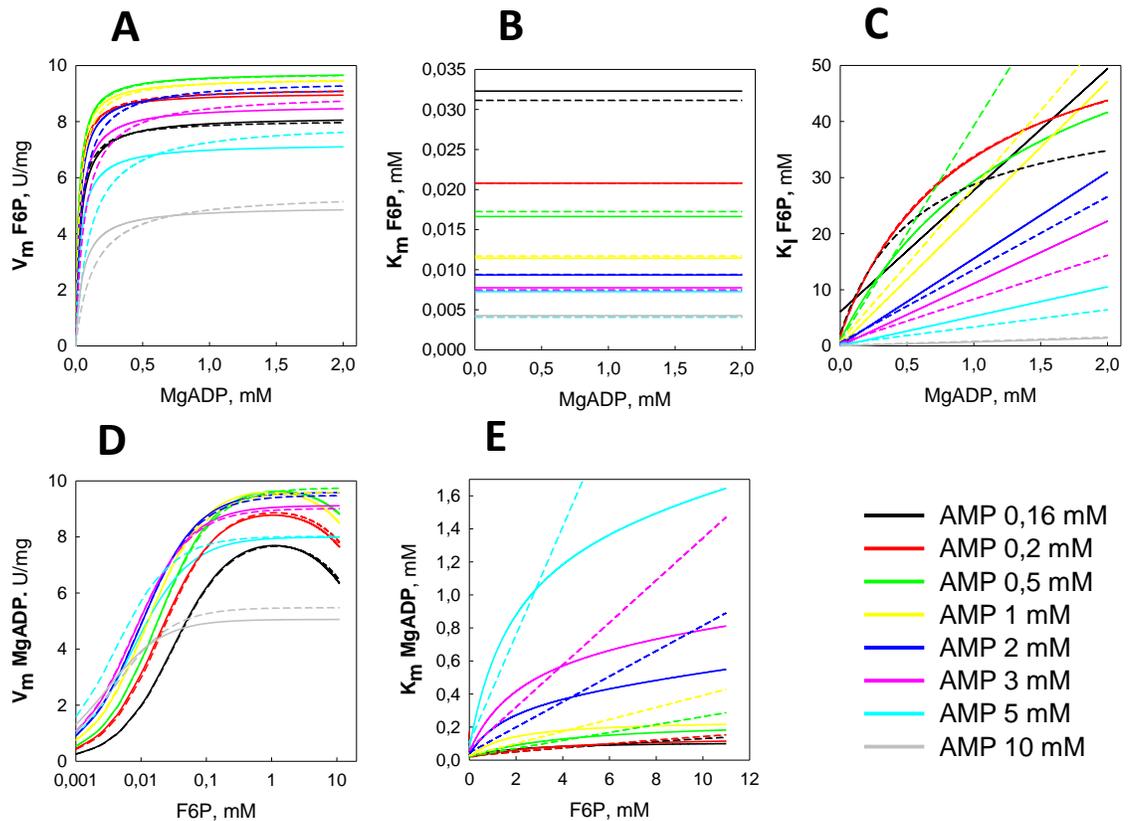
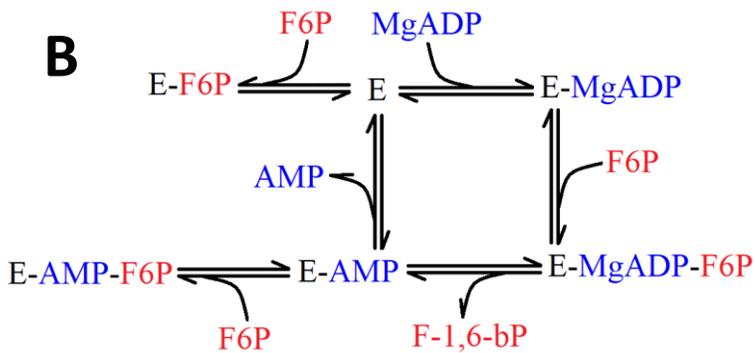
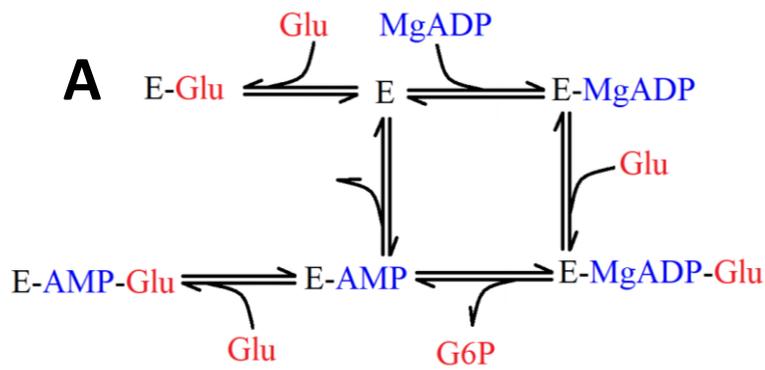


Figura 23. Comparación de los análisis de ajustes globales y ajustes por partes.

En cada gráfico, las líneas continuas corresponden a los mejores ajustes realizados sobre los parámetros cinéticos para cada sustrato de la actividad PFK en función de su cosustrato: A) V_m^{F6P} , B) K_m^{F6P} , C) K_i^{F6P} , D) V_m^{MgADP} , E) K_m^{MgADP} . Estos ajustes son los mismos que se muestran en la **Figura 20** y **Figura 22** para esos parámetros. Las líneas discontinuas corresponden a curvas simuladas para cada parámetro cinético en función de su cosustrato a partir del mejor ajuste global de las ecuaciones 11 o 13 (el ajuste con menor AIC en la **Tabla 6**) realizado sobre cada conjunto de datos a una concentración fija de AMP. Las concentraciones de AMP se muestran en la lista en la parte inferior derecha de la figura.

parámetro donde más error se obtuvo en su estimación, por lo que es esperable que sea también donde se obtuvieron más divergencias en esta comparación (**Figura 23E**). Sin embargo, al igual que lo que ocurre con K_i^{F6P} , a bajas concentraciones de cosustrato las curvas (obtenidas a partir de simulaciones y de ajustes por partes) tienden a converger. Por otro lado, el comportamiento de estas curvas a medida que se aumenta la concentración de AMP también es robusto para este parámetro.

En la **Figura 24** se muestra el mecanismo cinético determinado para ambas actividades enzimáticas. En ambos casos éste corresponde a un mecanismo secuencial-ordenado donde MgADP es el primer sustrato en unirse a la enzima y AMP el último producto en disociarse, y este mecanismo no es modificado por AMP. Para ambas actividades, la inhibición por el sustrato azúcar ocurriría mediante la formación de dos complejos no productivos E-azúcar y E-AMP-azúcar. Sin embargo, en la actividad PFK (**Figura 24B**), este último complejo dejaría de formarse a medida que la concentración de AMP aumenta.



↓ [AMP]↑

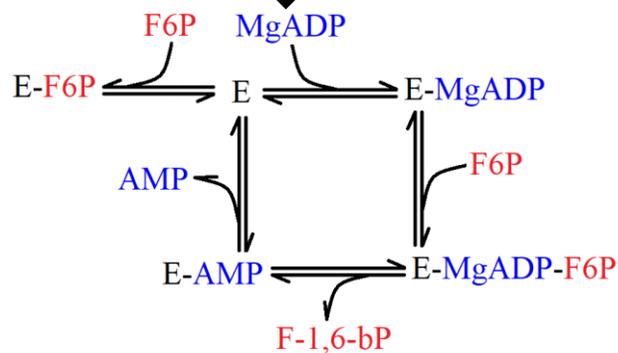


Figura 24. Modelos para el mecanismo cinético de cada actividad de MmPFK/GK.

Modelo propuesto para el mecanismo cinético de la actividad GK (A) y PFK (B). Ambos modelos consisten en un mecanismo secuencial-ordenado donde MgADP es el primer sustrato en unirse a la enzima y AMP el último producto en disociarse. Para ambas actividades ocurre inhibición por glucosa mediante la formación de dos complejos de punto muerto, E-Azúcar y E-AMP-Azúcar. Sin embargo, para PFK en altas concentraciones de AMP deja de formarse el complejo E-AMP-Azúcar.

3.3.2 Determinación del mecanismo de activación por AMP en MmPFK/GK

Hasta ahora hemos determinado en detalle el mecanismo cinético y de inhibición por el sustrato azúcar de la enzima MmPFK/GK para sus dos actividades, lo que se realizó a distintas concentraciones de AMP. Teniendo esto en cuenta ahora se procederá a determinar el mecanismo de activación por AMP.

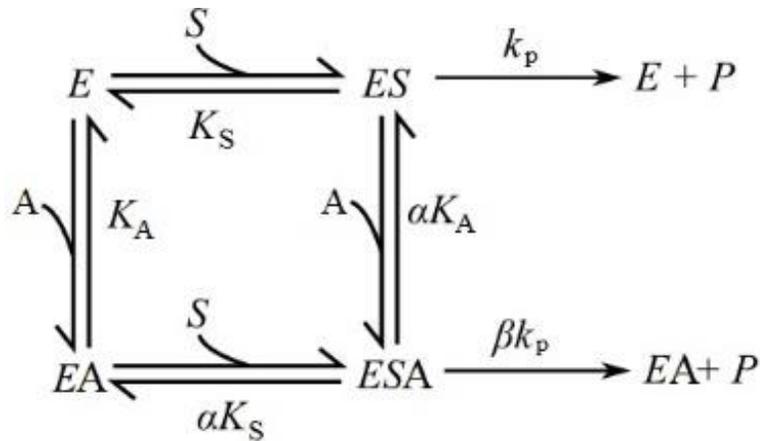
La activación enzimática puede ocurrir mediante tres mecanismos: 1) mediante un aumento en la catálisis, que se manifiesta como un incremento en la constante catalítica de la enzima; 2) mediante un aumento en la afinidad por el sustrato, que se manifiesta en una disminución en la K_m para ese sustrato; 3) mediante un mecanismo mixto que incluye una mezcla de ambos componentes. Como estamos frente a una enzima bisustrato, el efecto de AMP debe analizarse para cada sustrato por separado a concentraciones fijas del cosustrato.

A partir de los mismos datos que se muestran en la **Figura 10** y **Figura 13** para la actividad GK y en la **Figura 19** y **Figura 21** para la actividad PFK, se seleccionaron conjuntos de datos de velocidad inicial en función de distintas concentraciones de un sustrato y del efector AMP, manteniendo fija la concentración del otro sustrato. En este caso, se realizó un análisis de ajustes por separado, considerando de forma individual cada curva de saturación para MgADP o para el azúcar (glucosa o F6P), y obteniendo los parámetros cinéticos para cada sustrato en función de AMP a concentraciones fijas de cosustrato. Para determinar el mecanismo de activación se utilizó el modelo matemático de modificación general de la actividad enzimática, el que se explicará a continuación.

3.3.2.1 Modelo de modificador general de la actividad enzimática

En el nivel fenomenológico de la cinética enzimática en estado estacionario, tanto la inhibición (total o parcial) como la activación, pueden modelarse utilizando el mismo modelo matemático generalizado, llamado “modelo de modificación general de la actividad enzimática” (**Figura 25**). Cualquier modificación en la actividad enzimática producto de la unión de un ligando, ya sea inhibición o activación, pueden ocurrir mediante cualquiera de los tres los mecanismos mencionados anteriormente.

Un modelo de modificación general de actividad enzimática debe permitir la cuantificación de una constante de activación (o de inhibición, si fuera el caso), como también la cuantificación de los efectos del modificador sobre la afinidad del sustrato y sobre la catálisis. El modelo más básico considera la unión de un solo sustrato y de un efector en un ciclo termodinámico donde existen a la vez la enzima libre (E), la enzima unida a un sustrato (ES), la enzima unida al efector (EA) y la enzima unida a ambos (ESA) (**Figura 25**). En este modelo, tanto la enzima libre como la enzima unida al efector son capaces de llevar a cabo la catálisis, vale decir, tanto ES como EAS pueden generar producto (si esto no ocurriera y ESA no fuese catalíticamente activo, entonces estaríamos frente a un modelo de inhibición mixta clásico).



$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_S \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)} + [S] \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}}$$

$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max} \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}$$

$$K_S^{app} = \frac{K_S \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}$$

Figura 25. Modelo de modificador general de la actividad enzimática.

Modelo idealizado y generalizado que permite obtener parámetros cuantitativos del efecto en la actividad enzimática por la unión de un modificador alostérico considerando un solo sustrato. Se considera un ciclo termodinámico donde la enzima libre E puede unirse al sustrato S y/o al efector alostérico A formando los complejos ES, EA y el complejo ternario ESA. En cada caso las constantes consideradas para la unión de cada ligando son constantes de disociación (K_A , K_S , αK_A y αK_S). Tanto los complejos ES como ESA son catalíticamente productivos y sus respectivas constantes cinéticas son k_p y βk_p respectivamente. α es la razón entre la constante de disociación de la enzima para el sustrato bajo el efecto del modificador y en ausencia de éste; β es la razón para la constante catalítica en presencia y ausencia del modificador. Abajo del esquema de reacción se encuentra la ecuación de velocidad inicial para el modelo. A la derecha de ésta se encuentran las ecuaciones para la dependencia de los parámetros V_m^{app} y K_m^{app} de la enzima en función del modificador alostérico.

Si la unión del efector afecta la afinidad por el sustrato, entonces la constante de disociación para el sustrato (K_s) se verá modificada por la unión del A , lo que se representa como la constante K_s multiplicada por un parámetro α en la **Figura 25** (αK_s correspondería a la constante de disociación entre EA y S para formar EAS). Dicho de otra forma, este parámetro α se interpreta como la razón entre la constante de disociación para el sustrato modificada por el efector y K_s (la constante sin modificación); intuitivamente, α es una constante adimensional que representa la “cantidad del efecto” que tiene la unión de A sobre la afinidad de la enzima por el sustrato S . Si α es mayor a 1, entonces estamos frente a un efector que inhibe a la enzima al disminuir su afinidad por el sustrato, lo que se manifiesta en un aumento de constante de disociación; si α es menor a 1, entonces estamos frente a un activador a nivel de afinidad por el sustrato; si α es igual a 1, entonces no hay efecto sobre la afinidad.

Por otro lado, k_p corresponde a la constante catalítica de la enzima. Si la unión del efector A modifica la catálisis, eso se traducirá en un efecto sobre k_p . En ese caso, la constante catalítica modificada (vale decir, la constante catalítica de la reacción en la que se genera P a partir de EAS) se representa como k_p multiplicada por un parámetro β . Este parámetro adimensional representa la “cantidad de efecto” de A sobre la catálisis enzimática. Si β es menor a 1 entonces estamos frente a un inhibidor parcial (si es igual a cero entonces estamos frente a un inhibidor mixto clásico); si es mayor a 1, entonces A es un activador vía catálisis.

En una activación enzimática vía catálisis, α es igual a 1 y β mayor que 1; en una

activación vía afinidad, α es menor que 1 y β igual a 1; finalmente, en una activación mixta, α es menor que 1 y β mayor a 1. Nótese que el modelo presentado admite combinaciones tales como que el efector inhiba vía afinidad (α mayor que 1), pero a la vez active vía catálisis (β mayor que 1), o cualquier otra combinación de valores para α y β . Vale decir, no forma parte de las presuposiciones del modelo que el efector A deba comportarse a la vez como un inhibidor y/o activador tanto vía catálisis como vía afinidad por el sustrato.

De este modelo, suponiendo estado estacionario, se deduce la ecuación para la velocidad inicial que se muestra en la **Figura 25**. Al reordenar esta ecuación pueden obtenerse los parámetros cinéticos V_m y K_m en función del efector (Ecuaciones mostradas en la **Figura 25**). De esta forma, se puede evaluar el impacto del efector sobre la catálisis y sobre la afinidad por sustrato por separado, mediante un análisis de los gráficos secundarios para estos parámetros en función de $[A]$.

En este modelo, V_m^{ap} en función de $[A]$ es una hipérbola que intersecta el eje Y en un punto distinto de cero ($Y = V_m$) con asíntota igual a βV_m . Si $\beta > 1$, ésta será creciente; si $\beta < 1$, será decreciente; y si $\beta = 1$, será una constante. Por otro lado, K_m^{ap} también es una hipérbola que intersecta el eje Y en un punto distinto de cero ($Y = K_s$) con asíntota igual a αK_m^{ap} . Si $\alpha > 1$, ésta será creciente; si $\alpha < 1$, será decreciente; y si $\alpha = 1$, será una constante.

Un criterio importante para justificar la aplicación de este modelo es que los valores de K_A obtenidos a partir de los ajustes para V_m y K_m sean iguales (dicho de otro

modo, que sea posible realizar el ajuste considerando un mismo valor de K_A para ambos parámetros en función del efector). De lo contrario, la modificación de la catálisis y de la afinidad por sustrato (de existir ambas) corresponderían a procesos independientes, por lo que el modelo no sería aplicable. Por otro lado, en una enzima bisustrato, la K_A obtenida mediante el análisis para un sustrato debería ser la misma que la obtenida con el otro sustrato.

Sin embargo, en nuestro caso estamos en presencia de un activador que además es el producto de la enzima, por lo que el modelo presentado no puede ser ajustado directamente a los gráficos secundarios de los parámetros cinéticos para MmPFK/GK en función de AMP. Por este motivo, para poder obtener K_A y los factores α y β para cada sustrato, fue necesario determinar ecuaciones fenomenológicas que pudiesen representar tanto la activación, como el efecto inhibitorio de AMP.

3.3.2.2 Análisis de la activación por AMP en la actividad GK

Para aplicar el modelo de modificador general en la interpretación de los datos cinéticos, fue necesario encontrar ecuaciones fenomenológicas que representen tanto el efecto activador como la inhibición por AMP en los parámetros cinéticos V_m y K_m para cada uno de los sustratos. De esta forma, a partir del comportamiento de estos parámetros en función de AMP, fue posible obtener K_A y los factores α y β para cada sustrato a distintas concentraciones de cosustrato.

Se utilizaron los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los ajustes realizados sobre curvas de saturación para cada sustrato. Éstos son los mismos que se muestran en la **Figura 11** para V_m^{glu} , K_m^{glu} y K_i^{glu} y en la **Figura 14** para V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} , pero ordenados en función de AMP para concentraciones fijas de su respectivo cosustrato, como se muestran en la **Figura 26** y **Figura 27**.

En esta sección, además de describir el mecanismo de activación por AMP, se buscará entregar una explicación de la correlación entre la activación enzimática y el aumento en la inhibición por sustrato causada por el activador.

3.3.2.2.1 Análisis de los parámetros cinéticos para glucosa

En la **Figura 26** se muestran los gráficos secundarios de los parámetros cinéticos para glucosa (V_m^{glu} , K_m^{glu} y K_i^{glu}) en función de AMP a concentraciones fijas de MgADP. Cualitativamente, puede observarse que para todas las concentraciones de MgADP, AMP produce un aumento en V_m^{glu} seguido por un descenso luego de haber alcanzado un máximo. El que V_m^{glu} aumente en función de AMP es indicio de que la activación por AMP

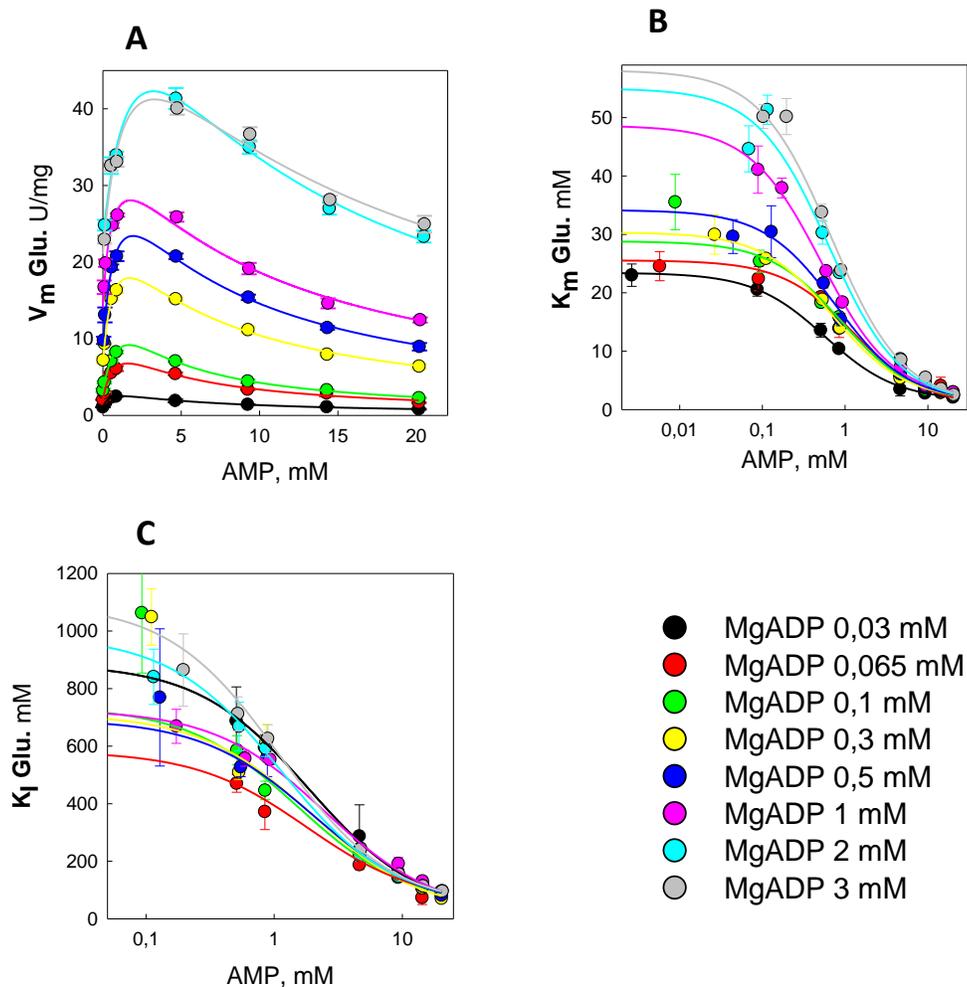


Figura 26. Gráficos secundarios para los parámetro cinéticos de glucosa en función de AMP a distintas concentraciones fijas de MgADP.

Parámetros V_m^{glu} (A), K_m^{glu} (B) y K_i^{glu} (C) de la actividad GK en función de AMP a distintas concentraciones fijas de MgADP (que se indican en la lista de la parte inferior derecha de la figura). En los tres gráficos el eje X se encuentra en escala logarítmica. Los parámetros corresponden a los mismos que se observan en la **Figura 11**, pero reordenados de esta forma. A las curvas para V_m^{glu} en función de AMP se les ajustó la ecuación fenomenológica 17 para cada concentración de MgADP; A K_m^{glu} , la ecuación 19; a K_i^{glu} hipérbolas que intersectan el eje Y con asíntota distinta a cero.

se manifiesta en un aumento de la catálisis. Por otro lado, el que V_m^{glu} disminuya luego de haber aumentado se debe a la inhibición por producto. Nótese que el comportamiento de estas curvas de V_m^{glu} es similar al comportamiento de la actividad en función de AMP, como se observa en la **Figura 26**. Por otro lado, según lo observado en los estudios de inhibición por GMP (**Figura 18A**), es esperable que, si AMP no activase a la enzima, entonces se produzca un decaimiento hiperbólico en V_m^{glu} .

Para K_m^{glu} se observa un decrecimiento de aspecto hiperbólico en función de AMP para todas las concentraciones fijas de MgADP, con un descenso de hasta dos órdenes de magnitud. Esto es indicio de que también existe un efecto activador sobre la afinidad por glucosa y que éste sería mayor que el que existe sobre la catálisis. En los ensayos de inhibición por GMP se observó que éste produce un aumento en K_m^{glu} , por lo que se espera que AMP hiciese lo mismo si es que no existiera el componente activador. Sin embargo, como se aprecia en la **Figura 18B**, el aumento de K_m^{glu} producido por GMP (la amplitud de la hipérbola del ajuste que se muestra en la **Figura 18B** es de alrededor de 2,7 veces respecto a K_m^{glu} en ausencia de GMP) es mucho menor si se compara con la disminución de este parámetro producido por AMP.

En el caso de K_i^{glu} también se observa un decrecimiento hiperbólico, con disminuciones de hasta dos órdenes de magnitud, lo que es consistente con el aumento del efecto inhibitorio de glucosa producido por la presencia de AMP.

Teniendo en cuenta el comportamiento de las curvas obtenidas, se generaron ecuaciones fenomenológicas que permitan explicar tanto el efecto activador como el

efecto inhibitor de AMP. A partir de estas ecuaciones pueden extraerse los parámetros de activación por AMP de acuerdo con el modelo de modificación general y, de esta manera, determinar el mecanismo mediante el cual este efecto ocurre.

Como se mencionó antes, el comportamiento de V_m^{glu} es similar a lo observado para el efecto de AMP sobre la actividad enzimática a concentraciones fijas de sustrato (**Figura 7**). Debido a esto, a todas las curvas de V_m^{glu} en función de AMP, se les ajustó la siguiente ecuación fenomenológica que es formalmente equivalente a la ecuación 5:

$$V_m = \frac{V_m^0 K_A + V_m^{m\acute{a}x} [AMP]}{K_A + [AMP] + \frac{[AMP]^2}{K_I}} \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde V_m^0 representa el valor inicial de V_m^{glu} en ausencia de AMP (intersección en el eje Y); $V_m^{m\acute{a}x}$, el valor máximo de V_m^{glu} si no existiese un componente inhibitorio por parte de AMP; K_A la constante de activación, que sería la $K_{0,5}$ de una hipérbola si es que solo existiese el componente activador de la curva; finalmente K_I representa una constante de inhibición, que sería la $K_{0,5}$ de la curva si solo existiese el componente inhibitorio. El ajuste de esta ecuación a V_m^{glu} en función de la concentración de AMP se observa en la **Figura 26A**.

Como la inhibición por AMP se debe a que éste es un producto de la reacción, se supone una inhibición total; vale decir, que la asíntota de la curva cuando AMP tiende a infinito es cero. A partir de los parámetros obtenidos en esta ecuación puede obtenerse el valor de β , que representa el efecto de AMP sobre V_m^{glu} , mediante la siguiente fórmula:

$$\beta = \frac{V_m^{m\acute{a}x}}{V_m^0} \quad \text{Ecuaci3n 18}$$

Por otra parte, como para K_m^{glu} se observ3 un decaimiento hiperb3lico en funci3n de AMP para todas las concentraciones de MgADP, y como no tiene sentido f3sico que 3ste tenga as3ntota en cero, para este par3metro se ajust3 una ecuaci3n fenomenol3gica que es b3sicamente una hip3rbola que interseca el eje Y con una as3ntota distinta de cero, que es la que se muestra a continuaci3n:

$$Km = \frac{K_m^0 K_A + K_m^{min} [AMP]}{K_A + [AMP]} \quad \text{Ecuaci3n 19}$$

En este caso, K_m^0 es el valor de K_m^{glu} en ausencia de AMP (intersecci3n en el eje Y); K_m^{min} es el valor de K_m^{glu} m3nimo, vale decir, el l3mite de la curva cuando la concentraci3n de AMP tiende a infinito; K_A es la $K_{0,5}$ de la funci3n, que corresponde a la constante de activaci3n determinada a trav3s de K_m^{Glu} . Es importante notar que esta ecuaci3n es v3lida tanto si K_m^{glu} aumentara ($K_m^{min} > K_m^0$) como si disminuyese ($K_m^{min} < K_m^0$), en funci3n del efector. Este 3ltimo es nuestro caso, lo que es consistente con que AMP sea un activador. Como se dijo m3s arriba, es esperable que AMP tambi3n tenga un efecto inhibitorio en este par3metro, lo que dar3a origen a un comportamiento consistente en dos hip3rbolas, una creciente y otra decreciente, que es b3sicamente lo que representa la ecuaci3n 17. Sin embargo, en todas las concentraciones de MgADP el mejor ajuste fue la ecuaci3n 19. Una explicaci3n para esto es que, como se dijo m3s arriba, es esperable que el efecto inhibitorio de AMP sobre K_m^{glu} sea peque1o, tal como se observ3 en los estudios de inhibici3n por GMP (**Figura 18B**), en comparaci3n con el

efecto activador. Por lo tanto, de existir dicho efecto, es enmascarado por el efecto activador de AMP.

A partir de los parámetros de la ecuación 19 se puede obtener el valor de α , que en este caso será menor que 1, mediante la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{K_m^{mín}}{K_m^0} \quad \text{Ecuación 20}$$

Hasta ahora podemos afirmar en forma cualitativa que AMP es un activador mixto para glucosa, dado que aumenta V_m^{glu} y disminuye K_m^{glu} . Calculando los parámetros α y β podremos determinar cuantitativamente cuál de estos efectos, el que ocurre sobre afinidad o sobre la catálisis, es el que prima para este sustrato.

Cuando se presentó el modelo idealizado de modificación general se mencionó que si ambas ecuaciones fenomenológicas (17 y 19) se toman en forma independiente y los valores de K_A inferidos a partir de ambas por separado no fuesen iguales (o, dicho de otro modo, no fuera posible realizar el ajuste de ambas ecuaciones presuponiendo el mismo valor de K_A), entonces el modelo de modificador general no sería aplicable. Si esto ocurriera, es posible que el cambio en ambos parámetros ocurra por procesos diferentes e independientes, por lo que sería necesario realizar más experimentos para determinar frente a qué tipo de mecanismo nos encontramos. En este sentido, un criterio importante para justificar el uso de este modelo para interpretar el mecanismo de activación de una enzima es que el valor de K_A sea el mismo inferido a partir de ambos parámetros cinéticos. Por lo que antes de interpretar los datos en base a este modelo y calcular los parámetros α y β , se compararon las constantes de activación a partir de

V_m^{glu} y de K_m^{glu} por separado.

Los ajustes de las ecuaciones 17 y 19 se realizaron sobre V_m^{glu} y K_m^{glu} , respectivamente, en función de AMP para cada una de las concentraciones fijas de MgADP utilizadas, como se observa en la **Figura 26** (A y B respectivamente). Como puede observarse en la **Tabla 7**, los valores de K_A obtenidos a partir de K_m^{glu} fueron similares a los obtenidos a partir de V_m^{glu} . Por lo tanto, es posible interpretar los datos utilizando el modelo de modificador general. De esta forma, los ajustes de la ecuación 19 para K_m^{glu} y de la ecuación 17 para V_m^{glu} en función de AMP se realizaron considerando un mismo valor de K_A para ambos. El valor obtenido de esta forma se muestra en la última columna de la **Tabla 7**. Interesantemente, como se observa en la tabla, el valor de la constante de activación fue independiente de la concentración de MgADP (en el sentido que la única función que tendría sentido ajustar sería una constante), obteniéndose un valor promedio de $0,66 \pm 0,10$ mM.

De estos ajustes se obtuvieron también los valores de α y β para glucosa para cada una de las concentraciones fijas de MgADP, los que se calcularon utilizando las ecuaciones 20 y 18, respectivamente. En la **Figura 30D** se observa que el valor de β para glucosa se mantiene relativamente constante en función de MgADP y, si bien es siempre mayor que 1, nunca llega a valores por sobre 10. Contrario a esto, en el caso de α , si bien también se mantiene relativamente constante en función de MgADP, y en algunos casos se obtuvo un error bastante grande en su estimación, en todos los casos se obtuvieron valores de al menos dos órdenes de magnitud por debajo de 1

MgADP, mM	K _A , mM		
	desde V _m	desde K _m	ajuste juntos
0,03	0,43 ± 0,14	0,60 ± 0,04	0,60 ± 0,18
0,065	0,97 ± 0,48	1,22 ± 0,25	1,21 ± 0,63
0,1	1,73 ± 0,35	0,54 ± 0,16	0,59 ± 0,30
0,3	0,74 ± 0,24	0,68 ± 0,06	0,70 ± 0,20
0,3	1,20 ± 0,20	0,86 ± 0,04	1,02 ± 0,14
0,3	0,97 ± 0,22	0,77 ± 0,05	0,86 ± 0,16
0,5	0,90 ± 0,28	0,89 ± 0,05	0,89 ± 0,28
1	1,07 ± 0,39	0,54 ± 0,04	0,65 ± 0,30
2	0,96 ± 0,40	0,69 ± 0,20	0,77 ± 0,34
3	0,80 ± 0,34	0,61 ± 0,12	0,66 ± 0,29

Tabla 7. Valores de la constante de activación obtenidas a distintas concentraciones de MgADP.

Constante aparente de activación K_A obtenida a partir del ajuste de la ecuaciones 17 y 19 a los gráficos secundarios de V_m^{glu} y K_m^{glu} respectivamente, mostrados en la **Figura 26**. La primera columna muestra los valores obtenidos para K_A a partir del ajuste de la ecuación 17 sobre V_m^{glu} en función de AMP, la segunda, a partir de K_m^{glu} al ajustar la ecuación 19, y la tercera a partir de haber ajustado las mismas ecuaciones, pero presuponiendo un mismo valor de K_A para ambos parámetros en función de AMP.

(incluso considerando el error obtenido, los valores siempre se encontraron más de un orden de magnitud por debajo de la unidad). De este resultado puede concluirse que el efecto activador de AMP sobre MmPFK/GK ocurre principalmente mediante un aumento en la afinidad de glucosa, siendo menos relevante el efecto sobre la catálisis. Interesantemente, ambos parámetros de activación, α y β para glucosa, tuvieron un comportamiento constante en función del cosustrato.

Los resultados obtenidos en esta sección permiten además proponer una explicación para el aumento en la inhibición por glucosa producido por AMP. Como hemos visto, el efecto activador de AMP se produce principalmente mediante un aumento en la afinidad por glucosa. Además, sabemos que la inhibición por este sustrato se produce debido a la unión de glucosa a la enzima libre o al complejo E-AMP, generando los complejos no productivos E-Glu y E-AMP-Glu, respectivamente. Teniendo en cuenta estos hechos podemos concluir que existe un aumento en la afinidad por glucosa en la enzima no solo en su forma catalítica (complejo E-MgADP), sino que también en la enzima libre y/o en el complejo enzima-AMP, lo que conlleva un aumento en la inhibición por sustrato en conjunto con un aumento en la actividad enzimática mediante un aumento en la afinidad por el azúcar.

3.3.2.2 Análisis de los parámetros cinéticos para MgADP

En La **Figura 27** muestra los gráficos secundarios para los parámetros cinéticos de MgADP (V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP}) en función de AMP a concentraciones fijas de glucosa. Estos datos son los mismos que se muestran en la **Figura 14** pero reordenados de esta forma.

A simple vista puede observarse que V_m^{MgADP} en función de AMP presenta un comportamiento hiperbólico creciente a concentraciones de glucosa de 10 mM o menores. Sin embargo, a concentraciones mayores adquiere un comportamiento similar al de V_m^{Glu} en función de AMP, consistente en un aumento seguido de un decrecimiento luego de haber alcanzado un máximo. Estos resultados confirman que AMP aumenta la catálisis, como ya se había visto al analizar los parámetros para glucosa. Para concentraciones de glucosa de 10 mM o menores, a la V_m^{MgADP} en función de AMP se le ajustó una hipérbola que intersecta el eje Y con asíntota distinta de cero (vale decir, se ajustó la ecuación 19, pero reemplazando K_m^0 por V_m^0 y $K_m^{\text{mín}}$ por $V_m^{\text{máx}}$). Para concentraciones de glucosa mayores a 10 mM se ajustó la ecuación 17. A partir de estos ajustes es posible calcular el valor de β utilizando la ecuación 18. Para obtener los valores de K_A a distintas concentraciones de glucosa primero debe determinarse una ecuación fenomenológica para ajustar a los datos de K_m^{glu} en función de AMP, de tal forma que se puedan realizar los ajustes considerando mismo valor de K_A para ambos parámetros en función de AMP.

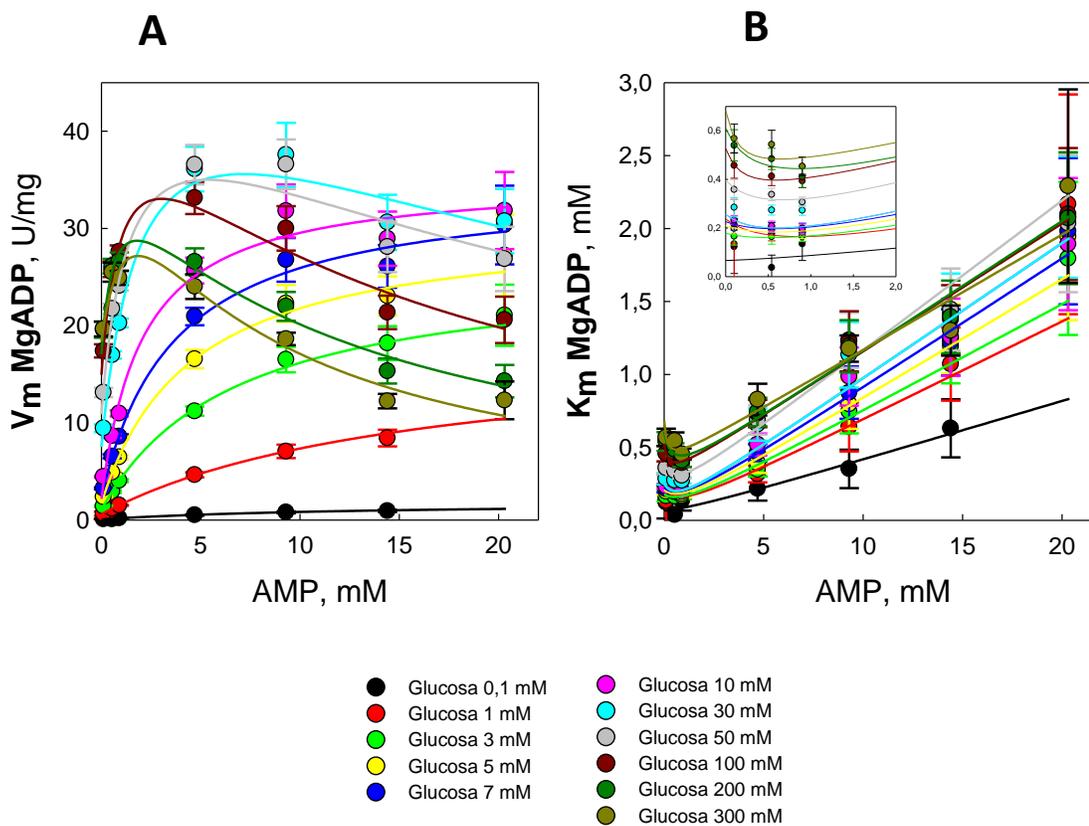


Figura 27. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos de MgADP en función de AMP a distintas concentraciones fijas de glucosa.

Parámetros V_m^{MgADP} (A) y K_m^{MgADP} (B) de la actividad GK en función de AMP a distintas concentraciones fijas de glucosa, las que se indican en la lista abajo de la figura. Inserto dentro de (B) se muestra un acercamiento a valores bajos de concentración de AMP y de K_m^{MgADP} . Los valores de cada parámetro son los mismos que se muestran en la **Figura 14**, pero reordenados de esta forma. A las curvas para V_m^{MgADP} en función de AMP, para concentraciones de glucosa igual a 10 mM o menores, se ajustó una hipérbola que intersecta el eje Y con asíntota distinta de cero; para concentraciones mayores a 10 mM, se les ajustó la ecuación 17. A las curvas para K_m^{MgADP} se les ajustó la ecuación 21.

K_m^{MgADP} presenta un comportamiento totalmente distinto a lo observado para K_m^{Glu} . Éste consiste en un leve decrecimiento a bajas concentraciones de AMP, seguido de un aumento en forma de línea recta en función de AMP. A simple vista puede apreciarse que este último es mucho más relevante que el decrecimiento inicial para todas las concentraciones fijas de glucosa. Este comportamiento para K_m^{MgADP} es esperable debido a que, según se observó en los experimentos de inhibición por GMP y consistente con el mecanismo cinético determinado para la enzima, AMP debería ser un inhibidor competitivo respecto a MgADP, por lo que, si no existiese activación, se espera que la dependencia de K_m^{MgADP} en función de AMP fuese una línea recta. Por lo tanto, el leve decrecimiento que ocurre a bajas concentraciones de AMP es atribuible a un efecto activador sobre la afinidad para este ligando, lo que daría como resultado una hipérbola decreciente con intersección en el eje Y con una asíntota distinta de cero si no existiese inhibición por producto. Por lo tanto, la ecuación fenomenológica que se ajustó a estos datos fue la siguiente:

$$K_m = \frac{K_m^0 K_A + K_m^{in} [AMP]}{K_A + [AMP]} + P[AMP] \quad \text{Ecuación 21}$$

Esta ecuación corresponde a una suma de dos funciones: una hipérbola que interseca el eje Y (notar que este sumando es equivalente a la ecuación 19), lo que viene a representar el efecto activador; y una recta de pendiente P , que representa el efecto de inhibición competitiva producido por AMP como producto. De esta forma, podemos desacoplar ambos efectos y analizarlos separadamente. Además, a partir de los

parámetros de esta ecuación es posible obtener el valor de α para MgADP mediante la ecuación 20.

Teniendo las ecuaciones fenomenológicas para V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} , es posible realizar los ajustes de cada una de éstas sobre cada parámetro suponiendo un mismo valor para K_A en ambas. El valor de K_A obtenido de esta forma se muestra en la **Figura 30B**. Este valor presenta un decaimiento hiperbólico respecto de la concentración de glucosa. En la misma figura, en forma de una línea discontinua horizontal, se muestra el valor promedio obtenido para K_A obtenido mediante los ajustes realizados en los parámetros para glucosa (que es el mismo que se muestra en el gráfico de barras de la **Figura 30A**). Interesantemente, a medida que la concentración de glucosa aumenta, el valor de K_A obtenido para MgADP tiende al mismo valor de K_A promedio obtenido a partir de glucosa.

A partir del ajuste de la ecuación 21 sobre los valores de K_m^{MgADP} fue posible obtener el valor de α (utilizando la ecuación 20 para su cálculo). Este parámetro, junto con el valor β para MgADP, se muestran en la **Figura 30E**. Como puede observarse, los valores de α de MgADP son menores a 1 para todas las concentraciones de glucosa ensayadas, sin embargo, se encuentran muy cercanos a la unidad, nunca alejándose de ésta más de un orden de magnitud para todas las concentraciones de glucosa. Esto marca una gran diferencia con respecto a los valores obtenidos para el valor α de glucosa, donde se obtuvieron valores siempre al menos dos órdenes de magnitud por debajo de la unidad (comparar la **Figura 30D** con 28E).

En el caso de β para MgADP, se obtuvo que a bajas concentraciones de glucosa llega a valores superiores a 10. Sin embargo, a altas concentraciones comienza a descender, llegando a estabilizarse en valores similares a los obtenidos para β de glucosa.

De estos resultados es posible concluir que, en la actividad GK, la activación por AMP ocurre principalmente mediante un aumento en la afinidad por glucosa, siendo el efecto sobre la catálisis y sobre la afinidad por MgADP mucho menores.

3.3.2.3 Análisis de la activación por AMP en la actividad PFK.

Para describir el mecanismo de activación por AMP de la actividad PFK se realizó el mismo procedimiento utilizado para el análisis de la activación en la actividad GK. Se obtuvieron los parámetros V_m^{F6P} , K_m^{F6P} y K_i^{F6P} en función de AMP a cada concentración fija de MgADP (**Figura 28**), así como también los parámetros V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} en función de AMP para cada una de las concentraciones fijas de F6P (**Figura 29**). Todos estos parámetros son los mismos que se muestran en la **Figura 20** y **Figura 22**, pero ordenados como curvas en función de AMP a concentraciones fijas de cosustrato.

Para esta actividad los errores de ajuste de los parámetros fueron bastante mayores que para la actividad GK. Esto se debe a que, como se ha mencionado, los valores de K_m^{F6P} son demasiado pequeños, entonces se requieren concentraciones de F6P cercanas al límite de detección del método para poder describir correctamente una curva cinética. Por otro lado, el efecto activador de AMP sobre esta actividad es menor que sobre la actividad GK, lo que también produce dificultades a la hora de describir el mecanismo de activación ajustando las ecuaciones que se han utilizado hasta ahora.

3.3.2.3.1 Análisis de los parámetros cinéticos para F6P

En el caso de V_m^{F6P} y K_m^{F6P} (**Figura 28**), se obtuvieron comportamientos semejantes a los observados para V_m^{glu} y K_m^{glu} en función de AMP. V_m^{F6P} aumenta en función de la concentración de AMP hasta llegar a un máximo y luego desciende, lo que ocurrió en todas las concentraciones de MgADP ensayadas (**Figura 28A**). Por otra parte, para K_m^{F6P} se obtuvo un decrecimiento hipérbólico con intersección en el eje Y, y una asíntota distinta de cero en todas las concentraciones de MgADP (**Figura 28B**). Para K_i^{F6P} también se obtuvieron como mejores ajustes hipérbolas que cruzan el eje Y en función de AMP para cada concentración fija de MgADP (**Figura 28C**). Sin embargo, tanto el aumento inicial de V_m^{F6P} como los decrecimientos de K_m^{F6P} y de K_i^{F6P} son menores que los observados para los parámetros cinéticos de glucosa en función de AMP.

Debido a las dificultades mencionadas anteriormente para esta actividad, no fue posible ajustar las ecuaciones 17 y 19 por separado sobre cada curva de V_m^{F6P} y K_m^{F6P} en función de AMP. Esto se debe, sobre todo, al hecho de que el efecto activador es considerablemente menor.

En el caso de V_m^{F6P} en función de AMP, para muchas concentraciones de MgADP, no hubo convergencia para el ajuste de la ecuación 17, a pesar de que es la única que tiene sentido matemáticamente para interpretar ese tipo de comportamiento y poder obtener los parámetros deseados. Esto se debe principalmente a que hay un mayor error en la estimación de parámetros y a que el efecto activador es menor. Por otro lado, cuando sí fue posible el ajuste, se obtuvieron grandes errores en los parámetros de la

ecuación 17.

En el caso de K_m^{F6P} en función de AMP, al ajustar la ecuación 19, también se obtuvieron grandes errores en los parámetros y para muchas concentraciones de MgADP los ajustes no convergieron, por lo que no pudo ajustarse esta ecuación para ninguna de las curvas de K_m^{F6P} en función de AMP consideradas individualmente.

Sin embargo, como fue mostrado en la **Figura 20B**, el comportamiento de K_m^{F6P} en función de MgADP es constante para todas las concentraciones de AMP. Teniendo esto en cuenta, es posible realizar el ajuste de la ecuación 19 sobre todos los datos para K_m^{F6P} en función de AMP, independiente de la concentración de MgADP a la que fueron obtenidos. Este ajuste se muestra en la **Figura 28B**. Haciendo esto, fue posible obtener un único valor de K_A para la actividad PFK para todas las concentraciones de MgADP, además de valores únicos para K_m^0 y $K_m^{mín}$. Por lo tanto, también fue posible calcular un único valor para el parámetro α para F6P, el cual fue independiente de la concentración del cosustrato.

Suponiendo este único valor de K_A , determinado a partir del ajuste de la ecuación 19 sobre K_m^{F6P} en función de AMP, fue posible realizar los ajustes de la ecuación 17 a los datos de V_m^{F6P} en función del efector alostérico (**Figura 28**) para cada concentración fija de MgADP por separado. De esta forma, se obtuvieron valores para V_m^0 y $V_m^{máx}$ con un error de estimación aceptable para cada curva, por lo tanto, fue posible calcular el parámetro β para F6P para cada una de las concentraciones de MgADP ensayadas utilizando la ecuación 18, como se aprecia en la **Figura 28A**.

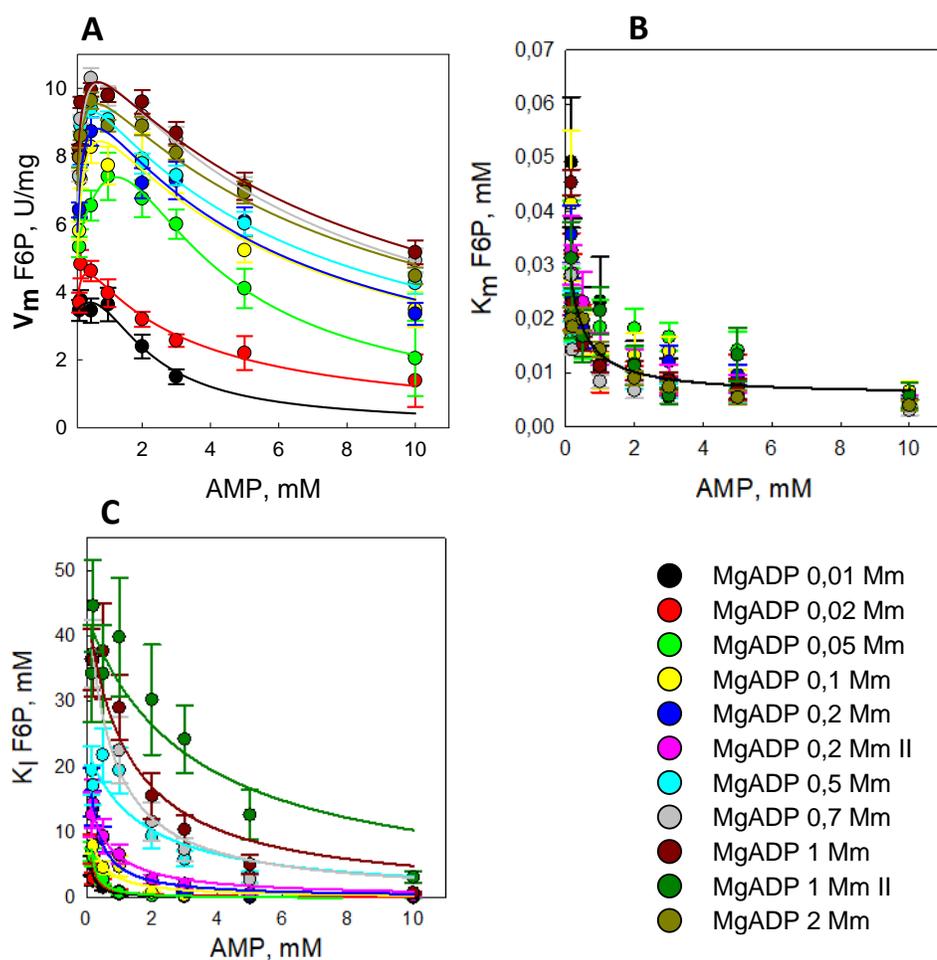


Figura 28. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos de F6P en función de AMP a concentraciones fijas de MgADP.

Parámetros V_m^{F6P} (A), K_m^{F6P} (B) y K_i^{F6P} (C) de la actividad PFK en función de AMP a distintas concentraciones fijas de MgADP, que se indican en la lista de la parte inferior derecha de la figura. Los parámetros son los mismos que se observan en la **Figura 20**, pero reordenados de esta forma. A cada curva para V_m^{F6P} en función de AMP se le ajustó la ecuación fenomenológica 17; a todos los datos de K_m^{F6P} , independiente de la concentración de MgADP a la que fueron obtenidos, se ajustó la ecuación 19 en función de AMP; a cada curva de K_i^{F6P} en función de AMP se ajustó una hipérbola que intersecta el eje Y con asíntota distinta de cero.

El valor único de K_A obtenido para la actividad PFK fue levemente menor que el valor de K_A obtenido para la actividad GK (**Figura 30A**). Sin embargo, ambos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud y sus errores de estimación se sobreponen. De esto puede concluirse que las diferencias observadas en el efecto activador de AMP, para ambas actividades, no está asociado a la constante de activación de este proceso para cada una de las actividades enzimáticas.

En la **Figura 30D** puede observarse que, al igual que en el caso de la actividad GK, en la actividad PFK el efecto activador en la afinidad por el sustrato azúcar es considerablemente mayor que el efecto en la catálisis enzimática. Esto se manifiesta en que el parámetro α para F6P² está al menos un orden de magnitud bajo la unidad en todas las concentraciones de MgADP, en cambio, el parámetro β siempre está menos de un orden de magnitud por sobre ésta. Interesantemente, tanto el efecto sobre la catálisis, como sobre la afinidad por el azúcar, fueron menores que los obtenidos para la actividad GK, como se aprecia al comparar los valores de α y β para F6P con los respectivos para glucosa (**Figura 30D**). Esto es especialmente notable en el caso del parámetro α , donde para F6P se obtuvieron valores de al menos un orden de magnitud mayor (vale decir, más cercano a la unidad) que para glucosa en todas las concentraciones de MgADP. De esto puede concluirse que, al menos para el caso del sustrato azúcar, la actividad PFK es menos activada que la actividad GK.

² Observar que el valor de α para F6P es el mismo para todas las concentraciones de MgADP, dado que se asumió que K_m^{F6P} es constante en función de este sustrato.

Para la actividad PFK también se obtuvo que K_i^{F6P} decrece hiperbólicamente en función de la concentración de AMP. Como se observó cuando se caracterizó el mecanismo cinético en la actividad PFK, AMP produce una modificación en el mecanismo de inhibición por F6P, pasando de un mecanismo en el cual se forman dos complejos de punto muerto (E-F6P y E-AMP-F6P) a uno donde solo se forma el complejo de punto muerto E-F6P. Esto constituye una aparente paradoja, pues se esperaría que al aumentar la concentración de AMP también aumente la formación del complejo E-AMP-F6P. Sin embargo, ocurre todo lo contrario, pasando ese complejo a no ser relevante a la hora de explicar la inhibición por sustrato. Teniendo en cuenta el mecanismo que se determinó para esta actividad enzimática, al igual que en GK, podemos concluir que el aumento en la inhibición por sustrato se debe exclusivamente a un aumento en la afinidad por F6P producido por AMP, independiente de si ésta ocurre en una forma catalíticamente activa (vale decir, el complejo E-MgADP para formar el complejo ternario catalítico) o en la enzima libre, conduciendo a la formación del complejo de punto muerto E-F6P.

3.3.2.3.2 Análisis de los parámetros cinéticos para MgADP

En la **Figura 29A** se muestra el parámetro V_m^{MgADP} en función de AMP a distintas concentraciones de F6P. Podemos ver que en este caso la mayoría de las curvas tuvieron un comportamiento consistente en un aumento para luego descender después de un máximo. A todas las curvas se pudo ajustar la ecuación 17.

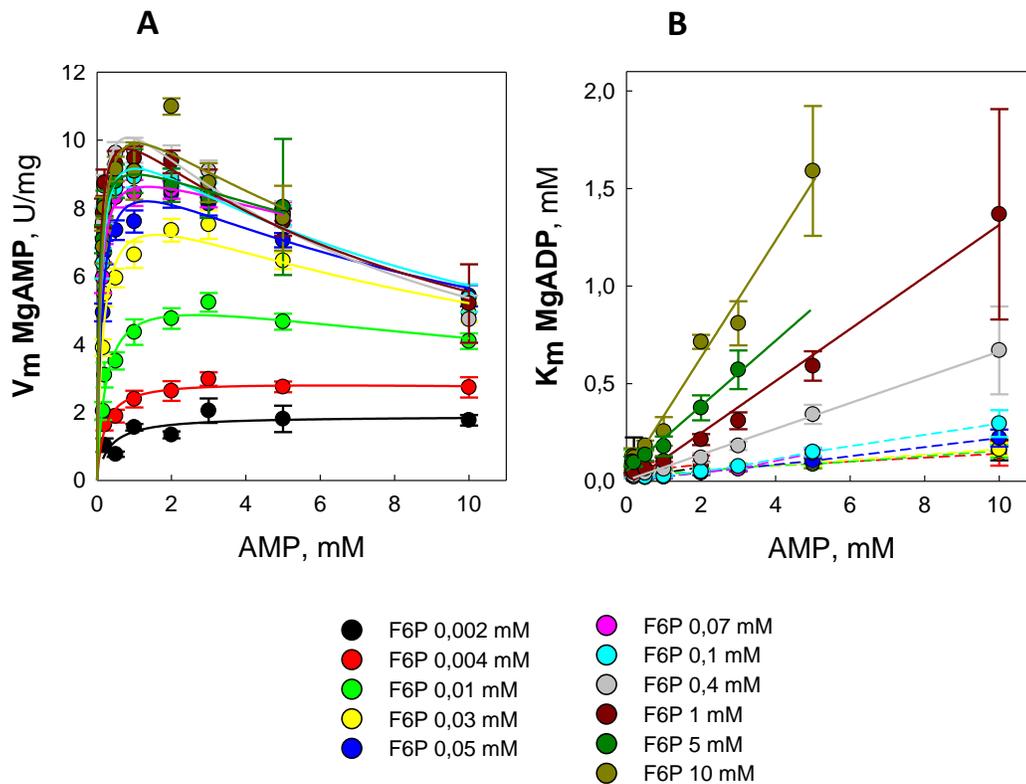


Figura 29. Gráficos secundarios de los parámetros cinéticos de MgADP en función de AMP a concentraciones fijas de F6P.

V_m^{MgADP} (A) y K_m^{MgADP} (B) para la actividad PFK en función de AMP a distintas concentraciones fijas de F6P, las que se indican en la lista abajo de la figura. Estos parámetros corresponden a los mismos que se muestran en la **Figura 22**, pero reordenados de esta forma. A las curvas para V_m^{MgADP} en función de AMP se les ajustó la ecuación 17. Para las curvas de K_m^{MgADP} realizadas a concentraciones de F6P mayores a 0,1 mM el mejor ajuste fue una recta; para las realizadas a concentraciones de F6P menores que F6P 0,1 mM no fue posible realizar ajustes, las líneas discontinuas que se muestran en este último caso solo conectan los puntos.

Para el caso de K_m^{MgADP} (**Figura 29B**) podemos ver que su comportamiento en función de AMP a bajas concentraciones de cosustrato es similar al observado para K_m^{MgADP} en la actividad GK. Sin embargo, debido principalmente a los errores en la estimación de su valor, los ajustes de la ecuación 19 no convergieron en la gran mayoría de las curvas y, cuando si se pudo ajustar, se obtuvieron errores considerables. Esto ocurrió incluso cuando se realizaron los ajustes de la ecuación 17 y 21 sobre V_m^{MgADP} y sobre K_m^{MgADP} compartiendo el valor de K_A . Interesantemente, se observó que el decrecimiento en K_m^{MgADP} que ocurre a bajas concentraciones del activador se hace cada vez más pequeño a medida que se aumenta la concentración del cosustrato F6P, llegando a desaparecer completamente a altas concentraciones del cosustrato, adquiriendo el comportamiento de una línea recta en función de AMP (**Figura 29B**). Esto puede interpretarse como que a altas concentraciones de cosustrato el efecto activador de AMP sobre la afinidad de la enzima por MgADP en la actividad PFK tiende a desaparecer. Si bien, debido a que no pudo ajustarse la ecuación 21 no es posible determinar el parámetro α para MgADP, a altas concentraciones de F6P se puede suponer que toma un valor de 1. Esto se justifica dado que el mejor ajuste para esos casos es una línea recta en función de AMP, vale decir, AMP se comporta solo como un inhibidor competitivo respecto a MgADP sin tener un efecto activador, que es lo mismo que decir que el parámetro α toma un valor de 1. En la **Figura 30F** estos valores se representan como estrellas ocupando el valor de 1, puesto que no fueron calculados, sino que supuestos.

Debido a que no se pudo realizar el ajuste de la ecuación 21 a los datos de K_m^{MgADP} , tanto el parámetro β para MgADP, así como K_A , debieron ser determinados solo a partir del ajuste de la ecuación 17 sobre V_m^{MgADP} . Los valores de K_A obtenidos mediante el análisis de V_m^{MgADP} arrojaron valores similares a los que se obtuvieron para este parámetro a partir de los parámetros de F6P. Estos valores no variaron respecto a la concentración de cosustrato, sin embargo, se obtuvo un error considerable (los datos no se muestran). El parámetro β para MgADP fue calculado utilizando la ecuación 18 y sus valores en función de F6P se muestran en la **Figura 30F**. Puede apreciarse que el valor de β fue constante en función de F6P y, si bien siempre fue mayor que 1, nunca supera el valor de 10. Con esto puede concluirse que el efecto activador de AMP en la actividad PFK ocurre principalmente mediante un aumento en la afinidad por F6P, siendo el aumento en la catálisis y en la afinidad por MgADP mucho menor.

Es interesante destacar que la comparación de los parámetros α y β para cada sustrato de ambas actividades permiten dar una explicación de por qué la actividad PFK es menos activada por AMP que la actividad GK. Si bien, en ambas actividades se obtuvieron valores de K_A similares (levemente menor en PFK) y se obtuvo que la activación ocurre principalmente mediante un aumento en la afinidad por el sustrato azúcar, en el caso de la actividad PFK el aumento de afinidad por F6P es alrededor de un orden de magnitud menor que el aumento en afinidad por glucosa.

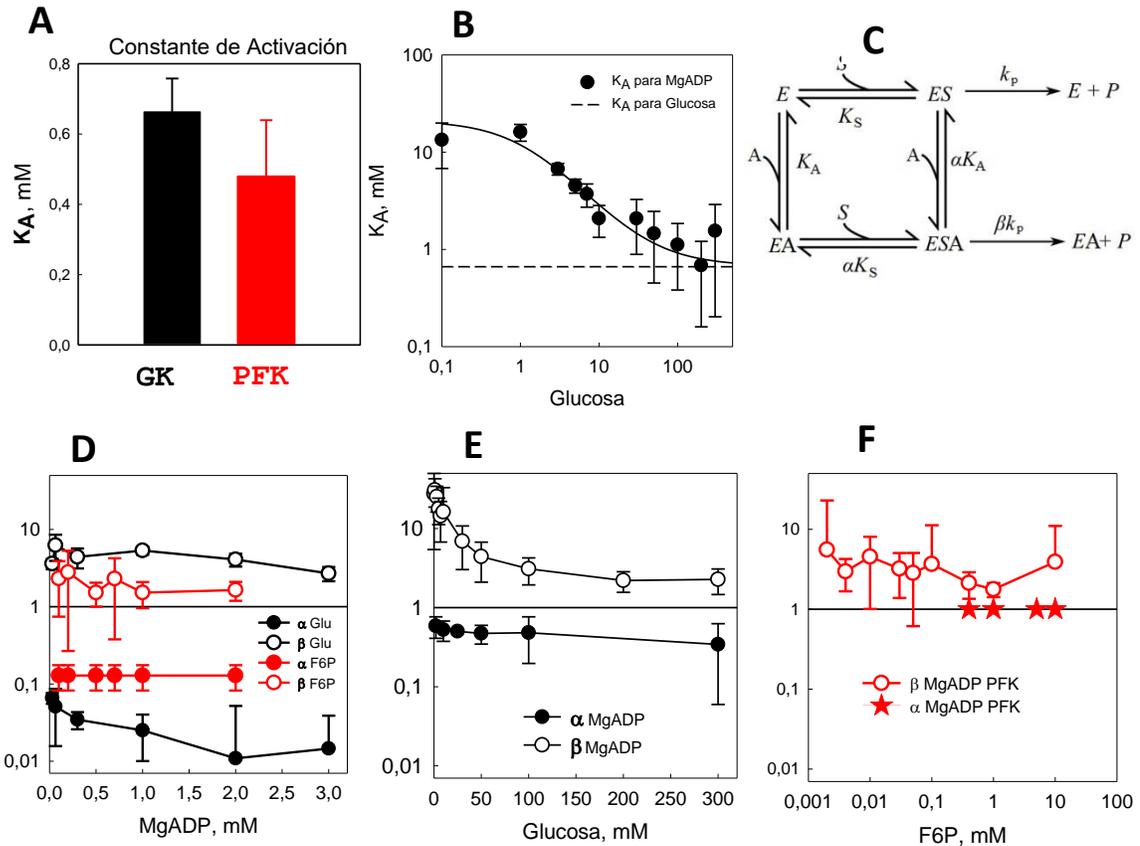


Figura 30. Parámetros de activación por AMP en MmPFK/GK.

A) Valor promedio de K_A para la actividad GK obtenidos a partir de los ajustes de las ecuaciones 17 y 19 realizados sobre V_m^{Glu} y K_m^{Glu} en función de la concentración de AMP (**Figura 26 A y B**) y de K_A para la actividad PFK obtenidos a partir del ajuste de la ecuación 19 sobre los valores de K_m^{F6P} en función de AMP (**Figura 28.B**). B) Valores de K_A para la actividad GK en función de glucosa obtenidos a partir de los ajustes sobre los valores de V_m^{MgADP} en función de AMP a distintas concentraciones de glucosa (**Figura 27**), a los que se les ajustó un decaimiento hiperbólico con asíntota distinta de cero, comparado con el valor promedio de K_A obtenido a partir de los parámetros de glucosa (línea discontinua). C) Modelo de modificador general. D) Valores de α (●) y β (○) para glucosa (actividad GK) calculados con las ecuaciones 20 y 18 respectivamente, y de α (●) y β (○) para F6P (actividad PFK) en función de MgADP. E) Valores de α (●) y β (○) para MgADP de la actividad GK en función de glucosa obtenidos a partir de la aplicación de las ecuaciones 22 y 18 respectivamente. F) Valores de β (○) para MgADP de la actividad PFK obtenidos a partir la aplicación de la ecuación 18; los valores de α (★) para MgADP de actividad PFK no se calcularon, sino que se asumió un valor de 1 al no encontrar efecto activador de AMP en la gráfica de K_m^{MgADP} en función de AMP a esas concentraciones de F6P, para concentraciones de F6P menores a 0,2 mM no pudo ser calculado.

3.3.3 Conclusiones y comparación de los mecanismos obtenidos para las actividades GK y PFK.

A modo de recapitulación, a partir del análisis de los datos cinéticos en estado estacionario fue posible determinar el mecanismo cinético y de inhibición por sustrato de MmPFK/GK para las actividades GK y PFK, a distintas concentraciones fijas de AMP. Finalmente, también fue posible determinar el mecanismo de activación por AMP en ambas actividades.

MmPFK/GK posee un mecanismo cinético secuencial-ordenado para ambas actividades enzimáticas, donde MgADP es el primer sustrato en unirse a la enzima, seguido del sustrato azúcar (glucosa o F6P) y AMP es el último producto en disociarse, luego del azúcar fosforilado.

En ambas actividades ocurre inhibición por el sustrato azúcar. Esta inhibición ocurre mediante la formación de dos complejos de punto muerto, E-Azúcar y E-AMP-Azúcar. En la actividad GK este mecanismo es invariante ante distintas concentraciones de AMP. Sin embargo, en la actividad PFK el aumento en la concentración de AMP produce que la inhibición pase a ser causada solo por la formación del complejo de punto muerto E-F6P. Esto se resume en la **Figura 24**.

En ambas actividades la activación producida por AMP ocurre principalmente mediante un aumento en la afinidad por el sustrato azúcar (glucosa o F6P dependiendo de la actividad); aunque también existe un aumento en la catálisis y en la afinidad por MgADP. Sin embargo, estos dos efectos ocurren en mucho menor medida. Esto puede apreciarse en la **Figura 30D**, donde se aprecian las diferencias en los parámetros α y β

para glucosa y para F6P en función de MgADP. Las constantes de activación para ambas actividades fueron similares, obteniéndose en promedio un valor promedio de $0,66 \pm 0,10$ mM para la actividad GK y uno de $0,48 \pm 0,16$ mM para la actividad PFK (**Figura 30A**). Sin embargo, como se aprecia en la **Figura 30D**, el parámetro α para glucosa es al menos un orden de magnitud más bajo que el parámetro α para F6P. A partir de estos resultados puede concluirse que, en las condiciones en que se realizaron los ensayos, MmPFK/GK se activa más por AMP en su actividad GK que en su actividad PFK, y esta diferencia está dada por una diferencia en el aumento en la afinidad por el sustrato azúcar entre ambas actividades.

Los resultados también permiten inferir que el aumento en la inhibición por el sustrato azúcar causado por AMP en ambas actividades, puede explicarse por el aumento en la afinidad por este sustrato producida por el efector, lo que aumenta la formación de complejos no productivos.

3.4 Estudios de unión de ligandos

En esta sección se exponen los resultados de estudios termodinámicos de unión del sustrato F6P a MmPFK/GK y el efecto de AMP sobre dicha interacción. Para esto se realizaron mediciones de fluorescencia intrínseca de triptófano.

Dado que MmPFK/GK no posee triptófanos en su estructura primaria, para realizar estos estudios se utilizó una mutante a la que se le reemplazó la asparragina 203 por un triptófano (mutante N203W) (Kern 2016). De acuerdo con lo publicado en la tesis de pregrado de Macarena Kern, los parámetros cinéticos de esta mutante no se ven mayormente afectados por la presencia de la mutación, como se muestra en la **Tabla 8**. Por lo tanto, se puede concluir que esta mutación no afecta funcionalmente a la enzima en términos cinéticos.

Para determinar la idoneidad de esta proteína para el estudio de unión de ligandos en el contexto de la activación por AMP, se realizaron ensayos de activación por este efector para dicha mutante. Como se muestra en la **Figura 31**, la enzima es activada por AMP en ambas actividades, por lo que es adecuada para entender la activación por AMP desde un punto de vista termodinámico.

Para la realización de estos estudios, distintas muestras de proteína fueron tituladas con F6P en presencia de concentraciones fijas de AMP. Para cada concentración de F6P se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia entre 305 nm y 450 nm, con una longitud de onda de excitación de 295 nm. Esto se realizó para 8 concentraciones diferentes de AMP, obteniéndose más de 100 espectros a distintas concentraciones de

	Actividad GK				Actividad PFK			
	MgADP		Glucosa		MgADP		F6P	
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
MmPFK/GK	44 ± 12	11 ± 1	14 ± 2	15 ± 1	850 ± 87	11 ± 1	65 ± 5	$9,7 \pm 0,9$
N203W	34 ± 6	8 ± 5	$0,9 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,4$	110 ± 8	$36,0 \pm 0,1$	29 ± 3	$3,3 \pm 0,1$

Tabla 8. Parámetros cinéticos K_m y k_{cat} de MmPFK/GK y de la mutante N203W

Datos extraídos de Kern 2016. Los parámetros fueron obtenidos en una concentración de Mg^{2+} libre de 5 mM.

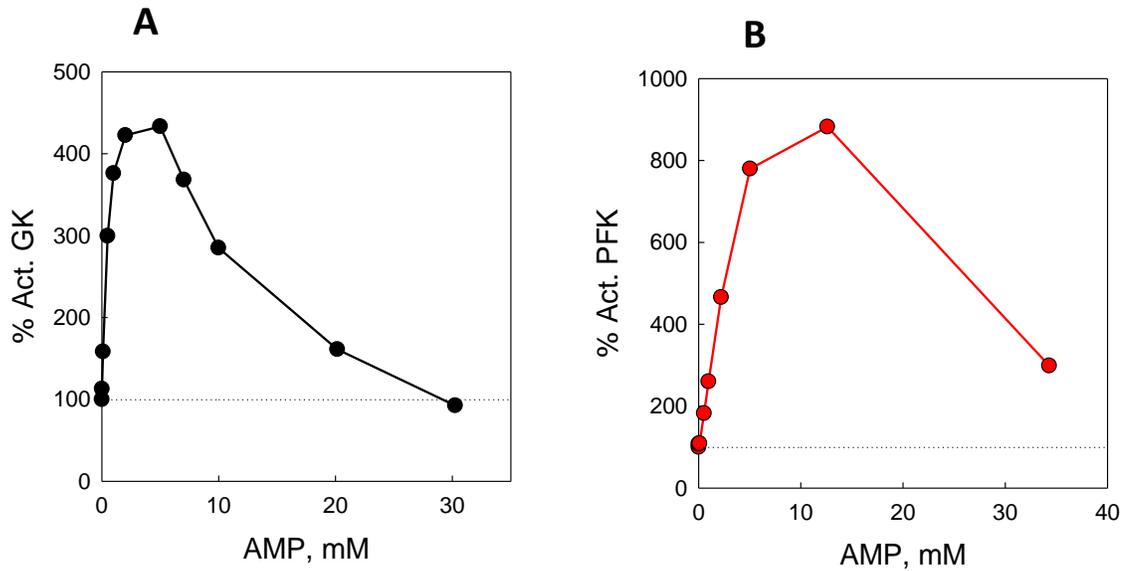


Figura 31. Activación por AMP de la mutante N203W de MmPFK/GK.

Efecto de AMP en las actividades GK (A) y PFK (B) de la mutante N203W de MmPFK/GK. En ambos casos se midió la actividad como se explica en la sección de materiales y métodos, variando solo la concentración de AMP a concentraciones fijas de sustratos. La actividad GK fue ensayada en Buffer HEPES-NaOH pH 7,8 50 mM, glucosa 2 mM, MgADP 0,2 mM y Mg^{2+} libre 1 mM, NAD^+ 0,2 mM. La actividad PFK fue ensayada en Buffer PIPES-NaOH pH 6,5 50 mM, F6P 0,01 mM, 0,1 mM, Mg^{2+} libre 1 mM, NADH 0,25 mM. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad enzimática en ausencia de AMP.

F6P y de AMP (**Figura 32**). Para cada uno de estos espectros se calculó el área bajo la curva utilizando el método de los trapecios. Este valor se corrigió como se describe en la sección de materiales y métodos. A partir de éstos se obtuvieron los porcentajes de apagamiento ($Q\%$) para cada una de las concentraciones de F6P utilizando la ecuación 8.

F6P produce un apagamiento en la fluorescencia de la mutante N203W, lo que se manifiesta en una disminución del área bajo la curva y del máximo de emisión del espectro a medida que aumenta la concentración del azúcar. También se observó un leve corrimiento del máximo de emisión hacia longitudes de onda más pequeñas (corrimiento hacia el azul). Para cada una de las concentraciones de AMP se graficó el porcentaje de apagamiento en función de la concentración de F6P. En la **Figura 33B** se observa que existe una saturación del apagamiento, lo que nos permite descartar efectos inespecíficos como apagamiento colisional. A cada curva se le ajustó una hipérbola (vale decir, se supuso un solo sitio para F6P y se consideró el hecho de que la concentración de proteína siempre estuvo al menos dos órdenes de magnitud por debajo de la $K_{0,5}$), la que se observa en la siguiente ecuación

$$Q\% = \frac{A[F6P]}{K_{0,5} + [F6P]} \quad \text{Ecuación 22}$$

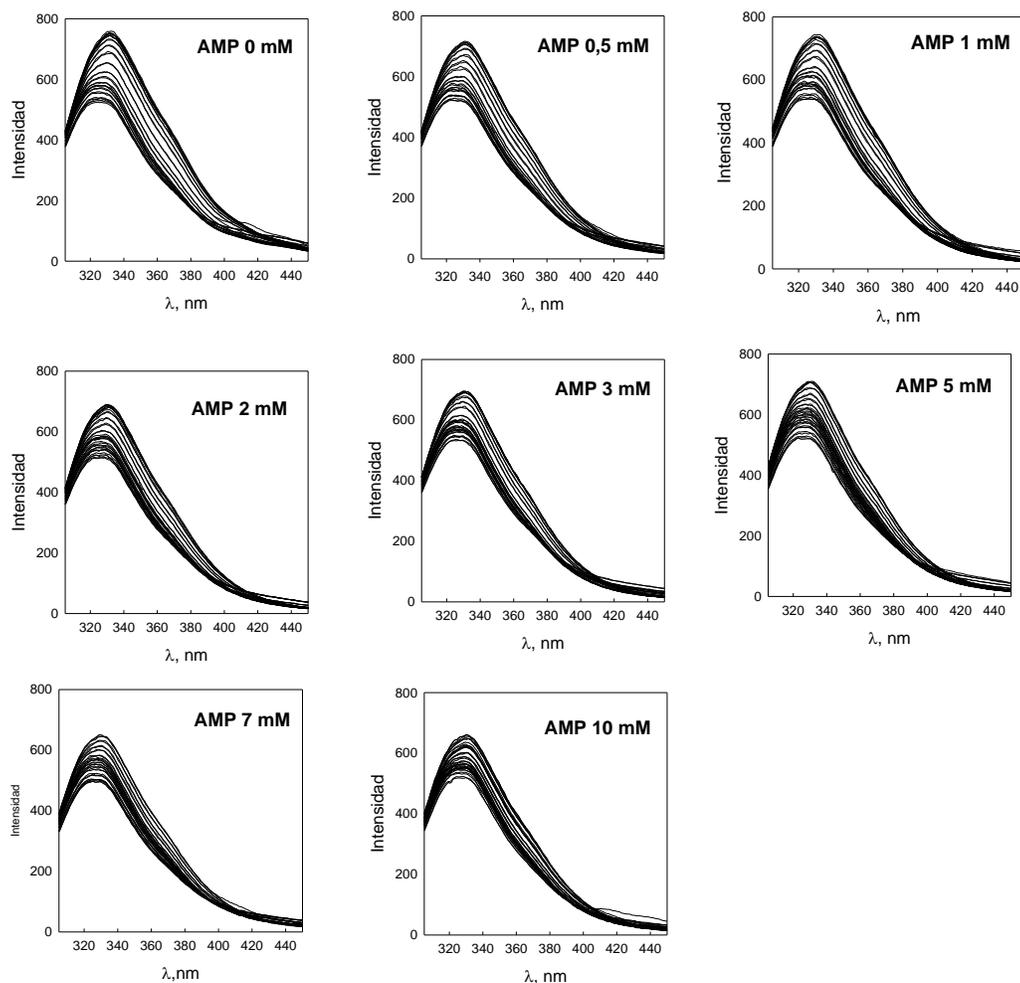


Figura 32. Espectros de emisión fluorescencia intrínseca de la mutante N203W de MmpPFK/GK.

Los espectros se obtuvieron entre 305 y 450 nm luego de una excitación a 295 nm. Cada uno se obtuvo a una concentración distinta de F6P mediante una titulación de la proteína con dicho ligando en presencia de una concentración fija de AMP, las que se indican en cada gráfico. F6P causó apagamiento de fluorescencia en todas las concentraciones de AMP ensayadas.

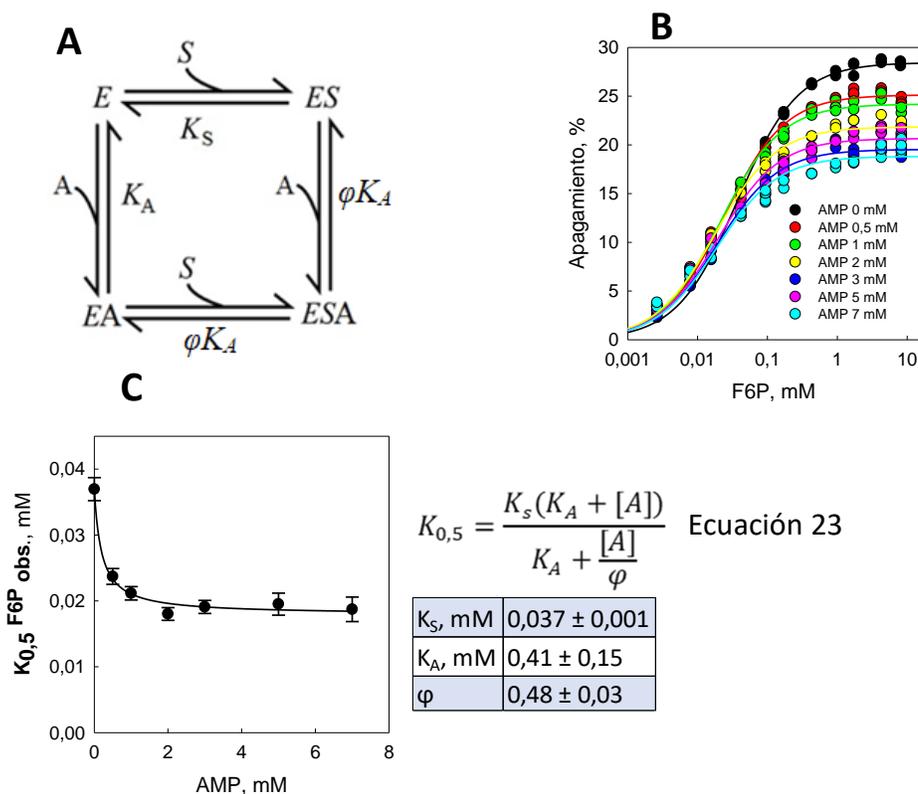


Figura 33. Efecto de AMP en los parámetros de unión de F6P calculados mediante fluorescencia intrínseca.

A) Modelo para la unión de dos ligandos a sitios distintos de una misma proteína con posible interacción entre sitios. B) Porcentaje de apagamiento causado por F6P en la mutante N203W a distintas concentraciones fijas de AMP (las se indican en la lista dentro del gráfico). Los datos fueron obtenidos a partir de los espectros que se muestran en la **Figura 32**. A éstos se les determinó el área bajo la curva utilizando el método de los trapecios. El área calculada se corrigió como se especifica en la sección de materiales y métodos y luego se calculó el apagamiento utilizando la ecuación 8. A cada curva obtenida se le ajustó una hipérbola (ecuación 22), con lo que se calculó $K_{0,5}$ para cada concentración de AMP. C) $K_{0,5}$ calculadas mediante los ajustes que se muestra en (B) en función de AMP. A estos datos se le ajustó la ecuación 23, que corresponde a una hipérbola que intersecta el eje Y con asíntota distinta a cero. El hecho de que esta hipérbola sea decreciente evidencia la existencia de interacción positiva entre los sitios de F6P y de AMP. En la tabla se pueden observar los valores obtenidos para cada uno de los parámetros en el ajuste de la ecuación 23

Donde A corresponde al valor de $Q\%$ en saturación de [F6P] y $K_{0,5}$ al valor de [F6P] cuando se ha alcanzado la mitad de la saturación, vale decir, la constante de disociación aparente para F6P, la que se obtuvo para cada concentración de AMP en la que se realizaron las titulaciones. A partir de estos ajustes se observó que existe un decrecimiento hiperbólico de $K_{0,5}$ respecto a la concentración de AMP, lo que es evidencia de la existencia de interacción entre los sitios para F6P y AMP (**Figura 33C**). El mejor ajuste para el comportamiento de $K_{0,5}$ en función de AMP fue una hipérbola que intercecta el eje Y que posee una asíntota distinta de cero. La ecuación utilizada para realizar el ajuste fue la siguiente:

$$K_{0,5} = \frac{K_s(K_A + [A])}{K_A + \frac{[A]}{\varphi}} \quad \text{Ecuación 23}$$

Esta ecuación se deduce del modelo que se presenta en la **Figura 33A**. K_s corresponde a la constante de disociación aparente para F6P en ausencia de AMP y K_A corresponde a la constante de afinidad aparente para AMP considerando un sistema termodinámico con un sitio independiente para cada ligando. A partir de esta ecuación es posible determinar la constante de acoplamiento entre los dos sitios (φ), que cunatifica el efecto que tiene la unión de uno de los ligandos en la afinidad del sitio para el otro ligando. Si da un valor mayor que 1, entonces existe un efecto heterotrópico negativo entre ambos sitios; si da menor que uno, se trataría de un efecto heterotrópico positivo; si da igual a 1 significa que no hay interacción entre los sitios de unión. En nuestro caso se obtuvo un valor de $0,48 \pm 0,03$, lo que indica un efecto heterotrópico

positivo de AMP respecto a F6P. Esto confirma en forma independiente lo obtenido en los experimentos de cinética enzimática en estado estacionario, donde se obtuvo que AMP produce un incremento en la afinidad por el sustrato azúcar. Por otro lado, para K_s se obtuvo un valor de $0,037 \pm 0,001$ mM, muy similar al obtenido para K_m^{F6P} a la mínima concentración de AMP usada, que fue de $0,032 \pm 0,003$ (**Figura 20B**). Para K_A se obtuvo un valor de $0,41 \pm 0,15$, muy similar al valor de K_A obtenido en los estudios de activación por AMP mediante cinéticas de estado estacionario, de $0,48 \pm 0,16$ mM (**Figura 30A**).

3.5 Estudios de modificación química

Hasta ahora, la evidencia que disponemos acerca de la existencia de un sitio alostérico para AMP es dependiente de los modelos cinéticos y/o termodinámicos que se han utilizado. Para confirmar la existencia de un sitio diferente al sitio activo para AMP se requiere de evidencia adicional e independiente de modelos. Para esto se realizaron estudios de modificación química utilizando 8-Azido-AMP, un análogo fotoactivable de AMP. Este compuesto, al ser expuesto a luz UV, genera un intermediario altamente reactivo consistente en un grupo nitreno (Baruah et al. 2008; Murale et al. 2017) que puede reaccionar con grupos metilo y amino. Esto provocaría que, al ser expuesto a luz UV, se una covalente a la proteína si es que se encuentra interaccionando con ésta. Para realizar estos estudios, distintas muestras de proteína en presencia de 8-Azido-AMP y de distintos ligandos fueron expuestas a luz UV utilizando un transiluminador. A estas muestras se les midió actividad enzimática y la activación por AMP.

Primero se calculó la estequiometría de la modificación covalente. Una muestra de 2 mg/ml de proteína en presencia de 5 mM de 8-Azido-AMP se expuso por 15 minutos a luz UV. Luego, esta muestra fue cargada en una columna de exclusión molecular (biospin- BioRad) para eliminar el 8-Azido-AMP que no hubiese reaccionado. A la solución que eluyó de dicha columna se le midió concentración de proteínas utilizando el método de Bradford y su absorbancia a 280 nm y a 259 nm. Lo mismo se hizo con una muestra control incubada en ausencia de 8-Azido-AMP. De estas mediciones se obtuvo una razón entre 8-Azido-AMP y proteína de $1,9 \pm 0,1$. Esto indica que habrían dos

moléculas de 8-Azido-AMP unidas covalentemente por cada molécula de proteína.

Con el objetivo de analizar si este análogo de AMP modifica el sitio activo de la enzima, se procedió a examinar el efecto de la exposición a luz UV en presencia de 8-Azido-AMP sobre la actividad enzimática. En la **Figura 34** se puede observar que, en presencia de esta molécula y en ausencia de otros ligandos, se pierde más de un 90% de la actividad enzimática a los tres minutos de exposición. Puede observarse que esto no es un efecto debido solo a la exposición UV o a algún artefacto experimental de otra clase, dado que al exponer la proteína a luz UV en ausencia del modificador químico, la actividad enzimática no se pierde. Para controlar que la pérdida de actividad se debe efectivamente a la modificación química del sitio activo, se realizaron experimentos de protección por sustrato. Dado que 8-Azido-AMP es un análogo de AMP, se espera que en concentraciones saturantes de MgADP no pueda unirse al sitio activo de la proteína. Al incubar la proteína en concentraciones saturantes MgADP y 8-azido-AMP, no se observó pérdida de la actividad enzimática luego de 10 minutos de exposición a UV (**Figura 34**). Este resultado indica que la pérdida de actividad al exponer la proteína a UV en presencia de 8-azido-AMP se debe efectivamente a la modificación del sitio activo.

Por otro lado, también se analizó el efecto de glucosa y de F6P en la modificación química por 8-Azido-AMP (**Figura 34**). Interesantemente, ambos sustratos azúcar generan una protección ante la modificación química. En presencia de una concentración saturante de glucosa la pérdida de actividad solo alcanza un 10 % a los 7 minutos de

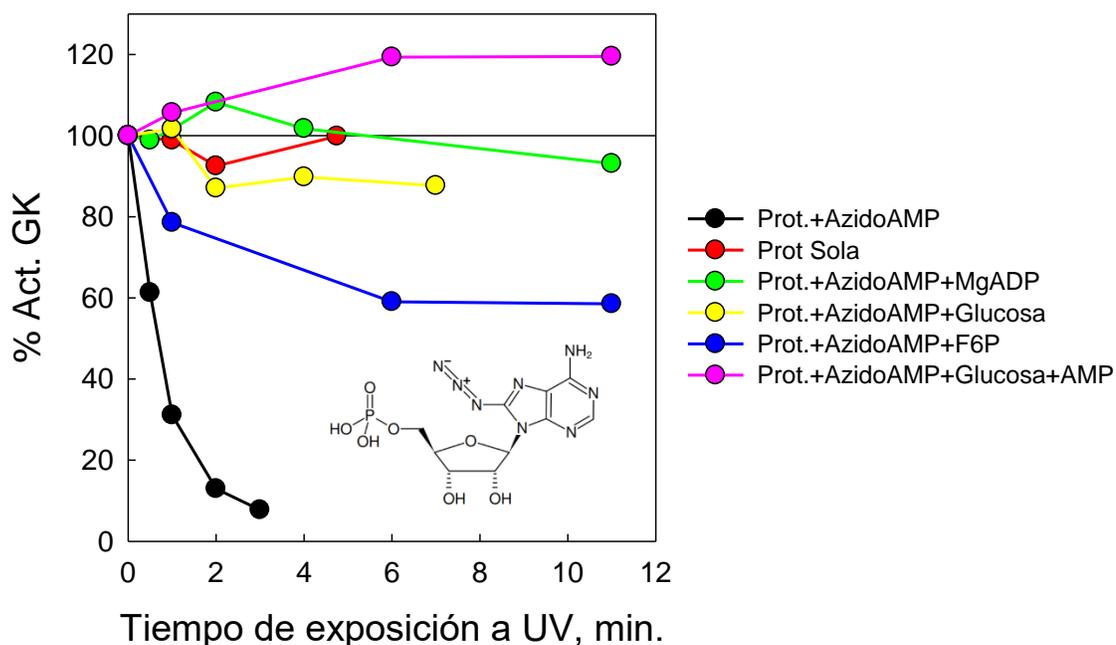


Figura 34. Efecto de la modificación química por 8-Azido-AMP en MmPFK/GK.

Actividad enzimática de MmPFK/GK luego de ser expuesta a luz UV en presencia de 8-Azido-AMP 8 mM (a excepción de ●, donde estaba a 5 mM y de ● donde el modificador estaba ausente) por distintos tiempos. En todos los ensayos la concentración de proteína fue de 0,12 mg/ml y se realizaron en HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,8 (a excepción de ●, en PIPES-NaOH 50 mM, pH 6,5), Mg^{2+} libre 1 mM, DTT 1 mM. Las concentraciones de ligando fueron ● MgADP 5 mM, ● Glucosa 100 mM, ● F6P 10 mM, ● Glucosa 500 mM, AMP 30 mM y 8-Azido-AMP 5 mM. Al interior del gráfico se muestra la estructura de 8-Azido-AMP en representación bidimensional.

exposición a UV, en tanto que en presencia de F6P la pérdida es del 40 % a los 11 minutos. Interesantemente, al realizarse la incubación en presencia de 8-Azido-AMP, glucosa y AMP ocurre un leve incremento de la actividad enzimática de 1,2 veces (**Figura 34**). Sin embargo, se necesitan más experimentos para poder encontrar una explicación para este resultado.

Por otra parte, es necesario analizar si 8-Azido-AMP modifica también el sitio alostérico de la proteína. Hasta ahora sabemos que hay dos moléculas de 8-Azido-AMP uniéndose covalentemente a cada molécula de proteína, y sabemos que una de éstas se une al sitio activo, probablemente en el sitio de unión para MgADP. Para estudiar si la otra molécula de 8-Azido-AMP modifica el sitio alostérico, primero se analizó el efecto de 8-Azido-AMP en la actividad enzimática (sin exposición a UV). En la **Figura 35** puede verse que al realizar mediciones de actividad GK a concentraciones de sustratos cercanas a la K_m de la enzima, el 8-Azido-AMP se comporta como un inhibidor. Esto podría tener tres explicaciones: 1) 8-Azido-AMP no se une al sitio alostérico, 2) 8-Azido-AMP se une con mucho menor afinidad que AMP (lo que sería esperable ya que hemos visto que el sitio alostérico es bastante selectivo ante bases nitrogenadas similares a adenina), 3) 8-Azido-AMP al unirse no genera el efecto alostérico de igual forma que AMP.

Para poder determinar si el 8-Azido-AMP es capaz de modificar químicamente el sitio alostérico, se realizaron experimentos en los que la proteína fue expuesta a luz UV en presencia del modificador y de distintos ligandos. Luego de exposición a UV por distintos tiempos, se midió la activación por AMP para la actividad GK en

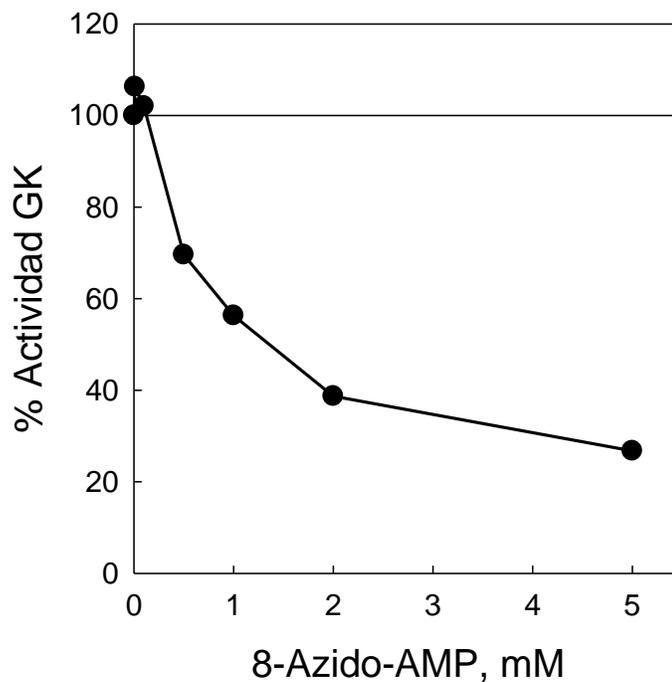


Figura 35. Efecto de 8-Azido-AMP en la actividad GK de MmPFK/GK.

La actividad GK se midió acoplado un ensayo auxiliar G6PDH mediante la producción de NADH, midiendo absorbancia a 340 nm en el tiempo. Los ensayos se realizaron variando solo la concentración de 8-Azido-AMP (sin previa exposición a UV). Las condiciones del ensayos fueron Buffer HEPES-NaOH pH 7,8 50 mM, glucosa 2 mM, MgADP 0,2 mM, Mg²⁺ libre 1 mM, NAD⁺ 0,2 mM. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad enzimática en ausencia de AMP.

concentraciones de sustratos cercanas a la K_m . En la **Figura 36** se puede observar que cuando se incuba la proteína en presencia de glucosa y 8-Azido-AMP, la activación por AMP va volviéndose cada vez más baja en función del tiempo de exposición a UV. Lo mismo ocurre cuando la proteína se expone a UV en presencia del modificador y de F6P. Esto apunta a que existe una modificación en el sitio alostérico de la proteína, la que evita que AMP pueda unirse o realizar su efecto activador. Cuando se incuba la proteína en presencia de AMP y glucosa junto con 8-Azido-AMP, además de haber un leve aumento de la actividad enzimática, no se produce una disminución en la activación por AMP, por lo que podríamos estar frente a una protección del sitio alostérico por parte de AMP. Estos resultados son evidencia independiente de la existencia de un sitio alostérico para AMP en MmPFK/GK.

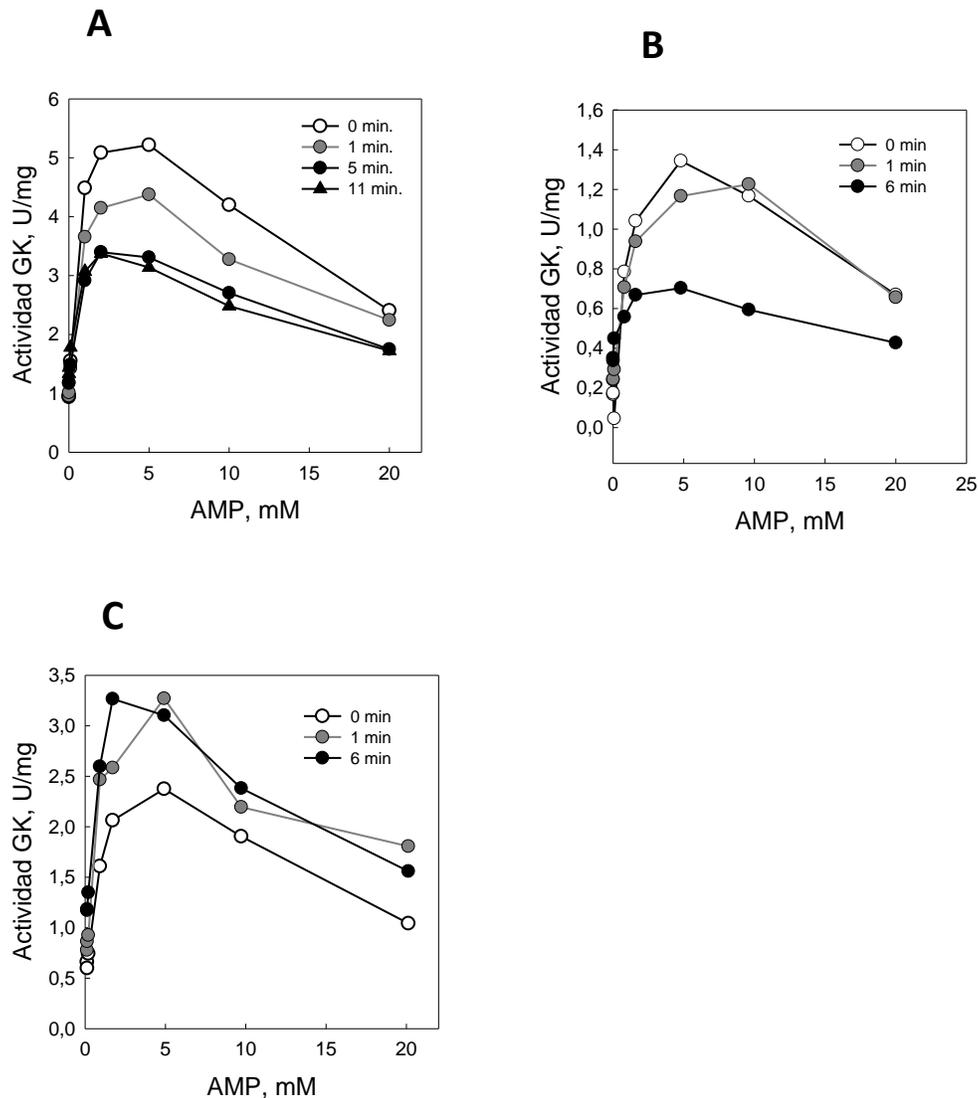


Figura 36. Efecto de la modificación química por 8-Azido-AMP sobre la activación por AMP en MmPFK/GK.

Ensayos de activación por AMP de MmPFK/GK luego de ser expuesta a luz UV por distintos tiempos en presencia de 8-Azido-AMP 5 mM y distintos ligandos. En los tres casos la actividad se midió en HEPES-NaOH 50 mM pH 7,8, glucosa 2 mM, MgADP 0,2 mM, Mg²⁺ libre 1 mM, NAD⁺ 0,2 mM, variando la concentración de AMP. La actividad GK se midió mediante un ensayo acoplado G6PDH. Los resultados se expresan en unidades por milígramo. En los tres casos la concentración de proteína fue de 0,12 mg/ml y fue incubada en presencia de 8-Azido-AMP 5 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM. A) corresponde a la activación de la muestra que además poseía glucosa 500 mM; B) F6P 10 mM; C) AMP 30 mM y glucosa 500 mM.

3.6 Evolución de la activación por AMP en la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP de *Archaea*.

Hasta ahora, sabemos que MmPFK/GK es activada por su producto de reacción AMP, tanto en su actividad GK como PFK. Sabemos, además, que la enzima bifuncional de *Methanocaldococcus janasachii*, organismo perteneciente al mismo orden que *M. maripauludis* (*Methanococcales*), también es activada por AMP (Herrera-Morandé 2015). Estos son los datos con que se contaba al momento de comenzar este trabajo de tesis, vale decir, se sabía que al menos las enzimas bifuncionales PFK/GK pertenecientes al orden *Methanococcales* eran activadas por AMP. Sin embargo, se desconocía en qué otras enzimas de la familia, presentes en los distintos órdenes de *Archaea*, también estaba presente este rasgo. Esta activación no había sido observada en las enzimas caracterizadas hasta ahora, pertenecientes en su mayoría al orden *Thermococcales*, donde solo hay enzimas GK y PFK específicas. Por otro lado, se desconoce si la activación por AMP es una novedad evolutiva presente solo en las enzimas bifuncionales de *Methanococcales*, o si se trata de un rasgo ancestral.

Para determinar si la activación por AMP es un rasgo ancestral o una novedad evolutiva dentro de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP, se realizó un estudio comparativo de activación por AMP entre varias proteínas de la familia pertenecientes a distintos órdenes. Además, se ensayó la activación por AMP en los ancestros reconstruidos para cada uno de los órdenes que se estudiaron.

La metodología de reconstrucción de proteínas ancestrales consiste en la

obtención, mediante modelos probabilísticos, de la secuencia más probable para el ancestro común de un grupo de secuencias homólogas. Las secuencias más probables de ancestros para los distintos grupos filogenéticos de esta familia de proteínas fueron reconstruidas como se muestra en Castro-Fernandez 2015 y Castro-Fernandez et al. 2017 y su posición en el árbol filogenético se muestra en la **Figura 3**. Estos genes se sintetizaron y las proteínas codificadas se expresaron y purificaron como se indica en Castro-Fernandez et al. 2017. Mediante la caracterización bioquímica de estas proteínas ancestrales es posible detectar la presencia de diversos rasgos moleculares e inferir una ruta evolutiva para su aparición o desaparición en las distintas ramas filogenéticas de la familia. Por ejemplo, como se explicó en la introducción, mediante esta técnica pudo establecerse la historia evolutiva de la especificidad por sustratos en esta familia, determinándose que la bifuncionalidad es ancestral. En este caso, usaremos esta técnica para detectar la presencia de activación por AMP en las enzimas ancestrales reconstruidas y en enzimas actuales. Con esto será posible inferir la ruta evolutiva de la aparición o desaparición de este rasgo en esta familia de proteínas.

Para este estudio se eligieron las siguientes enzimas actuales como representantes: de las GK específicas de *Thermococcales* se eligió la enzima GK de *Thermococcus litoralis* (TIGK). De las PFK específicas de *Thermococcales*, la PFK de *Pyrococcus horicohii* (PhPFK). De las bifuncionales de *Methanococcales*, MmPFK/GK. De las bifuncionales de *Methanosarcinales*, la PFK de *Methanosarcina mazei* (MzPFK). En la **Figura 3** se muestra el árbol filogenético de esta familia y se indica la posición de cada

una de estas enzimas.

En las dos enzimas específicas, ya sea por glucosa (TIGK) o por F6P (PhPFK), no se encontró activación por AMP (**Figura 37**). Sin embargo, en las dos enzimas bifuncionales ensayadas, MmPFK/GK y MzPFK, representantes de dos clados lejanos (**Figura 3**), sí se encontró activación por AMP (**Figura 37**). No obstante, en la enzima MzPFK se observa una activación menor que la observada en MmPFK/GK. Esto puede ser un vestigio evolutivo, aunque con los datos disponibles hasta este momento, no se puede concluir acerca de la trayectoria evolutiva de la activación por AMP en esta familia.

Hasta ahora, se ha visto que la activación por AMP es un rasgo compartido solo entre los grupos de enzimas bifuncionales. Al ser MmPFK/GK y MzPFK bifuncionales y distantes filogenéticamente, puede hipotetizarse que la activación por AMP se trataría de un rasgo ancestral el que podría estar correlacionado con la bifuncionalidad. Con el fin de poner a prueba esta hipótesis, se estudió la evolución de la activación por AMP en la transición evolutiva que comprende la bifurcación entre el linaje bifuncional de las PFK/GK de *Methanococcales* y el linaje de las PFKs específicas de *Thermococcales* (**Figura 3**). Para esto se estudió la presencia o ausencia de este rasgo en los ancestros de ambos linajes (ancM y ancT respectivamente), el ancestro común entre ambos (ancMT) y el último ancestro común entre ambos linajes y las PFKs de *Methanosarcinales* (ancMMT) (**Figura 3**). En el centro de la **Figura 38** se puede ver una sección del árbol filogenético que representa la transición evolutiva que se está estudiando, donde se marca la

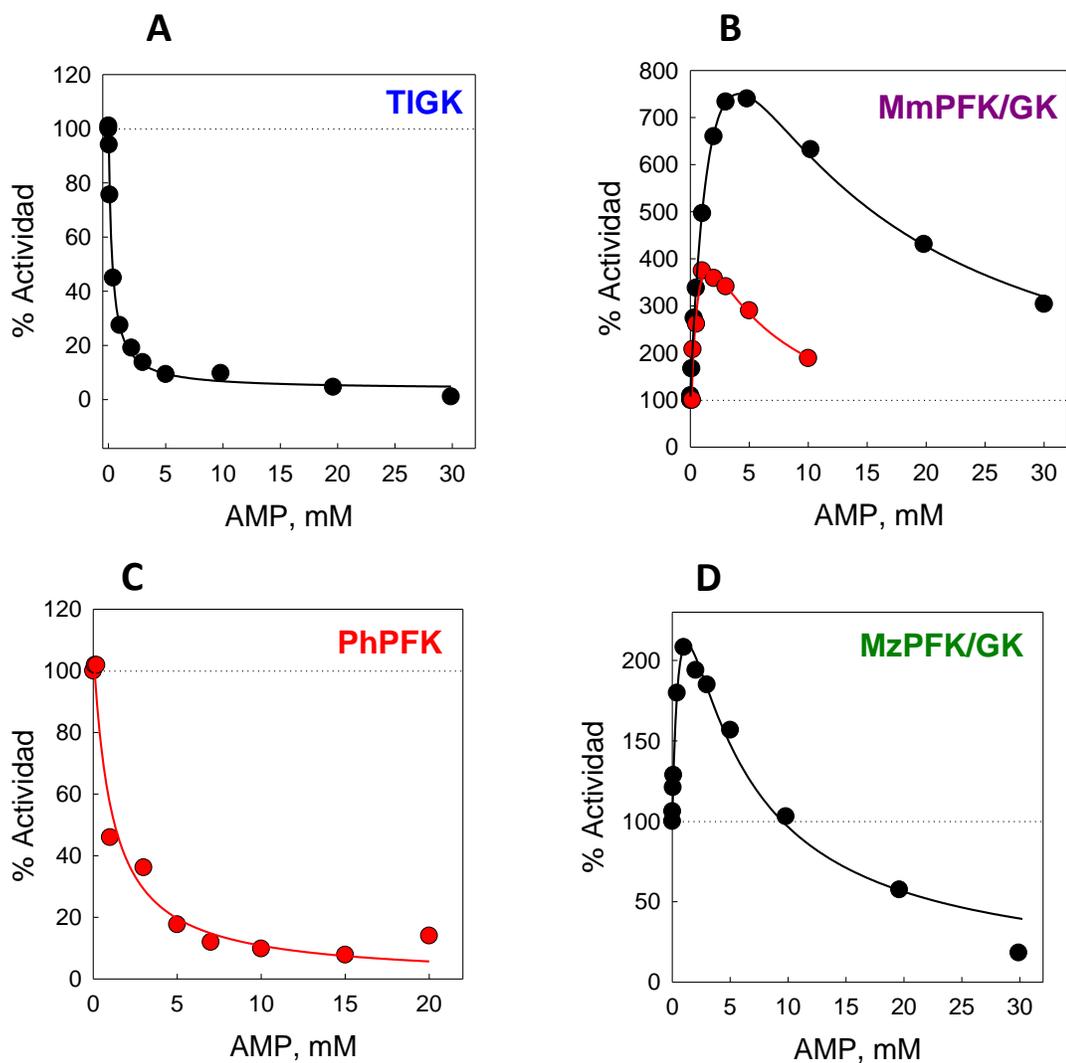


Figura 37. Efecto de AMP en distintas proteínas actuales de la familia de quinasas dependientes de ADP de *archaea*.

La actividades enzimática GK (●) o PFK (●) se midieron a distintas concentraciones de AMP. En todos los casos los ensayos fueron realizados a concentraciones de sustrato cercanas a la K_m de cada una de las enzimas. Los resultados se expresan como porcentaje del valor de actividad en ausencia de AMP. A las curvas de TIGK (A) y PhPFK (C) se les ajustó una hipérbola descendiente con asíntota en cero (ecuación 4); a las de MmPFK/GK (B) y de MzPFK/GK (D) se les ajustó la ecuación fenomenológica 6.

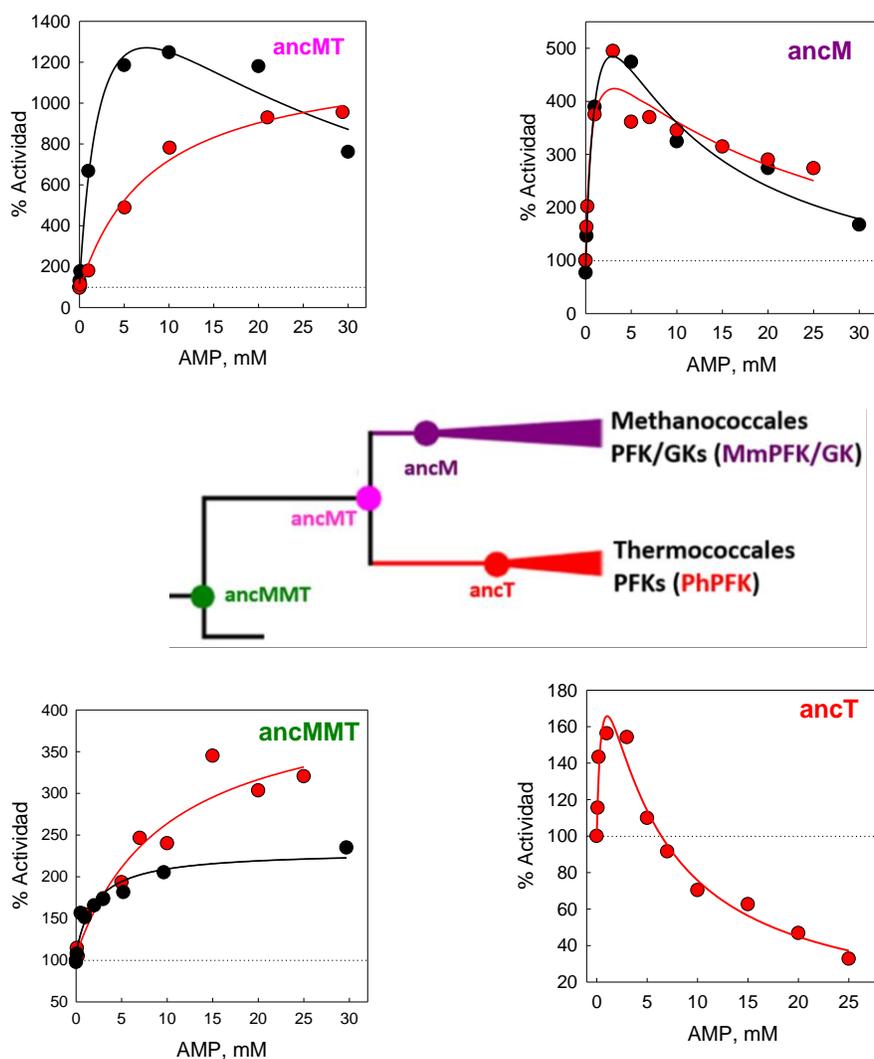


Figura 38. Efecto de AMP en distintos ancestros reconstruidos de la familia de quinasas dependientes de ADP de *archaea*.

Cada ancestro se indica dentro de su respectivo gráfico. Al centro se muestra un fragmento del árbol filogenético de la **Figura 3** que corresponde a la transición evolutiva desde **ancMMT** hasta las enzimas actuales específicas por F6P de *Thermococcales* y bifuncionales de *Methanococcales*, pasando por **ancMT** y la transición hacia **ancM** y **ancT** a partir de éste. Cada proteína fue ensayada en concentraciones de sustrato cercanas a su respectiva K_m . A las curvas para **ancT**, **ancM** y **ancMT** se les ajustó la ecuación fenomenológica 6, mientras que a la curva de **ancMMT** se ajustaron hipérbolas que intersectan el eje Y (ecuación 5). Los resultados se representan como porcentaje de la actividad enzimática en ausencia de AMP.

posición de cada uno de los ancestros estudiados. Como se aprecia en los gráficos de esta misma **Figura 38**, los ancestros ancMMT, ancMT y ancM, todos ellos bifuncionales, son activados por AMP en ambas actividades enzimáticas. Sin embargo, el ancestro ancT, que es PFK-específico posee una activación remanente mucho menor que cualquiera de las otras proteínas investigadas. Esto puede indicar que la activación por AMP es un rasgo ancestral que se perdió en la transición hacia el linaje de las enzimas PFK específicas de *Thermococcales*. Además, de esto se desprendería que la activación por producto es un rasgo correlacionado evolutivamente con la bifuncionalidad.

Para determinar si las diferencias en activación corresponden a una diferencia efectiva relacionada con la presencia o ausencia del rasgo en las distintas enzimas y no a diferencias debidas a las concentraciones de sustrato a las que se realizaron los ensayos y, además corroborar que la activación observada para ancT sea efectivamente un remanente, se repitieron los experimentos de activación variando la concentración de los sustratos. Para esto realizaron ensayos en los que se dejó constante un sustrato en concentración cercana a la K_m de la proteína, mientras que el cosustrato se llevó a concentraciones de saturación (al menos 10 veces K_m). Se espera que al saturar con MgADP se minimice (o incluso desaparezca) el efecto inhibitorio del AMP al no poder competir con ese sustrato por el sitio activo, maximizándose el efecto activador, como efectivamente ocurre con MmPFK/GK (**Figura 6**). Por otro lado, al saturar con el azúcar se espera que el efecto activador de AMP se vea reducido a un mínimo, así como se observa para MmPFK/GK en la **Figura 6**, pues, si la activación en estas proteínas también

ocurre mediante un aumento en la afinidad por glucosa, entonces, al saturar con este sustrato este efecto se minimizaría.

En el caso de PhPFK, se observa que para todas las concentraciones de sustratos utilizadas no se observa activación, habiendo solo inhibición (**Figura 39E**). Sin embargo, como se espera, esta inhibición es menor al aumentar la concentración de MgADP, lo que es consistente con el hecho de que AMP es un inhibidor competitivo respecto a este sustrato.

En el caso del ancestro ancT se observa que, como es esperable, al saturar con MgADP aumenta efecto activador y al saturar con F6P éste disminuye no llegando a activarse la enzima (**Figura 39D**). Sin embargo, el efecto activador nunca es superior a 1,5 veces, siendo menor que en todas las enzimas actuales y los ancestros que sí se activan. Con estos resultados la evidencia apunta a que la activación por AMP se fue perdiendo en el transcurso evolutivo desde el ancestro ancMT a las enzimas actuales específicas por F6P de *Thermococcales*, pero que quedan remanentes del rasgo en ancT.

En el caso de la actividad GK del ancestro ancM (**Figura 39C**) se observa que al saturar con MgADP la activación por AMP se maximiza, no observándose el efecto inhibitorio; y al saturar con glucosa, el efecto activador desaparece. Sin embargo, en la actividad PFK (**Figura 39B**) se observó un comportamiento totalmente distinto; al saturar con F6P la inhibición por AMP no aparece, observándose sólo una activación hiperbólica, en forma similar a cuando se satura con MgADP. El mismo comportamiento

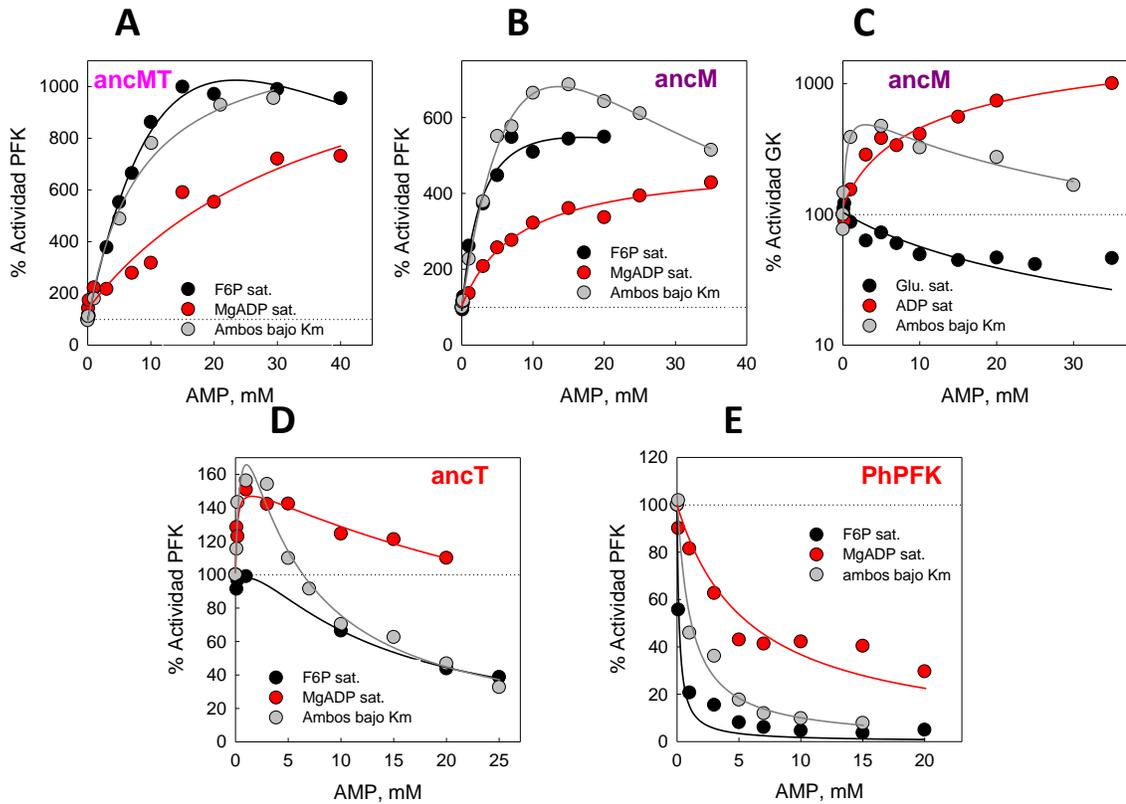


Figura 39. Efecto de AMP sobre la actividad enzimática de ancMT, ancM, ancM y PhPFK a distintas concentraciones de sustratos.

Efecto de AMP sobre la actividad enzimática en **ancMT** (A), **ancM** (B), **ancM** (C), **ancT** (D), **PhPFK** (E) ante distintas concentraciones de sustrato. ● azúcar (F6P o glucosa) en condiciones saturantes y MgADP en baja concentración. ● azúcar (F6P o glucosa) en baja concentración y MgADP en condiciones saturantes. ● ambos sustratos en baja concentración. A cada curva se le ajustó la ecuación 6 cuando se observó a la vez efecto activador y efecto inhibitorio; la ecuación 4 cuando solo se observó inhibición; la ecuación 5 cuando solo se observó activación.

se observa para la actividad PFK del ancestro ancMT (**Figura 39A**). Los resultados para la activación de la actividad PFK de ambos ancestros sugiere la existencia de un posible cambio en el mecanismo de activación (por ejemplo, la existencia de un mayor componente activador en la catálisis). Sin embargo, hacen falta más experimentos para poder explicar de forma precisa la naturaleza de estas diferencias.

Todos estos resultados indican que la activación por AMP es un rasgo ancestral, el que se encuentra correlacionado evolutivamente con la bifuncionalidad, habiéndose perdido en la transición desde la bifuncionalidad hacia las PFK específicas de *Thermococcales*.

De acuerdo con lo reportado por Castro-Fernández et al. 2017, la transición desde la bifuncionalidad a la especificidad por F6P se habría producido mediante la pérdida de la afinidad por glucosa en la transición desde el ancestro ancMT a las PFK-específicas de *Thermococcales*. Esta pérdida de afinidad se debe principalmente al cambio de un ácido glutámico por una alanina en el sitio activo. Al producir la mutación puntual E72A en ancMT, esta proteína pierde la capacidad de catalizar la reacción GK, volviéndose específica por F6P al igual que el ancestro ancT (Castro-Fernández et al. 2017). Para corroborar si la transición hacia la especificidad por F6P y la pérdida de la activación por AMP están asociadas a un cambio en el mismo sitio (al mismo evento evolutivo), se analizó la activación por AMP en la mutante ancMT E72A. Interesantemente, esta mutante no pierde su capacidad de ser activada por AMP (**Figura 40**). Lo que implica que el cambiar la especificidad de una enzima bifuncional, no afecta la activación por AMP.

Este resultado constituye otra evidencia, desde una mirada evolutiva, de que existe un sitio alostérico para AMP y muestra además que la evolución de estos dos sitios (activo y alosterico) se debe a modificaciones diferentes, las que tuvieron como resultado final la pérdida de la activación por AMP en las PFK de *Thermococcales*.

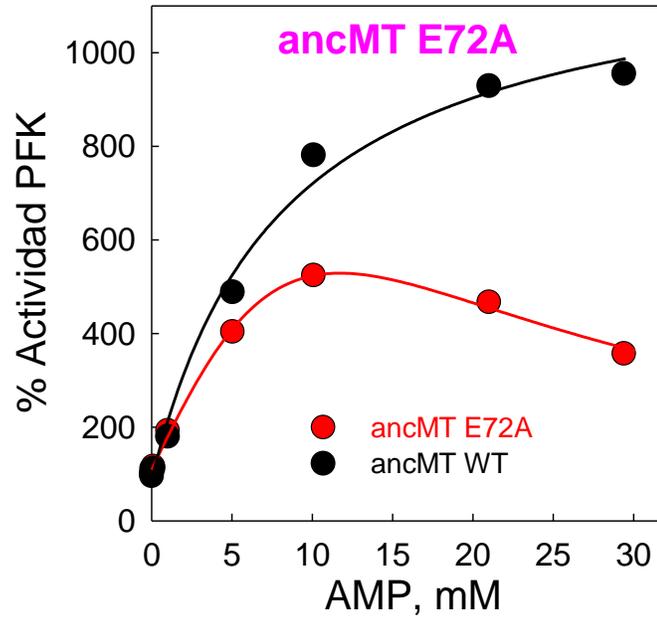


Figura 40. Efecto de AMP en la actividad de la mutante E72A de ancMT.

Los resultados se muestran como porcentaje de la actividad enzimática en ausencia de AMP. En negro se muestra la activación por AMP del ancestro ancMT WT; en rojo, de la mutante E72A. A los datos se ajustó la ecuación fenomenológica 6. Los ensayos fueron realizados a una concentración fija de sustratos cercanos a la K_m de la enzima.

4 Discusión

En la publicación de Castro-Fernández et al. 2014, mediante el estudio de la PFK de *Methanococcus maripalis* (MmPFK/GK) se mostró que las enzimas PFK del orden *Methanococcales*, que habían sido anotada como específicas PFK con la excepción de la enzima bifuncional de *Methanocaldococcus janaschii*, eran en realidad bifuncionales PFK/GK (Castro-Fernández et al. 2014). En esa misma publicación los autores mencionan que la enzima MmPFK/GK es activada por AMP. Este hallazgo trajo consigo el desafío de entender el mecanismo cinético mediante el cual ocurre este efecto, la evolución de este rasgo dentro de la familia de enzimas y el rol metabólico de dicha activación. En este trabajo de tesis se han abordado experimentalmente los primeros dos aspectos.

En particular, se ha descrito el mecanismo de la activación por AMP en la enzima MmPFK/GK. Además, se ha determinado que se trata de un rasgo conservado y ancestral en las enzimas bifuncionales PFK/GK de *Methanococcales*, el que se perdido en la transición hacia la especificidad por F6P o por glucosa en las enzimas PFK y GK específicas de *Thermococcales*. El hecho de que esta enzima sea activada por AMP por si solo ya es una novedad científica importante dentro del conocimiento que tenemos acerca de las *Archaea* metanogénicas y su metabolismo, pues hasta antes del comienzo de esta tesis las enzimas PFK y GK de *Archaea* habían sido reportadas como no reguladas.

Además, en este trabajo también se ha descrito en detalle el mecanismo cinético de MmPFK/GK, siendo la primera vez que se hace este estudio para una enzima

bifuncional del orden de los *Methanococcales*. Junto con eso, también es la primera vez que se caracteriza en detalle el mecanismo de inhibición por sustrato presente en estas enzimas. Se obtuvo que, al igual que las enzimas descritas hasta ahora (Rivas-Pardo et al. 2013), el mecanismo cinético corresponde a un secuencial ordenado donde MgADP es el primer sustrato en unirse a la enzima y AMP el último producto en disociarse. En Castro-Fernandez et al. 2014 solo se reportó la activación para la actividad GK, no mencionándose si estaba presente en la actividad PFK. Por lo tanto, primero que todo, se corroboró que ambas actividades enzimáticas, GK y PFK, son activadas por el nucleótido. Sin embargo, se demostró que la actividad PFK es menos activada que la actividad GK, lo que se discutirá más adelante.

4.1 Aspectos estructurales de la regulación

Pese a que se sabía que la enzima era activada por AMP (Castro-Fernandez et al. 2014; Herrera-Morandé 2015), no había evidencia de la existencia de un sitio alostérico para esta molécula en esta proteína o en otras proteínas de la familia. En este trabajo se ha proporcionado evidencia de la existencia de dicho sitio.

Una fuente de evidencia de la existencia de un sitio alostérico son los estudios detallados de cinética enzimática en los que se caracterizó el mecanismo de activación por AMP. Sin embargo, esta fuente de evidencia es dependiente del modelo, puesto que es el modelo utilizado para interpretar los datos de activación el que presupone su existencia. Sin embargo, pese a ser dependiente del modelo, la evidencia es robusta,

puesto que se analizó el efecto de AMP en la actividad enzimática para ambos sustratos a distintas concentraciones de cosustrato. Por otro lado, teniendo en cuenta los efectos de AMP en la actividad, es poco probable y poco parsimonioso que éstos no se deban a la existencia de un sitio alostérico.

La evidencia más directa de la existencia de un sitio alostérico son los experimentos de modificación química, ya que consiste en evidencia independiente del modelo acerca de que la activación por AMP ocurre mediante la unión de esta molécula a un sitio para AMP distinto del sitio activo. No solo se logró calcular la estequiometría de modificación química, sino que se obtuvo que esta modificación afecta la activación por AMP, incluso en condiciones donde existe protección del sitio activo ante la modificación debido a la presencia de algún ligando.

Si bien con la evidencia disponible podemos concluir la existencia del sitio alostérico, en esta tesis no se pudo obtener una caracterización detallada de su estructura. Actualmente no existen estructuras depositadas para esta proteína en particular, sin embargo, existen estructuras de proteínas homólogas bifuncionales, como por ejemplo la PFK/GK de *Methanocaldococcus janaschii* (Tokarz et al. 2018) y el ancestro ancMT (Castro-Fernandez et al. 2017). Sin embargo, en estas estructuras no es posible establecer directamente el sitio de unión para AMP dado que dicha molécula no aparece presente en la estructura en un sitio distinto al sitio activo.

Si bien no se obtuvo una caracterización detallada del sitio alostérico, a partir de los resultados obtenidos en esta tesis es posible especular acerca de aspectos

estructurales del sitio de unión para AMP. De los experimentos realizados, los que entregan más información acerca de aspectos estructurales del sitio son aquellos en los que se evaluó la especificidad del efecto alostérico por distintos nucleótidos y nucleósidos, analizando el efecto de distintas moléculas en la actividad de la enzima.

Lo primero que se infiere de estos resultados es que la presencia del fosfato del nucleótido es fundamental para que AMP produzca su efecto activador. Esto se infiere a partir de que tanto adenosina como desoxi-adenosina, moléculas donde la única diferencia con AMP y desoxi-AMP es la ausencia del fosfato, no activan a la enzima. Interesantemente, ambos nucleótidos producen inhibición, de lo que puede inferirse que sí pueden unirse al sitio activo, lo que evidencia la distinta especificidad de los sitios activo y alostérico. Respecto a la ribosa presente en el nucleótido, solo podemos determinar que la ausencia de un hidroxilo en la posición 2 no modifica el efecto activador, como se puede ver en los resultados para desoxi-AMP. Por otro lado, además sabemos que ADP no produce un efecto activador en la enzima, de lo que podemos inferir que el sitio es específico para nucleótidos monofosfato. Con esta información podemos especular que el sitio debe presentar residuos de carga positiva que generen interacción con el fosfato y que, por otro lado, debe existir alguna característica estérica que solo permita la unión de nucleótidos con un solo fosfato.

Los datos obtenidos apuntan a que la estructura de la base nitrogenada también es importante para la generación del efecto activador y, sobre todo, para la especificidad por el efector. La única diferencia entre las bases púricas de adenosina, guanosina e

inosina radica en la presencia o ausencia de un grupo amino y su posición cuando está presente (**Figura 8**). En adenosina, esta amina se encuentra en la posición 6 del anillo heterocíclico, en cambio en guanosina se encuentra en la posición 2, siendo reemplazada por un carbonilo en la posición 6. En inosina la amina no está presente, siendo reemplazada también por un carbonilo en ambas posiciones. IMP no produce efecto alguno en la enzima, en cambio, GMP produce solo inhibición (la que se determinó como competitiva, por lo que se estaría uniendo al sitio activo). A partir de estos datos se puede inferir que la posición o presencia del grupo amino en la posición 6 de la base púrica es determinante para producir la activación. Esto sugiere una gran especificidad por el anillo de adenina en el sitio alostérico, lo que da cuenta de la existencia de interacciones altamente específicas y/o de propiedades estéricas relevantes en el sitio alosterico.

Interesantemente, los nucleótidos monofosfato de pirimidinas tienen un leve efecto activador. Si bien éste es bastante menor que el producido por AMP, en el caso de TMP llega a ser de 3 veces. Como las estructuras de las bases nitrogenadas de estos nucleótidos son distintas a la de adenosina, no es posible especular respecto a cuáles de las diferencias concretas en las estructuras moleculares de estos ligandos son las responsables de sus efectos activadores y de las diferencias entre éstos. Por otro lado, la gran especificidad del sitio por AMP en el caso de nucleótidos púricos, sugiere la existencia de una arquitectura con grandes impedimentos estéricos para la unión de ligandos del tamaño de AMP o mayores. Tomando esto en cuenta cabe pensar que, como

los anillos pirimidínicos son más pequeños que los anillos dobles púricos, éstos podrían ingresar con más facilidad al sitio alostérico y, como se ha visto, provocar el efecto activador, pero en menor medida.

Hasta ahora, solo se ha especulado acerca de los aspectos estructurales del sitio alostérico de MmPFK/GK. Sin embargo, es necesario distinguir dos aspectos en los efectos alostéricos. Por un lado, el efector debe unirse a la enzima en un sitio distinto al sitio activo. Pero, por otro lado, la unión del efector a ese sitio debe producir un efecto en la actividad de la enzima, lo que implica un cambio en la conformación o en la dinámica del sitio activo. En ese sentido, es posible que haya ligandos que se unan al sitio alostérico pero que no produzcan un efecto en el sitio activo, o que no lo produzcan con la misma intensidad que otros ligandos.

Teniendo en cuenta la información disponible acerca de la especificidad del efecto alostérico mediante los estudios de los efectos de distintos nucleótidos en la actividad de la enzima, podemos inferir que en la amina de la posición 6 del anillo nitrogenado de adenina radica gran parte de la acción alostérica de AMP (si se le compara con otros nucleótidos monofosfato) y su especificidad como efector. En ese sentido, con los experimentos realizados, no es posible determinar si GMP y/o IMP se unen a la enzima en dicho sitio, pero sin causar el efecto alostérico. Para poder diferenciar los efectos de la estructura del ligando en la afinidad de la unión y en el efecto alostérico es necesario hacer experimentos de unión de ligandos y determinar constantes termodinámicas para dicho proceso. En resumen, alteraciones en el efecto

alostérico (en nuestro caso en la activación) no son una señal directa de lo que ocurre solamente en el sitio alostérico, sino que de todo un proceso causal que incluye la unión del ligando y los efectos que ésta pueda tener en la actividad enzimática mediante la generación de cambios conformacionales o estabilización de conformaciones. Para concluir que una modificación en la activación enzimática está siendo causada solo por una alteración en la unión del efector, se requiere más información.

Como se dijo anteriormente, los experimentos de modificación química usando 8-Azido-AMP son evidencia independiente del modelo acerca de la existencia de un sitio alostérico. En este caso, se cuenta con la información de que 8-Azido-AMP se puede unir covalentemente a la proteína con una estequiometría de unión de dos moléculas de modificador por cada molécula de proteína. Además, se determinó que una de estas moléculas se une covalentemente al sitio activo. Entonces, teniendo estos antecedentes en cuenta, la mejor explicación para las alteraciones en el efecto activador por AMP producto de la modificación química, es la existencia de un sitio alostérico y que, además hay una molécula de 8-Azido-AMP uniéndose covalentemente a éste. Sin embargo, como se ve en la **Figura 35**, esta molécula no activa a la enzima. Lo que se ha discutido hasta el momento acerca de las características estructurales del sitio alostérico ayudan a entender este fenómeno. Puede ocurrir que 8-Azido-AMP se una al sitio alostérico (tal vez con una afinidad distinta), pero que su unión no genere el efectos en el sitio activo. Esto se debería a que, como se puede ver en la **Figura 34**, 8-Azido-AMP presenta un grupo azido en la posición 8 del anillo púrico. Este experimento puede reinterpretarse

como una confirmación de la gran especificidad por AMP del sitio alosterico para provocar el efecto activador, principalmente debido a la estructura de la base nitrogenada.

Utilizando la cinética enzimática de estado estacionario es posible separar los dos aspectos del alosterismo, vale decir, la unión del efector y los efectos de esta unión en el sitio activo de la proteína. Sin embargo, la forma de hacer esto es dependiente de modelos matemáticos. En nuestro caso utilizamos el modelo de modificador general de la actividad enzimática. En este modelo, la constante de activación cuantifica la afinidad del sitio alostérico por el efector, mientras que los parámetros α y β dan cuenta de los efectos que tiene la unión del efector en el sitio activo, tanto sobre la afinidad por sustrato como sobre la catálisis, respectivamente. Cabe señalar que esta interpretación es puramente fenomenológica. Tanto para corroborarla, como para darle una interpretación en términos estructurales, se requiere más información proveniente de otro tipo de experimentos, tales como estudios termodinámicos y cinéticos de unión de ligandos, determinación de la estructura de la proteína, mutaciones sitio dirigidas, etc.

4.2 Aspectos cinéticos de la regulación por AMP y del mecanismo cinético de MmPFK/GK

En este trabajo se determinó el mecanismo cinético para ambas actividades enzimáticas presentes en MmPFK/GK. En ambos casos se obtuvo un mecanismo secuencial-ordenado donde el primer sustrato en unirse a la enzima es MgADP y el

último producto en disociarse es AMP. En ambas actividades este mecanismo no es afectado cualitativamente por AMP. Ambas actividades presentan además inhibición por el sustrato azúcar. En el caso de la actividad GK se obtuvo un mecanismo de inhibición consistente en la formación de dos complejos de punto muerto (E-Glu y E-AMP-Glu) en todas las concentraciones de AMP ensayadas. En la actividad PFK, en cambio, se obtuvo este mismo mecanismo a bajas concentraciones de AMP, pero al aumentar la concentración de este ligando el mecanismo varía a la formación de un solo complejo de punto muerto, el complejo E-F6P. Vale decir, un mecanismo donde la inhibición solo se produce por la competencia entre F6P y MgADP por la unión a la enzima libre.

Tanto en la determinación del mecanismo cinético, como en el de inhibición por sustrato, se realizaron dos suposiciones en el momento de elegir los modelos que serían utilizados. Para el caso del mecanismo cinético se descartó que éste ocurriese mediante un mecanismo al azar. Por otro lado, para la inhibición por el azúcar no se consideró el caso de que esta ocurriese mediante un efecto alostérico. A continuación, se pasará a justificar ambas suposiciones.

Para un mecanismo cinético al azar, la ecuación de velocidad inicial que se deduce, en función de los dos sustratos, tiene la forma de un cociente de polinomios cuadráticos (Purich 2010). Esta función, debido a su cantidad de parámetros, es capaz de ajustarse tanto a muchísimos comportamientos cinéticos diferentes. Por otro lado, un mecanismo secuencial-ordenado puede ser visto como un caso límite de un mecanismo al azar. Es más, la ecuación de un mecanismo al azar también podría ser ajustada a los

resultados que se obtendrían para los tres modelos de inhibición por sustrato que se muestran en la **Figura 12**. Entonces, cabe preguntarse, ¿Cómo descartar la existencia de un mecanismo al azar si las ecuaciones que se deducen de éste siempre se pueden ajustar a los datos? La respuesta es que, al ser un mecanismo matemáticamente más complejo y físicamente poco parsimonioso, a menos que se tengan razones para sospechar de su existencia, debiese ser descartado en beneficio de un modelo más simple que sea capaz de explicar todos los datos. La presencia de un mecanismo al azar frecuentemente da origen a curvas de saturación no Michaelianas para los sustratos, las que pueden tener comportamientos tales como de inhibición por sustrato, de cooperatividad negativa, sigmoides, sigmoides con máximo, inhibición por sustrato parcial, etc. Sin embargo, si estos comportamientos se debiesen efectivamente a un mecanismo al azar, al aumentar la concentración del cosustrato respectivo las curvas de saturación deberían tornarse Michaelianas (Purich 2010). Si esto ocurre, entonces puede sospecharse la presencia de un mecanismo al azar. Si no ocurre, vale decir, el comportamiento no Michaeliano se mantiene o aumenta, entonces es evidencia de que estamos frente a otro tipo de mecanismo, que podría ser, por ejemplo, una inhibición de sustrato mediante la formación de un punto muerto, un efecto alostérico, etc. Si las curvas de sustrato dan simplemente Michaelianas, entonces también puede descartarse un mecanismo al azar. En nuestro caso la inhibición por sustrato es completa (vale decir, la asíntota de las curvas de sustrato para azúcar y F6P es igual a cero) y no desaparece al aumentar la concentración de cosustrato en el intervalo de concentraciones utilizadas.

Teniendo esto en cuenta y que todos los datos pueden ser representados utilizando modelos más simples que un mecanismo al azar, entonces puede descartarse la utilización de este modelo para explicar los datos.

Es común en la literatura encontrar trabajos, tales como Santiago-Martínez et al. 2019, en donde se suponen mecanismos al azar debido solo a que se ajustan correctamente a los datos. Sin embargo, esto es erróneo, pues cuando se propone un mecanismo debe descartarse la presencia de otros posibles. Por ejemplo, es posible que otro mecanismo igual de complejo, o incluso más simple, también se ajuste a los datos. En el trabajo citado, los autores dicen haber determinado el mecanismo cinético de la inhibición por AMP de *Methanosarcina acetivorans*, pero lo que realmente hacen es ajustar un modelo con muchos parámetros a los pocos datos que poseen, por lo que es imposible llegar a alguna conclusión confiable respecto a mecanismos a partir de dicha publicación.

Mediante un razonamiento similar se procedió a descartar una inhibición alostérica por parte del sustrato azúcar. Al igual que lo que ocurre con un mecanismo al azar, es usual que una inhibición alostérica por sustrato dé como resultado ecuaciones más complejas (mayor número de parámetros) que las obtenidas en nuestro caso. Por lo mismo, a menos que se tengan razones para sospechar de una inhibición alostérica por sustrato, ésta debe descartarse. Sin embargo, este razonamiento que apela a la parsimonia es válido cuando solamente se considera la evidencia cinética en forma independiente. Eso significa que, si se posee evidencia independiente de la cinética

acerca de la existencia de un sitio alostérico para el sustrato, entonces debería considerarse la utilización de modelos de inhibición alostérica para el sustrato. En nuestro caso, además de la parsimonia de los modelos matemáticos, también contamos con evidencia evolutiva, dado que en toda esta familia de proteínas no se han reportado evidencia de sitios alostéricos para el sustrato azúcar.

Cuando se determina la presencia de un sitio alostérico para el sustrato, usualmente es a través de fuentes de evidencia diversas e independientes, no considerando solo la cinética. Un ejemplo de esto es la Fosfofructoquinasa-2 de *E. coli*, enzima perteneciente a la Familia Riboquinasa, que, a su vez pertenece a la Superfamilia Riboquinasa, la misma donde se clasifican las quinasas dependientes de ADP. Esta enzima posee un sitio alostérico para su sustrato MgATP. Además, junto con presentar inhibición por MgATP en las curvas para ese sustrato (Guixé & Babul 1985), presenta curvas sigmoides para F6P a altas concentraciones de MgATP³ (Cabrera et al. 2011; Baez et al. 2013; Villalobos et al. 2016). Para esta proteína se caracterizó una mutante que no poseía inhibición por sustrato (Guixé & Babul 1985). Posteriormente se obtuvo evidencia acerca de un sitio independiente para MgATP mediante estudios de fluorescencia (Guixé et al. 1998). Finalmente se obtuvo la estructura de la proteína con MgATP en el sitio alostérico (Cabrera et al. 2008). Con esta información se realizaron mutaciones de dicho

³ Observar que con esta información ya es posible descartar que estos comportamientos se deban a la presencia de un mecanismo al azar, dado que, en lugar de volverse Michaelianas las curvas para F6P al aumentar la concentración de MgATP, ocurre todo lo contrario; aumenta la sigmoidicidad de las curvas al aumentar la concentración del cosustrato.

sitio, con lo que se logró mapear la red de interacciones que dan origen a la inhibición por MgATP (Villalobos et al. 2016). Este es un excelente ejemplo de cómo la convergencia de muchas fuentes de evidencia diversas e independientes llevan a establecer con solidez la existencia de una propiedad en la naturaleza; en este caso, de la existencia de un sitio alostérico para el sustrato de una enzima. Sin embargo, si solo nos centramos en la cinética, en este caso tenemos un comportamiento que no puede ser explicado ni por la formación de un complejo de punto muerto ni por un mecanismo al azar, vale decir, que un aumento en la concentración de MgATP produzca que las curvas de saturación para glucosa se vuelvan sigmoides.

De lo que se ha discutido, puede concluirse que para MmPFK/GK estamos justificados en descartar tanto un mecanismo alostérico de inhibición por el sustrato azúcar como un mecanismo al azar de unión de sustratos y disociación de productos. Con esto en cuenta, podemos pasar a la discusión de otros aspectos concernientes a los estudios cinéticos realizados para MmPFK/GK.

La realización de estudios de inhibición por producto es una de las metodologías más exactas para determinar el mecanismo cinético de una enzima. Esto permite corroborar el tipo de mecanismo y determinar en forma directa el orden de unión de los sustratos y de disociación de los productos. Para el caso de un mecanismo secuencial-ordenado, solo el último producto en disociarse será un inhibidor competitivo del primer sustrato en unirse, ya que ambos se unen a la misma forma de enzima (la enzima libre). En este caso, todas las otras relaciones entre productos y sustratos corresponderán a

inhibiciones de tipo mixto.

Como se explicó en la sección de resultados, en nuestro caso no se pueden utilizar estudios de inhibición por producto para la determinación del orden de unión de sustratos y de disociación de productos pues el producto azúcar fosforilado es consumido por las reacciones acopladas de los ensayos cinéticos y AMP activa a la enzima. Para inferir el mecanismo cinético se utilizaron entonces dos técnicas indirectas. Estas corresponden, por un lado, a la utilización de la información acerca del mecanismo de inhibición por sustrato y, por otro lado, al uso de un análogo de producto para realizar estudios de inhibición, en este caso GMP como análogo de AMP. El mecanismo de inhibición por sustrato determinado para cada una de las dos actividades enzimáticas solo es incompatible con un mecanismo en el que MgADP es el primer sustrato en unirse y AMP el último producto en disociarse. Por otro lado, suponiendo que GMP se comporta como AMP, pero sin activar la enzima, entonces, el hecho de que sea un inhibidor competitivo para MgADP permite inferir que AMP es el último producto en disociarse y MgADP el primer sustrato en unirse. Combinando ambas fuentes de evidencia se obtiene una conclusión robusta y confiable respecto al mecanismo cinético de la enzima.

Para determinar el mecanismo de inhibición por el sustrato azúcar, se utilizaron dos métodos independientes para el análisis de los datos. Por un lado, se analizó la dependencia funcional de cada uno de los parámetros cinéticos para cada sustrato en función de la concentración de su cosustrato respectivo. Por otro lado, se realizaron ajustes globales de las ecuaciones de velocidad inicial de cada uno de los modelos de

inhibición por sustrato. De estas dos metodologías, la de ajustes globales es más robusta y confiable que la de ajustes por partes. Esto se debe a que la cantidad de datos usados sobre los que se realiza el ajuste es mayor. Además, se evitan sesgos y errores que podrían producirse al considerar cada curva de saturación por separado. El realizar los dos análisis independientemente (por parte y ajuste global) y además obtener una convergencia entre ambas metodologías, permite obtener conclusiones que pueden ser afirmadas con una alta confiabilidad. Un ejemplo de esto es cuando se determinó que AMP modifica el mecanismo de inhibición por sustrato en la actividad PFK. Pese a que en las dos metodologías se obtienen resultados distintos en cuanto a cuál es la concentración de AMP a partir de la cual se produce el cambio del mecanismo, al considerar ambos análisis puede concluirse robustamente que ese cambio sí existe y no se trata de algún tipo de artefacto producto de la metodología de análisis utilizada.

Un aspecto importante que aclarar acerca de los ajustes globales, realizados tanto en la actividad PFK como en la actividad GK, tiene que ver con el haber supuesto para algunos modelos que algunos parámetros cinéticos eran constantes en función de su cosustrato, como, por ejemplo, suponer K_m^{F6P} o K_I^{Glu} constante en función de MgADP para algunos conjuntos de datos. Podría ser el caso que esta suposición genere un sesgo en el ajuste, produciendo que se seleccione un modelo que no es el correcto. La forma de ver que este no es el caso, es que al no suponer constantes dichos parámetros se obtuvo igualmente que el mejor ajuste correspondió al modelo “E-Glu & E-AMP-Glu” en el caso de la actividad GK y al modelo “E-F6P & E-AMP-F6P” para bajas concentraciones

de AMP y “E-F6P” para altas concentraciones de AMP en la actividad PFK, con lo que puede concluirse que el haber supuesto algunos parámetros como constantes en función de su cosustrato no produce sesgos en los ajustes sobre los datos.

Teniendo en cuenta las conclusiones respecto al mecanismo de inhibición por sustrato, en los casos donde se forman dos complejos de punto muerto (Actividad GK y en PFK a bajas concentraciones de AMP), cabe preguntarse cuál de los dos complejos es el más relevante para explicar la inhibición. Con la evidencia disponible no es posible responder esta pregunta. Sin embargo, es posible especular al respecto basándose en el ajuste de los distintos modelos a los datos. Si para la actividad GK ocurriese que, a pesar de que el modelo “E-Glu & E-AMP-Glu” fue el que mejor se ajusta globalmente, con el ajuste del modelo “E-Glu” se obtuvieran resultados similares en la simulación de K_i^{Glu} en función de MgADP, entonces podríamos concluir de forma cualitativa, que, pese a que se forman ambos complejos de punto muerto, la formación de E-Glu es preferente. Sin embargo, como se puede ver en la **Figura 16**, esto no es lo que ocurre, pues para todas las concentraciones de AMP la curva simulada para K_i^{Glu} en función de MgADP a partir del modelo “E-Glu”, no se asemeja al comportamiento que se obtiene haciendo la simulación a partir del ajuste del modelo “E-Glu & E-AMP-Glu”. Por lo tanto, no se puede obtener en forma aproximada cuál sería el complejo de punto muerto más importante en este caso.

Otro aspecto importante que es necesario mencionar es que el verdadero sustrato de esta enzima es MgADP, no ADP libre, por lo que los estudios cinéticos fueron

realizados controlando adecuadamente la concentración del complejo MgADP y manteniendo siempre la concentración de Mg²⁺ libre en 1 mM. Esto se realizó calculando la concentración total de ambas especies en cada una de las condiciones de reacción ensayadas, utilizando la ecuación 1. Es común ver en la literatura que se comete el error de realizar los ensayos cinéticos en concentraciones equimolares de Mg²⁺ y ADP. Un ejemplo de esto es Richter et al. 2016, donde caracterizan una glucoquinasa dependiente de ADP de mamíferos, perteneciente a la misma familia que MmPFK/GK. Esto constituye un error pues no se está controlando la concentración del verdadero sustrato de la enzima, el que se está siendo sobreestimado. Por otro lado, el Mg²⁺ libre puede tener efectos en la actividad enzimática. Este es precisamente el caso en la quinasas de azúcares dependientes de ADP, donde Mg²⁺ tiene un efecto inhibitorio. En este sentido, la quinasa dependiente de ADP de mamíferos caracterizada por Richter et al. 2016 no es una excepción (como lo indican resultados aún no publicados obtenidos en nuestro laboratorio), por lo que no controlar la concentración de Mg²⁺ libres de los ensayos enzimáticos constituye otra fuente de error. Al hacer los ensayos con concentraciones equimolares de Mg²⁺ y ADP ocurrirá que el Mg²⁺ libre irá aumentando a medida que aumenta la concentración de ADP, provocando inhibición en la enzima. Esto es precisamente lo que ven los autores, que reportan la existencia de inhibición por sustrato, lo que realmente es un artefacto debido a no considerar adecuadamente la

concentración del sustrato verdadero de la enzima y de Mg^{2+} libre⁴. En este trabajo de tesis no se analizó el efecto de la concentración de Mg^{2+} libre en las propiedades determinadas para la enzima. Por lo tanto, todas las conclusiones obtenidas para el mecanismo cinético, de inhibición por sustrato azúcar y de activación por AMP para ambas actividades solo son válidas para una concentración de Mg^{2+} libre de 1 mM.

Respecto a la activación por AMP, se ha determinado que esta molécula activa a MmPFK/GK en ambas actividades mediante un mecanismo mixto, donde el aumento en la afinidad por el sustrato azúcar es el componente principal en ambas actividades. Para llegar a esta conclusión se utilizó el modelo general de modificación de actividad enzimática (**Figura 25**). Hemos visto que para las dos actividades se obtuvieron valores similares de K_A para AMP. Sin embargo, la actividad PFK es menos activada que la actividad GK. Esta diferencia radica principalmente en que el efecto de AMP sobre la enzima es cuantitativamente diferente en ambas actividades, lo que se traduce en diferentes valores de los parámetros α y β , siendo especialmente notoria la diferencia en el aumento de la afinidad por el sustrato azúcar (valor de α), que en la actividad GK es alrededor de un orden de magnitud mayor que en la actividad PFK.

Los experimentos cinéticos para las actividades GK y PFK fueron realizados a dos pHs diferentes, los que corresponden a los óptimos determinados para cada actividad

⁴ Recientemente, en nuestro laboratorio se ha caracterizado la enzima glucoquinasa dependiente de ADP humana haciendo correctamente los ensayos enzimáticos, no habiéndose detectado inhibición por sustrato MgADP.

(Castro-Fernández et al. 2014), siendo estos valores de 7,8 y 6,5 respectivamente. Estos pHs se eligieron con fines comparativos respecto a lo ya publicado en la literatura. Esto tiene como consecuencia que las conclusiones obtenidas para cada una de las actividades se encuentren restringidas al pH en que se ensayó cada una. Con los resultados obtenidos no se puede saber si el pH afecta a la activación por AMP. Como no disponemos información estructural acerca de los residuos involucrados en la unión de los sustratos, en la catálisis, en la unión de AMP al sitio alostérico y en la transmisión del efecto alostérico, no podemos saber *a priori* cuales son los posibles efectos del pH en el mecanismo cinético ni en la activación por AMP. Tampoco se puede saber en qué medida las diferencias cuantitativas observadas entre la activación por AMP en cada una de las actividades corresponde a factores intrínsecos de éstas o a un efecto en el pH en que fueron hechos los ensayos. Sin embargo, para ambas actividades se obtienen resultados robustos que, salvo las diferencias en el mecanismo de inhibición por sustrato azúcar, son cualitativamente equivalentes.

Por otro lado, el pH podría estar modificando al AMP, cuyo pKa está alrededor de 6,7 (Tribolet & Sigel 1987; Wang et al. 1996). Este valor está dentro del intervalo de pHs que se utilizaron, con lo que los ensayos para la actividad PFK se realizaron por debajo de este valor y los de GK por encima. Sin embargo, la constante de activación obtenida para ambas actividades fue similar, por lo que puede concluirse que la variación en el estado de protonación del AMP en los pHs utilizados no afecta significativamente las propiedades del ligando en cuanto a su unión a la proteína.

Otro efecto que puede descartarse es un efecto quelante de Mg^{2+} por parte de AMP. Como se dijo en la introducción, esta enzima es inhibida por Mg^{2+} libre. Por ende, podría ser posible que el efecto activador de AMP se deba en parte a una desinhibición producto del secuestro de Mg^{2+} libre. Sin embargo, la constante de disociación para el complejo MgAMP es de alrededor de 10 mM (Smith et al. 1991). Además, se hicieron controles en los que se disminuyó la concentración de Mg^{2+} libre como si éste fuese quelado por AMP (equilibrios calculados con una constante de disociación de 11 mM) obteniéndose que no hay efecto en la actividad de la proteína en las concentraciones donde se observa el efecto activador (resultados no mostrados).

Como comentario final respecto de los estudios cinéticos, es necesario hacer una revisión de las constantes asociadas al mecanismo activación que fueron determinadas, vale decir K_A , α y β . Al respecto, se puede decir que el hecho de que cada una de estas se hayan obtenido a varias concentraciones de cosustrato agrega robustez a los resultados obtenidos, incluso en casos donde se obtuvo un gran error. Por otro lado, si miramos como ejemplo el valor de α para glucosa (**Figura 30D**) podemos ver que hay puntos en los que el error llega a ser más alto que el valor del parámetro (es por eso que, al estar en escala logarítmica el eje de las ordenadas, solo se muestra la barra de error que apunta hacia el lado positivo del eje Y). Sin embargo, a pesar del error, el valor siempre está al menos un orden de magnitud por debajo de la unidad, y, más importante aún, no se intersecta con los valores de α para F6P. Por lo tanto, pese a los errores, se puede concluir en forma robusta que, en las condiciones en que se hicieron los ensayos,

el valor de α para glucosa es siempre menor que el de F6P.

Un último comentario al respecto tiene que ver con el uso del término “afinidad por el sustrato” en la descripción del mecanismo de activación por AMP, siendo que se está en condiciones fuera del equilibrio, donde la K_m no es (necesariamente) homologable a una constante de afinidad. Esto se hace pues el modelo fenomenológico utilizado para interpretar los datos (modelo de modificador general de la actividad) se construye suponiendo constantes de afinidad (K_s) para cada sustrato. Esto es justificable pues, si no se supusiera afinidad y se utilizaran en su lugar las constantes cinéticas microscópicas (como se hizo, por ejemplo, cuando se dedujeron las ecuaciones para los mecanismos secuencial-ordenado y Ping-Pong), las ecuaciones que se obtendrían tendrían la misma forma. En ese sentido, el término “afinidad” que se utiliza para caracterizar estos resultados tiene un significado puramente fenomenológico, no termodinámico, aplicable a condiciones de estado estacionario como las ocupadas para realizar el ensayo.

4.3 Unión de ligandos y fluorescencia.

Los experimentos de fluorescencia intrínseca que se realizaron permiten establecer que, de haber un sitio para AMP, éste presenta interacción con el sitio activo, concretamente con el sitio de unión para F6P. Sin embargo, estos experimentos se hicieron realizando varias suposiciones. Una de éstas es que hay solo un sitio para F6P, suposición que se justifica basada en evidencia evolutiva, estructural y cinética, no en

experimentos de unión. Para poder justificar esta suposición basándose en los mismos experimentos de fluorescencia, habría que realizar curvas de saturación a distintas concentraciones de proteína y extraer a partir de éstas la correspondiente isoterma de unión, como se muestra en Bujalowski & Jezewska 2014. Por otro lado, también se supuso que la concentración de ligando total es aproximadamente la misma que la de ligando libre. Esto se justifica en que la concentración de proteína está al menos dos órdenes de magnitud por debajo de las constantes aparentes de disociación que se obtuvieron.

Algo que se aprecia inmediatamente es que los resultados obtenidos mediante fluorescencia son cuantitativamente similares a los obtenidos en los estudios de cinética enzimática en es estado estacionario. El valor obtenido para la constante de afinidad para AMP es similar a los obtenidos para la constante de activación en la actividad PFK. Así mismo, el valor que se obtuvo para la constante de afinidad para F6P en ausencia de AMP es similar al valor obtenido para K_m^{F6P} en la concentración de AMP más baja utilizada. Sin embargo, la constante de acoplamiento ϕ de los experimentos de unión difiere del parámetro α obtenido en los experimentos cinéticos. Si bien la diferencia entre ambos es menor a un orden de magnitud, el que sean diferentes es un resultado esperable. Los experimentos de fluorescencia y los de cinética no son conmensurables, dado que los primeros están realizados en condición de equilibrio y los segundos en estado estacionario, por lo que bien podría haber sido el caso que los resultados de los experimentos de unión de ligandos hubiesen sido diferentes a los resultados cinéticos

en cuanto a las magnitudes de las constantes obtenidas. En los primeros, la proteína y sus dos ligandos (efector y un sustrato) se encuentran aislados, en cambio en los segundos están presentes los dos sustratos y está produciéndose la reacción química, lo que implica la existencia de varias formas de enzima, no solo las que se indican en el ciclo termodinámico de la **Figura 33A**.

4.4 Evolución

Uno de los resultados más novedosos de este trabajo es el hallazgo de que la activación por AMP es un rasgo ancestral que se correlaciona evolutivamente con la bifuncionalidad.

Sin embargo, si bien puede determinarse en qué linajes evolutivos se ha conservado este rasgo y en cuales se ha perdido, con los datos obtenidos no podemos afirmar cuales son los fundamentos estructurales y fisicoquímicos de esa conservación o pérdida. Por ejemplo, no sabemos si se ha conservado el mismo mecanismo cinético de activación que se determinó para MmPFK/GK en los ancestros reconstruidos que se estudiaron o en las proteínas actuales en que el rasgo está presente. Por otro lado, no sabemos si en los linajes filogenéticos en que se perdió la activación, fue por una disminución en la afinidad por AMP (cambio en el sitio alostérico), por cambios en el efecto que produce la unión de AMP en el sitio (en la red alostérica) o por ambos efectos a la vez. Para poder determinar los fundamentos fisicoquímicos de este proceso evolutivo sería necesario determinar el mecanismo de activación tanto para proteínas

actuales como para los ancestros reconstruidos.

Lo que es relevante funcionalmente en la activación por AMP y, por ende, es susceptible de ser seleccionado evolutivamente, es la presencia o ausencia del rasgo y el intervalo de concentraciones de AMP donde la activación ocurre. Como se vio en los estudios evolutivos, todas las proteínas se activan en intervalos de concentración de AMP similares (**Figura 37**, **Figura 38** y **Figura 39**). Sin embargo, esto podría estar determinado por diferentes mecanismos subyacentes. Vale decir, una proteína podría ser activada por AMP de la misma forma que MmPFK/GK, en cuanto al máximo de activación y al intervalo de concentraciones en donde ocurre, pero teniendo un mecanismo de activación diferente (por ejemplo, aumentando la catálisis en lugar de la afinidad por azúcar, o aumentando la afinidad por MgADP en lugar que la del azúcar, o compensando pérdidas en afinidad por AMP con aumentos en los efectos alostéricos, etc.).

Algo similar es lo que sucede con la termoestabilidad de las proteínas. En un nicho ecológico con una temperatura dada (que podría ir desde muy fría a muy cálida), lo que se selecciona evolutivamente es la capacidad de mantener el estado nativo por el tiempo suficiente para la realización de la función. Para esto es necesario que la proteína tenga una temperatura de desplegamiento (T_m) adecuada al ambiente donde realiza su función, lo que tiene como consecuencia evolutiva una correlación entre este parámetro y la temperatura del nicho ecológico donde la proteína realiza su función. Esto es especialmente notorio en proteínas que funcionan a altas temperaturas. Sin embargo,

T_m es determinada por los parámetros termodinámicos ΔH , ΔS y ΔC_p ; distintas combinaciones de valores de estos tres parámetros podrían dar como resultado el mismo valor de T_m . Existe evidencia que durante la evolución de la termoestabilidad de proteínas el mecanismo termodinámico que determina esta estabilización no se conserva (Hart et al. 2014). Esto sucede porque el parámetro relevante para que la proteína realice su función en una temperatura determinada es la T_m , por lo que cualquier combinación de ΔH , ΔS y ΔC_p que de como resultado una T_m adecuada podrá ser seleccionado. Esto tiene como resultado que no exista una correlación entre los valores de los parámetros termodinámicos y la temperatura del nicho ecológico donde la proteína realiza su función. A este proceso se le ha llamado “deriva termodinámica” (Hart et al. 2014).

En el caso de la regulación alostérica de proteínas, perfectamente podríamos estar frente a un caso de “deriva mecánica”, donde lo que se selecciona es la activación o inhibición independiente de cuales sean los mecanismos cinéticos y termodinámicos que la determinen ⁵. Sin embargo, para determinar si estamos o no frente a este caso,

⁵ Ontológicamente, a este tipo de propiedades macroscópicas que, en principio, pueden ser llevadas a cabo por muchos tipos de configuraciones macroscópicas o microscópicas, se les conoce como “múltiple realizadas”. Un ejemplo simple de esto es la fragilidad de un material, que puede ser realizada por varios tipos de configuraciones microscópicas moleculares diferentes (cristales, vidrios y cerámicas son frágiles, pero presentan distintas configuraciones moleculares que determinan la fragilidad). En la evolución es frecuente que los rasgos macroscópicos que son seleccionados sean múltiple realizados, pudiendo estar determinados por muchas configuraciones fisiológicas o bioquímicas diferentes. En nuestro caso, la propiedad de una enzima de ser activada por AMP podría ser, en principio, múltiple realizada por varios mecanismos cinéticos de activación posibles, sin embargo, es algo que hay que estudiar en forma empírica.

es necesario caracterizar el mecanismo cinético de activación o inhibición que está presente en otras proteínas actuales de la misma familia, además de en los ancestros reconstruidos.

Como se mostró en los resultados, la activación por AMP en las proteínas de esta familia se correlaciona evolutivamente con la bifuncionalidad. Cabe preguntarse si ambos rasgos fueron seleccionados juntos por una correlación estructural o fisicoquímica, o si fue debido a algún otro motivo. Un aspecto importante es que las proteínas bifuncionales y específicas que fueron analizadas en este trabajo pertenecen a organismos cuyos metabolismos difieren enormemente. Las proteínas específicas, tanto PFKs como GKs, forman parte de los *Thermococcales*, que son organismos heterótrofos. Mientras que las proteínas bifuncionales que se estudiaron se encuentran en los *Methanococcales* y *Methanosarcinales*, que son organismos autótrofos metanogénicos cuyos metabolismos se asemejan en varios aspectos (Castro-Fernandez et al. 2017). Es por esto, que lo más probable es que ambos rasgos, bifuncionalidad y activación por AMP, hayan sido seleccionados juntos debido al tipo de metabolismo donde estas enzimas participan. Consistente con esto, es que la mutante E72A del ancestro ancMT, que recapitularía el proceso evolutivo en el que se perdió la bifuncionalidad para dar origen a la especificidad por F6P, es activada por AMP. Esto puede considerarse como evidencia de la existencia de un sitio independiente para AMP y de que la asociación evolutiva entre ambas propiedades (bifuncionalidad y activación por AMP) no responde a factores estructurales o fisicoquímicos comunes a ambos

rasgos. Por lo tanto, a partir de esta evidencia, puede hipotetizarse que sería el contexto metabólico el que determina que la activación por AMP se haya conservado, no la bifuncionalidad. Por lo tanto, si en un organismo metanogénico con metabolismo similar a *M. maripaludis* la enzima que lleva a cabo alguna de estas actividades fuese específica (GK o PFK), se esperaría que la activación por AMP esté igualmente presente.

Hasta ahora se ha hablado laxamente acerca de que “las proteínas evolucionan”. Esto no es del todo correcto, pues la evolución se produce en poblaciones de organismos. Una clarificación conceptual al respecto ayudará a ordenar varias ideas acerca de los procesos evolutivos a nivel molecular y evitar malentendidos que pudiesen producirse. Tomaremos como ejemplo nuestro caso de la activación por AMP. Para esto hay que distinguir cuatro participantes diferentes de un proceso evolutivo: el replicador, el interactor, el manifestador de adaptación y el beneficiario de la selección (Lloyd 2000; Lloyd 2007). El replicador es la unidad biológica que es copiada y transmitida de generación en generación. En un caso biológico se trataría de un gen o grupo de genes (aunque algunos autores postulan que es el genoma completo, o una unidad más pequeña que involucra varios genes, pero esa discusión excede los objetivos de esta tesis). En nuestro caso, el replicador es el gen que codifica para MmPFK/GK. El interactor son los aspectos del fenotipo que interaccionan con el ambiente, vale decir, lo que es seleccionado. El replicador puede sufrir cambios (mutaciones) que pueden generar, a su vez, cambios en el interactor. Éstos últimos, a su vez, pueden contribuir a la adaptación diferencial del organismo y a la posibilidad de ser seleccionado (o no) evolutivamente.

En nuestro caso, MmPFK/GK es una parte del interactador de *M. maripaludis* y sus propiedades (bifuncionalidad, activación por AMP, etc.) contribuyeron que el organismo se haya adaptado al ambiente, habiendo sido seleccionado evolutivamente. El manifestador de la adaptación corresponde a la propiedad específica del interactador que ha permitido al organismo adaptarse y, por lo tanto, ha determinado que haya sido seleccionado en un proceso evolutivo, lo que tiene como consecuencia que esta propiedad quede fijada en el linaje del organismo. En nuestro caso, se puede inferir que la activación por AMP pudo haber sido un manifestador de adaptación en los organismos metanogénicos, pese a que no se conozca bien su función metabólica. Finalmente, el beneficiario de la selección es la estructura que se conserva en el proceso evolutivo. En nuestro caso, ésta corresponde a la secuencia del gen que codifica la enzima con la propiedad de ser activada por AMP (aunque algunos autores dirían que es el beneficiario es un linaje completo de genes).

Por lo tanto, decir que una proteína evolucionó puede ser interpretado como un resumen de un proceso más complejo, en el que hubo un cambio en un gen (replicador) que produjo una proteína con una propiedad específica (manifestador de la adaptación) que determinó que el organismo al que pertenece (interactor) se haya adaptado a un ambiente y que, por lo tanto, haya sido seleccionado evolutivamente, por lo que dicha propiedad quedó fijada en el linaje de este organismo gracias a la conservación de una secuencia génica específica (beneficiario de la selección). Por supuesto que el análisis en términos de los cuatro aspectos mencionados dependerá del proceso evolutivo que se

considere y del nivel de descripción que se esté utilizando. En cada nivel las entidades que ocupen el rol de interactor, manifestador de adaptación y beneficiario serán distintas, sin embargo, entrar en detalles al respecto excede los objetivos de esta tesis y exigiría un estudio filosófico en profundidad acerca de la evolución de proteínas.

4.5 Relevancia metabólica

Al principio de esta tesis se dijo que el hallazgo de la activación por AMP representa un desafío a la hora de entender el metabolismo de los organismos metanogénicos. Éste es un fenómeno que aún está siendo estudiado (Deppenmeier & Müller 2008; Costa & Leigh 2014; Welte & Deppenmeier 2014; Castro-Fernandez et al. 2017; Enzmann et al. 2018; Wagner et al. 2019) y, a la fecha, no hay un panorama general que permita situar funcionalmente la activación por AMP de estas enzimas en un esquema mecanístico concreto.

Como se dijo en la introducción, la gran mayoría de enzimas que participan en la glicólisis de *Archaea* han sido descritas en la literatura como no reguladas. Sin embargo, poco a poco se ha visto que esto se debe principalmente a una falta de estudios rigurosos enfocados en el tema, más que a una ausencia de este proceso. Por eso no es de extrañarse que, a medida que se vayan haciendo estudios detallados del tema se encuentren nuevos efectores alostéricos, con lo que habrá más información que permitirá tener una imagen más completa acerca de la regulación alostérica en el metabolismo de *Archaea*.

Por ejemplo, recientemente se publicó un estudio evolutivo acerca de la regulación alostérica en las piruvatoquinasas (PK) de *Archaea* (Johnsen et al. 2019), donde se observó que las variantes de estas enzimas presentes en *Crenarchaeota* son activadas por 3-fosfoglicerato (algo que ya era conocido para *Pyrobaculum aerophilum* (Solomons et al. 2013)). Interesantemente, en este trabajo se encontró que varias PKs de *Euryarchaeota* son activadas por AMP. Tanto las PK de *Thermococcales* como las de *Methanosarcinales* y de *Methanococcales* descienden de un ancestro común que poseía este rasgo⁶. Sin embargo, ésta se perdió en las PK de *Methanosarcinales* y en las de *Thermococcales*, conservándose en algunas de *Methanococcales* (concretamente en las de la subdivisión de los *Methanocaldococcales*), pero estando ausente en la PK de *M. maripaludis*, de la que los autores concluyen que es no regulada. Una posibilidad que surge de esta situación es que la activación por AMP forme parte de un mecanismo de activación de la glicólisis en *Methanococcales*, y que éste haya cambiado de posición en la ruta metabólica, dejando de estar presente en la PK, pero apareciendo en la PFK en este linaje de *Archaea*, sin embargo, esta es una hipótesis que debe ponerse a prueba.

Por otro lado, se ha reportado que la FBPasa de *Methanosarcina acetivorans* es inhibida por AMP (Santiago-Martínez 2019). Sin embargo, no hay información suficiente como para determinar si se trata de un rasgo conservado en las FBPasa de

⁶ Es importante destacar que en este trabajo la determinación de que la activación por AMP es ancestral y el linaje donde ésta aparece se hace solo mediante inferencia filogenética, sin utilizar la técnica de reconstrucción de ancestros que se ha usado en este trabajo.

Methanosarcinales o si también está presente en enzimas homólogas de otros lineajes de *Archaea*, como los *Methanococcales*. Sin embargo, si es que fuese el caso que FBPasa de *M. maripaludis* sea inhibida por AMP, entonces estaríamos ante la existencia de un mecanismo de regulación metabólica en el que AMP participa en la inhibición de la gluconeogénesis y en la activación de la glicólisis. Sin embargo, cabe preguntarse por qué un metabolito que se produce en la glicólisis de *Archaea* sería además un activador de esta ruta. Por otro lado, en esta tesis también se mostró que el fosfato, un producto de la gluconeogénesis, inhibe a MmPFK/GK, por lo que cabe preguntarse algo similar respecto a la función de esta molécula en la regulación del metabolismo de azúcares. Para poder responder a estas preguntas hace falta adquirir más información acerca del metabolismo de *Archaea*, de su evolución y de las propiedades que participan en él.

Una posibilidad del rol de AMP en el metabolismo de *Archaea* es que sea un señalizador del estado nutricional del organismo. Vale decir, un sensor de carga energética, como habría sido definido por Atkinson (Atkinson & Walton 1967) en bacterias y Eucarya. En ese sentido, un aumento en la concentración de AMP intracelular implicaría una carga energética baja, lo que llevaría a la célula a cambiar su estado metabólico para poder aumentarla mediante la inhibición y activación de rutas metabólicas específicas. Los *Methanococcales* producen ATP a través de la metanogénesis (Castro-Fernandez et al. 2017; Wagner et al. 2019). En condiciones de carencia de nutrientes la metanogénesis dejaría de producirse, con una consecuente baja de ATP intracelular y un concomitante aumento de ADP y AMP. En estas condiciones

es necesario activar la glicólisis para poder generar ATP e intermediarios para la metanogénesis y otros procesos. Según hemos visto en este trabajo de tesis, podemos sugerir que en este proceso la enzima MmPFK/GK jugaría un rol fundamental al ser activada por AMP. Si, además de esto la FBPasa de *Methanococcales* se inhibiera por AMP al igual que se ha reportado en *M. acetivorans*, entonces estaríamos frente a un mecanismo de regulación del metabolismo en el cual AMP determinaría el cambio de un metabolismo gluconeogénico a uno glicolítico. Esto abre muchas posibles líneas de investigación para la búsqueda de otros mecanismos en la realización de este cambio de metabolismo, así como del efecto de AMP en otras enzimas de la glicólisis y la gluconeogénesis, además de la búsqueda de otros reguladores que participen en este proceso.

5 Apéndice: Ecuaciones generales

Durante la exposición de este trabajo de tesis se utilizaron diversas ecuaciones, tanto para estimar parámetros como para describir comportamientos de curvas. Algunas de éstas no se encontraban explícitamente en el texto, por ejemplo, cuando en varias curvas se ajustó una “hipérbola que interseca el eje Y con asíntota distinta de cero”. Por otro lado, muchas de las ecuaciones que se utilizaron en este trabajo son formalmente equivalentes. En esta sección se presentarán en forma general y formal la mayoría las funciones utilizadas. Esta lista incluye a todas las que se mencionaron sin ser explicitadas, además se indicará a cuáles de las ecuaciones que sí fueron explicitadas son formalmente equivalentes.

A) Hipérbola decreciente que tiende a cero: Esta función definida por dos parámetros corresponde al cociente entre una constante y un polinomio de grado 1.

$$Y = \frac{AB}{B + X}$$

Esta función interseca el eje Y en el valor del parámetro A, es monótonamente decreciente y tiene asíntota horizontal en cero. El parámetro B corresponde al valor que toma X cuando $Y = A/2$, lo que usualmente se llama $K_{0,5}$.

Una instancia de esta función es la ecuación 4.

B) Hipérbola rectangular o hipérbola Michaeliana: Esta función definida por dos parámetros consiste en un cociente de polinomios de grado 1 en el que el nominador no contiene un término libre.

$$Y = \frac{AX}{B + X}$$

Esta función interseca el origen, es monótonamente creciente y tiene una asíntota horizontal correspondiente al valor del parámetro A. El parámetro B

corresponde a la $K_{0,5}$. La ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 2) es un caso de esta ecuación, donde $A = V_m$ y $B = K_m$.

Ecuaciones formalmente equivalentes a ésta que se usaron en este trabajo de tesis son, además de la ecuación 2, la V_m y K_m de la ecuación 8A en función de su cosustrato, la V_m , de la ecuación 9A en función de cosustrato y la ecuación 22.

C) Hipérbola que interseca el eje Y en un punto distinto de cero: Esta función definida por tres parámetros consiste en un cociente de polinomios de grado 1. A diferencia de la anterior, el término libre del numerador no es igual a cero.

$$Y = \frac{AX + BC}{B + X}$$

Esta función interseca al eje Y en el valor del parámetro C y tiene una asíntota horizontal con el valor del parámetro A . El parámetro B corresponde al valor que toma X donde $Y = (A+C)/2$.

Si $A > C$, esta función será monótonamente creciente. Si $A < C$, será monótonamente decreciente. Si $A = C$, será una función constante.

Un ejemplo de ecuación formalmente equivalente a esta función es el comportamiento de la K_m para un sustrato en función del cosustrato en un modelo secuencial-ordenado (K_m de la ecuación 9A).

Las otras ecuaciones que son instancias de esta función son la ecuación 5, ecuación 16, ecuación 19 y ecuación 23. También son instancias de esta función las ecuaciones para V_m^{app} y K_m^{app} que se muestran en la **Figura 25**.

D) Función tipo inhibición por sustrato: Esta función definida por tres parámetros corresponde al cociente entre un polinomio de grado 1 y un polinomio de grado 2, donde el término libre del numerador es igual a cero.

$$Y = \frac{AX}{B + X + CX^2}$$

Esta función interseca el origen y tiene asíntota horizontal en cero. Hay un intervalo a partir de cero en que es creciente para después transformarse en

decreciente luego de haber alcanzado un máximo. El parámetro A corresponde al valor que tendría la asíntota horizontal si C fuese igual a cero. En ese caso, B tendría el valor de la $K_{0,5}$.

Un ejemplo de ecuación formalmente equivalente a esta función es la ecuación de inhibición por sustrato (ecuación 3), donde $A = V_m$, $B = K_m$ y $C = 1/K_i$.

Las otras ecuaciones que son instancias de esta función son V_m^{MgADP} y K_m^{MgADP} en función de [glucosa] de la ecuación 12B y V_m^{MgADP} en función de [glucosa] de la ecuación 13B.

E) Función tipo “Activación-inhibición”: Esta función definida por 4 parámetros corresponde al cociente entre un polinomio de grado 1 y un polinomio de grado 2, donde el término libre del numerador no es cero.

$$Y = \frac{AX + BD}{B + X + CX^2}$$

Esta función interseca el eje Y en el valor del parámetro D y tiene asíntota en cero. Dependiendo de los valores de los parámetros podrá tomar varios comportamientos, como tener un máximo y comenzar a decrecer luego de una fase creciente, o ser monótonamente decreciente tomando una forma sigmoide.

El parámetro B representa el valor que tendría la $K_{0,5}$ de una hipérbola que interseca el eje Y si es que C fuese cero; en ese caso, A sería la asíntota horizontal.

Las ecuaciones 6 y 17 son instancias de esta función.

Finalmente, K_m^{MgADP} en función de [glucosa] de la ecuación 11B corresponde a un cociente de un polinomio de grado 2 con uno de grado 1 y K_m^{MgADP} en función de [glucosa] de la ecuación 13B corresponde al cociente de dos polinomios de grado 2.

6 Bibliografía

- Abarca-Lagunas MJ, Rivas-Pardo JA, Ramírez-Sarmiento CA & 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(21):3271-6.
- Ahmed H, Tjaden B, Hensel R & Siebers B (2004) "Embden-Meyerhof-Parnas and Entner-Doudoroff Pathways in *Thermoproteus Tenax*: Metabolic Parallelism or Specific Adaptation?" Biochem. Soc. Trans. 32(Pt 2): 303-4.
- Asúa M; Delfino JM, González-Flecha L, Kaufman SB, Rossi JP & Rossi R (2006) *La Investigación En Ciencias Experimentales: Una Aproximación Práctica*. EUDEBA, Buenos Aires, Argentina.
- Atkinson DE & Walton GM (1967) "Adenosine Triphosphate Conservation in Metabolic Regulation. Rat Liver Citrate Cleavage Enzyme." J. Biol. Chem. 242(13):3239-41.
- Atomi H & Reeve J (2019) "Microbe Profile: *Thermococcus Kodakarensis*: The Modehyperthermophilic Archaeon." Microbiology 165(11):1166-1168.
- Babul J (1978) "Phosphofructokinases from *Escherichia Coli*. Purification and Characterization of the Nonallosteric Isozyme." J. Biol. Chem. 253(12):4350-5.
- Baez M, Cabrera R, Pereira HM, Blanco A, Villalobos P, Ramírez-Sarmiento CA, Caniuguir A, Guixé V, Garratt RC & Babul J (2013) "A Ribokinase Family Conserved Monovalent Cation Binding Site Enhances the MgATP-Induced Inhibition in *E. Coli* Phosphofructokinase-2." Biophys. J. 105(1):185-93.
- Baptiste E, Moreira D & Philippe H (2003) "Rampant Horizontal Gene Transfer and Phospho-Donor Change in the Evolution of the Phosphofructokinase." Gene. 318:185-91.
- Baruah H, Puthenveetil S, Choi YA, Shah S & Ting AY (2008) "An Engineered Aryl Azide Ligase for Site-Specific Mapping of Protein-Protein Interactions through Photo-Cross-Linking." Angew Chem Int Ed Engl. 47(37):7018-21.
- Bork P, Sander C & Valencia A (1993) "Convergent Evolution of Similar Enzymatic Function on Different Protein Folds: The Hexokinase, Ribokinase & Galactokinase Families of Sugar Kinases." Protein Sci. 2, 31-40.
- Bräsen C, Esser D, Rauch B & Siebers B (2014) "Carbohydrate Metabolism in *Archaea*: Current Insights into Unusual Enzymes and Pathways and Their Regulation." MMBR 78(1): 89-175.
- Brunner NA, Brinkmann H, Siebers B & Hensel R (1998) "NAD⁺-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Thermoproteus Tenax*. The First Identified *Archaeal* Member of the Aldehyde Dehydrogenase Superfamily Is a Glycolytic Enzyme with Unusual Regulatory Properties." J. Biol. Chem. 273(11):6149-56.

- Bujalowski W & Jezewska MJ (2014) "Quantitative Thermodynamic Analyses of Spectroscopic Titration Curves." *J. Mol. Struct.* 1077:40-50.
- Cabrera R, Ambrosio AL, Garratt RC, Guixé V & Babul J. (2008) "Crystallographic Structure of Phosphofructokinase-2 from *Escherichia Coli* in Complex with Two ATP Molecules. Implications for Substrate Inhibition." *J. Mol. Biol.* 383(3):588-602.
- Cabrera R, Baez M, Pereira HM, Caniuguir A, Garratt RC & Babul J (2011) "The Crystal Complex of Phosphofructokinase-2 of *Escherichia Coli* with Fructose-6-Phosphate: Kinetic and Structural Analysis of the Allosteric Atp Inhibition." *J. Biol. Chem.* 286(7):5774-83.
- Cárdenas ML, Cornish-Bowden A & Ureta T (1998) "Evolution and Regulatory Role of the Hexokinases." *Biochim. Biophys. Acta.* 1401(3):242-64.
- Castro-Fernandez V (2015) "Resurrección de Enzimas Ancestrales: Historia Evolutiva de La Especificidad Por Sustratos En La Superfamilia Riboquinasa." Tesis de Doctorado, Universidad de Chile. Chile.
- Castro-Fernandez V, Zamora R, Herrera-Morande A, Vallejos G, Gonzalez-Ordenes F & Guixé V (2017) "Evolution, Metabolism and Molecular Mechanisms Underlying Extreme Adaptation of Euryarchaeota and Its Biotechnological Potential." en Sghaier H, *Archaea - New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications.* IntechOpen. UK.
- Castro-Fernandez V, Herrera-Morande A, Zamora R, Merino F, Gonzalez-Ordenes F, Padilla-Salinas F, Pereira HM, Brandão-Neto J, Garratt RC & Guixé V. (2017) "Reconstructed Ancestral Enzymes Reveal That Negative Selection Drove the Evolution of Substrate Specificity in ADP-Dependent Kinases." *J. Biol. Chem.* 292(38):15598-15610.
- Castro-Fernandez V, Bravo-Moraga F, Herrera-Morande A & Guixé V (2014) "Bifunctional ADP-Dependent Phosphofructokinase/Glucokinase Activity in the Order Methanococcales - Biochemical Characterization of the Mesophilic Enzyme from *Methanococcus Maripaludis*." *FEBS Journal.* 281(8):2017-29.
- Changeux JP (2013) "50 Years of Allosteric Interactions: The Twists and Turns of the Models." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(12):819-29.
- Cornish-Bowden, A. (2013) *Fundamentals of Enzyme Kinetics* 4th edition. Wiley-Blackwell. USA.
- Costa KC & Leigh JA (2014) "Metabolic Versatility in Methanogens." *Curr Opin Biotechnol* 29(1):70-75.
- Currie M a, Merino F, Skarina T, Wong AHY, Singer A, Brown G, Savchenko A, Caniuguir A, Guixé V, Yakunin AF & Jia Z (2009) "ADP-Dependent 6-Phosphofructokinase from *Pyrococcus Horikoshii* OT3. Structure Determination and Biochemical Characterization of PH1645." *J. Biol. Chem.* 284, 22664–71.
- Deppenmeier U & Müller V (2008) "Life Close to the Thermodynamic Limit: How Methanogenic *Archaea* Conserve Energy." *Results Probl. Cell Differ.* 45:123-52.

- Enzmann F, Mayer F, Rother M & Holtmann D (2018) "Methanogens: Biochemical Background and Biotechnological Applications." *AMB Express*. 8(1):1
- Gonzalez-Ordenes F, Cea PA, Fuentes-Ugarte N, Muñoz SM, Zamora RA, Leonardo D, Garratt RC, Castro-Fernandez V & Guixé V (2018) "ADP-Dependent Kinases from the *Archaeal* Order *Methanosarcinales* Adapt to Salt by a Non-Canonical Evolutionarily Conserved Strategy." *Front. Microbiol* 9: 1305.
- Goyal N, Zhou Z & Karimi IA (2016) "Metabolic Processes of *Methanococcus Maripaludis* and Potential Applications." *Microb Cell Fact*. 15(1):107
- Grüber G, Manimekalai MS, Mayer F & Müller V (2014) "ATP Synthases from *Archaea*: The Beauty of a Molecular Motor." *Biochim. Biophys. Acta*. 1837(6):940-52.
- Guixé V & Babul J (1985) "Effect of ATP on Phosphofructokinase-2 from *Escherichia Coli*. A Mutant Enzyme Altered in the Allosteric Site for MgATP²⁻." *J. Biol. Chem*. 260(20):11001-5.
- Guixé V & Merino F (2009) "The ADP-dependent sugar kinase family: kinetic and evolutionary aspects". *IUBMB Life* 61, 753–61.
- Guixé V, Rodríguez PH & Babul J (1998) "Ligand-Induced Conformational Transitions in *Escherichia Coli* Phosphofructokinase 2: Evidence for an Allosteric Site for MgATP²⁻." *Biochemistry*. 37(38):13269-75.
- Hart KM, Harms MJ, Schmidt BH, Elya C, Thornton JW & Marqusee S (2014) "Thermodynamic System Drift in Protein Evolution." *PLoS Biology*. 12(11): e1001994.
- Hendrickson EL, Kaul R, Zhou Y, Bovee D, Chapman P, Chung J, et al (2004) "Complete Genome Sequence of the Genetically Tractable Hydrogenotrophic Methanogen *Methanococcus Maripaludis*." *J. Bacteriol.* 186(20):6956-6969.
- Herrera-Morande A (2015) "Estudios Funcionales y Estructurales En Quinasas Dependientes de ADP Relacionadas Con El Metabolismo de Glucosa En *Archaea*." Tesis de Doctorado, Universitat de Barcelona, España.
- Herrera-Morande A, Castro-Fernández V, Merino F, Ramírez-Sarmiento CA, Fernández FJ, Vega MC & Guixé V (2018) "Protein Topology Determines Substrate-Binding Mechanism in Homologous Enzymes." *Biochim. Biophys. Acta. Gen Subj*. 1862(12):2869-2878.
- Hers HG, Hue L & van Schaftingen E (1982) "Fructose 2,6-Bisphosphate." *Biochem J*. 206(1): 1–12
- Johnsen U, Reinhardt A, Landan G, Tria FDK, Turner JM, Davies C & Schönheit P (2019) "New Views on an Old Enzyme: Allosteric Regulation and Evolution of *Archaeal* Pyruvate Kinases." *FEBS Journal*. 286(13): 2471-24.89
- Kawai S, Mukai T, Mori S, Mikami B & Murata K (2005) "Hypothesis: Structures, Evolution & Ancestor of Glucose Kinases in the Hexokinase Family." *J. Biosci. Bioeng*. 99(4): 320–30.
- Kemp RG & Gunasekera D (2002) "Evolution of the Allosteric Ligand Sites of Mammalian Phosphofructo-1-Kinase." *Biochemistry*. 41(30):9426-30.

- Kemp RG & Krebs EG (1967) "Binding of Metabolites by Phosphofructokinase." *Biochemistry*. 6(2):423-34.
- Kengen SW, De Bok FA, Van Loo ND, Dijkema C, Stams AJ & De Vos WM (1994) "Evidence for the Operation of a Novel Embden-Meyerhof Pathway That Involves ADP-Dependent Kinases during Sugar Fermentation by *Pyrococcus Furiosus*." *Biol. Chem.* **269**, 17537–17541.
- Kern M (2016) "Estudios de La Flexibilidad de La ADP-PFK/GK de *Methanococoides Burtonii* Como Mecanismo de Adaptación al Frio En La Superfamilia de Las Riboquinasas." Tesis de Pregrado, Universidad de Chile. Chile.
- Khatibi PA, Chou CJ, Loder AJ, Zurawski JV, Adams MWW & Kelly RM. (2017) "Impact of Growth Mode, Phase & Rate on the Metabolic State of the Extremely Thermophilic Archaeon *Pyrococcus Furiosus*." *Biotechnol. Bioeng.* 114(12):2947-2954.
- Lee HS, Shockley KR, Schut GJ, Conners SB, Montero CI, Johnson MR, Chou CJ, Bridger SL, Wigner N, Brehm SD, Jenney FE Jr, Comfort DA, Kelly RM & Adams MW (2006) "Transcriptional and Biochemical Analysis of Starch Metabolism in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Furiosus*." *J. Bacteriol.* 188(6):2115-25.
- Li Y, Rivera D, Ru W, Gunasekera D & Kemp RG (1999) "Identification of Allosteric Sites in Rabbit Phosphofructo-1-Kinase." *Biochemistry*. 38(49):16407-12.
- Lloyd EA (2000) "Units and Levels of Selection: An Anatomy of the Units of Selection Debates." en Singh RS, Krimbas CB, Paul DB & Beatty J, *Thinking About Evolution (Historical, Philosophical, and Political Perspectives, vol. 2)*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Lloyd EA (2007) "Units and Levels of Selection." en Hull DL, *The Cambridge Companion to the Philosophy of Biology*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- McNae IW, Martinez-Oyanedel J, Keillor JW, Michels PA, Fothergill-Gilmore LA & Walkinshaw MD. (2009) "The Crystal Structure of ATP-Bound Phosphofructokinase from *Trypanosoma Brucei* Reveals Conformational Transitions Different from Those of Other Phosphofructokinases." *J. Mol. Biol.* 385(5):1519-33.
- Merino F, Rivas-Pardo JA, Caniuguir A, García I & Guixé V (2012) "Catalytic and regulatory roles of divalent metal cations on the phosphoryl-transfer mechanism of ADP-dependent sugar kinases from hyperthermophilic *Archaea*." *Biochimie* 94, 516–524.
- Murale DP, Hong SC, Haque MM & Lee JS (2017) "Photo-Affinity Labeling (PAL) in Chemical Proteomics: A Handy Tool to Investigate Protein-Protein Interactions (PPIs)." *Proteome Sci.* 15:14.
- Poorman RA, Randolph A, Kemp RG & Henrikson RL (1984) "Evolution of Phosphofructokinase - Gene Duplication and Creation of New Effector Sites." *Nature*. 309(5967):467-9.
- Purich DL (2010) *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control. A Reference of Theory and Best-Practice Methods*. Academic Press, Elsevier. London, UK

- Qian Z, Zhao J, Bai X, Tong W, Chen Z, Wei H, Wang Q & Liu S. (2013) "Thermal Stability of Glucokinases in *Thermoanaerobacter tengcongensis*." Biomed Res Int. 2013: 646539.
- Quiroga-Roger D, Babul J & Guixé V (2015) "Role of Monovalent and Divalent Metal Cations in Human Ribokinase Catalysis and Regulation." BioMetals. 28(2):401-13.
- Richter JP, Goroncy AK, Ronimus RS & Sutherland-Smith AJ (2016) "The Structural and Functional Characterization of Mammalian ADP-Dependent Glucokinase." J. Biol. Chem. 291(8):3694-704.
- Richter S, Richter JP, Mehta SY, Gribble AM, Sutherland-Smith AJ, Stowell KM, Print CG, Ronimus RS & Wilson WR (2012) "Expression and Role in Glycolysis of Human ADP-Dependent Glucokinase." Mol. Cell. Biochem. 364, 131–145.
- Rivas-Pardo JA, Caniuguir A, Wilson CA, Babul J & Guixé V (2011) "Divalent Metal Cation Requirements of Phosphofructokinase-2 from *E. Coli*. Evidence for a High Affinity Binding Site for Mn²⁺." Arch. Biochem. Biophys. 505(1):60-6.
- Rivas-Pardo JA, Herrera-Morande A, Castro-Fernandez V, Fernandez FJ, Vega MC & Guixé V (2013) "Crystal Structure, SAXS and Kinetic Mechanism of Hyperthermophilic ADP-Dependent Glucokinase from *Thermococcus Litoralis* Reveal a Conserved Mechanism for Catalysis." PLoS ONE. 8(6): e66687.
- Romero-Rodríguez A, Ruiz-Villafán B, Rocha-Mendoza D, Manzo-Ruiz M & Sánchez S (2015) "Biochemistry and Regulatory Functions of Bacterial Glucose Kinases." Arch. Biochem. Biophys. 577-578:1-10.
- Ronimus RS, Koning J & Morgan HW (1999) "Purification and Characterization of an ADP-Dependent Phosphofructokinase from *Thermococcus Zilligii*." Extremophiles. 3(2):121-9
- Ronimus RS & Morgan HW (2004) "Cloning and Biochemical Characterization of a Novel Mouse ADP-Dependent Glucokinase." Biochem. Biophys. Res. Commun. 315, 652–658.
- Sakuraba H, Yoshioka I, Koga S, Takahashi M, Kitahama Y, Satomura T, Kawakami R & Ohshima T (2002) "ADP-Dependent Glucokinase/Phosphofructokinase, a Novel Bifunctional Enzyme from the Hyperthermophilic Archaeon *Methanococcus Jannaschii*." J. Biol. Chem. 277, 12495–12498.
- Santiago-Martínez MG, Encalada R, Lira-Silva E, Pineda E, Gallardo-Pérez JC, Reyes-García MA, Saavedra E, Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A & Jasso-Chávez R (2016) "The Nutritional Status of *Methanosarcina Acetivorans* Regulates Glycogen Metabolism and Gluconeogenesis and Glycolysis Fluxes." FEBS Journal. 283(10):1979-99.
- Santiago-Martínez MG, Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, Yoval-Sánchez B, Feregrino-Mondragón RD, Rodríguez-Zavala JS, Pardo JP, Moreno-Sánchez R & Jasso-Chávez R (2019) "FruBPase II and ADP-PFK1 Are Involved in the Modulation of Carbon Flow in the Metabolism of Carbohydrates in *Methanosarcina Acetivorans*." Arch. Biochem. Biophys. 669:39-49.
- Schut GJ, Brehm SD, Datta S & Adams MWW (2003) "Whole-Genome DNA Microarray Analysis of a Hyperthermophile and an Archaeon: *Pyrococcus Furiosus* Grown on Carbohydrates or Peptides." J. Bacteriol. 185(13):3935-47.

- Schut GJ, Bridger SL & Adams MWW (2007) "Insights into the Metabolism of Elemental Sulfur by the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Furiosus*: Characterization of a Coenzyme A-Dependent NAD(P)H Sulfur Oxidoreductase." *J. Bacteriol.* 189(12):4431-41.
- Sebastian S, Wilson JE, Mulichak A & Garavito RM (1999) "Allosteric Regulation of Type I Hexokinase: A Site-Directed Mutational Study Indicating Location of the Functional Glucose 6-Phosphate Binding Site in the N-Terminal Half of the Enzyme." *Arch. Biochem. Biophys.* 362(2):203-10.
- Selkov E, Maltsev N, Olsen GJ, Overbeek R & Whitman WB (1997) "A Reconstruction of the Metabolism of *Methanococcus Jannaschii* from Sequence Data." *Gene.* 197(1-2): GC11-26.
- Sigrell JA, Cameron AD & Mowbray SL (1999) "Induced Fit on Sugar Binding Activates Ribokinase." *J. Mol. Biol.* 290(5):1009-18.
- Smith RM, Martell AE & Chen Y (1991) "Critical Evaluation of stability constants for nucleotide complexes with protons and metal ions and the Accompanying Enthalpy Change." *Pure and Applied Chemistry* 63(7): 1015-1080.
- Solomons J, Graham T, Johnsen U, Schönheit P & Davies C (2013) "3-Phosphoglycerate Is an Allosteric Activator of Pyruvate Kinase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrobaculum Aerophilum*." *Biochemistry.* 52(34):5865-75.
- Thauer RK (2012) "The Wolfe Cycle Comes Full Circle." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(38):15084-5
- Tokarz P, Wiśniewska M, Kamiński MM, Dubin G & Grudnik P (2018) "Crystal Structure of ADP-Dependent Glucokinase from *Methanocaldococcus Jannaschii* in Complex with 5-Iodotubercidin Reveals Phosphoryl Transfer Mechanism." *Protein Sci.* 27(3):790-797.
- Traut T (2008) *Allosteric Regulatory Enzymes Allosteric Regulatory Enzymes*. Springer. Switzerland.
- Tribolet R & Sigel H (1987) "Self-association and Protonation of Adenosine 5'-monophosphate in Comparison with Its 2'- and 3'-analogues and Tubercidin 5'-monophosphate (7-deaza-AMP)." *Eur. J. Biochem.* 163(2):353-63.
- Tuininga JE, Verhees CH, van der Oost J, Kengen SW, Stams a J & de Vos WM (1999) "Molecular and Biochemical Characterization of the ADP-Dependent Phosphofructokinase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Furiosus*." *J. Biol. Chem.* 274, 21023–21028.
- VanFossen AL, Lewis DL, Nichols JD & Kelly RM (2008) "Polysaccharide Degradation and Synthesis by Extremely Thermophilic Anaerobes." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125:322-37.
- Villalobos P, Soto F, Baez M & Babul J (2016) "Regulatory Network of the Allosteric ATP Inhibition of *E. Coli* Phosphofructokinase-2 Studied by Hybrid Dimers." *Biochimie.* 128-129: 209-16.
- Voet D & Voet J (2011) *Biochemistry*, 4th Edition. Wiley. USA.
- Wagner T, Watanabe T & Shima S (2019) "Hydrogenotrophic Methanogenesis." *Biogenesis of Hydrocarbons*, 1-29.

- Wang P, Izatt I, Oscarson JL & Gillespie SE (1996) "H NMR Study of Protonation and Mg(II) Coordination of AMP, ADP & ATP at 25, 50 & 70 °C." J. Phys. Chem. 100(22) 9556-9560.
- Welte C & Deppenmeier U (2014) "Bioenergetics and Anaerobic Respiratory Chains of Aceticlastic Methanogens." Biochim. Biophys. Acta. 1837(7):1130-47.
- Yamaoka K, Nakagawa T & Uno T (1978) "Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the Evaluation of Linear Pharmacokinetic Equations." J. Pharmacokinet. Biopharm. 6(2):165-75
- Yu JP, Ladapo J & Whitman WB (1994) "Pathway of Glycogen Metabolism in *Methanococcus Maripaludis*." J. Bacteriol. 176(2):325-32.
- Zamora RA, Gonzalez-Órdenes F, Castro-Fernández V & Guixé V (2017) "ADP-Dependent Phosphofructokinases from the *Archaeal* Order *Methanosarcinales* Display Redundant Glucokinase Activity." Arch. Biochem. Biophys. 633:85-92.