

UCH-FC  
B. Ambiental  
M562  
C.1



**“ADAPTACIONES DE ARQUEAS HIPERTERMÓFILAS  
A AMBIENTES DE ALTAS TEMPERATURAS:  
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD TÉRMICA Y  
MECANISMO CINÉTICO EN QUINASAS  
DEPENDIENTES DE ADP”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en  
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título  
de Biólogo Ambiental.**

*FELIPE IGNACIO MERINO LEÓN*

Dr. Jorge Babul Cattán  
**Director Seminario de Título**

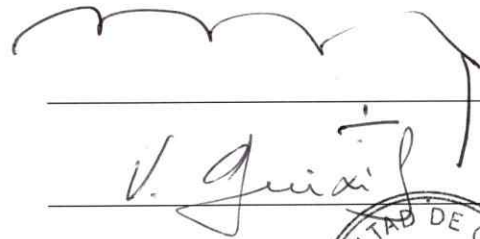
Dr. Victoria Guixé Leguía  
**Co-Directora Seminario de Título**

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dr. Marcelo Baeza  
**Presidente Comisión**

Dr. Francisco Chávez  
**Corrector**

Santiago de Chile, Septiembre de 2011







**ADAPTACIONES DE ARQUEAS HIPERTERMÓFILAS A  
AMBIENTES DE ALTAS TEMPERATURAS: ESTUDIOS  
DE ESTABILIDAD TÉRMICA Y MECANISMO  
CINÉTICO EN QUINASAS DEPENDIENTES DE ADP**

Seminario de Título

entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Biólogo Ambiental

por

Felipe Ignacio Merino León

Septiembre de 2011  
Santiago, Chile

Director de Seminario de Título: Dr. Jorge Babul Cattán





*Dedicado a  
mi familia*



## Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento hacia el Dr. Jorge Babul y a la Dra. Victoria Guixé por la confianza que han depositado en mí, así como por su guía y el constante apoyo que me han brindado como estudiante y como científico. Quisiera agradecer al Dr. Ricardo Cabrera y al Dr.(c) Mauricio Baez por su constante guía en el desarrollo de esta memoria así como en mi desarrollo profesional. Agradezco la colaboración experimental de Andrés Caniuguir y su apoyo general. También me gustaría decir gracias a todos los miembros del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular ya que gracias a su aporte hacer ciencia se hace posible. De manera especial me gustaría reconocer el incondicional apoyo que me han brindado mi familia y mis amigos más cercanos. Quisiera agradecer al Dr. Takayoshi Wakagi y al Dr. Alexander Yakounin quienes amablemente enviaron los clones de las enzimas utilizadas en este estudio. Finalmente me gustaría agradecer al proyecto FONDECYT 1050818 por financiar este proyecto.

# Índice

Resumen	IX
Abstract	XI
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Hipótesis . . . . .	8
1.2. Objetivos . . . . .	9
1.2.1. Objetivo general . . . . .	9
1.2.2. Objetivos específicos . . . . .	9
<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>10</b>
2.1. Purificación de las enzimas . . . . .	10
2.1.1. Glucoquinasas dependiente de ADP de <i>Thermococcus Litoralis</i>	10
2.1.2. Fosfofructoquinasa dependiente de ADP de <i>Pyrococcus horikoshii</i>	11
2.2. Caracterizaciones bioquímicas . . . . .	12
2.2.1. Caracterizaciones cinéticas . . . . .	12
2.2.2. Determinación de la concentración de proteínas . . . . .	13
2.2.3. Determinación del radio hidrodinámico en condiciones nativas	13
2.2.4. Fluorescencia intrínseca . . . . .	14
2.3. Estudios de estabilidad . . . . .	14
2.3.1. Desplegamiento al equilibrio de la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i>	14
2.3.2. Cinética de desplegamiento de la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i> .	16
2.4. Caracterización bioinformática . . . . .	18
2.4.1. Generación de alineamientos de secuencia y análisis de posi- ciones conservadas . . . . .	18
2.4.2. Modelado molecular de una glucoquinasa dependiente de ADP mesófila . . . . .	19
2.4.3. Caracterización estructural de la superfamilia riboquinasa . .	19
<b>3. Resultados</b>	<b>21</b>
3.1. Caracterización bioquímica . . . . .	21
3.1.1. Purificación y estado de agregación . . . . .	21
3.1.2. Caracterizaciones cinéticas . . . . .	24

3.2. Estudios de estabilidad . . . . .	28
3.2.1. Desplegamiento de la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i> . . . . .	28
3.2.2. Cinética de despliegamiento de la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i> .	31
3.3. Caracterización bioinformática . . . . .	36
3.3.1. Modelado de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>M. acetivorans</i> . . . . .	36
3.3.2. Alineamientos de secuencia y análisis de posiciones conservadas	38
3.3.3. Caracterización estructural de la superfamilia riboquinasa . .	38
<b>4. Discusión</b>	<b>43</b>
4.1. Caracterización bioquímica de las quinasas dependientes de ADP . .	43
4.2. Estudios de despliegamiento por GdmHCl . . . . .	45
4.3. Caracterización de la superfamilia riboquinasa . . . . .	51
<b>5. Conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>6. Rerefencias</b>	<b>59</b>
<b>Apéndices</b>	<b>65</b>
<b>A. Desplegamiento al equilibrio</b>	<b>65</b>
<b>B. La ecuación de Eyring</b>	<b>69</b>

## Índice de figuras

1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes para las fracciones purificadas de la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i> y la fosfofructoquinasa de <i>P. horikoshii</i> . . . . .	22
2.	Estado de agregación de las quinasas dependientes de ADP . . . . .	23
3.	Dependencia de la constante catalítica con la concentración de sustrato para la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de <i>P. horikoshii</i> . . . . .	25
4.	Dependencia de la constante catalítica con la concentración de sustrato para la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i> . . . . .	26
5.	Gráficos de dobles recíprocos para la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i> a distintas concentraciones de MgADP y glucosa . . . . .	27
6.	Fluorescencia intrínseca de triptofanos para la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i> . . . . .	30
7.	Curvas de desplegamiento para la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i> . . . . .	32
8.	Desplegamiento en el tiempo de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i> medido por fluorescencia a 77,8 °C en presencia de distintas concentraciones de GdmHCl . . . . .	34
9.	Dependencia de la constante cinética de desplegamiento con la temperatura para la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>T. litoralis</i> . . . . .	35
10.	Análisis de correlación del orden de contacto de los residuos de 23 proteínas de la superfamilia riboquinasa normalizado por el largo de su secuencia con la temperatura de crecimiento óptimo del organismo de donde provienen . . . . .	39
11.	Comparación del contenido porcentual de los distintos aminoácidos en proteínas pertenecientes a la superfamilia riboquinasa provenientes de organismos mesófilos e hipertermófilos . . . . .	41
12.	Análisis de correlación entre la temperatura de crecimiento óptimo y la cantidad de residuos aromáticos, residuos ionizables y la cantidad de puentes salinos en 23 proteínas de la superfamilia riboquinasa . . . . .	42
13.	Modelos termodinámicos para el aumento de la estabilidad térmica de una proteína . . . . .	48

## Índice de tablas

1.	Parámetros cinéticos de desplegamiento para la glucoquinasa de <i>T. litoralis</i> . . . . .	35
2.	Evaluación de la calidad de los modelos construidos para la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>M. acetivorans</i> . . . . .	37
3.	Estructuras cristalográficas utilizadas en la caracterización de la superfamilia riboquinasa. . . . .	40
4.	Constantes cinéticas de desplegamiento para proteínas provenientes de organismos termófilos reportadas hasta la fecha . . . . .	50



## Lista de Abreviaturas

$A_{280}$ , absorbancia a 280 nm;  $A_{580}$ , absorbancia a 580 nm;  $C_m$ , concentración de agente caotrópico a la que ocurre la mitad del desplegamiento; GdmHCl, cloruro de guanidinio; HPLC, cromatografía líquida de alto desempeño; IPTG, isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido;  $k_{cat}$ , constante catalítica;  $K_M$ , constante de Michaelis-Menten;  $k_u$ , constante cinética de desplegamiento,  $k_{u(H_2O)}$ , constante cinética de desplegamiento en ausencia de agente caotrópico; LB, medio Luria-Bertani; NAD<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida; PCR, reacción en cadena de la polimerasa;  $R_h$ , radio hidrodinámico.

## Resumen

Los organismos extremófilos son aquellos que viven en ambientes considerados como extremos. En general, la mayoría de estos microorganismos pertenecen al dominio celular de las arqueas. Uno de los grupos más estudiados de arqueas es el de los *thermococcales*, en particular la arquea hipertermófila *Pyrococcus furiosus*. Una de las características más interesantes de este orden es que el flujo glicolítico procede a través de una versión modificada de la vía de Embden-Meyerhof, donde las actividades glucoquinasa y fosfofructoquinasa son dependientes de ADP en vez de ATP. Estas quinasas son homólogas entre sí y estudios estructurales han mostrado que pertenecen a la superfamilia riboquinasa. En este trabajo se estudiaron algunas características cinéticas, aspectos de la regulación de la actividad, estabilidad y estructura de dos quinasas de la familia ADP-dependiente, la glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis* y la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *Pyrococcus horikoshii*, con el fin de comprender las bases de su adaptación a ambientes de alta temperatura. Los resultados mostraron que ambas enzimas presentan cinéticas de saturación hiperbólicas para ambos sustratos. Además, sugieren que ambas enzimas presentan un mecanismo al azar de adición de sustratos. Se estudió la estabilidad de la glucoquinasa de *T. litoralis* mediante desplegamiento inducido por cloruro de guanidinio y estudios de la dependencia de la velocidad de desplegamiento con la temperatura. Se observó que el proceso de desplegamiento es extremadamente lento a todas las temperaturas ensayadas debido principalmente a una barrera energética de activación de tipo entálpico. Se determinó que para el plegamiento tipo-riboquinasa existe una correlación significativa entre la cantidad de residuos ionizables y la temperatura de crecimiento óptimo de los organismos a los que estas

proteínas pertenecen, principalmente debido a un aumento de residuos glutámicos y argininas en las proteínas termófilas. También, se encontró una correlación entre la cantidad de residuos aromáticos y la temperatura de crecimiento óptimo, principalmente debido a un aumento de las fenilalaninas en las proteínas termófilas. Una correlación más débil se observó con los puentes salinos. Los datos sugieren una contribución importante del fortalecimiento de las interacciones hidrofóbicas y de las interacciones electrostáticas de largo alcance a la estabilidad. Tanto cisteínas, histidinas como glutaminas disminuyen en las proteínas termófilas en comparación con las proteínas mesófilas.

## Abstract

The extremophilic organisms are those who live in environments considered as extremes. In general, most of them belong to the archaea cellular domain. The *thermococcales* are one of the most studied groups of the archaea domain, in particular the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus*. One of the most interesting features of this group is that the glycolytic flux proceeds through a modified version of the Embden-Meyerhof pathway, where the glucokinase and phosphofructokinase activities are ADP-dependent instead of ATP-dependent. These kinases are homologous to each other and structural studies have shown that they belong to the ribokinase superfamily. In this work we studied some kinetic characteristics, regulatory aspects of the activity, stability and structural features of two kinases of the ADP dependent family, of the ADP-dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis* and the ADP-dependent phosphofructokinase from *Pyrococcus horikoshii*, in order to gain knowledge of the basis of their adaptations to extreme temperature environments. The results showed that both enzymes present hyperbolic kinetic saturations for both substrates. The stability of the glucokinase from *T. litoralis* was studied by using guanidinium hydrochloride induced unfolding together with the dependence of the unfolding kinetics with temperature. It was observed that the unfolding process is extremely slow at all the temperatures used due to an enthalpic activation energy barrier. It was determined that, for the ribokinase-like fold, exists a significant correlation between the number of ionizable residues and the optimal growth temperature of the organisms to these proteins belong, mainly due to an increase of glutamic and arginine residues in the thermophilic proteins. Also, it was found a significant correlation between the number of aromatic residues and the optimal

growth temperature, which is due to an increase of the phenylalanine residues in the thermophilic proteins. A slighter correlation was seen with salt bridges. The results suggest a relevant contribution of the strengthening of the hydrophobic interaction along with long range electrostatic interactions to the stability. Cysteine, histidine and glutamine residues decrease in the thermophilic proteins compared to the mesophilic ones.

# 1. Introducción

Tradicionalmente se han considerado aquellos ambientes hostiles para el ser humano como extremos, siendo algunos de ellos tan extremos que inicialmente se pensó que en éstos no podía existir vida. Algunos de estos ambientes presentan concentraciones extremadamente altas de sales, como el mar muerto, temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua, como chimeneas volcánicas en el mar, pH's extremos, altas presiones o combinaciones de ellos. Hoy en día, mediante el mejoramiento de las técnicas de cultivo, en conjunto con la disponibilidad de técnicas de biología molecular capaces de identificar de manera independiente del cultivo la presencia de microorganismos, ha sido posible mostrar que existe gran diversidad de formas microbianas en estos hábitats. Consecuentemente estos organismos son denominados extremófilos.

Dentro de los extremófilos, la gran mayoría pertenece al dominio celular denominado arquea. Si bien es un área bastante activa de investigación, se trata de un campo relativamente joven ya que las arqueas fueron reconocidas como grupo independiente a comienzos de la década de los 90 (Woese *et al.*, 1990).

Entre los organismos que habitan ambientes más extremos se encuentran aquellos denominados hipertermófilos, los cuales son capaces de crecer óptimamente a temperaturas que bordean al punto de ebullición del agua. Las arqueas con las temperaturas de crecimiento óptimo mayores (100 – 110 °C) pertenecen a los géneros *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* y *Methanopyrus* (Stetter, 1996). Por otra parte el grupo de las bacterias sólo contiene dos géneros de organismos hipertermófilos: *Aquifex* y *Thermotoga*, mientras que, a la fecha, no se conocen organismos eucariontes con estas características.

Debido a la inestabilidad que presentan en general las biomoléculas a las temperaturas en la que estos organismos viven, se ha estudiado intensamente la manera en la que estos organismos están adaptados a estas condiciones extremas, tanto desde el punto de vista de las ciencias aplicadas como el de la ciencia básica. Entre las adaptaciones más interesantes se encuentran la incorporación de enlaces éter entre los ácidos grasos de la membrana (en contraste con los típicos enlaces ester formados en las membranas de organismos mesófilos) lo que permite mantener la fluidez de esta a temperaturas elevadas y la presencia de proteínas que mantienen sus estructuras nativas a altas temperaturas. En particular, se han hecho grandes esfuerzos para entender el mecanismo que lleva a la estabilidad de las proteínas a altas temperaturas debido a sus aplicaciones tecnológicas (Kumar y Nussinov, 2001).

Las aplicaciones biotecnológicas de las enzimas termoestables varían desde su uso en procedimiento de laboratorio como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), su utilización en la industria de los alimentos o su uso en procedimientos de remediación ambiental como la degradación de moléculas de aromáticos policíclicos (para una revisión ver Niehaus *et al.*, 1999).

Una de las aplicaciones más interesantes del diseño de proteínas termófilas, desde el punto de vista de la industria y la biología ambiental, es la obtención de xilanasas estables a altas temperaturas para su utilización en el blanqueo del papel (Viikari *et al.*, 1994). Anualmente se producen en los Estado Unidos de Norteamérica más de dos millones de toneladas de desechos clorados del proceso de blanqueo del papel, siendo este uno de los mayores problemas ambientales en ese país (Niehaus *et al.*, 1999 y referencias en este trabajo). La sustitución de este proceso industrial por uno realizado enzimáticamente generaría una tecnología más limpia.

Existen dos tipos de aproximaciones que permiten obtener enzimas adecuadas

para un proceso determinado: búsqueda y diseño. La primera de ellas, como su nombre lo indica, consiste en buscar la función de interés en organismos que presenten las características adecuadas a la manera en la que se desempeña el proceso. El ejemplo clásico para esto es la obtención de una polimerasa termoestable a partir de la bacteria termófila *T. aquaticus* y su utilización en el proceso de PCR. Desafortunadamente esta aproximación está limitada por la cantidad de información sobre microorganismos y sus enzimas disponibles. Sin embargo, debido a la creciente cantidad de organismos con genomas secuenciados, en conjunto con el mejoramiento de los algoritmos de predicción de función en las proteínas, esta aproximación es cada vez más razonable. Algunos avances se han conseguido de esta manera (Niehaus *et al.*, 1999).

En la segunda aproximación, en cambio, la estrategia es diseñar una enzima con las características deseadas a partir de una proteína que presente parte de las características que se buscan. De nuevo, dos tipos de estrategias existen en la literatura: evolución dirigida y diseño racional. En la primera de ellas se emulan los procesos evolutivos a nivel genético utilizando PCR con alto grado de error, reordenamiento de genes o genomas entre otros métodos (para una revisión de las metodologías ver Yuan *et al.*, 2005). Estas técnicas son especialmente importantes cuando la función que se desea no existe o no se conoce en la naturaleza como es el caso de la degradación enzimática de moléculas orgánicas halogenadas, proceso de gran importancia para la biotecnología ambiental (ver Yuan *et al.*, 2005 y referencias en este trabajo). Esta aproximación, sin embargo, necesita de un método eficiente de búsqueda a través de enormes librerías de genes mutantes y, usualmente, requiere de varias rondas de evolución dirigida para obtener finalmente el producto que se busca. En cambio, en la aproximación del diseño racional se intenta generar una proteína con la



función de interés utilizando información estructural y evolutiva acerca de la proteína que se desea modificar. La gran limitante de esta aproximación es que se necesita información detallada acerca de la estructura de las enzimas, así como información experimental de la función que se desea diseñar. Aplicaciones de esta metodología han ido desde la manipulación de la estereoselectividad de una glucoquinasa (Yang *et al.*, 2004) hasta el aumento de la estabilidad térmica de enzimas (Spector *et al.*, 2000). Con respecto a este último punto, se han hecho bastantes esfuerzos por entender los determinantes estructurales que llevan al aumento de la estabilidad térmica de las enzimas, sin embargo la clave de la termoestabilidad parece estar fundada en reglas complejas por lo que el diseño de proteínas termófilas aún es un objetivo esquivo.

En un contexto metabólico, los procesos biológicos que ocurren dentro de un organismo que vive a altas temperaturas deben estar regulados de tal manera que tanto la constante catalítica de las enzimas como la afinidad por sus sustratos, deben permanecer en un intervalo de valores apropiado para su función (Somero, 1978). En este sentido ha sido posible demostrar, por ejemplo, que la regulación de la actividad catalítica en un par mesófilo/termófilo de enzimas homólogas se encuentra en el compromiso que existe entre la flexibilidad de la proteína y su actividad catalítica (Wolf-Watz *et al.*, 2004).

Fisiológicamente, el grupo de las arqueas ha mostrado ser un grupo muy interesante, principalmente debido a su tendencia a vivir en ambientes de condiciones consideradas extremas. Gracias al creciente estudio de estos microorganismos ha sido posible conocer nuevas funciones enzimáticas así como también, en particular, conocer más acerca de las adaptaciones de las proteínas a las altas temperaturas. Una de las arqueas hipertermófilas más estudiada es *Pyrococcus furiosus*. Una de sus

características más interesantes es la manera en la que degrada glucosa. Inicialmente se pensó que esto ocurría a través de una versión modificada de la vía de Entner-Doudoroff llamada pyroglicólisis (Mukund y Adams, 1991). Sin embargo, en 1994 fue posible demostrar que el flujo desde glucosa hacia piruvato ocurre a través de una versión modificada de la vía de Embden-Meyerhof (Kengen *et al.*, 1994). Esta vía comparte sólo 4 enzimas con la glicólisis canónica (Verhees *et al.*, 2003). Una de las principales modificaciones que presenta esta vía es que tanto la fosforilación de glucosa como la de fructosa-6-P son dependientes de ADP en vez de ATP. La razón fisiológica de esta preferencia aún no es clara aunque se ha atribuido a la mayor estabilidad térmica de los nucleótidos di-fosfato. Estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado que si bien estas enzimas no son capaces de utilizar ATP como dador de fosforilo, este si puede unirse al sitio de nucleótidos de la enzima con afinidades en el rango milimolar (resultados no publicados).

Estudios de secuencia mostraron que estas quinasas son homólogas entre sí, pero no presentan identidad de secuencia significativa con las quinasas dependientes de ATP conocidas a la fecha, por lo que se propuso que constituirían una nueva familia de proteínas (Tuininga *et al.*, 1999). A la fecha, se han publicado las estructuras cristalográficas de las glucoquinasas dependientes de ADP de *Thermococcus litoralis* (Ito *et al.*, 2001), *Pyrococcus horikoshii* (Tsuge *et al.*, 2002) y *Pyrococcus furiosus* (Ito *et al.*, 2003) junto con la fosfofructoquinasa de *Pyrococcus horikoshii*. De manera interesante, aún a pesar de la baja identidad de secuencia con las quinasas conocidas a la fecha (bajo el 20%), estructuralmente estas enzimas pueden ser clasificadas como pertenecientes a la superfamilia riboquinasa. Este grupo de proteínas contiene fosfotransferasas que pueden utilizar azúcares como ribosa y 2-ceto-3-deoxyglucosa, azúcares fosforilados como fructosa-6-P, tagatosa-6-P y fructosa-1-P, coenzimas como

piridoxal, 4-metil-5- $\beta$ -hidroxietiltiazol y 4-amino-5-hidroxiometil-2-metilpirimidina y nucleósidos como aceptores de fosforilo, usando como dador ATP.

El plegamiento tipo riboquinasa consiste en un "sándwich"  $\alpha\beta\alpha$  en donde una sábana  $\beta$  central de 8 hebras se encuentra rodeada por 8 hélices  $\alpha$ , 3 en un lado y 5 en el otro. Adicionalmente, estas quinasas pueden presentar un pequeño dominio extra compuesto siempre por una sábana  $\beta$  de 4 o 5 hebras y ocasionalmente por algunas inserciones de hélices  $\alpha$ . A este último grupo pertenecen las quinasas dependientes de ADP.

En la superfamilia riboquinasa la presencia del dominio menor está relacionada con la unión del aceptor de fosforilo, además de servir como interfaz para la interacción entre subunidades en algunas enzimas del grupo.

Es posible encontrar representantes de esta superfamilia en los tres dominios celulares efectuando variadas funciones. A la fecha, gran parte de la información de este grupo de proteínas proviene de estudios cristalográficos. Afortunadamente, las estructuras cristalinas disponibles pertenecen tanto a organismos termófilos como mesófilos, lo que convierte a la superfamilia riboquinasa y, en particular a la familia de quinasas dependientes de ADP, un sujeto interesante para el estudio de las adaptaciones fisiológicas y estructurales a los ambientes de alta temperatura.

Es importante señalar que, dentro de los pocos estudios disponibles abordando el tema de la estabilidad de proteínas provenientes de organismos hipertermófilos, la gran mayoría utiliza como modelos pequeñas proteínas monoméricas de un dominio, ya que estas son experimentalmente más fáciles de estudiar, por lo que es interesante llevar el estudio a modelos más complejos.

En base a los antecedentes mencionados, en este trabajo se propuso estudiar las adaptaciones estructurales de las proteínas a altas temperaturas utilizando como

modelo la glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis*, proteína monomérica de dos dominios, que no presenta cisteínas y cuya estructura cristalográfica se conoce. Por otra parte, esta enzima en conjunto con la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *Pyrococcus horikoshii* se utilizarán para el estudio de la glicólisis modificada en arqueas.

### 1.1. Hipótesis

La utilización de ADP y no ATP, en la glicólisis de arqueas termófilas, resulta de una adaptación fisiológica a altas temperaturas.

Adicionalmente, es posible encontrar determinantes estructurales de la estabilidad térmica realizando comparaciones entre las estructuras nativas de estas quinasas y otros miembros mesófilos de la superfamilia riboquinasa.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general

- Estudiar las adaptaciones funcionales y estructurales a ambientes de altas temperaturas, a nivel de la glicólisis y específicamente de las enzimas glucoquinasa y fosfofructoquinasa presentes en las arqueas del grupo de los *thermococales*.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar cinéticamente las enzimas glucoquinasa y fosfofructoquinasa presentes en la vía modificada de Embden-Meyerhof de las arqueas del grupo de los *thermococales*.
- Estudiar el desplegamiento de la glucoquinasa de *Thermococcus litoralis* mediante cambios en la fluorescencia intrínseca y pérdida de la actividad enzimática.
- Asociar los resultados de estabilidad a determinantes estructurales mediante la comparación de la estructura de la glucoquinasa de *Thermococcus litoralis* con un modelo construido por homología para la enzima glucoquinasa dependiente de ADP *Methanosarcina acetivorans* y otras enzimas de la superfamilia riboquinasa.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Purificación de las enzimas

#### 2.1.1. Glucoquinasas dependiente de ADP de *Thermococcus Litoralis*

El gen que codifica para la glucoquinasa dependiente de ADP de *Thermococcus litoralis* inserto en el vector de expresión pET17b fue donado por el Dr. Takayoshi Wakagi (Departamento de Biotecnología, Universidad de Tokio). La cepa BL21(DE3) pLyss de *E. coli* fue transformada con él. Las bacterias recombinantes se guardaron en alícuotas de aproximadamente 1 ml en 50 % glicerol a -80 °C.

Para la purificación de esta enzima se inocularon 50 ml de medio Luria Bertani (LB) con 50  $\mu$ L de la cepa en presencia de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y 35  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. El cultivo se creció durante la noche a 37 °C. Luego estos 50 mL se inocularon en 1 L de medio LB en presencia de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y 35  $\mu$ g/ml de cloranfenicol y se crecieron a 37 °C hasta una  $A_{580} \sim 0,5$ . La sobreexpresión enzimática fue inducida en ese momento con 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y el crecimiento se continuó por 4 h más. Las células se cosecharon por centrifugación a 3.220 g por 15 min. Estas se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Las células se resuspendieron en 50 ml de amortiguador TrisHCl 50 mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM (Amortiguador A), se lisaron por sonicación y se centrifugaron por 10 min a 8.230 g. El líquido sobrenadante se incubó a 90 °C por 30 min y se centrifugó por 15 min a 3.210 g. Luego, el líquido sobrenadante se llevó a 60 % de saturación con sulfato de amonio en hielo con agitación permanente por 1 h. Las proteínas precipitadas se removieron por centrifugación a 8.230 g por 10 min. El líquido sobrenadante se cargó en una columna de t-butil sepharose (Econo-Pac cartridge, BIO-RAD) equilibrada con Amortiguador A y 60 % sulfato de amonio. La

columna se lavó con 5 volúmenes del mismo amortiguador. La proteína fue eluída con un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna entre 60 % y 20 % sulfato de amonio en Amortiguador A. Las fracciones con la mayor actividad se agruparon y dializaron contra 1 L de Amortiguador A a temperatura ambiente durante una noche. Luego de la diálisis la proteína se cargó en una columna MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) equilibrada en Amortiguador A. La columna se lavó con 10 volúmenes del mismo amortiguador y la proteína fue eluída con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna entre 0 y 1 M KCl en Amortiguador A. Las fracciones que mostraron mayor actividad se agruparon, concentraron y guardaron hasta su utilización a 4 °C.

### 2.1.2. Fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *Pyrococcus horikoshii*

El gen que codifica para la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *Pyrococcus horikoshii*, inserto en el vector de expresión pET15b, fue donado por el Dr. Alexander Yakunin (Consortio de Genómica Estructural, Universidad de Toronto). La cepa BL21 (DE3) de *E. coli* fue transformada con él. Las bacterias recombinantes se guardaron en alícuotas de aproximadamente 1 ml en 50 % glicerol a -80 °C.

Para la purificación de esta enzima se inocularon 50 ml de medio LB con 50  $\mu$ L de la cepa, en presencia de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y 35  $\mu$ g/ml de kanamicina. El cultivo se creció durante la noche a 37 °C. Luego, estos 50 ml se inocularon en 1 L de medio LB en presencia de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y 35  $\mu$ g/ml de kanamicina y se crecieron a 37 °C hasta una  $A_{580} \sim 0,5$ . La sobreexpresión enzimática se indujo en ese momento con 1 mM de IPTG y el crecimiento se continuó por 4 h más. Las células se cosecharon por centrifugación a 3.220 g por 15 min y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Para la purificación de la enzima las células se resuspendieron en 50 ml de amr-



tiguador fosfato 20 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, imidazol 20 mM, NaCl 0,3 M (Amortiguador B), lisaron por sonicación y se centrifugaron por 10 min a 8.230 rpm conservando sólo el líquido sobrenadante. Posteriormente la solución se incubó a 70 °C por 30 min y se centrifugó por 15 min a 3.210 g. El líquido sobrenadante se cargó en una columna HisTrap<sup>TM</sup>(GE Healthcare) equilibrada en Amortiguador B, la que se lavó con 5 volúmenes de columna con el mismo amortiguador. La proteína fue eluída con amortiguador B en presencia de imidazol 0,5 M. Las fracciones con la mayor actividad se agruparon y dializaron contra amortiguador fosfato 20 mM pH 5,7, MgCl<sub>2</sub> 5 mM durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, esta solución fue cromatografiada en una columna Sephacryl S200 (Amersham Biosciences). Las fracciones con la mayor actividad se agruparon, dializaron contra amortiguador PIPES 25 mM pH 6,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y se concentraron. La proteína se guardó a 4 °C hasta su utilización.

## 2.2. Caracterizaciones bioquímicas

### 2.2.1. Caracterizaciones cinéticas

La actividad glucoquinasa dependiente de ADP se midió espectrofotométricamente en condiciones aeróbicas a 40 °C. El ensayo enzimático contenía amortiguador TrisHCl 50 mM pH 7,8, NAD<sup>+</sup> 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM libre y concentraciones variables de glucosa y MgADP. La producción de glucosa-6-P se acopló a la producción de NADH por la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* y se siguió espectrofotométricamente por el aumento de la absorbancia a 340 nm utilizando un coeficiente de extinción de 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Kornberg y Pricer, 1953). La reacción fue siempre iniciada por la adición de la enzima glucoquinasa.

La actividad fosfofructoquinasa dependiente de ADP se midió espectrofotométricamente en condiciones aeróbicas a 50 °C. El ensayo enzimático contenía amortiguador PIPES 25 mM pH 6,5, NADH 0,16 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM libre y concentraciones variables de fructosa-6-P y MgADP. La producción de fructosa-1,6-bisP fue acoplada al consumo de NADH utilizando como enzimas auxiliares aldolasa, triosa-P isomerasa y gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (todas de músculo de conejo) y seguida por la disminución de la absorbancia a 340 nm. Debido a la baja estabilidad de las enzimas auxiliares a esa temperatura, la reacción se inició por la adición de éstas y de la enzima fosfofructoquinasa. Tanto para el ensayo de la actividad glucoquinasa como fosfofructoquinasa las enzimas auxiliares no fueron limitantes.

### 2.2.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford (1976) y usando seroalbúmina de bovino como estándar.

### 2.2.3. Determinación del radio hidrodinámico en condiciones nativas

La masa molecular relativa en condiciones nativas de la glucoquinasa de *T. li-toralis* se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular en HPLC. El experimento se realizó utilizando un sistema HPLC de dos bombas Waters 1525 con una columna Bio-Sil SEC-250 (7,8 mm x 30 cm) (BioRad, Hercules, CA, USA) equilibrada con amortiguador TrisHCl 50 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 0,2 M usando un flujo constante de 0,6 ml/min. El radio hidrodinámico se calculó a partir del volumen de elusión utilizando los siguientes estándares: Vitamina B-12 (8,5 Å R<sub>h</sub>), mioglobina de caballo (19 Å R<sub>h</sub>), albúmina de huevo de pollo (30,5 Å R<sub>h</sub>), γ-globulina de bovino (41,8 Å R<sub>h</sub>) y tiroglobulina de bovino (85 Å R<sub>h</sub>) suponiendo

una relación lineal entre el recíproco del volumen de elución y el radio hidrodinámico (Uversky, 1993). La elución de proteínas se monitoreó mediante absorbancia a 280 nm utilizando un detector en línea Waters 2487.

La masa molecular relativa en condiciones nativas de la fosfofructoquinasa de *P. horikoshii* se determinó mediante dispersión dinámica de luz utilizando el aparato de DLS DynaPro MSTC014 (Protein Solutions Inc.). La enzima se incubó en amortiguador PIPES 25 mM, pH 6,5, MgCl<sub>2</sub> 7 mM en cuatro condiciones diferentes: en presencia de fructosa-6-P 2 mM, en presencia de ADP 2 mM, en presencia de fructosa-6-P 2 mM y ADP 2 mM o sin ligandos a 40 °C por 20 min. Para cada muestra se realizaron 30 mediciones en triplicado a 55 °C. Los datos se procesaron utilizando el programa DYNAMICS v5.26.39 (Protein Solutions Inc.).

#### 2.2.4. Fluorescencia intrínseca

La fluorescencia intrínseca de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* se midió en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm y ranuras de excitación y emisión de 5 nm. La concentración de proteína y el volumen de incubación variaron según el experimento realizado.

### 2.3. Estudios de estabilidad

#### 2.3.1. Desplegamiento al equilibrio de la glucoquinasa de *T. litoralis*

Para obtener medidas termodinámicas a partir de las curvas de estabilidad, es fundamental que la reacción estudiada sea reversible y que la condición de equilibrio haya sido alcanzada. Esta condición exige que las velocidades de interconversión entre

las especies presentes en cada concentración de agente caotrópico sean iguales, lo que es observado experimentalmente cuando las transiciones de las curvas de estabilidad son invariables dentro de un determinado intervalo de tiempo (Pace, 1986). Por lo tanto, para determinar la reversibilidad de la reacción y el tiempo requerido para lograr la condición de equilibrio, se obtuvieron curvas de estabilidad a partir del estado desplegado de la enzima o a partir del estado nativo.

Para las curvas en el sentido del desplegamiento, diferentes alícuotas que contenían amortiguador A y 0,5  $\mu\text{M}$  de proteína se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio (GdmHCl) a 40 °C. Para obtener el estado desplegado requerido para los experimentos en el sentido del repliegamiento, la proteína concentrada se incubó por dos días en presencia de GdmHCl 6 M y amortiguador A a 40 °C. Posteriormente la proteína se diluyó a las concentraciones deseadas de GdmHCl. Las curvas de estabilidad se obtuvieron mediante mediciones de actividad enzimática utilizando glucosa 4 mM y MgADP 2 mM o siguiendo el máximo de emisión en los experimentos de fluorescencia intrínseca. Las curvas de estabilidad obtenidas se ajustaron a la ecuación

$$y = y_n - (y_n - y_u) \frac{e^{\left(\frac{-(\Delta G_{H_2O} - m[D])}{RT}\right)}}{1 + e^{\left(\frac{-(\Delta G_{H_2O} - m[D])}{RT}\right)}} \quad (1)$$

suponiendo un mecanismo de desplegamiento de dos estados  $N \xrightleftharpoons{K} U$ , siendo  $N$  la proteína nativa y  $U$  la proteína desplegada, donde  $y_n$  corresponde a la propiedad de la enzima nativa,  $y_u$  corresponde a la señal de la proteína desplegada,  $\Delta G_{H_2O}$  es la energía libre de desplegamiento a 0 M de GdmHCl,  $m$  es la dependencia de la energía libre con la concentración de agente desnaturalante,  $[D]$  la concentración molar de GdmHCl,  $R$  es la constante universal de los gases y  $T$  es la temperatura

absoluta (Para la derivación en extenso de esta ecuación ver el Apéndice A). Para las curvas de estabilidad de fluorescencia la señal nativa  $y_n$  tiene una dependencia lineal con la concentración de GdmHCl la que fue incluida en los ajustes.

### 2.3.2. Cinética de desplegamiento de la glucoquinasa de *T. litoralis*

Para el análisis de la dependencia de la constante cinética de desplegamiento con la temperatura se utilizó el formalismo de Eyring (1935). Aquí la constante cinética de desplegamiento depende de la temperatura según la ecuación

$$k = \left( \frac{k_B T}{h} \right) e^{\left( \frac{-\Delta G^\ddagger}{RT} \right)} \quad (2)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzman,  $h$  es la constante de Planck,  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\Delta G^\ddagger$  es la energía libre de activación de desplegamiento. Desafortunadamente, la relación de Eyring fue construida utilizando un modelo en fase gaseosa. Por el contrario, para un proceso en fase condensada donde la búsqueda difusiva domina el proceso, el valor  $\ln \frac{k_B T}{h} \sim 6,2 \cdot 10^{12} s^{-1}$  es demasiado alto. De hecho, basado en medidas de las velocidad de plegamiento de algunos lazos ha sido propuesto que el valor  $\ln \frac{k_B T}{h}$  debería ser reemplazado por  $10^6 s^{-1}$  (Eaton *et al.*, 1996).

Considerando lo anterior y ya que  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$  los datos obtenidos fueron ajustados a la relación

$$\ln \left| \frac{k}{T} \right| = 8,12 + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (3)$$

donde  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$  corresponden a la entalpía y entropía de activación respectivamente. Por supuesto, esta modificación sólo afecta la entropía de activación calculada

ya que la entalpía es independiente del modelo.

El desplegamiento se siguió mediante el decaimiento de la fluorescencia a 334 nm excitando a 295 nm y utilizando ranuras de excitación y emisión de 5 nm. Los experimentos se realizaron en cubetas con agitación constante y con 1  $\mu$ M de proteína a distintas temperaturas. En todos los casos la mezcla, que contenía amortiguador A y distintas concentraciones de GdmHCl, se incubó por 15 min a la temperatura deseada y el desplegamiento se inició agregando la proteína manualmente. El tiempo muerto fue de 7 a 10 s. Los datos se ajustaron a la ecuación

$$y = y_0 + Ae^{-kt} + ct \quad (4)$$

donde  $y_0$  es la fluorescencia del estado desplegado de la enzima,  $A$  es la diferencia entre la fluorescencia del estado nativo y el desplegado (la amplitud del cambio)  $k$  es la constante cinética de desplegamiento y  $t$  el tiempo. El factor  $ct$  incluye el efecto del fotoblanqueo de los triptófanos en el tiempo ( $c$  puede ser igual a 0).

La constante cinética de desplegamiento en ausencia de agente caotrópico se obtuvo mediante una extrapolación lineal de las constantes cinéticas de desplegamiento obtenidas a distintas concentraciones de GdmHCl. Todas las concentraciones de GdmHCl utilizadas desnaturan completamente a la proteína en las temperaturas ensayadas.

## 2.4. Caracterización bioinformática

### 2.4.1. Generación de alineamientos de secuencia y análisis de posiciones conservadas

La estructura de las glucoquinasas dependientes de ADP de *P. furiosus*, *P. horikoshii* y *T. litoralis* (Códigos PDB 1UA4, 1L2L y 1GC5 respectivamente) y la estructura de la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *P. horikoshii* (Código PDB 1U2X) se alinearon estructuralmente utilizando el programa CE-MC (Guda *et al.*, 2001). Adicionalmente, cada estructura se separó en sus dominios menor y mayor. Luego se realizó un nuevo alineamiento estructural para cada dominio utilizando el programa DeepView (Guex y Peitsch, 1997). Basado en estos dos alineamientos estructurales se construyó un alineamiento final de secuencia.

Todas las secuencias de quinasas ADP dependiente de arqueas disponibles en la base de datos de secuencias no redundantes de GeneBank se alinearon utilizando el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), usando como perfil el alineamiento estructural y con los parámetros por defecto. Posteriormente el alineamiento se refinó manualmente.

Para estudiar posibles posiciones conservadas diferencialmente en los grupos mesófilos y termófilos (posiblemente relacionadas con la estabilidad térmica), el alineamiento final se procesó mediante un algoritmo de información mutua<sup>1</sup> (Mirny y Gelfand, 2002).

---

<sup>1</sup>Servidor disponible en <http://mutations.mit.edu/SDR/>

#### 2.4.2. Modelado molecular de una glucoquinasa dependiente de ADP mesófila

La estructura de la glucoquinasa de *M. acetivorans* se modeló utilizando el programa MODELLER 8 (Sali y Blundell, 1993). Como moldes se utilizaron 1UA4, 1GC5 y 1L2L de la siguiente manera. Las estructuras 1UA4 y 1L2L se dividieron inicialmente en sus dominios menor y mayor. Éstos fueron superpuestos a la estructura de 1GC5. Con estos 4 fragmentos y la estructura de *T. litoralis*, en conjunto con el alineamiento construido anteriormente, se generaron 15 modelos. La calidad de los modelos se revisó utilizando los programas PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), Prosa2003 (Sippl, 1993), Verify3D (Lüthy *et al.*, 1992) y ProQ (Wallner y Elofsson, 2003).

#### 2.4.3. Caracterización estructural de la superfamilia riboquinasa

Con el fin de buscar, en la superfamilia riboquinasa, determinantes estructurales relacionados con la estabilidad térmica, se analizaron las estructuras 1UA4, 1GC5, 1L2L, 1U2X, 1EKQ, 1JXH, 1KYH, 1LHP, 1TD2, 1UB0, 1V8A, 2AX3, 2DDM, 2F7K, 2I5B, 2AFB, 1BX4, 1DGM, 2AJR, 1RKS, 1TZ3 y 1V1A (código de acceso PDB).

Actualmente, es posible predecir la velocidad de plegamiento de proteínas monoméricas de un solo dominio mediante un parámetro estructural conocido como orden de contacto (Plaxco *et al.*, 1998). Este se puede definir como la distancia promedio en secuencia entre un residuo y sus contactos. Para obtener información de la cinética de plegamiento de las estructuras analizadas el orden de contacto de ellas se calculó utilizando un programa Perl disponible en la página del laboratorio de David Baker<sup>2</sup>.

<sup>2</sup>Disponible en <http://depts.washington.edu/bakerpg/>



Debido a que en proteínas estables a altas temperaturas se ha observado un aumento en la cantidad de residuos ionizables (ver Kumar y Nussinov, 2001), se analizó la cantidad de puentes salinos presentes en cada estructura utilizando el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996). Finalmente, se calculó el porcentaje de cada residuo aminoacídico en la secuencia de estas proteínas mediante un programa escrito en Perl para este propósito.

La temperatura de crecimiento óptimo para cada organismo se obtuvo de la base de datos de temperatura de crecimiento de procariontes<sup>3</sup> (Huang *et al.*, 2004).

---

<sup>3</sup>Servidor PGTDdb disponible en <http://pgtdb.csie.ncu.edu.tw/>

## 3. Resultados

### 3.1. Caracterización bioquímica

#### 3.1.1. Purificación y estado de agregación

Ambas quinasas dependientes de ADP se purificaron hasta al menos un 90 % como se muestra en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (Figura 1). La glucoquinasa de *T. litoralis* muestra una migración electroforética correspondiente a una masa molecular relativa de 46.000 mientras que la fosfofructoquinasa de *P. horikoshii* muestra una migración equivalente a una masa molecular relativa de 49.000. Estos valores se encuentran en acuerdo con la masa molecular relativa estimada a través de la secuencia aminoacídica de 53.600 y 54.800 para las quinasas de *T. litoralis* y *P. horikoshii* respectivamente.

La masa molecular relativa en condiciones nativas de la glucoquinasa de *T. litoralis* se determinó por cromatografía de exclusión molecular en HPLC (Figura 2A). En el cromatograma sólo se observa un pico con un tiempo de retención correspondiente a un radio hidrodinámico de 3,22 nm y a una masa molecular relativa de 49.300. Esto indica un estado de agregación monomérico de la enzima, como ha sido publicado anteriormente (Koga *et al.*, 2000).

La masa molecular relativa en condiciones nativas de la fosfofructoquinasa de *P. horikoshii* no pudo ser determinado mediante cromatografía de exclusión molecular, principalmente debido a la tendencia de la proteína a formar agregados insolubles en la columna a los valores de pH estudiados. Esta agregación puede ser revertida con un aumento de la temperatura, lo que sugiere una baja solubilidad de la enzima. El punto isoeléctrico de la enzima se estimó utilizando el servidor H++<sup>4</sup> con el método

<sup>4</sup>Servidor H++ disponible en <http://biophysics.cs.vt.edu/H++/>

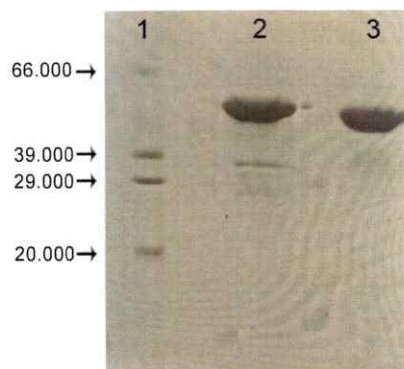


Figura 1: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes. **1:** Estándares de masa molecular (la masa relativa de cada uno se indica a la izquierda de la figura). **2:** Fracción purificada de la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *P. horikoshii*. **3:** Fracción purificada de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*.

de Poisson-Boltzman (Gordon *et al.*, 2005).

El resultado muestra que la enzima presenta un punto isoeléctrico de 7,13 lo que explica la baja solubilidad de ésta cuando el pH es cercano a 7. Por esta razón el estado de agregación de la fosfofructoquinasa de *P. horikoshii* se determinó usando dispersión dinámica de luz como técnica alternativa. Los resultados muestran que en condiciones nativas la proteína muestra un radio hidrodinámico de  $5,88 \pm 0,32$  nm correspondiente a una masa molecular relativa de  $213.000 \pm 28.000$ , consistente con un estado de agregación tetramérico (Figura 2B) igual al observado para la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de la arquea *P. furiosus* (Tuininga *et al.*, 1999). Adicionalmente es posible observar, mediante la misma técnica, que la presencia de los sustratos induce un cambio pequeño, pero significativo, en el radio hidrodinámico de la proteína (prueba de *t* de Student,  $p > 0,05$ ) (Figura 2B).

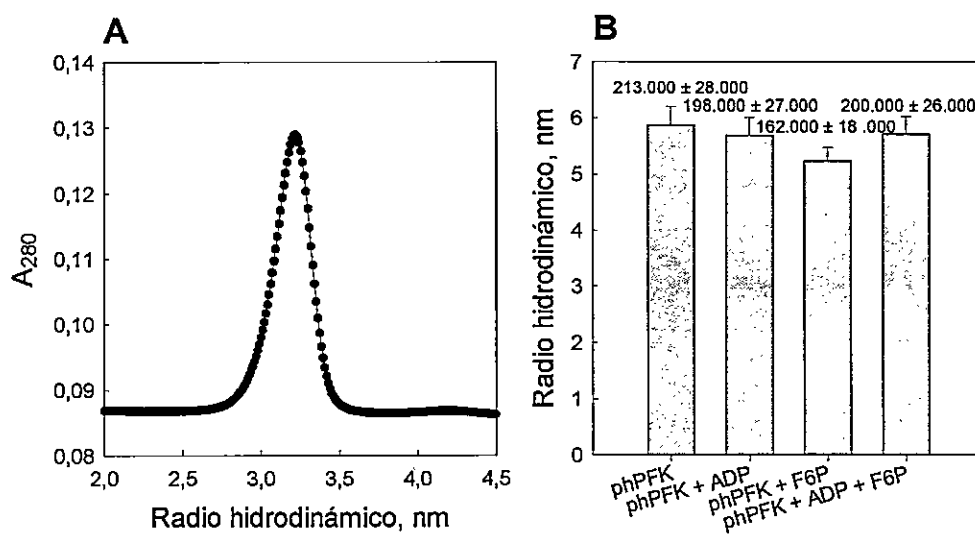


Figura 2: Estado de agregación de las quinasas dependientes de ADP. A. Cromatografía de exclusión molecular para la glucoquinasa de *T. litoralis*. B. Radio hidrodinámico de la fosfofructoquinasa de *P. horikoshii* obtenido mediante dispersión dinámica de luz en presencia y ausencia de sus sustratos a 55 °C. La masa molecular relativa correspondiente se indica en la figura.

### 3.1.2. Caracterizaciones cinéticas

La fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *P. horikoshii* muestra curvas de saturación hiperbólica para ambos sustratos (Figura 3). A diferencia de las fosfofructoquinasas dependientes de ATP, ésta no muestra inhibición a altas concentraciones del nucleótido, lo cual es un rasgo característico de las fosfofructoquinasas de esta familia (Tuininga *et al.*, 1999; Ronimus *et al.*, 1999; Verhees *et al.*, 2001; Sakuraba *et al.*, 2002). Esta enzima muestra valores de  $K_M$  de 15 y 13  $\mu\text{M}$  para fructosa-6-P y MgADP respectivamente y una constante catalítica de 44,5  $\text{s}^{-1}$ . Esta es la segunda fosfofructoquinasa ADP dependiente reportada para esta familia con un valor de  $K_M$  en el orden micromolar para fructosa-6-P siendo la primera la enzima bifuncional glucoquinasa/fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *Methanocaldococcus jannaschii* (Verhees *et al.*, 2001; Sakuraba *et al.*, 2002). Tanto la fosfofructoquinasa de *T. litoralis* como la proveniente de *P. furiosus* muestran valores de  $K_M$  en el orden milimolar. La razón de esta diferencia no es clara.

La glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* muestra también curvas de saturación hiperbólica para ambos sustratos, con una ligera inhibición a altas concentraciones de glucosa (Figura 4), la que no depende de la concentración de MgADP (no mostrado). Los valores de  $K_M$  son 0,43 y 0,019 mM para glucosa y MgADP en concordancia con los valores reportados anteriormente para esta enzima (Koga *et al.*, 2000). Sin embargo, la constante catalítica de 41,1  $\text{s}^{-1}$  es menor a la de 64,5  $\text{s}^{-1}$  reportada anteriormente (Koga *et al.*, 2000).

Como primera aproximación al estudio del mecanismo cinético de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*, se estudió la variación de los parámetros cinéticos para un sustrato en función de la variación en la concentración del cosustrato. La figura 5 muestra las gráficas de dobles recíprocos para ambos sustratos a distintas

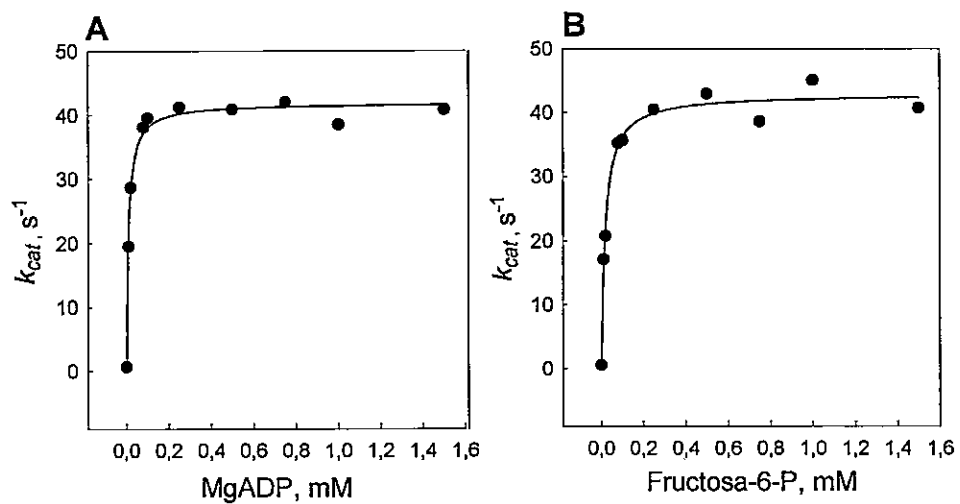


Figura 3: Dependencia de la constante catalítica con la concentración de sustrato para la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *P. horikoshii*. A. Saturación para MgADP. B. Saturación para fructosa-6-P.

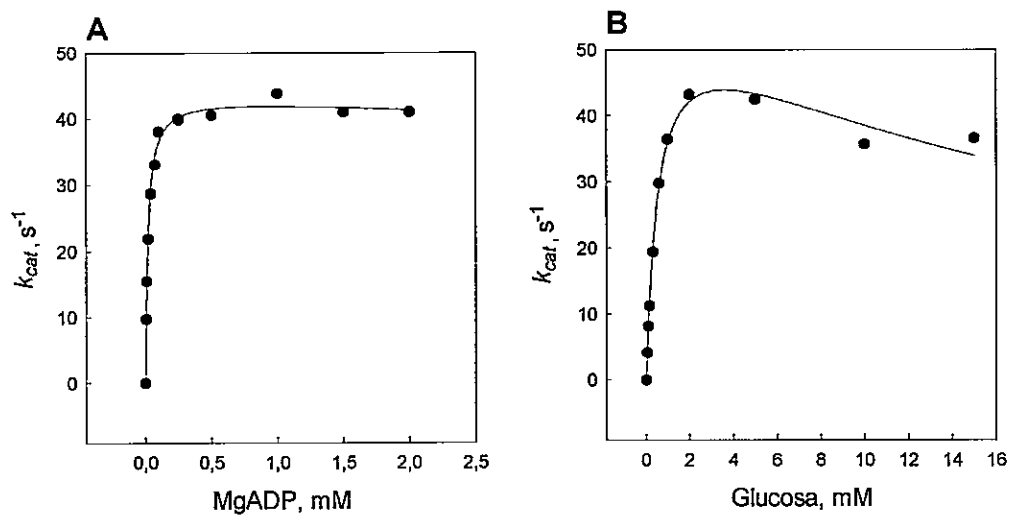


Figura 4: Dependencia de la constante catalítica con la concentración de sustrato para la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*. A. Saturación para MgADP. B. Saturación para glucosa.

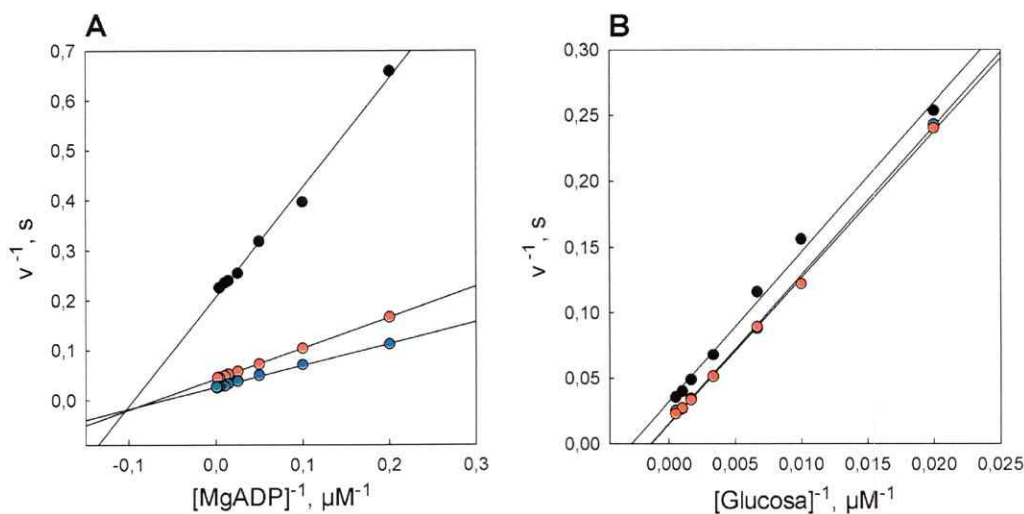


Figura 5: Gráficos de dobles recíprocos para la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* a distintas concentraciones de MgADP y glucosa. **A.** Dobles recíprocos para MgADP a 0,04 (negro), 0,4 (azul) y 4 mM (rojo) de glucosa. **B.** Dobles recíprocos para glucosa a 0,05 (negro), 0,5 (rojo) y 2 mM (azul) de MgADP.

concentraciones del cosustrato. Sólo la sección con comportamiento hiperbólico de las curvas de saturación fue considerada para los gráficos de dobles recíprocos.

Cuando el sustrato variable es glucosa, las curvas de dobles recíprocos son paralelas con pendientes de 11,37, 11,28 y 11,12  $\mu M^{-1} s^{-1}$  para 0,05, 0,5 y 2 mM de MgADP respectivamente. Este comportamiento es típico de enzimas con mecanismo *ping-pong* de catálisis. Sin embargo, hasta la fecha, no existe prueba de la existencia de alguna fosfotransferasa que presente este mecanismo. Adicionalmente, no se ha reportado la existencia de un intermediario en la reacción en donde la enzima esté unida covalentemente al grupo fosfato transferido, requerimiento para un meca-



nismo de este tipo. En la estructura cristalina de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* tampoco se observan pruebas de unión covalente entre el  $\beta$ -fosfato del ADP y la enzima (Ito *et al.*, 2001). Esto sugiere que es poco probable que la enzima esté operando con un mecanismo de este tipo.

Tanto el valor de  $K_M$  como el de  $k_{cat}$  para MgADP aumentan al aumentar la concentración de glucosa (Figura 5). Las curvas de dobles recíprocos muestran pendientes de 2,19, 0,62 y 0,44  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  para 0,04, 0,4 y 4 mM glucosa respectivamente. Estas se intersectan en el tercer cuadrante del plano cartesiano. Esto es consistente con un mecanismo al azar de unión de sustratos donde se observa antagonismo entre ellos (Segel, 1975). Adicionalmente se sabe que esta enzima es capaz de unir MgADP en ausencia de glucosa ya que ha sido posible obtener cristales en esta condición (Ito *et al.*, 2001).

Mediante cromatografía de exclusión molecular en presencia de ADP muestran unión del nucleótido por el método de Hummel-Dreyer (no mostrado). Sin embargo, para probar la hipótesis del mecanismo al azar es necesario demostrar que existe unión de glucosa a la enzima libre.

## 3.2. Estudios de estabilidad

### 3.2.1. Desplegamiento de la glucoquinasa de *T. litoralis*

Los estudios de fluorescencia intrínseca de esta enzima se realizaron excitando la muestra a 295 nm, longitud de onda a la cual absorben sólo los residuos de triptofano. El espectro de fluorescencia de la enzima nativa muestra un máximo de emisión a 334 nm (Figura 6). Este valor corresponde a la emisión de los 4 triptofanos presentes en esta proteína, donde 3 de ellos (W97, W111 y W113) se encuentran en el dominio

menor de la enzima mientras que el restante (W12) se encuentra en el dominio mayor. El máximo de emisión observado sugiere que los triptofanos se encuentran en un ambiente apolar, lo que es consistente con su superficie expuesta al solvente (ASA) calculada por el servidor VADAR<sup>5</sup> a partir de la estructura cristalográfica (Willard *et al.*, 2003). Los valores son de 0 %, 9 %, 2 % y 24 % para los triptofanos 12, 97, 111 y 113 respectivamente.

El espectro de fluorescencia de la proteína desplegada en GdmHCl 6 M muestra un máximo de emisión a 351 nm. Este valor es similar al obtenido para el análogo de triptofano N-acetil-triptofanamida (NATA) en solvente acuoso, lo que sugiere que en esta condición los 4 triptofanos se encuentran completamente expuestos al solvente (Figura 6). Esto muestra que el uso de la fluorescencia intrínseca de triptofanos es adecuado para los estudios de desplegamiento, ya que estas sondas abarcan gran parte de la proteína y adicionalmente son sensibles a los cambios estructurales producidos por el desplegamiento de la cadena polipeptídica.

En la figura 7 se muestran las curvas de estabilidad obtenidas a 40 °C mediante mediciones de actividad enzimática y fluorescencia intrínseca. A pesar de que el desplegamiento fue seguido durante 2 semanas las curvas de desplegamiento y replegamiento no se superponen. Sin embargo se observa un grado de replegamiento significativo a concentraciones pequeñas de GdmHCl ya que es posible recuperar al menos un 50 % de la actividad de la enzima en condiciones nativas. Es posible ver una disminución progresiva de la concentración de GdmHCl necesaria para obtener la mitad del cambio ( $C_m$ ) en el tiempo (donde  $C_m = \Delta G_{H_2O} m^{-1}$ , ver Apéndice A), aún cuando han transcurrido dos semanas de experimento (Figura 7, Inserto). Cuando la curva de desplegamiento de dos semanas se ajusta a la ecuación (1) se obtienen

<sup>5</sup> Servidor disponible en <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar/>

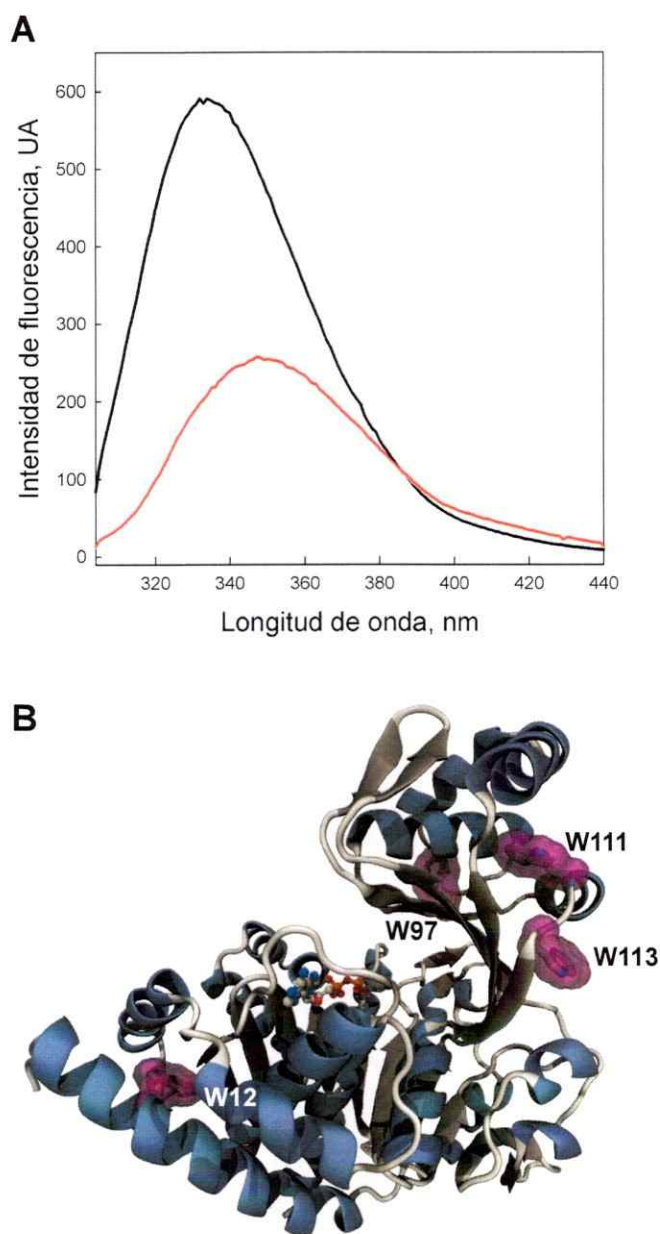


Figura 6: **A.** Espectro de fluorescencia de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* en condiciones nativas (—) y en presencia de 6 M de GdmHCl (—) utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm. **B.** Posición de los cuatro residuos de triptofano en la estructura de la glucoquinasa de *T. litoralis*.

valores de  $\Delta G_{H_2O}$  y  $m$  de 12,9 kcal mol<sup>-1</sup> y 3,68 kcal M<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> respectivamente.

Desafortunadamente no fue posible ajustar las curvas de replegamiento a la ecuación (1) debido a que ésta contiene demasiados parámetros para la cantidad de datos disponibles. Experimentos de desplegamiento al equilibrio realizados con esta enzima a valores de pH más alcalinos y temperaturas más bajas muestran una histeresis aún mayor. Sin embargo, el ajuste de la ecuación (1) a las curvas de replegamiento en esas condiciones muestra valores de  $\Delta G_{H_2O}$  y  $m$  mayores que para las curvas de desplegamiento, lo que sugiere que los valores informados para 40 °C a partir de las curvas de desplegamiento están subestimando los parámetros que se obtienen al equilibrio (Figura 7).

### 3.2.2. Cinética de desplegamiento de la glucoquinasa de *T. litoralis*

Es sabido que el proceso de desplegamiento es, en general, muy lento para proteínas provenientes de organismos termófilos (ver Luke *et al.*, 2007 y referencias en este trabajo). Por esta razón, y ya que no fue posible obtener desplegamiento en condiciones de equilibrio el proceso fue estudiado desde una perspectiva cinética.

La constante cinética de desplegamiento para diferentes temperaturas fue estimada a partir de las constantes observadas a distintas concentraciones de GdmHCl en las cuales se obtiene el 100 % de las moléculas en estado desplegado.

La figura 8 muestra el grupo de cinéticas de desplegamiento realizadas a 77,8 °C obtenidas a diferentes concentraciones de GdmHCl. En ellas es posible ver al menos un intermediario cinético de desplegamiento. Este presenta una mayor fluorescencia intrínseca de triptofanos como puede juzgarse en la figura, donde se observa que en las dos concentraciones menores de agente caotrópico utilizadas hay un aumento inicial de la fluorescencia por sobre la observada para la enzima nativa. Esta especie

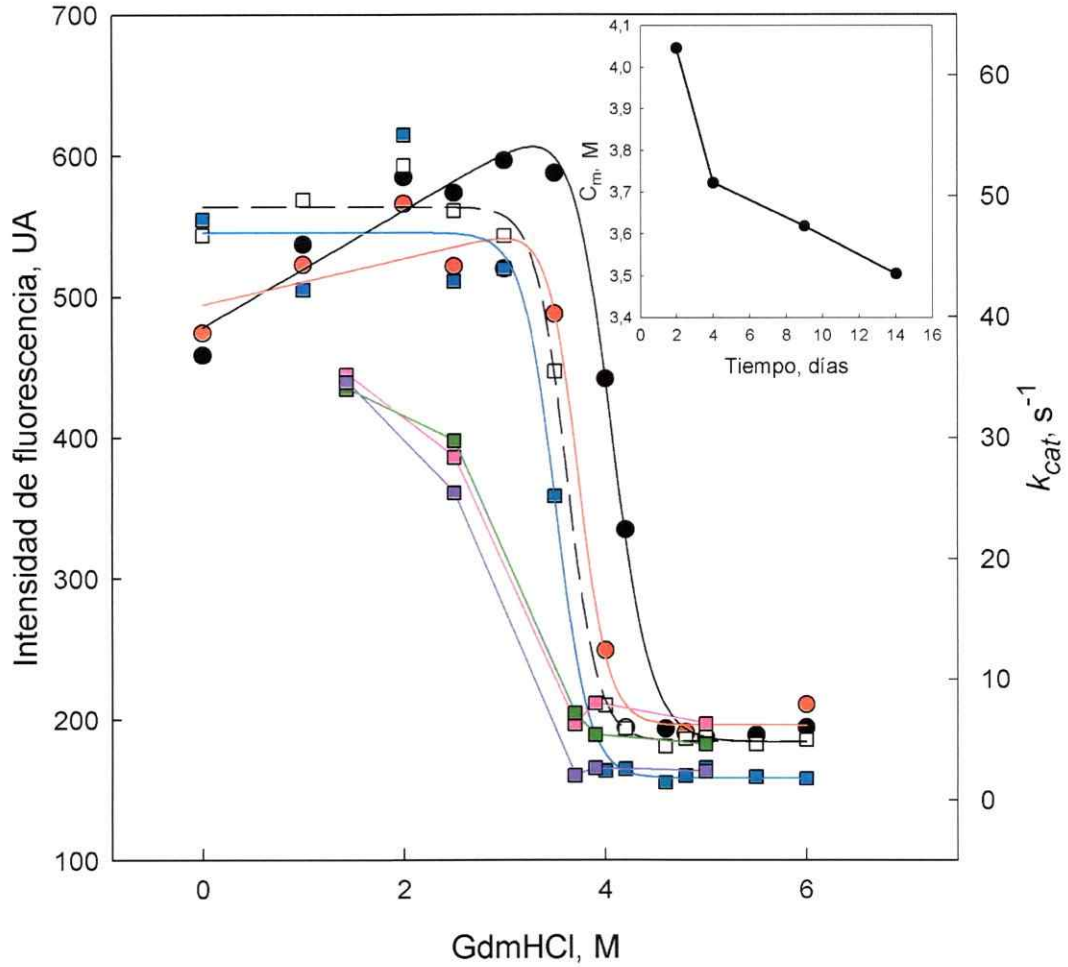


Figura 7: Curvas de desplegamiento para la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*. En círculos se muestran los resultados obtenidos por fluorescencia para el desplegamiento después de 2 (negro) y 4 días (rojo) en presencia de las concentraciones indicadas de agente desnaturante. En cuadros se muestran los resultados obtenidos por actividad enzimática para el desplegamiento después de 9 días (blanco) y dos semanas (azul) y para el replegamiento después de 2 (rosa), 5 (verde) y 12 (púrpura) días, en presencia de las concentraciones indicadas de agente desnaturante. **Inserto.** Dependencia del valor de  $C_m$  con los días transcurridos en el experimento de desplegamiento.

sólo puede ser observada a concentraciones de GdmHCl donde el desplegamiento es más lento. Debido a que el intermediario no se observa en concentraciones mayores de GdmHCl el desplegamiento se analizó sólo en términos de la constante cinética para el último paso del desplegamiento, el que parece ser el paso limitante.

Independiente de la temperatura analizada, el logaritmo natural de la constante cinética de desplegamiento del intermediario depende linealmente con la concentración de agente caotrópico (Figura 9). Al extrapolar el valor de la constante para 0 M de GdmHCl se observa que para todas las temperaturas analizadas el proceso es muy lento en comparación con el mismo parámetro observado en proteínas mesófilas (Tabla 1). Por ejemplo, el  $\ln k_u$  medido a 50 °C para la proteasa  $\alpha$ -lítica, una de las proteínas mesófilas de desplegamiento más lento conocido es -12,2 (Jaswal *et al.*, 2005). En cambio el  $\ln k_u$  para la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* es -21,9 a 54,3 °C. La vida media calculada a partir de la constante extrapolada para esta proteína a 77,8 °C es de aproximadamente 76 días lo que sugiere que esta enzima es estable a la temperatura a la que la arquea *Thermococcus litoralis* vive ( $\sim 80$  °C). A través del análisis de la dependencia de la constante cinética de desplegamiento con la temperatura es posible obtener los parámetros termodinámicos que describen el paso desde la estructura nativa al estado de transición utilizando el formalismo propuesto por Eyring (1935). Dado que la formación del intermediario no fue tomada en cuenta en este análisis, los valores obtenidos se aplican al paso desde el intermediario cinético al estado de transición.

La figura 9 muestra la variación del  $\ln(k_u/T)$  con el cambio de  $T^{-1}$ . En el intervalo de temperatura ensayado es posible ver una dependencia lineal entre estas dos variables. Utilizando la ecuación (3) es posible obtener un  $\Delta H^\ddagger$  de 55,6 kcal mol<sup>-1</sup> y un  $\Delta S^\ddagger$  de 0,11 kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> para el proceso. Esto muestra que el proceso de

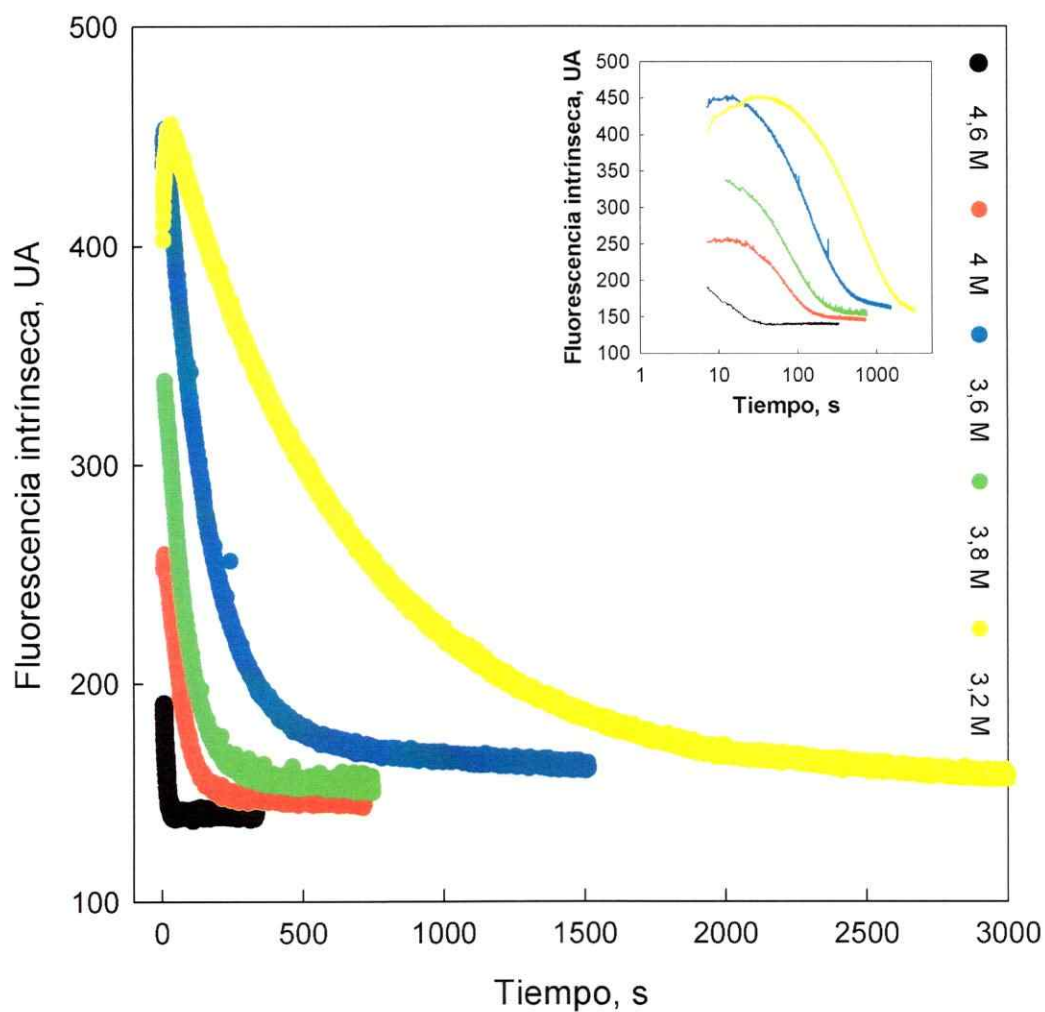


Figura 8: Despliegamiento en el tiempo de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* medido por fluorescencia a 77,8 °C en presencia de distintas concentraciones de GdmHCl. **Inserto.** Igual al gráfico principal con el tiempo en escala logarítmica para mostrar la presencia del intermediario cinético a tiempos cortos del experimento.

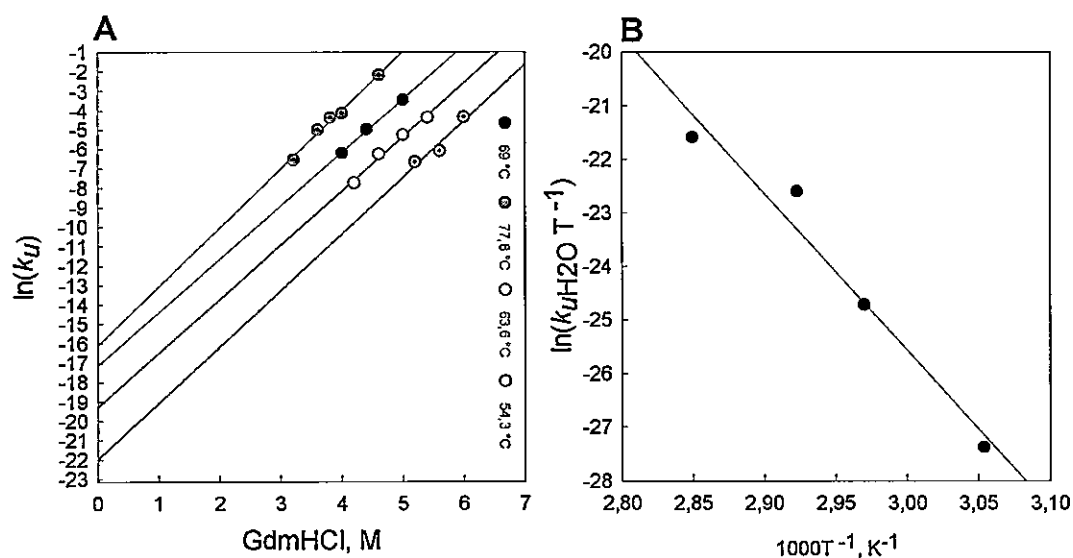


Figura 9: Dependencia de la constante cinética de desplegamiento con la temperatura para la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*. A. Dependencia de la constante cinética de desplegamiento con la concentración de GdmHCl a distintas temperaturas. B. Gráfico de Eyring para la constante cinética de desplegamiento extrapolada a GdmHCl 0 M para cada temperatura.

Tabla 1: Parámetros cinéticos de desplegamiento para la glucoquinasa de *T. litoralis*

Temperatura	$k_u(H_2O)$	$m^a$	$t_{1/2}$
$^{\circ}C$	$s^{-1}$	$M^{-1}s^{-1}$	días
54,3	$2,9 \cdot 10^{-10}$	2,9	27.260
63,6	$4,4 \cdot 10^{-9}$	2,8	1.834
69	$3,7 \cdot 10^{-8}$	2,7	216
77,8	$1,0 \cdot 10^{-7}$	3	76

<sup>a</sup>Dependencia entre la concentración de GdmHCl y la constante cinética de desplegamiento observada



despliegamiento está desfavorecido entálpicamente.

### 3.3. Caracterización bioinformática

#### 3.3.1. Modelado de la glucoquinasa dependiente de ADP de *M. acetivorans*

Debido a que hasta ahora no se ha publicado la estructura de una enzima de la familia de quinasas dependientes de ADP proveniente de un organismo mesófilo, la estructura de la glucoquinasa dependiente de ADP de *M. acetivorans* fue modelada a partir de las estructuras de las glucoquinasas pertenecientes a *P. furiosus* (Ito *et al.*, 2003), *P. horikoshii* (Tsuge *et al.*, 2002) y *T. litoralis* (Ito *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a que la identidad de secuencia de los moldes con la secuencia a modelar es alrededor del 25 %, la calidad esperada del modelo resultante no es muy alta por lo que sólo se utilizará para comparaciones que involucren un conocimiento de la estructura a baja resolución.

La tabla 2 muestra la distribución de ángulos diedros para cada modelo calculada por PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) en conjunto con el puntaje otorgado a cada modelo por los programas Prosa2003 (Sippl, 1993), ProQ (Wallner y Elofsson, 2003) y verify3D (Lüthy *et al.*, 1992). Como fue mencionado anteriormente, la calidad de los modelos es baja, especialmente en términos de los ángulos diedros del esqueleto polipeptídico. Adicionalmente, los modelos generados presentan problemas de contactos locales, como puede juzgarse a partir del valor de  $z$  de pares obtenido en Prosa2003.

Tabla 2: Evaluación de la calidad de los modelos construidos para la glucoquinasa dependiente de ADP de *M. acetivorans*

	ProQ		verify3D <sup>a</sup>	PROCHECK				Prosa2003		
	MaxSub	Lg		Núcleo (%)	Permitida (%)	Generalmente permitida (%)	No permitida (%)	z-combined	z-par	z-surface
1	4,68	0,45	168,37	87,5	9,5	2	1	-10,19	-6,34	-7,72
2	5,34	0,5	174,64	87	9,5	1,5	2	-10,38	-6,3	-7,97
3	4,72	0,45	164,78	87,2	10	1	1,8	-10,06	-5,84	-7,89
4	4,72	0,42	172	87,5	9,5	1,3	1,8	-10,26	-6,05	-7,99
5	5,52	0,51	173,75	89,2	8,8	1,5	0,5	-10,24	-6,31	-7,81
6	4,75	0,43	161,46	88,2	9	1,5	1,3	-10,14	-5,95	-7,91
7	4,83	0,46	162,64	89	8,5	1,5	1	-10,36	-6,56	-7,79
8	5,08	0,47	159,13	89,2	8,5	1,5	1,8	-10,15	-6,03	-7,87
9	5	0,46	163,49	87,5	9	1,5	2	-10,16	-5,88	-7,99
10	4,89	0,48	164,3	90	8,3	0,8	1	-10,13	-6,31	-7,67
11	5,42	0,49	165,84	90	7,3	1,5	1,3	-10,49	-6,32	-8,08
12	5,06	0,48	162,74	88	9,5	1,5	1	-10,02	-6,14	-7,66
13	4,72	0,45	167,71	89	9	1	1	-9,86	-6,17	-7,45
14	4,99	0,45	160,12	88,2	9,5	1	1,3	-9,99	-5,92	-7,76
15	5,16	0,52	185,48	87,7	9	1,5	1,8	-10,18	-6,16	-7,82
								Valor esperado <sup>b</sup>		
								-13,07	-9,54	-9,02

<sup>a</sup>El valor mostrado es la suma de el puntaje para cada residuo en la proteína

<sup>b</sup>El valor esperado para el puntaje arrojado por Prosa2003 para una secuencia del largo de la glucoquinasa ADP dependiente de *M. acetivorans*.

### 3.3.2. Alineamientos de secuencia y análisis de posiciones conservadas

Para buscar determinantes de función en la familia de quinasas dependientes de ADP se utilizó el algoritmo para la búsqueda de mutaciones correlacionadas basado en información mutua desarrollado por Mirny y Gelfand (2002). Si bien este procedimiento fue desarrollado inicialmente para buscar determinantes de función en proteínas parálogas, la aplicación del método en este grupo de secuencias no arrojó determinantes de función en esta familia, los cuales son conocidos a partir de otros estudios realizados por nuestro grupo (Merino y Guixé, 2008). En contraste, el algoritmo encuentra 9 posiciones que parecen estar relacionadas con las diferencias entre proteínas de organismos termófilos y mesófilos. Sin embargo, la relación de las diferencias observadas con la estabilidad de las proteínas de organismos termófilos no es clara.

El resultado anterior sugiere que la termoestabilidad en estas enzimas no es organismo-específica. Sin embargo, debido a la ausencia de una estructura cristalográfica de una enzima mesófila para esta familia y a la baja calidad de los modelos de estructura realizados para la glucoquinasa dependiente de ADP de *M. acetivorans* no es posible poner a prueba esta hipótesis. Desafortunadamente, esta es la glucoquinasa mesófila dependiente de ADP más similar en términos de identidad de secuencia conocida.

### 3.3.3. Caracterización estructural de la superfamilia riboquinasa

Estudios anteriores han demostrado que el orden de contacto se relaciona con la constante cinética de replegamiento en proteínas pequeñas, globulares y de un solo dominio (Plaxco *et al.*, 1998). Como una aproximación al estudio de la relación entre la constante cinética de plegamiento y las adaptaciones a altas temperaturas

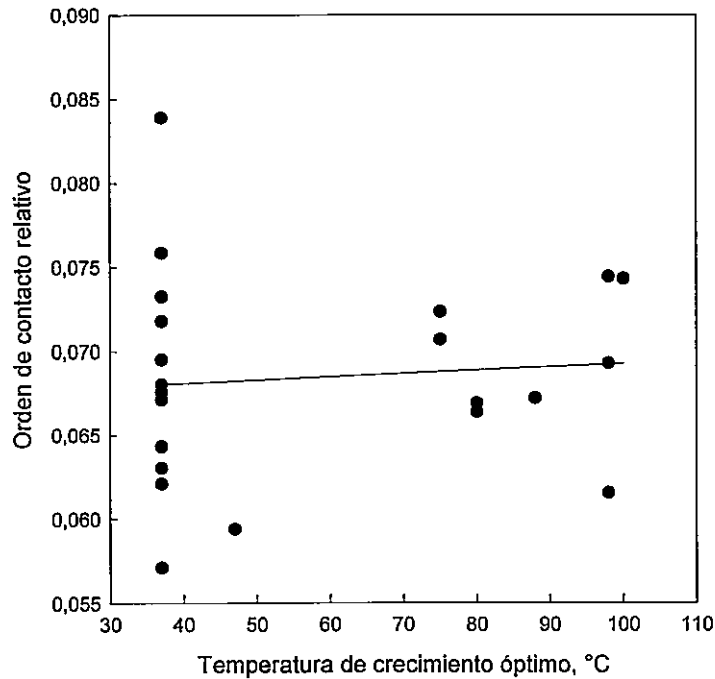


Figura 10: Análisis de correlación del orden de contacto de los residuos de 23 proteínas de la superfamilia riboquinasa normalizado por el largo de su secuencia con la temperatura de crecimiento óptimo del organismo de donde provienen.

en la superfamilia riboquinasa se calculó el orden de contacto de 23 estructuras de la familia (Tabla 3) el que fue correlacionado con la temperatura de crecimiento óptimo del organismo de donde provienen. La figura 10 muestra la dependencia entre estos dos parámetros. Del análisis del gráfico es evidente que no existe correlación entre ellos, en concordancia con la observación de que la constante cinética de plegamiento para proteínas termófilas es similar al de proteínas mesófilas (Luke *et al.*, 2007).

Para estudiar la dependencia de la composición aminoacídica con la temperatura

Tabla 3: Estructuras cristalográficas utilizadas en la caracterización de la superfamilia riboquinasa.

	PDB ID	Organismo	Temperatura de crecimiento óptimo (°C)	Estado de agregación	Función	
ADP-Dependientes	1UA4	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	Dímero	Glucoquinasa	
	1GC5	<i>Thermococcus litoralis</i>	88	Monómero	Glucoquinasa	
	1L2L	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	98	Monómero	Glucoquinasa	
	1U2X	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	98	Tetrámero	Fosfofructoquinasa	
Sin Dominio Menor	1EKQ	<i>Bacillus subtilis</i>	37	Trímero	Hidroxietil thiazol quinasa	
	1JXH	<i>Salmonella typhimurium</i>	37	Dímero	4-Amino-5-hydroximetil-2-metil pirimidina fosfato quinasa	
	1KYH	<i>Bacillus subtilis</i>	37	Tetrámero	Función desconocida	
	1LHP	<i>Ovis Aries</i>	37	Dímero	Piridoxal quinasa	
	1TD2	<i>Escherichia coli</i>	37	Dímero	Piridoxamina quinasa	
	1UB0	<i>Thermus thermophilus</i>	75	Dímero	Fosfometil pirimidina quinasa	
	1V8A	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	98	Trímero	Hidroxietil thiazol quinasa	
	2AX3	<i>Thermotoga maritima</i>	80	Desconocido	Función desconocida	
	2DDM	<i>Escherichia coli</i>	37	Dímero	Piridoxal quinasa	
	2F7K	<i>Homo sapiens</i>	37	Dímero	Piridoxal quinasa	
	2I5B	<i>Bacillus subtilis</i>	37	Dímero	Piridoxal quinasa	
	Con Dominio Menor	2AFB	<i>Thermotoga maritima</i>	80	Dímero	2-ceto-3-desoxigluconato quinasa
		1BX4	<i>Homo sapiens</i>	37	Monómero	Adenosina quinasa
1DGM		<i>Toxoplasma gondii</i>	37	Monómero	Adenosina quinasa	
2AJR		<i>Thermotoga maritima</i>	80	Dímero	Función desconocida	
1RKS		<i>Escherichia coli</i>	37	Dímero	Ribosa quinasa	
1TZ3		<i>Salmonella enterica</i>	37	Dímero	Amino imidazol ribosido quinasa	
1V1A		<i>Thermus thermophilus</i>	75	Dímero	2-ceto-3-desoxigluconato quinasa	
2ABQ		<i>Bacillus halodurans</i>	47	Dímero	1-fosfofructoquinasa	

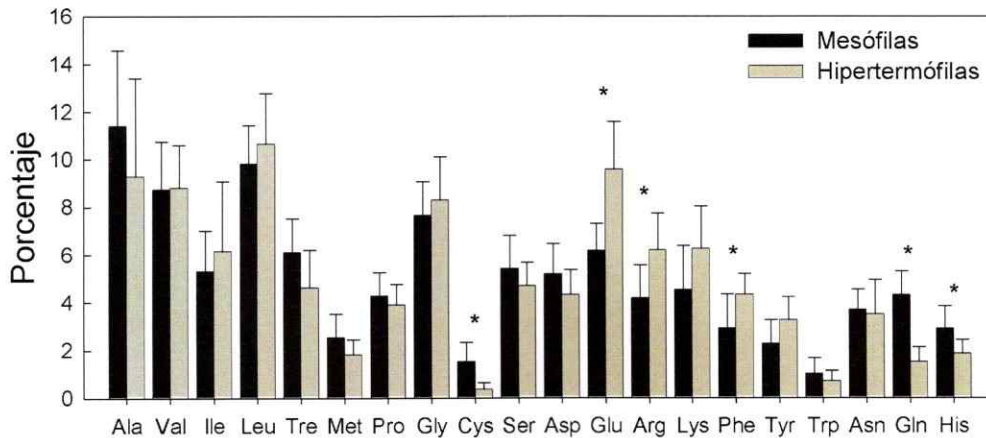


Figura 11: Comparación del contenido porcentual de los distintos aminoácidos en proteínas pertenecientes a la superfamilia riboquinasa provenientes de organismos mesófilos e hipertermófilos. Los aminoácidos con diferencias significativas se indican con un asterisco en la figura.

de crecimiento de los organismos, se calculó el porcentaje de cada residuo aminoacídico en las 23 estructuras mencionadas anteriormente. Se observó un aumento significativo del porcentaje de residuos de ácido glutámico, arginina y fenilalanina junto con una disminución de los residuos cisteína, asparragina e histidina para proteínas termófilas (Figura 11) (prueba de t de Student). No fue posible observar otras tendencias reportadas para proteínas de organismos termófilos como una disminución de serinas y treoninas (Chakravarty y Varadarajan, 2000).

Adicionalmente se observa correlación significativa (prueba no paramétrica de Spearman,  $p > 0,05$ ) que muestra un aumento de la cantidad de residuos ionizables y los residuos aromáticos con la temperatura de crecimiento óptimo de los organismos

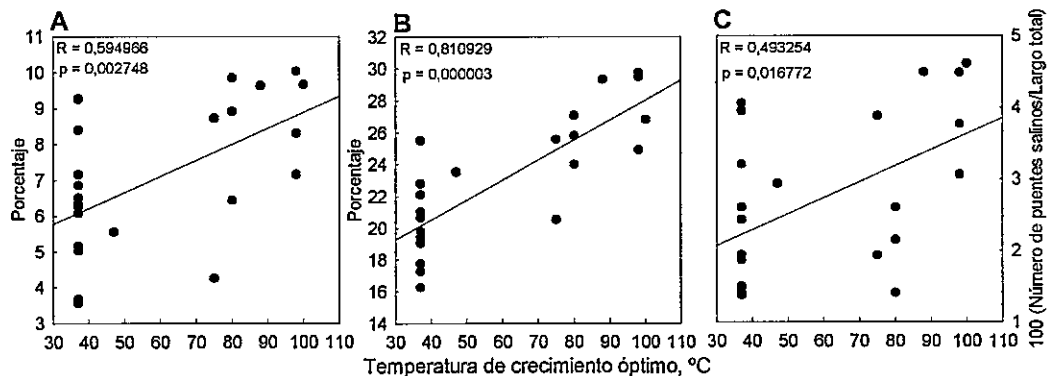


Figura 12: Análisis de correlación entre la temperatura de crecimiento óptimo y la cantidad de residuos aromáticos (A), la cantidad de residuos ionizables (B) y la cantidad de puentes salinos (C) en 23 proteínas de la superfamilia riboquinasa.

(Figura 12). Es interesante destacar que también existe una correlación entre la cantidad de puentes salinos calculados a partir de las estructuras cristalinas con la temperatura de crecimiento del organismo. Sin embargo, esta correlación es mucho más débil que la que se observa para los residuos ionizables, lo que sugiere una contribución importante de las interacciones electrostáticas de largo alcance a la estabilidad de las proteínas a altas temperaturas (Figura 12).

## 4. Discusión

### 4.1. Caracterización bioquímica de las quinasas dependientes de ADP

Tanto los parámetros cinéticos como el estado de agregación obtenidos en el presente estudio para la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* se encuentran en buen acuerdo con los publicados por otros grupos para esta enzima (Koga *et al.*, 2000). Para la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *P. horikoshii* no existen caracterizaciones bioquímicas publicadas a la fecha. Sin embargo, la fosfofructoquinasa de *P. furiosus*, un homólogo cercano, ha sido clonada y caracterizada (Tuininga *et al.*, 1999). Su estado de agregación es tetramérico al igual que la proveniente de *P. horikoshii*. A diferencia de la quinasa caracterizada por el grupo de Tuininga, la estudiada en este trabajo presenta valores de  $K_M$  alrededor de dos órdenes de magnitud menor, lo que sugiere una mayor afinidad de esta enzima por sus dos sustratos. Debido a que estas dos arqueas son filogenéticamente bastante cercanas y viven en ambientes similares no es clara la explicación para esta diferencia.

En la familia de quinasas dependientes de ADP se han descrito enzimas con estados de agregación monoméricos (Koga *et al.*, 2000; Verhees *et al.*, 2001; Sakuraba *et al.*, 2002), diméricos (Koga *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2003) y tetraméricos (Tuininga *et al.*, 1999). Adicionalmente en la superfamilia riboquinasa se observan distintos estados de agregación desde monómeros hasta hexámeros (Tabla 3). Los datos reunidos en la tabla 3 sugieren que el estado de agregación en esta superfamilia está relacionado con la función de cada enzima y no con la estabilidad térmica, como ha sido publicado anteriormente para otros grupos de proteínas (Walden *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2002).



La variación de los parámetros cinéticos para glucosa con respecto a la concentración de MgADP en la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* (Figura 5) muestra un comportamiento típico de una enzima con mecanismo tipo *ping-pong*. A la fecha no existe registro de una fosfotransferasa con este tipo de mecanismo. De ser este el caso, necesariamente el MgADP debería ser el primer sustrato en unirse a la enzima para transferirle el grupo fosfato. Para probar este mecanismo debería obtenerse MgAMP a partir de la enzima incubada sólo en presencia de MgADP. Un gráfico de dobles recíprocos con pendientes muy similares tenderán a intersectarse muy lejos de la zona en donde se grafican los datos experimentales, dando la apariencia de curvas paralelas, lo que podría explicar los resultados obtenidos en ausencia de un mecanismo con intermediarios enzima-ligando covalentemente unidos. En el caso de la variación de los parámetros cinéticos para MgADP con la concentración de glucosa, las curvas son consistentes con un mecanismo al azar de adición de sustratos en donde existe antagonismo de unión entre ellos (Segel, 1975). Para probar que una enzima presenta un mecanismo de tipo *ping-pong* es necesario que los gráficos de dobles recíprocos para ambos sustratos muestren curvas paralelas, sin embargo, las curvas para MgADP desestiman la hipótesis del mecanismo con intermediario covalente.

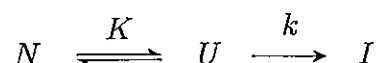
Experimentos de dispersión dinámica de luz para la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *P. horikoshii* muestran que el radio hidrodinámico se ve modificado en presencia de cada uno de los sustratos (Figura 2). Esto muestra que la enzima es capaz de unir ambos sustratos por separado, lo que sugiere un mecanismo cinético al azar de adición de sustratos. Ya que el cambio en el radio hidrodinámico de esta enzima tras la unión de los sustratos es suficientemente pequeño es claro que no hay cambio en el estado de agregación a diferencia de otras fosfofructoquinasas

dependientes de ATP de la superfamilia (Baez *et al.*, 2008).

Es importante destacar el hecho de que las fosfofructoquinasas de esta familia no son inhibidas por el sustrato ADP ya que la inhibición por ATP en las fosfofructoquinasas que utilizan este nucleótido es clave para evitar la generación de un ciclo fútil en la glicólisis (Torres *et al.*, 1997). En el caso de los *thermococcales* la ausencia de inhibición puede ser explicada ya que al fin de esta glicólisis modificada AMP, fosfoenol piruvato y fosfato inorgánico son usados para producir ATP (Sakuraba *et al.*, 2004).

#### 4.2. Estudios de desplegamiento por GdmHCl

Como se puede observar en la figura 7, no fue posible obtener condiciones de equilibrio para la glucoquinasa de *T. litoralis*. Sin embargo, el proceso no es completamente irreversible ya que es posible recuperar alrededor de un 50 % de la actividad cuando la enzima es replegada a GdmHCl 1 M. La histeresis observada puede ser provocada cinéticamente o por la presencia de un intermediario irreversible en donde al equilibrio  $N \xrightleftharpoons{K} U$  se suma la aparición de una especie  $I$  que se relaciona al equilibrio de desplegamiento de la forma



en donde el paso de  $U$  a  $I$  esta controlado cinéticamente. Al analizar la dependencia de la concentración de agente desnaturante a la que se obtiene la mitad del cambio en las curvas de estabilidad  $C_m$  (Figura 7) se observa que entre los 4 días de experimento y las dos semanas, éste disminuye alrededor de 0,2 M mientras que las curvas de replegamiento parecen estacionarse a los 5 días. Esto sugiere que la histéresis puede

ser de tipo cinético y que las condiciones de equilibrio se alcanzarían en tiempos mayores. Para la dihidrofolato reductasa de *Thermotoga maritima* se ha reportado que el equilibrio no se puede alcanzar en tiempos razonables para temperaturas bajo 50 °C en donde se observa una fuerte histéresis principalmente debido a que el proceso de desplegamiento es demasiado lento (Dams y Jaenicke, 1999). Es posible que para la glucoquinasa de *T. litoralis* el equilibrio de desplegamiento se alcance a temperaturas mayores.

Se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre el  $\Delta C_p$  (cambio de calor específico a presión constante) de desplegamiento, la diferencia entre la superficie expuesta al solvente de la proteína plegada y desplegada y el valor  $m$  de desplegamiento (ver ecuación 1 (Myers *et al.*, 1995). Suponiendo que en el estado desplegado de la glucoquinasa de *T. litoralis* la cadena polipeptídica se encuentra completamente extendida, uno podría esperar un cambio de superficie expuesta al solvente entre el estado nativo y el desplegado de aproximadamente 42.500 Å<sup>2</sup> y un valor de  $m$  de 10,2 kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> (Myers *et al.*, 1995). El valor  $m$  estimado de esta manera es mucho mayor al observado experimentalmente en las curvas fuera del equilibrio. Experimentos realizados a temperatura ambiente con esta enzima muestran que el valor  $m$  no debería sobrepasar 8,03 kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> por lo que es posible que el estado desplegado no se encuentre totalmente extendido.

La dependencia de la energía libre de desplegamiento con la temperatura está descrita por la ecuación

$$\Delta G = \Delta H_0 - T\Delta S_0 + \Delta C_p \left( T - T_0 + T \ln \left| \frac{T_0}{T} \right| \right) \quad (5)$$

conocida como la curva de Gibbs-Helmholtz o "curva de estabilidad" en donde  $\Delta H_0$

y  $\Delta S_0$  son en cambio en la entalpía y entropía a la temperatura de referencia  $T_0$  respectivamente. Gráficamente, la curva corresponde a una parábola que corta dos veces el eje de las abscisas. Las temperaturas en donde la energía libre es igual a cero se conocen como  $T_m$  (en una de ellas se produce la desnaturación por frío y en la otra desnaturación por calor). La temperatura donde la estabilidad es máxima es conocida como  $T_s$  ya que que el cambio de entropía en este punto es cero. Se han propuesto tres modelos termodinámicos para la estabilidad térmica de las proteínas termófilas (Figura 13). En el modelo 1 el  $\Delta C_p$  de desplegamiento es menor en proteínas termófilas causando que la curva de estabilidad sea más ancha y, por lo tanto, la  $T_m$  de desnaturación por frío disminuye y la de desnaturación por calor aumenta (Figura 13, curva roja). En el modelo 2 el cambio de energía libre a la temperatura  $T_s$  aumenta por lo que la curva se desplaza hacia arriba, de este modo la  $T_m$  de desnaturación por calor aumenta mientras que la de desnaturación por frío disminuye (Figura 13, curva azul). Por último, en el modelo 3 la temperatura de máxima estabilidad aumenta por lo que la curva se desplaza hacia la derecha para proteínas termófilas (Figura 13, curva verde). Distintas combinaciones de estos tres modelos han sido observadas en proteínas de organismos termófilos (ver Kumar *et al.*, 2001 y referencias en este trabajo).

Para una mutante libre de cisteínas de la ribonucleasa H de *T. thermophilus* se ha demostrado que la presencia de estructura residual en el estado desplegado de la enzima contribuye a la disminución del  $\Delta C_p$  de desplegamiento aumentando así la temperatura de desplegamiento por calor (Robic *et al.*, 2003). Los datos de desplegamiento obtenidos para la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* sugieren que el estado desplegado de la enzima no se encuentra completamente extendido. Debido a esto, es posible que un mecanismo similar al mencionado anteriormente

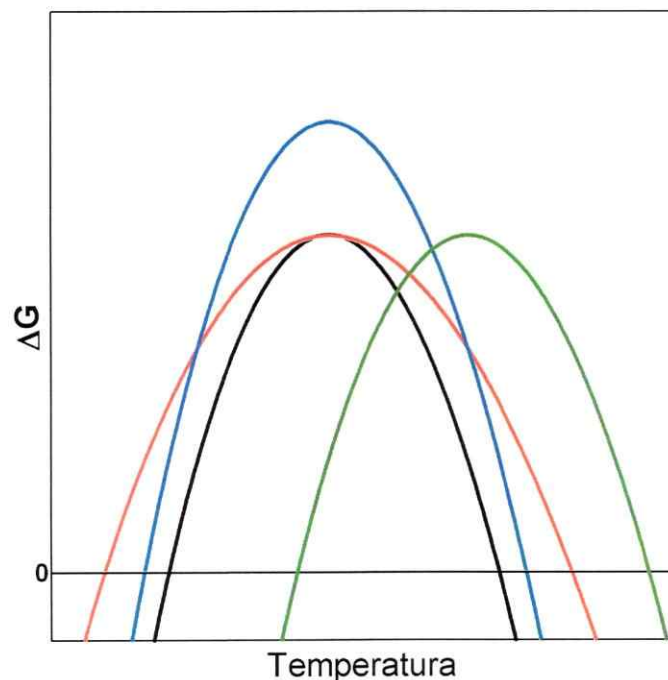


Figura 13: Curva de estabilidad para una proteína hipotética (—) así como la de tres proteínas termófilas en donde se ha disminuido el  $\Delta C_p$  sin modificar  $T_s$  (—), se ha aumentado sólo la estabilidad máxima (—) o se ha aumentado sólo  $T_s$  (—).

para la ribonucleasa H este operando para aumentar la estabilidad térmica de la glucoquinasa de *T. litoralis*.

Los estudios de la dependencia de la constante cinética de desplegamiento con la temperatura muestran que aún a temperaturas cercanas a los 80 °C el desplegamiento de esta enzima es un proceso muy lento (Figura 9, Tabla 1). El ajuste de los datos cinéticos extrapolados a GdmHCl 0 M a la ecuación (3) muestra que la barrera energética entre el estado nativo y el estado de transición es de tipo entálpico.

ca. Anteriormente se ha reportado para otras proteínas termófilas que el proceso de desplegamiento es más lento que para proteínas mesófilas, aún cuando se comparan homólogos en condiciones isoenergéticas (ver Luke *et al.*, 2007 y referencias en este trabajo). Debido a que siempre se observa este comportamiento se ha propuesto el control cinético del desplegamiento como una de las principales características de las proteínas termófilas (Luke *et al.*, 2007).

La tabla 4 muestra las constantes cinéticas de desplegamiento para varias proteínas termófilas. Aquí es posible ver que aún en condiciones de alta temperatura el proceso de desplegamiento es lento. Si bien la explicación de este fenómeno no es clara, un estudio reciente ha mostrado que podría ser consecuencia de la presencia de residuos hidrofóbicos de gran tamaño (Dong *et al.*, 2008).

Un estudio reciente sobre la estabilidad de un grupo de proteasas metaestables ha mostrado que estas presentan un gran  $\Delta C_p$  de activación en conjunto con un gran  $\Delta G^\ddagger$  (Jaswal *et al.*, 2005). En este sentido, el estado de transición de desplegamiento de estas enzimas debería exponer una mayor superficie al solvente. Debido a que el gráfico de Eyring para la glucoquinasa de *T. litoralis* es lineal en el intervalo de temperatura observado, no es posible determinar el  $\Delta C_p$  de activación directamente del ajuste para el proceso. La linealidad del gráfico puede deberse a un cambio de calor específico de activación muy pequeño o a que el intervalo de temperatura estudiado es muy limitado. Comparando la región de temperatura estudiada con el ensayado para las proteasas metaestables (Jaswal *et al.*, 2005) y para la dihidrofolato reductasa de *T. maritima* (Dams y Jaenicke, 1999) es posible ver que en esta zona el  $\ln(k_u/T)$  depende linealmente con  $T^{-1}$  y la curvatura que permite calcular el  $\Delta C_p$  sólo es posible observarla a menores temperaturas. Sin embargo, determinar la constante cinética de desplegamiento a temperaturas bajo los 40 °C se vuelve

Tabla 4: Constantes cinéticas de desplegamiento para proteínas provenientes de organismos termófilos reportadas hasta la fecha (Modificada de Luke *et al.*, 2007). Los experimentos fueron realizados a temperaturas entre 20 y 25 °C, excepto para la Ribonucleasa HII (50 °C) y la glucoquinasa ADP-dependiente (54 °C).

Proteína	Organismo	Temperatura de crecimiento óptimo	Estado de agregación	PDB ID	$k_u$
		°C			$s^{-1}$
Co-chaperonina 10	<i>Aquifex aeolicus</i>	95	Heptámero	-	$5,5 \cdot 10^{-5}$
Ferredoxina 1	<i>Aquifex aeolicus</i>	95	Monómero	1F37	$2 \cdot 10^{-12}$
Ferredoxina 5	<i>Aquifex aeolicus</i>	95	Monómero	1F37	$2 \cdot 10^{-12}$
Ferredoxina	<i>Acidianus ambivalens</i>	80	Monómero	-	$2 \cdot 10^{-4}$
Rubredoxina	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	Monómero	1ZRP	$2 \cdot 10^{-10}$
ORF56	<i>Sulfolobus islandicus</i>	>50	Dímero	-	$1,8 \cdot 10^{-7}$
proteína de estrés por frío (Cold shock protein)	<i>Thermotoga maritima</i>	80	Monómero	1G6P	0,02
Metilguanina metiltransferasa	<i>Thermococcus kodakaensis</i>	95	Monómero	-	$1,5 \cdot 10^{-7}$
Dihidrofolato reductasa	<i>Thermotoga maritima</i>	80	Dímero	1CZ3	$4,6 \cdot 10^{-12}$
Pirrolidon carboxil peptidasa	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	Tetrámero	1IOF	$1,6 \cdot 10^{-15}$
Ribonucleasa HII	<i>Thermococcus kodakaensis</i>	95	Monómero	1X1P	$5 \cdot 10^{-8}$
Glucoquinasa ADP-dependiente	<i>Thermococcus litoralis</i>	80	Monómero	1GC5	$2,94 \cdot 10^{-10}$

experimentalmente complejo debido a lo lento del proceso.

### 4.3. Caracterización de la superfamilia riboquinasa

Varios estudios han tratado el problema de la estabilidad de proteínas termófilas desde una perspectiva estructural. Sin embargo, la manera en que estas proteínas pueden mantener su estado nativo a altas temperaturas parece obedecer a reglas complejas. Anteriormente, se ha mencionado que el control cinético del desplegamiento sería una de las principales características de las proteínas termófilas (ver Luke *et al.*, 2007 y referencias en este trabajo). En este trabajo hemos demostrado que esta regla se cumple también para la glucoquinasa de *T. litoralis*. Sin embargo, debido a los problemas en la reversibilidad del proceso de desplegamiento no fue posible medir las constantes cinéticas del proceso de replegamiento. La comparación del orden de contacto relativo de 23 estructuras de la superfamilia riboquinasa mostró que este parámetro no tiene correlación con la temperatura de crecimiento óptimo de los organismos de donde provienen estas enzimas. Debido a que esta característica estructural muestra una fuerte correlación con la constante cinética de replegamiento (Plaxco *et al.*, 1998) es posible inferir que la velocidad a la que estas proteínas se pliegan es similar entre organismos mesófilos y termófilos, en buen acuerdo con lo que ha sido publicado anteriormente (ver Luke *et al.*, 2007). El orden de contacto relativo calculado para el mejor de los modelos de la glucoquinasa de *M. acetivorans* es 0,0534, valor que es bastante menor al calculado para las glucoquinasa de organismos termófilos. De hecho, es menor que los 23 valores obtenidos para los miembros de la superfamilia riboquinasa analizados, lo que sugiere un plegamiento más rápido para esta enzima. Sin embargo, debido a que el principal problema de los modelos construidos para la glucoquinasa de *M. acetivorans* radica en los contactos locales,



esto puede ser un artefacto producto de la mala calidad de los modelos obtenidos y no de una característica estructural de esta enzima (ver valor z-par, Tabla 2).

Debido a que las enzimas de la familia de quinasas dependientes de ADP de organismos mesófilos presentan una baja identidad de secuencia con las de organismos termófilos, es posible que la baja calidad de los modelos, principalmente en términos de contactos locales, se deba a problemas en los alineamientos. Posiblemente esto explique también la falta de correlación entre los resultados obtenidos mediante el análisis de posiciones conservadas (Mirny y Gelfand, 2002) y la temperatura de crecimiento de los organismos, ya que una gran cantidad de los determinantes funcionales encontrados están en regiones de baja calidad de los alineamientos. Aún así es posible que estas posiciones estén relacionadas mediante reglas más complejas con la estabilidad térmica, pero esto debe ser probado experimentalmente.

Si bien se han realizado algunos intentos para encontrar patrones de secuencias de proteínas en genomas de organismos termófilos en comparación con mesófilos, no se ha descubierto una única tendencia (ver Kumar y Nussinov, 2001). Entre las características más importantes se ha mencionado un aumento de los residuos ionizables en las secuencias así como un acortamiento de éstas para los organismos termófilos (ver Kumar y Nussinov, 2001 y referencias en este trabajo). De manera interesante, en la familia de quinasas dependientes de ADP se puede observar que la longitud de las secuencias de organismos termófilos son siempre más cortas que las secuencias de organismos mesófilos, ya sean arqueas o eucariontes en acuerdo con la tendencia informada anteriormente.

Para probar la existencia de alguna preferencia particular aminoacídica en las proteínas de organismos termófilos de la superfamilia, se calculó el porcentaje de cada residuo para 23 proteínas del grupo cuya estructura cristalográfica se encuentra

disponible (Figura 11). Es posible observar un aumento significativo del contenido de fenilalaninas, glutámicos y argininas y una disminución significativa de glutaminas, histidinas y cisteínas en las proteínas termófilas con respecto al contenido de las proteínas mesófilas. La disminución de cisteínas y glutaminas ha sido informada anteriormente en otros análisis basados en secuencia (ver Kumar y Nussinov, 2001). Al parecer las cadenas laterales con grupos amida disminuyen debido a su termolabilidad. La disminución de cisteínas por su parte, puede que esté relacionada con restricciones asociadas a la velocidad de plegamiento ya que estas cadenas laterales pueden atrapar a las proteínas en “trampas cinéticas” que hacen el proceso de plegamiento más lento.

Para un grupo de estructuras de proteínas provenientes de organismos termófilos se ha demostrado que existe la tendencia de formar conjuntos densos de residuos aromáticos que interactúan entre ellos, principalmente con sus planos aromáticos perpendiculares entre sí (Kannan y Vishveshwara, 1999). En esta conformación, los hidrógenos parcialmente positivos de un anillo interactúan con la nube  $\pi$  del anillo adyacente. Adicionalmente, se ha propuesto un aumento de los residuos hidrofóbicos de mayor superficie en proteínas de organismos termófilos (ver Kumar y Nussinov, 2001 y referencias en este trabajo). En la superfamilia riboquinasa, fue posible observar un aumento significativo de la cantidad de fenilalaninas así como una correlación significativa entre la temperatura de crecimiento óptimo y la cantidad de residuos aromáticos en la secuencia (Figura 11 y 12). Es probable que esta tendencia apunte al fortalecimiento de las interacciones hidrofóbicas en la proteína y al control cinético del desplegamiento, como fue posible demostrar para la ribonucleasa HIII de *T. kodakarensis* (Dong *et al.*, 2008). Con anterioridad se demostró mediante experimentos de transferencia entre solventes de compuestos modelo, que el efecto hidrofóbico

aumenta con la temperatura (Privalov y Gill, 1988), por lo que el fortalecimiento de estas interacciones en proteínas termófilas podría ser aún más importante a altas temperaturas.

Por largo tiempo se ha considerado que el aporte de las interacciones salinas a la estabilidad de las proteínas es pequeño. En este tipo de interacciones la gran fuerza de la interacción en el estado plegado se ve compensado por la gran penalización de desolvatación de las cadenas al pasar del estado desnaturado al nativo, por lo que el aporte neto a la estabilidad de las proteínas es marginal. Sin embargo, la tendencia más clara en proteínas termófilas es el aumento de los residuos ionizables, así como una correlación débil entre la temperatura de crecimiento óptimo y la cantidad de puentes salinos de la estructura (Kumar y Nussinov, 2001). En la superfamilia riboquinasa fue posible ver una correlación positiva tanto entre la cantidad de residuos ionizables como de los puentes salinos con la temperatura de crecimiento óptimo. De manera interesante, es posible ver que la correlación con los puentes salinos es más débil que aquella vista para los residuos ionizables, lo que sugiere que las interacciones electrostáticas de largo alcance cobran una importancia mayor. Estudios de electrostática continua han demostrado que los puentes salinos si contribuyen a la estabilidad de proteínas termófilas principalmente debido de la disminución de la constante dieléctrica del agua con la temperatura, una disminución del costo de desolvatación de residuos cargados con el aumento de la temperatura y una optimización de la interacción de los puentes salinos con el resto de la proteína (Hendsch y Tidor, 1994). Estudios de mutagénesis sistemática de residuos de cadenas laterales ionizables por alanina en la proteína ribosómica L30e de *Thermococcus celer* han mostrado que la remoción de algunas de estas cadenas laterales puede aumentar la temperatura de desnaturación en contraposición al estudio mencionado

anteriormente (Lee *et al.*, 2005). Adicionalmente, en ese estudio se demuestra que las interacciones electrostáticas de largo alcance son tan importantes como las de corto alcance para la estabilidad de la proteína (Lee *et al.*, 2005).

La importancia de los puentes salinos para la estabilidad y estructura de una mini-proteína de 20 residuos (Tc5b) fue estudiada mediante resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular (Hudáky *et al.*, 2008). En este estudio se muestra que la optimización del único puente salino en la estructura aumenta la estabilidad térmica del péptido y de manera interesante, provoca la optimización del núcleo hidrofóbico de la enzima mediante un efecto de largo alcance. En particular, en la familia de quinasas ADP dependientes la cantidad de puentes salinos en la estructura parecen aumentar de manera significativa con la temperatura de crecimiento de los organismos ya que el mejor modelo de la glucoquinasa de *M. acetivorans* sólo presenta 5 de ellos en contraste con los cerca de 20 que presentan las glucoquinasas de fuentes termófilas. Sin embargo, es posible que esta diferencia esté sobreestimada debido a la baja calidad de los modelos construidos.

El grupo de David Baker en el año 2003 fue capaz de diseñar con éxito una proteína con un plegamiento no observado en la naturaleza y con una alta estabilidad térmica y frente a los agentes caotrópicos, mediante un algoritmo que sistemáticamente optimizaba la estructura y la secuencia (Kuhlman *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando la secuencia se intenta optimizar para una estructura fija los resultados no son tan buenos. Esto muestra que si bien los campos de fuerza utilizados en el diseño de proteínas son capaces de predecir de manera gruesa la estabilidad conformacional de las proteínas, las reglas que llevan al aumento de la estabilidad térmica de éstas aún no están claras. Estudios de mutagénesis sitio-dirigida en la ribonucleasa HIII de *Thermococcus kodakarensis* han mostrado que existe un compromiso entre la

actividad y la estabilidad de la enzima (Mukaiyama *et al.*, 2006). En este trabajo se demostró mediante mutagénesis sitio-dirigida que la mayoría de los residuos que forman parte del sitio activo de la enzima disminuyen la estabilidad de la proteína. La misma tendencia ha sido observada en enzimas provenientes de organismos mesófilos (Meiering *et al.*, 1992; Shoichet *et al.*, 1995). Esto sugiere que el diseño de enzimas termoestables útiles para procesos industriales estará limitado por el conocimiento que se tenga del plegamiento que se está utilizando así como su relación con la función enzimática y la inclusión de estos factores en las estrategias de diseño racional de las proteínas.

Los resultados informados aquí, en conjunto con la literatura citada, sugieren que los determinantes de la estabilidad térmica de las proteínas no se encuentran en la estructura nativa. En contraste, es posible que la estructura del estado desplegado en conjunto con la manera en la que el estado de transición de desplegamiento se conecta con la estructura plegada de la proteína sean la clave de la estabilidad a altas temperaturas.

## 5. Conclusiones

- La fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *P. horikoshii* forma tetrameros en condiciones nativas y presenta cinéticas de saturación hiperbólicas para sus dos sustratos.
- Pruebas cinéticas como estructurales sugieren que tanto la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis* como la fosfofructoquinasa dependiente de ADP de *P. horikoshii* presentan mecanismos al azar de adición de sustrato.
- Los experimentos de desplegamiento por agente caotrópico de la glucoquinasa de *T. litoralis* sugieren que el estado desplegado de la enzima contiene estructura residual. Sin embargo, es necesario conseguir condiciones de equilibrio para probar esta hipótesis. Posiblemente experimentos a mayores temperaturas resuelvan este problema.
- La glucoquinasa de *T. litoralis* muestra constantes cinéticas de desplegamiento pequeñas aún a temperaturas altas, lo que sugiere que en esta enzima la estabilidad térmica es resultado de la lentitud del desplegamiento, como ha sido reportado anteriormente para otras proteínas provenientes de organismos hipertermófilos.
- El análisis de secuencias realizado para la superfamilia riboquinasa muestra que existe un aumento significativo de los residuos arginina, glutámico y feni-

lalanina y una disminución de los residuos cisteína, glutamina e histidina en las proteínas de organismos termófilos con respecto a las proteínas de organismos mesófilos, en concordancia con lo que ha sido publicado anteriormente.

- La cantidad de residuos ionizables y aromáticos muestran una correlación positiva con la temperatura de crecimiento óptimo de los organismos. La cantidad de puentes salinos también muestra esta correlación aunque de manera más débil. Esto sugiere que tanto las interacciones iónicas de largo alcance como las de corto alcance son importantes para la estabilidad térmica de las enzimas.

## 6. Rereferencias

- Baez, M., Merino, F., Astorga, G., Babul, J., 2008. Uncoupling the mgatp-induced inhibition and aggregation of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2 by c-terminal mutations. *FEBS Lett.*, **582**(13): 1907–1912.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248–254.
- Chakravarty, S., Varadarajan, R., 2000. Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Lett*, **470**(1): 65–69.
- Dams, T., Jaenicke, R., 1999. Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium *thermotoga maritima*. *Biochemistry*, **38**(28): 9169–9178.
- Dong, H., Mukaiyama, A., Tadokoro, T., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S., 2008. Hydrophobic effect on the stability and folding of a hyperthermophilic protein. *J Mol Biol*, **378**(1): 264–272.
- Eaton, W.A., Thompson, P.A., Chan, C.K., Hage, S.J., Hofrichter, J., 1996. Fast events in protein folding. *Structure*, **4**(10): 1133–1139.
- Eyring, H., 1935. The activated complex in chemical reactions. *J Chem Phys*, **3**: 107–115.
- Gordon, J.C., Myers, J.B., Folta, T., Shoja, V., Heath, L.S., Onufriev, A., 2005. H<sup>++</sup>: a server for estimating pK<sub>a</sub>s and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res*, **33**(Web Server issue): 368–371.
- Guda, C., Scheeff, E.D., Bourne, P.E., Shindyalov, I.N., 2001. A new algorithm for the alignment of multiple protein structures using monte carlo optimization. *Pac Symp Biocomput*, pp. 275–286.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. Swiss-model and the swiss-pdbviewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**(15): 2714–2723.
- Hendsch, Z.S., Tidor, B., 1994. Do salt bridges stabilize proteins? a continuum electrostatic analysis. *Protein Sci*, **3**(2): 211–226.
- Huang, S.L., Wu, L.C., Liang, H.K., Pan, K.T., Horng, J.T., Ko, M.T., 2004. Pgtdb: a database providing growth temperatures of prokaryotes. *Bioinformatics*, **20**(2): 276–278.



- Hudáky, P., Stráner, P., Farkas, V., Váradi, G., Tóth, G., Perczel, A., 2008. Cooperation between a salt bridge and the hydrophobic core triggers fold stabilization in a trp-cage miniprotein. *Biochemistry*, **47**(3): 1007–1016.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. Vmd: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, **14**(1): 33–38, 27–28.
- Ito, S., Fushinobu, S., Yoshioka, I., Koga, S., Matsuzawa, H., Wakagi, T., 2001. Structural basis for the adp-specificity of a novel glucokinase from a hyperthermophilic archaeon. *Structure*, **9**(3): 205–214.
- Ito, S., Fushinobu, S., Jeong, J.J., Yoshioka, I., Koga, S., Shoun, H., Wakagi, T., 2003. Crystal structure of an adp-dependent glucokinase from *pyrococcus furiosus*: implications for a sugar-induced conformational change in adp-dependent kinase. *J Mol Biol*, **331**(4): 871–883.
- Jaswal, S.S., Truhlar, S.M.E., Dill, K.A., Agard, D.A., 2005. Comprehensive analysis of protein folding activation thermodynamics reveals a universal behavior violated by kinetically stable proteases. *J Mol Biol*, **347**(2): 355–366.
- Jeong, J.J., Fushinobu, S., Ito, S., Shoun, H., Wakagi, T., 2003. Archaeal adp-dependent phosphofructokinase: expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**(Pt 7): 1327–1329.
- Kannan, N., Vishveshwara, S., 1999. Identification of side-chain clusters in protein structures by a graph spectral method. *J Mol Biol*, **292**(2): 441–464.
- Kengen, S.W., de Bok, F.A., van Loo, N.D., Dijkema, C., Stams, A.J., de Vos, W.M., 1994. Evidence for the operation of a novel embden-meyerhof pathway that involves adp-dependent kinases during sugar fermentation by *pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, **269**(26): 17537–17541.
- Koga, S., Yoshioka, I., Sakuraba, H., Takahashi, M., Sakasegawa, S., Shimizu, S., Ohshima, T., 2000. Biochemical characterization, cloning, and sequencing of adp-dependent (amp-forming) glucokinase from two hyperthermophilic archaea, *pyrococcus furiosus* and *thermococcus litoralis*. *J Biochem*, **128**(6): 1079–1085.
- Kornberg, A., Pricer, W.E., 1953. Enzymatic esterification of alpha-glycerophosphate by long chain fatty acids. *J Biol Chem*, **204**: 345–357.
- Kuhlman, B., Dantas, G., Ireton, G.C., Varani, G., Stoddard, B.L., Baker, D., 2003. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science*, **302**(5649): 1364–1368.

- Kumar, S., Nussinov, R., 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol Life Sci*, **58**(9): 1216–1233.
- Kumar, S., Tsai, C.J., Nussinov, R., 2001. Thermodynamic differences among homologous thermophilic and mesophilic proteins. *Biochemistry*, **40**(47): 14152–65.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. Procheck: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, **26**: 283–291.
- Lee, C.F., Makhatadze, G.I., Wong, K.B., 2005. Effects of charge-to-alanine substitutions on the stability of ribosomal protein l30e from thermococcus celer. *Biochemistry*, **44**(51): 16817–16825.
- Lowry, T.H., Richardson, K.S., Mechanism and theory in organic chemistry (Harper & Row, 1976).
- Luke, K.A., Higgins, C.L., Wittung-Stafshede, P., 2007. Thermodynamic stability and folding of proteins from hyperthermophilic organisms. *FEBS J*, **274**(16): 4023–4033.
- Lüthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D., 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, **356**(6364): 83–85.
- Maeda, N., Kanai, T., Atomi, H., Imanaka, T., 2002. The unique pentagonal structure of an archaeal rubisco is essential for its high thermostability. *J Biol Chem*, **277**(35): 31656–31662.
- Meiering, E.M., Serrano, L., Fersht, A.R., 1992. Effect of active site residues in barnase on activity and stability. *J Mol Biol*, **225**(3): 585–589.
- Merino, F., Guixé, V., 2008. Specificity evolution of the adp-dependent sugar kinase family: in silico studies of the glucokinase/phosphofructokinase bifunctional enzyme from methanocaldococcus jannaschii. *FEBS J*, **275**(16): 4033–4044.
- Mirny, L.A., Gelfand, M.S., 2002. Using orthologous and paralogous proteins to identify specificity determining residues. *Genome Biol*, **3**(3): 7–20.
- Mukaiyama, A., Haruki, M., Ota, M., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S., 2006. A hyperthermophilic protein acquires function at the cost of stability. *Biochemistry*, **45**(42): 12673–12679.
- Mukund, S., Adams, M.W., 1991. The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaebacterium, pyrococcus furiosus, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. evidence for its participation in a unique glycolytic pathway. *J Biol Chem*, **266**(22): 14208–14216.

- Myers, J.K., Pace, C.N., Scholtz, J.M., 1995. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci*, **4**(10): 2138–2148.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**(6): 711–729.
- Pace, C.N., 1986. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol*, **131**: 266–280.
- Plaxco, K.W., Simons, K.T., Baker, D., 1998. Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins. *J Mol Biol*, **277**(4): 985–994.
- Privalov, P.L., Gill, S.J., 1988. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Protein Chem*, **39**: 191–234.
- Robic, S., Guzman-Casado, M., Sanchez-Ruiz, J.M., Marqusee, S., 2003. Role of residual structure in the unfolded state of a thermophilic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(20): 11345–11349.
- Ronimus, R.S., Koning, J., Morgan, H.W., 1999. Purification and characterization of an adp-dependent phosphofructokinase from thermococcus zilligii. *Extremophiles*, **3**(2): 121–129.
- Sakuraba, H., Goda, S., Ohshima, T., 2004. Unique sugar metabolism and novel enzymes of hyperthermophilic archaea. *Chem. Rec.*, **3**(5): 281–287.
- 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**(15): 12495–12498.
- Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, **234**(3): 779–815.
- Segel, I., Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium steady-state enzyme systems (Wiley-Interscience, 1975).
- Shoichet, B.K., Baase, W.A., Kuroki, R., Matthews, B.W., 1995. A relationship between protein stability and protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(2): 452–456.

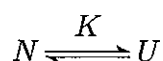
- Sippl, M.J., 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*, **17**(4): 355–362.
- Somero, G., 1978. Temperature adaptation of enzymes: Biological optimization through structure-function compromises. *Ann Rev Ecol Syst*, **9**: 1–29.
- Spector, S., Wang, M., Carp, S.A., Robblee, J., Hendsch, Z.S., Fairman, R., Tidor, B., Raleigh, D.P., 2000. Rational modification of protein stability by the mutation of charged surface residues. *Biochemistry*, **39**(5): 872–879.
- Stetter, K.O., 1996. Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found Symp*, **202**: 1–10; discussion 11–18.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**(24): 4876–4882.
- Torres, J.C., Guixé, V., Babul, J., 1997. A mutant phosphofructokinase produces a futile cycle during gluconeogenesis in *Escherichia coli*. *Biochem J*, **327** ( Pt 3): 675–84.
- Tsuge, H., Sakuraba, H., Kobe, T., Kujime, A., Katunuma, N., Ohshima, T., 2002. Crystal structure of the adp-dependent glucokinase from *pyrococcus horikoshii* at 2.0-Å resolution: a large conformational change in adp-dependent glucokinase. *Protein Sci*, **11**(10): 2456–2463.
- Tuininga, J.E., Verhees, C.H., van der Oost, J., Kengen, S.W., Stams, A.J., de Vos, W.M., 1999. Molecular and biochemical characterization of the adp-dependent phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, **274**(30): 21023–21028.
- Uversky, V.N., 1993. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry*, **32**(48): 13288–13298.
- Verhees, C.H., Kengen, S.W.M., Tuininga, J.E., Schut, G.J., Adams, M.W.W., De Vos, W.M., Van Der Oost, J., 2003. The unique features of glycolytic pathways in archaea. *Biochem J*, **375**(2): 231–246.
- Verhees, C.H., Tuininga, J.E., Kengen, S.W., Stams, A.J., van der Oost, J., de Vos, W.M., 2001. Adp-dependent phosphofructokinases in mesophilic and thermophilic methanogenic archaea. *J Bacteriol*, **183**(24): 7145–7153.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M., 1994. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiol Rev*, **13**(2-3): 335–350.

- Walden, H., Bell, G.S., Russell, R.J., Siebers, B., Hensel, R., Taylor, G.L., 2001. Tiny tim: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol*, **306**(4): 745–757.
- Wallner, B., Elofsson, A., 2003. Can correct protein models be identified? *Protein Sci*, **12**(5): 1073–1086.
- Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R.F., Sykes, B.D., Wishart, D.S., 2003. Vadar: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res*, **31**(13): 3316–3319.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**(12): 4576–4579.
- Wolf-Watz, M., Thai, V., Henzler-Wildman, K., Hadjipavlou, G., Eisenmesser, E.Z., Kern, D., 2004. Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nat Struct Mol Biol*, **11**(10): 945–949.
- Yang, J., Liu, L., Thorson, J.S., 2004. Structure-based enhancement of the first anomeric glucokinase. *ChemBiochem*, **5**(7): 992–996.
- Yuan, L., Kurek, I., English, J., Keenan, R., 2005. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**(3): 373–392.

# Apéndices

## A. Despliegamiento al equilibrio

Para obtener información acerca de la estabilidad del estado nativo de una proteína es necesario conocer la relación entre las concentraciones de cada uno de los estados macroscópicos posibles del polipéptido cuando estos se encuentran al equilibrio (e.g. el estado nativo y el estado denaturado). Sin embargo, en las condiciones usuales de estudio el estado nativo es el que se encuentra poblado mayoritariamente, siendo los demás sólo marginalmente representados. Esto hace que, generalmente, sea imposible detectar los demás estados. Además, usualmente no es posible diferenciarlos mediante técnicas espectroscópicas. Tradicionalmente, la solución a este problema ha sido aplicar perturbaciones externas al sistema las cuales puedan modificar la proporción entre las especies. Así, por ejemplo, para favorecer el estado desplegado por sobre el estado nativo se puede aumentar la temperatura del sistema o utilizar agentes caotrópicos como cloruro de guanidinio o urea. Para el caso de la denaturación química, donde la temperatura se mantiene constante en el experimento, podemos definir el sistema más simple posible



donde la proteína sólo puede encontrarse en dos estados en equilibrio entre ellos: El estado nativo  $N$  y el estado desplegado  $U$ . Aquí, la constante de equilibrio para el proceso,  $K$ , estará definida por

$$K = \frac{[U]}{[N]} \quad (6)$$

Por otra parte, podemos definir la concentración de cada uno de los estados en términos de la concentración de proteína total. Así, si  $f_u$  es la fracción de proteína en el estado desplegado y  $f_n$  es la fracción de proteína en el estado nativo entonces  $[U] = f_u[P_{tot}]$  y  $[N] = f_n[P_{tot}]$ , donde  $f_u + f_n = 1$ . Reordenando tenemos

$$[N] = (1 - f_u)[P_{tot}] ,$$

$$[U] = f_u[P_{tot}]$$

Reemplazando en la ecuación (6) se obtiene

$$K = \frac{f_u[P_{tot}]}{(1 - f_u)[P_{tot}]}$$

simplificando  $[P_{tot}]$

$$K = \frac{f_u}{(1 - f_u)}$$

y despejando en función de  $f_u$  obtenemos

$$\frac{K}{1 + K} = f_u \quad (7)$$

Si el experimento es realizado a diferentes concentraciones de agente caotrópico es posible relacionar la fracción de moléculas que se encuentran en el estado desplegado con alguna observable del sistema. Así, por ejemplo, es posible seguir el desplegamiento con técnicas espectroscópicas (como fluorescencia y dicroísmo circular), cambios en la actividad enzimática, cambios en la viscosidad, etcétera.

Particularmente, para una propiedad como la fluorescencia intrínseca o la actividad enzimática que disminuyen con la fracción de moléculas desplegadas es posible definir  $f_u$  como

$$f_u = \frac{y_n - y}{y_n - y_u}$$

donde  $y$  es el valor de la propiedad observada a una determinada concentración de agente caotrópico,  $y_n$  es la propiedad observada en condiciones que favorecen completamente el estado nativo e  $y_u$  es la propiedad observada en condiciones que favorecen completamente el estado desplegado. Reordenando tenemos que

$$y = y_n - (y_n - y_u)f_u \quad (8)$$

Ya que el sistema se encuentra en equilibrio sabemos que la relación entre la constante de equilibrio y la diferencia de energía libre entre los estados desplegado y nativo es

$$\Delta G = -RT \ln K$$

o reordenando

$$K = e^{\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)} \quad (9)$$

Adicionalmente, se ha observado que el  $\Delta G$  de desplegamiento para las proteínas tiene una dependencia lineal con la concentración de agente caotrópico  $[D]$



$$\Delta G = \Delta G_{H_2O} - m[D] \quad (10)$$

donde  $\Delta G_{H_2O}$  es la diferencia de energía libre entre los estados nativo y desplegado en ausencia de agente caotrópico y  $m$  es la dependencia de la diferencia de la energía libre con este.

Si combinamos las ecuaciones (7), (8), (9) y (10) obtenemos la ecuación (1)

$$y = y_n - (y_n - y_u) \frac{e^{\left(\frac{-(\Delta G_{H_2O} - m[D])}{RT}\right)}}{1 + e^{\left(\frac{-(\Delta G_{H_2O} - m[D])}{RT}\right)}}$$

utilizada para ajustar de las curvas de desplegamiento obtenidas.

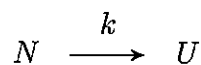
Para calcular la concentración de agente caotrópico necesaria para causar la mitad de la transición  $C_m$  podemos utilizar la ecuación (10). Ya que en este punto el valor de  $\Delta G$  es igual a 0 es posible obtener este valor con la relación  $C_m = \Delta G_{H_2O}/m$ .

## B. La ecuación de Eyring

La ecuación de Eyring describe la dependencia de la constante cinética de una reacción con la temperatura. Esta ecuación es una construcción teórica basada en el modelo del estado de transición.

En este modelo cuando un par de moléculas, en una reacción química, se juntan en una colisión que lleva a la formación de productos (o cuando una molécula, para una reacción unimolecular, sigue los movimientos que finalmente causarán el cambio químico) pasan por una configuración de máxima energía potencial conocida como *estado de transición*. La diferencia de energía entre los reactantes y el estado de transición es conocida como la energía de activación de la reacción. Así, la energía de activación define la energía mínima que deben tener los reactantes para formar productos. De este modo, la velocidad de la reacción será proporcional a la cantidad de moléculas que se encuentren en el estado de transición.

Consideremos, cinéticamente, el modelo de dos estados para el desplegamiento de una proteína

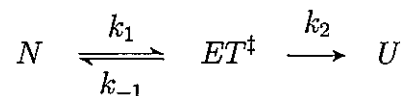


donde  $N$  es el estado nativo,  $U$  es el estado desplegado y  $k$  es la constante cinética para el proceso. Aquí, el cambio de la concentración de proteína desplegada en el tiempo estará dado por

$$\frac{d[U]}{dt} = k[N] \quad (11)$$

Por otra parte, de acuerdo al modelo del estado de transición tenemos una especie de máxima energía a través de la coordenada de reacción en equilibrio rápido con el

estado nativo (el reactante)



donde  $ET^\ddagger$  corresponde al estado de transición de la reacción,  $k_1$ ,  $k_{-1}$  y  $k_2$  son las constantes cinéticas del proceso.

La cinética de la reacción desde el estado nativo al estado desplegado depende de la concentración de moléculas que se encuentran en el estado de transición. Según el esquema anterior

$$\frac{d[ET^\ddagger]}{dt} = k_1[N] - k_{-1}[ET^\ddagger] - k_2[ET^\ddagger]$$

pero debido a que las especies  $N$  y  $ET^\ddagger$  se encuentran en equilibrio  $k_1[N]$  y  $-k_{-1}[ET^\ddagger]$  se cancelan entre ellos, lo que nos da

$$-\frac{d[ET^\ddagger]}{dt} = k_2[ET^\ddagger] = \frac{d[U]}{dt} \quad (12)$$

Además, debido al equilibrio rápido entre el estado nativo y el estado de transición de la reacción tenemos que

$$K^\ddagger = \frac{[ET^\ddagger]}{[N]}$$

es la constante de equilibrio para el proceso. Reordenando obtenemos

$$[ET^\ddagger] = K^\ddagger [N] \quad (13)$$

Combinando las ecuaciones (11), (12) y (13) obtenemos una expresión que relaciona la constante cinética total del proceso con el estado de transición

$$[U] k = k_2 K^\ddagger [U]$$

y simplificando [U]

$$k = k_2 K^\ddagger \quad (14)$$

Desde la termodinámica sabemos que podemos relacionar la constante de equilibrio de un proceso con la diferencia de energía libre entre los reactantes y productos. Así, sabemos que

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \quad (15)$$

donde  $\Delta G^\ddagger$  es la energía libre de activación,  $R$  es la constante universal de los gases y  $T$  es la Temperatura.

Adicionalmente, aunque no será tratado explícitamente aquí, desde la mecánica estadística podemos calcular que el valor de la constante  $k_2$  en la ecuación (14) es<sup>6</sup>

<sup>6</sup>Para la derivación formal de esta constante ver (Lowry y Richardson, 1976)

$$k_2 = \frac{k_B T}{h} \quad (16)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura y  $h$  es la constante de Planck.

Finalmente, si combinamos las ecuaciones (14), (15) y (16) obtenemos la ecuación (2) de materiales y métodos

$$k = \left( \frac{k_B T}{h} \right) e^{\left( \frac{-\Delta G^\ddagger}{RT} \right)}$$