

UCH-FC
Biotecnología
G216e
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO



Metales divalentes en el mecanismo catalítico y regulación de la glucoquinasa ADP dependiente de *Pyrococcus furiosus*. Papel del motivo conservado NXXE en la interacción con el metal

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

IVONNE DEL CARMEN GARCÍA CARVAJAL



Directora de Tesis: Dra. Victoria Guixé Leguía

Abril, 2011
Santiago-Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE- FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.

IVONNE DEL CARMEN GARCÍA CARVAJAL

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Victoria Guixé Leguía
Directora Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Ana Preller Simmons
Presidenta Comisión

Ana Preller



Dr. Osvaldo Álvarez Araya
Evaluador

Santiago de Chile, Abril 2011



BIOGRAFÍA



Nací en Santiago un día de primavera, mi mamá tenía 19 años. Pienso en lo joven que era ella cuando llegué a ocupar un lugar en su vida y la admiro mucho, es la mejor mamá del mundo. Mi papá es sureño, un hombre esforzado y muy cariñoso....siempre preocupado de la familia. Soy la primogénita de tres hermanos y desde que era niña mis padres me decían que la mejor herencia que me podían dejar eran mis estudios, como también que no me olvidara de Dios....hoy les agradezco mucho su dedicación y los valores entregados. La unidad de la familia, el valor de la amistad y la capacidad de entregar cariño, son algunas de las cosas que he aprendido de ellos y que me han hecho ser una mejor persona. En estas líneas también quiero señalar que en la universidad conocí a mis mejores amigas, con las cuales hemos compartido momentos de felicidad y también me han escuchado en mis etapas de tristeza....las requiero!

Me siento muy feliz de haber estudiado ciencias y poder entregar un poquito de conocimiento nuevo....quiero destacar una frase dicha por Albert Einstein y que me identifica bastante.... *"El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar. Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos"*...en este sentido la ciencia es un sin fin de misterios, cada uno de los cuales al ser descubierto nos llena de alegría y satisfacción.



*Esta investigación se la dedico a mi Familia, a
quienes agradezco el constante apoyo y amor...
Dios los bendiga siempre.*



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes personas:

A Dios por estar siempre junto a mí y darme la posibilidad de cumplir uno de mis sueños.

A la Dra. Victoria Guixé, por su paciencia, guía y gran apoyo en este camino

Al Dr. Mauricio Báez por su destacado intelecto

Al Dr. Tito Ureta, Dra. Ana Preller y Dr. Jorge Babul, por su generosa acogida durante mi permanencia en el laboratorio.

Al Dr. Ricardo Cabrera por su ayuda y amistad

A Felipe Merino por su cooperación y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Andrés Rivas, Pablo Villalobos, César Ramírez, Patricia Ayala, Diego Valdés, Christian Wilson, Rodrigo Muñoz, Luis Matsuda, Freddy Navarro, Magaly León y Diego Quiroga por su amistad y gran trabajo en equipo.

A Jazmín Herrera, Anita Lizama y Mauricio Arriagada por su trabajo y colaboración.

En especial a mis amigos Claudia Sanhueza, Daniel Aguilera, Patricia Luz, Mónica Núñez y Andrés Caniguir por su cariño y confianza.

Finalmente a FONDECYT por el financiamiento otorgado a la investigación.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
a. Descripción de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>Pyrococcus furiosus</i>	7
b. Estructura de la superfamilia riboquinasa: Motivos conservados y sitio activo.....	10
c. Efecto de iones en la actividad fosfotransferasa de la superfamilia riboquinasa y otras quinasas: aspectos funcionales del motivo NXXE.....	16
HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS.....	18
a. Hipótesis.....	18
b. Objetivo general.....	18
c. Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
a. Reactivos.....	19
b. Medios de Cultivo.....	20



c. Mutagénesis sitio dirigida.....	21
Vectores.....	21
Partidores.....	21
d. Reacción de amplificación.....	22
e. Cepas.....	23
f. Preparación de células competentes.....	24
g. Transformación por shock térmico.....	24
PURIFICACIÓN DE ADN PLASMIDIAL A PEQUEÑA ESCALA.....	25
SECUENCIACIÓN DE LAS MUTANTES E295Q Y E295L	25
ENSAYO DE EXPRESIÓN DE <i>Pfgk</i> EN LA TRANSFORMANTE BL21-pET17b	25
SOBREEXPRESIÓN DE LA ENZIMA SILVESTRE Y MUTANTES.....	27
PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA SILVESTRE Y MUTANTES.....	27
DICROISMO CIRCULAR DE LA ENZIMA SILVESTRE Y MUTANTES.....	29
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENIMÁTICA DE LA ENZIMA SILVESTRE Y MUTANTES.....	29
ANÁLISIS DE DATOS.....	31
RESULTADOS.....	32
a. Expresión y purificación de la enzima silvestre y mutantes E295Q y E295L.....	31
b. Dicroísmo circular de la enzima silvestre y las mutantes.....	35
c. Mutagénesis sitio dirigida.....	37
d. Especificidad por metales divalentes de las enzimas silvestre y las mutantes E295Q y E295L.....	39



e. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima silvestre y las mutantes E295Q y E295L.....	44
f. Efecto del aumento de metal libre sobre la actividad de la enzima silvestre y las mutantes E295Q y E295L.....	48
g. Efecto del aumento de ADP libre sobre la actividad de la enzima silvestre.....	56
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	66
REFERENCIAS.....	67



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Vía modificada de Embden-Meyerhof. Metabolismo de maltosa propuesto para <i>Pyrococcus furiosus</i>	6
Figura 2	Estructura de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	8
Figura 3	Estructura del sitio activo de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	9
Figura 4	Sobreposición de estructura secundaria de miembros de la superfamilia riboquinasa.....	11
Figura 5	Diagrama topológico de miembros de la superfamilia Riboquinasa...	14
Figura 6.	Alineamiento de secuencia entre miembros de la superfamilia riboquinasa.....	15
Figura 7	Electroforesis en condiciones desnaturalantes de las diferentes etapas de la purificación de la enzima silvestre.....	34
Figura 8	Espectros de dicroísmo circular de la glucoquinasa dependiente de ADP silvestre y las mutantes E295Q y E295L.....	36
Figura 9	Resultado de la amplificación del gen de la glucoquinasa dependiente de ADP silvestre para la mutación del residuo E295 y diseño de partidores para los cambios E295Q y E295.....	38
Figura 10	Especificidad por cationes divalentes de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i> silvestre.....	40
Figura 11	Especificidad por cationes divalentes de la mutante E295Q de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	41
Figura 12	Especificidad por cationes divalentes de la mutante E295L de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	42
Figura 13	Comparación de la especificidad de cationes divalentes. Actividad relativa alcanzada con cada metal divalente ensayado.....	43



Figura 14	Comparación de los valores de Km obtenido para las tres enzimas....	47
Figura 15	Efecto de la concentración de metal libre sobre la actividad de la enzima dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i> silvestre.....	51
Figura 16	Efecto de la concentración de metal libre sobre la actividad de la enzima mutante E295Q de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	52
Figura 17	Efecto de la concentración de metal libre sobre la actividad de la enzima mutante E295L de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	53
Figura 18	Efecto de la concentración de metal libre sobre los parámetros cinéticos de la PfgK	54
Figura 19	Modelo de inhibición propuesto para la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	55
Figura 20	Actividad de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i> en función de la concentración de ADP libre a diferentes concentraciones de Mg ²⁺ total	57
Figura 21	Inhibición por ADP libre de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i> usando MgADP como sustrato variable.....	58



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Pasos de purificación de la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	33
Tabla II	Parámetros cinéticos de glucoquinasa dependiente de ADP silvestre con los diferentes cationes que emplea para la catálisis.....	44
Tabla III	Parámetros cinéticos obtenidos para la mutante E295Q de la glucoquinasa ADP dependiente de <i>P. furiosus</i>	45
Tabla IV	Parámetros cinéticos obtenidos para la mutante E295L de la glucoquinasa ADP dependiente de <i>P. furiosus</i>	46
Tabla V	Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste global para la glucoquinasa dependiente de ADP de <i>P. furiosus</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS

pfGK	Glucocuinasa dependiente de ADP de <i>Pyrococcus furiosus</i>
GK	Glucocuinasa
RK	Ribocuinasa
AK	Adenosina quinasas
PFK	Fosfofructocuinasa
CMD	Catión metálico divalente
THZ	4-metil-5- β -hidroxietiltiazol quinasas
HMPP	4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina quinasas
AIR	Aminoimidazol ribósido quinasas
IPTG	Isopropiltiogalactósido
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
AMP-PCP	5'-adenilimetilendifosfonato (análogo no hidrolizable del ATP)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
EDTA	Etilendiamina tetra acetato
EPR	Resonancia paramagnética del electrón

RESUMEN

La arquea *Pyrococcus furiosus* presenta una vía modificada de Embden-Meyerhof, en su vía glicolítica contiene una glucoquinasa dependiente de ADP (*PfGK*). Esta enzima pertenece a la superfamilia riboquinasa cuyos miembros poseen una estricta dependencia de un catión divalente para la catálisis y donde el motivo conservado NXXE, se ha asociado con su unión. En este trabajo estudiamos el efecto de distintos metales divalentes sobre la catálisis y regulación de la *PfGK* y el papel del motivo conservado NXXE en estas conductas. La *PfGK* silvestre puede utilizar diversos metales divalentes con valores de K_m similares para los distintos complejos metal-nucleótido. Por otro lado, se determinó que es inhibida por el metal libre de acuerdo a un mecanismo no competitivo parcial, como también por ADP libre, quien se comporta como un inhibidor competitivo con respecto al complejo metal-nucleótido. Las mutantes E295Q y E295L, del motivo conservado NXXE, presentan una disminución severa en la k_{cat} y un aumento en el valor de K_m para el complejo metal-nucleótido. La inhibición por el metal libre en la mutante E295L es similar a la de la enzima silvestre, mientras que la mutante E295Q presenta alteraciones en este comportamiento. La promiscuidad en la utilización de metales sugiere que el papel de estos cationes se relaciona con la geometría de los grupos fosfato más que con sus características químicas y que el residuo E295 es crucial para la interacción y estabilización del complejo metal-nucleótido y para la regulación por el metal libre.

INTRODUCCION

Los microorganismos hipertermófilos, los que viven entre 80 y 105°C, en su mayoría pertenecen al dominio arquea y se considera que son los seres vivos más ancestrales. Varios de estos hipertermófilos crecen en presencia de carbohidratos, tales como hexosas, pentosas y polímeros de azúcares. Representantes de arqueas anaeróbicas del género *Pyrococcus*, *Thermococcus* y *Desulfurococcus* fermentan azúcares a acetato como principal producto (Selig M y col, 1997). Dentro del género *Pyrococcus* la arquea heterótrofa *Pyrococcus furiosus* ha sido una de las más estudiadas (Kengen S y col, 1995), debido a su facilidad de cultivo. Este microorganismo utiliza almidón, celobiosa, maltosa y piruvato como sustratos para su crecimiento. Aparentemente maltosa y celobiosa son ingresadas a la célula y degradadas a glucosa por α y β -glucosidasas respectivamente (Kengen S y col, 1994). La degradación de estas moléculas se inicia con la glicolisis, el cual corresponde a un proceso donde las moléculas de azúcar son activadas por quinasas específicas a su forma fosforilada (Verhees C y col, 2002). Este proceso catabólico es de gran importancia para el metabolismo celular ya que facilita el flujo de carbono y la formación de ATP, en especial para las arqueas ya que éstas en general, no poseen el sistema transferasa dependiente de fosfoenolpiruvato. Este sistema constituye un complejo multiproteico que acopla el transporte de azúcares a través de la membrana bacteriana con su

fosforilación simultánea, utilizando fosfoenolpiruvato como dador de fosforilos (Dör C y col, 2003; Freitag N y col, 2009).

Durante el proceso evolutivo, la química de esta serie de reacciones de fosforilación se ha conservado en una amplia gama de organismos. A través de comparaciones de secuencia, estructura y función, en un conjunto de 60 quinasas con diferentes especificidades, Bork y colaboradores (1993) identificaron tres familias de quinasas de azúcares: hexoquinasa, riboquinasa y galactoquinasa. De acuerdo con este análisis, la función enzimática de fosforilación de azúcares ha evolucionado de manera independiente en tres módulos estructurales distintos, dando cuenta de una evolución convergente.

El ATP se considera el dador de fosforilos más común para quinasas (Matte A y col, 1998). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que en algunas arqueas opera una vía modificada de Embden-Meyerhof, en la cual ciertas quinasas tienen diferente especificidad por el dador de grupos fosforilo. Estos estudios revelaron que en arqueas hipertermófilas existe un nuevo metabolismo de azúcares. Tales enzimas requieren de ADP como grupo dador de fosforilos en vez de ATP (Figura 1) (Sakuraba H y col, 2002-04; Ito S y col, 2003-01). Ejemplos de ello lo constituyen una glucoquinasa y fosfofructoquinasa dependiente de ADP en *Pyrococcus furiosus* (Koga S y col, 2000; Tuininga y col, 1999), una fosfofructoquinasa dependiente de ADP en *Pyrococcus horikoshii* (Tsuge H y col, 2002) y una glucoquinasa dependiente de ADP en *Thermococcus litoralis* (Ito S y col, 2001). Las glucoquinasas dependientes de ADP se

encuentran en arqueas del orden *termococales*, tales como *Pyrococcus furiosus*, *Termococcus litoralis*, en algunas arqueas metanogénicas como *Metanococcus jannaschii* y recientemente se identificó una representante eucariota en la especie *Mus musculus* (Ronimus R y Morgan H, 2004). En *M. jannaschii* existe una enzima bifuncional que posee actividad glucoquinasa (GK-ADP) y fosfofructoquinasa (PFK-ADP) (Sakuraba y col, 2002).

Los genes que codifican las GK-ADP de *P. furiosus*, *T. litoralis* y *M. jannaschii* se encuentran caracterizados (Koga S y col, 2000; Sakuraba H y col, 2002). Estas proteínas se pueden presentar en forma homodimérica (*P. furiosus*, *M. jannaschii*) o monomérica (*T. litoralis*), con subunidades de alrededor de 50 kDa. Otra característica destacada es que poseen una alta especificidad por ADP y el sustrato azúcar correspondiente. Basándose en el análisis de su estructura primaria, se observó que no poseen una similitud significativa con otras quinasa de azúcares. Por otra parte, la determinación de la estructura de las GK de *T. litoralis* y *P. furiosus* permitió clasificarlas como miembros de la superfamilia riboquinasa. Sin embargo, tomando en cuenta las modificaciones estructurales de estas proteínas y su relación filogenética con otras enzimas de la superfamilia, es que se las ha clasificado en un clado separado, el cual se ha denominado recientemente como “familia de las quinasa dependientes de ADP” (Ito y col, 2003).

El estudio de una enzima hipertermófila como lo es la glucoquinasa dependiente de ADP de *Pyrococcus furiosus* es relevante desde el punto de vista evolutivo ya que

nos permitirá establecer si la *PfGK* posee mecanismos catalíticos similares a otras quinasas de azúcares del dominio arquea como también a aquellas que pertenecen a otros clados de la superfamilia riboquinasa que utilizan sustratos diferentes pero que comparten una estructura similar.

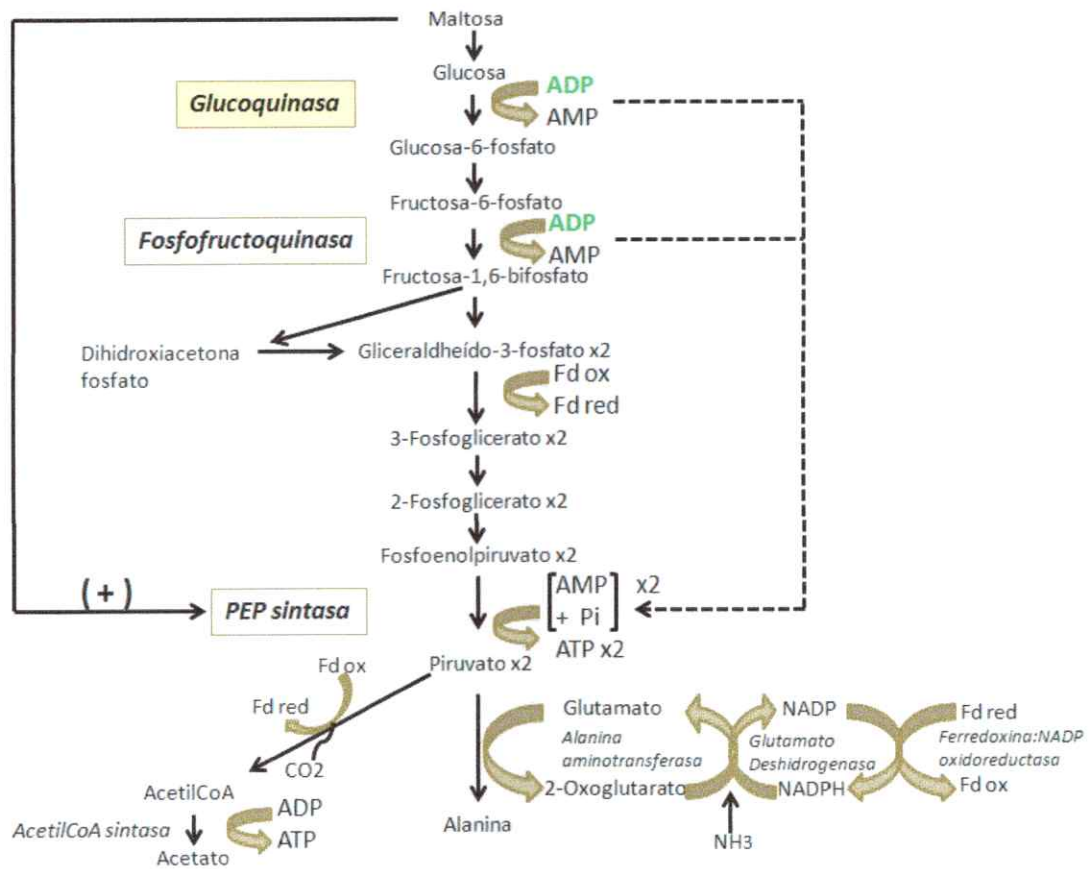


Figura 1. Vía modificada de Embden-Meyerhof. Metabolismo de maltosa propuesto para *Pyrococcus furiosus* (Sakuraba H y Ohshima T, 2002).

1. Glucoquinasa dependiente de ADP de *Pyrococcus furiosus*

La glucoquinasa cataliza la transferencia del fosfato β del ADP al grupo 1-OH de la glucosa para generar glucosa-6-fosfato y AMP. Esta enzima pertenece al clado "quinasas ADP dependientes" de la superfamilia riboquinasa. Corresponde a un homodímero de aproximadamente 50 kDa con 456 residuos de aminoácidos. Su estructura se ha determinado mediante cristalografía de proteínas a una resolución de 1,9 Å en conformación cerrada, acomplejada con glucosa y AMP. La glucosa se une a un surco entre el dominio grande y pequeño, además se observó densidad electrónica en el átomo O1 tanto con la conformación α como β anomérica (Ito S y col, 2003). La enzima presenta una fuerte inhibición por AMP reportándose una K_i de 0,06 mM (Verhees C.H y col, 2002) y prefiere usar CDP en lugar de ADP, pero no puede emplear GDP (Koga S y col, 2000). La base catalítica de esta glucoquinasa corresponde a Asp440. En la estructura de *PfGk* no se observa un Mg^{2+} unido como se encuentra en la estructura de la glucoquinasa dependiente de ADP de *T. litoralis*, pero un espacio hidrofílico de 17 moléculas de agua aportarían el área suficiente para acomodar este ion y el fosfato β terminal del ADP. Los residuos Gln113, Glu266, Asn292, Glu295 y Asp440 parecen sostener la unión entre moléculas de agua y Mg^{2+} (Ito S y col, 2003) (Figura 2 y 3).

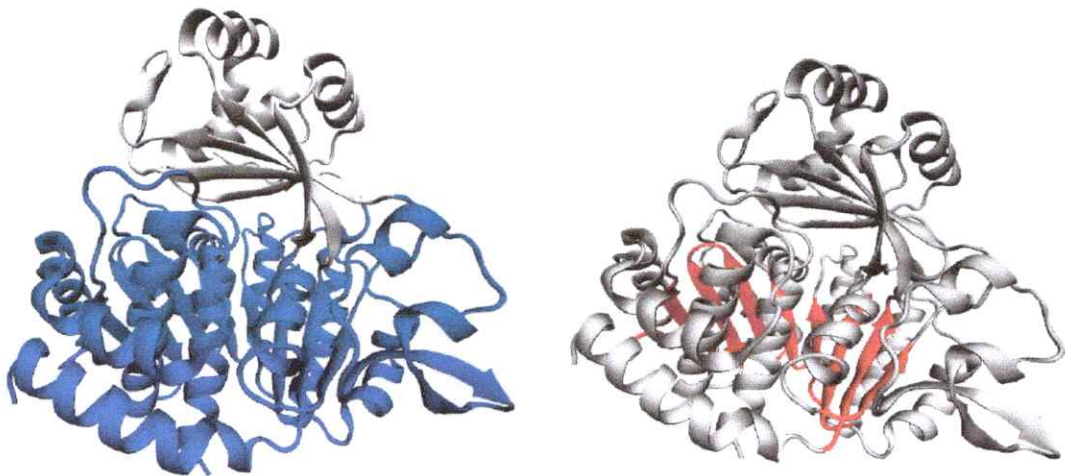


Figura 2. Estructura del monómero de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* realizada con el programa VMD. En la imagen de la izquierda se destaca la presencia de un dominio menor (gris) y un dominio mayor (azul). En la imagen de la derecha se observa el plegamiento $\alpha\beta\alpha$ que caracteriza a la superfamilia riboquinasa, destacándose en rojo las hojas beta centrales presentes en el plegamiento tipo Rossmann modificado.

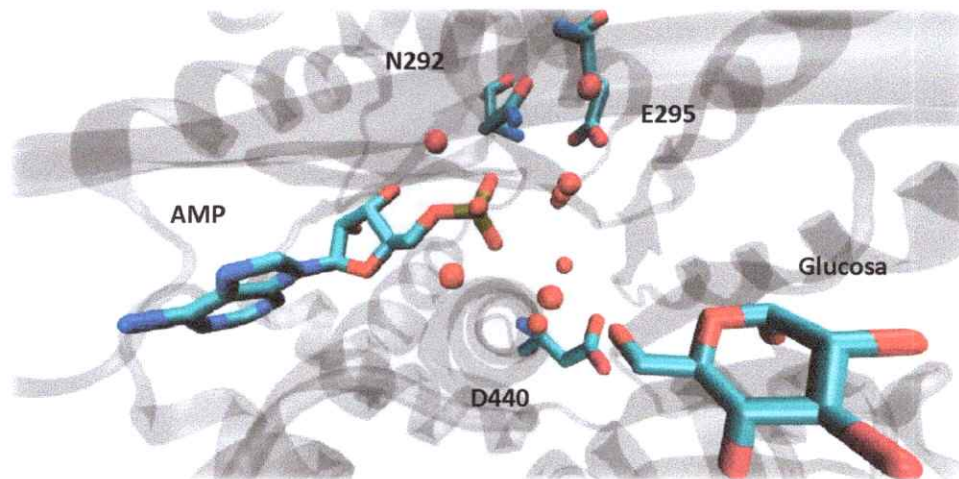


Figura 3. Estructura del sitio activo de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* realizado con el programa VMD. Se destaca la posición de los residuos involucrados en el motivo NXXE (N292 y E295), el residuo catalítico (D440), las moléculas con las cuales se encuentra cristalizada la proteína (glucosa y AMP) y algunas aguas (esferas rojas) incluidas en el cluster hidrofílico que al parecer unirían el ión Mg^{2+} . En celeste los átomos de carbono, rojo los oxígenos, amarillo el fosfato y azul el nitrógeno.

2. Estructura de la superfamilia riboquinasa: Motivos conservados y sitio activo

Las enzimas de la familia riboquinasa se encuentran clasificadas como proteínas de tipo alfa y beta (α/β) (Sigrell y col, 1998-99; Mathews y col, 1998; Cook y col, 2000).

Varias

estructuras de proteínas con función conocida que pertenecen a esta familia de quinasa se han reportado hasta la fecha: riboquinasa (RK)(Park J y col, 2007; Chuvikovskiy D y col, 2006), adenosina quinasa humana (AK) (Spychala J y col, 1996), adenosina quinasa de *Toxoplasma gondii* (Schumacher y col, 2000), 4-metil-5- β -hidroxietiltiazol quinasa (THZ) (Campobasso N y col, 2000), 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina quinasa (HMMP) (Cheng G y Col, 1995; Newman J y col, 2006), aminoimidazol ribosido quinasa de *Salmonella entérica* (Zhang Y y col, 2004), piridoxal quinasa (Li M y col, 2002), glucoquinasa dependiente de ADP de *Termococcus litoralis* (Ito y col, 2001) y *Pyrococcus furiosus* (Ito y col, 2003), fosfofructoquinasa de *Pyrococcus furiosus* (Ito y col, 2003) y *Pyrococcus horikoshi* (Currie M y col, 2009), GK/PFK de *Methanococcus jannashii* (Sakuraba y col, 2002) y KDG quinasa (Pauluhn A y col, 2008) entre otras. El monómero de los miembros de la familia consta de un dominio mayor y un dominio menor y su plegamiento está muy conservado (Figura 4), mientras que la estructura cuaternaria varía entre ellos presentándose desde estructuras tetraméricas (YXKO) (Zhang Y y col, 2002) y triméricas (1KYH) (Campobasso y col, 2000) hasta monoméricas (T/GK) (Ito y col, 2001).

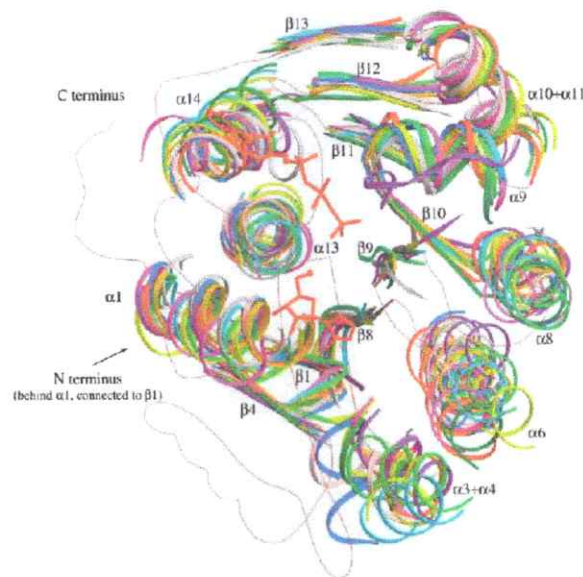


Figura 4. Sobreposición de estructura secundaria de miembros de la superfamilia riboquinasa basados en la posición de 107 C α . En el modelo se señalan las regiones conservadas entre los miembros de la superfamilia. Aminoimidazol ribósido quinasa en rojo (AIR); Riboquinasa en naranja (RK); Adenosina quinasa humana en azul (AK); *Toxoplasma gondii* adenosina quinasa en rosa; Glucoquinasa en amarillo (GK); HMPP quinasa en verde; THZ quinasa en magenta; Piridoxal quinasa en cyan; KDG quinasa en olivo; 1O14 en púrpura; y 1KYH en gris (Zhang Y y col, 2004).

Una característica común en esta superfamilia corresponde a 8 hojas beta centrales flanqueadas por hélices alfa (Figura 2 y 5) (Zhang Y y col, 2004). El sitio activo está localizado en una hendidura poco profunda a lo largo del borde de una hoja beta central en el dominio mayor. El dominio menor consiste en una estructura tipo tapa que cubre el sitio activo. Sin embargo, enzimas como THZ quinasa (Campobasso N y col 2000) y HMPP quinasa (Newman J y col 2006) carecen de esta característica estructural. Se ha sugerido que esta tapa constituye un marcador morfológico de la evolución dentro de la superfamilia (Ohshima y col 2004). En los miembros diméricos como la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*, el dominio menor forma parte de la interfaz entre las subunidades (Ito S y col 2003).

Dentro de esta familia de enzimas se distingue tres motivos conservados en la secuencia de aminoácidos. El primero corresponde a un dipéptido de glicina (GG) cerca del N-terminal (Bork y col, 1993; Wu y col, 1991). El segundo motivo corresponde a la secuencia GXGD, que contiene un residuo aspártico altamente conservado que se propone como la base catalítica general en la reacción de fosforilación (Maj y col, 2000; Mathews y col, 1998; Schumacher y col, 2000; Sigrell y col, 1998) (Figura 6). El último motivo corresponde a NXXE y se localiza en el sitio activo de las enzimas, el cual está involucrado con la unión de iones Mg^{2+} y PO_4^- (Figura 6)(Maj y col, 2002; Parducci R y col, 2006). Está descrito que en la estructura cristalina de la adenosina quinasa (AK) de humano hay dos adenosinas y un Mg^{2+} el cual está coordinado con 6 moléculas de agua en configuración octaédrica (MO6) unidas a residuos del sitio activo. Esta asociación

incluye contactos con las cadenas laterales del motivo NXXE, específicamente con el residuo E266 y la base catalítica D300.

En la estructura de la AK de *Toxoplasma gondii* se observa que el ión Mg^{2+} está unido de forma distinta a lo encontrado en la AK de humano. En esta proteína el catión metálico divalente está coordinado entre los fosfatos α y β del análogo de ATP no hidrolizable (AMP-PCP). Por otra parte, en la estructura de la riboquinasa de *Escherichia coli* se observa que el motivo conservado NXXE forma interacciones con ADP y un ión fosfato (Maj y col, 2002). Una de las estructuras tridimensionales de THZ quinasa (Campobasso N y col, 2000), incorpora sustrato y producto simultáneamente, junto a dos iones magnesio en el sitio activo. En la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* el motivo NXXE corresponde a los residuos N292 y E295. En esta investigación se estudiará el rol que cumple el residuo E295 de Pfgk en la catálisis y unión de sustratos mediante una caracterización cinética de la glucoquinasa silvestre y mutaciones sitio-dirigidas.

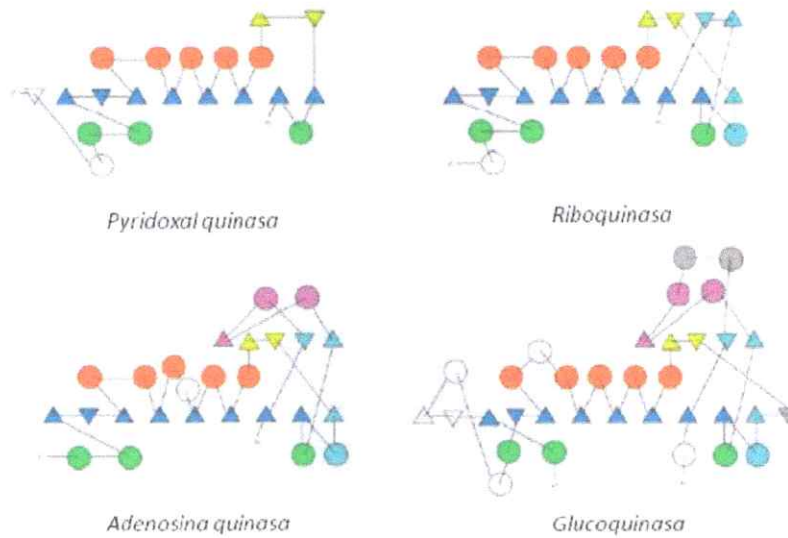


Figura 5. Diagrama topológico de miembros de la superfamilia Riboquinasa (RK). Las hélices alfa se muestran como círculos y las hebras beta como triángulos. Los triángulos que apuntan en la misma dirección representan hebras paralelas y los que apuntan en dirección opuesta hebras antiparalelas. Los elementos de estructura secundaria que se conservan en toda la superfamilia RK se muestran del mismo color: Hebras beta central, azul; hélices alfa a cada lado, rojas y verde; Elementos de estructura secundaria en magenta representan una inserción en relación a la riboquinasa. Elementos de estructura secundaria en gris representan una inserción en la adenosina quinasa. Elementos de estructura secundaria únicos para cada enzima se representan en blanco. El resto de colores señalan inserciones en relación a miembros no mostrados en la figura (Adaptado de Zhang Y y col, 2004).

				Motivo NXXE		Motivo GXGD					
Dependientes de ADP	1GC5 - <i>T. libralis</i> glucokinase	301	80	EVV	AAE	312	445	89	212	18	454
	1LZL - <i>P. hankoshii</i> glucokinase	291	80	EVV	AD	302	437	87	211	18	446
	1UZX - <i>P. hankoshii</i> phosphofructokinase	283	80	EEA	AQ	294	427	87	211	18	436
	1UA4 - <i>P. furiosus</i> glucokinase	258	80	EVV	AS	297	434	87	211	18	443
Dependientes de ATP	1BX4 - <i>H. sapiens</i> adenosine kinase	219	227	EDT	ATF	238	294	25	21	24	303
	1LII - <i>T. gondii</i> adenosine kinase	219	227	ERE	AIR	238	312	29	21	24	321
	1RKD - <i>E. coli</i> ribokinase	183	227	EET	EKE	194	249	29	21	24	258
	1TZ5 - <i>S. enterica</i> aminimidazole riboside kinase	185	227	ERD	COE	194	246	27	21	24	255
	1V1A - <i>T. thermophilus</i> 2-keto-3-deoxygluconate kinase	189	227	ERE	EL	208	245	27	21	24	254
	1VK4 - <i>T. manama</i> (putative) carbohydrate kinase	169	227	ERE	ET	188	228	28	21	24	237
	1VM7 - <i>T. maritima</i> ribokinase	174	227	ERK	EA	185	248	27	21	24	249
	2ABQ - <i>S. hawaiiensis</i> fructose-1-phosphate kinase	177	227	ERH	EE	188	243	28	21	24	252
	2AFD - <i>T. maritima</i> 2-keto-3-deoxygluconate kinase	190	227	ERL	EE	201	271	28	21	24	263
	2AJR - <i>T. manama</i> (putative) carbohydrate kinase	188	227	ERD	EA	199	255	27	21	24	264
	2CA9 - <i>M. jannaschii</i> nucleoside kinase	182	227	ERD	EA	193	241	27	21	24	260
	2DCN - <i>S. tokodaii</i> 2-keto-3-deoxygluconate kinase	190	227	ERD	ET	201	246	27	21	24	249
	2F02 - <i>E. faecalis</i> tagatase-6-phosphate kinase	191	227	ERD	EE	192	249	28	21	24	258
	2FV7 - <i>H. sapiens</i> ribokinase	195	227	ERD	ET	206	263	27	21	24	272
	2HW1 - <i>H. sapiens</i> fructokinase	188	227	ERD	EE	199	250	27	21	24	261
	2JG1 - <i>S. aureus</i> tagatase-6-phosphate kinase	181	227	ERD	ET	192	248	28	21	24	257
	2JG5 - <i>S. aureus</i> (putative) phosphofructokinase	177	227	ERD	EE	188	243	27	21	24	252
	2NWH - <i>A. tumefaciens</i> (putative) carbohydrate kinase	183	227	EEA	EA	194	247	27	21	24	256
	2PKN - <i>M. tuberculosis</i> adenosine kinase	191	227	EDY	DIA	202	251	28	21	24	260
	2QCV - <i>B. halodurans</i> (putative) 5-dehydro-2-deoxygluconate kinase	201	227	ERD	DVE	212	266	28	21	24	275
	2QHP - <i>R. thetaiotaomicron</i> fructokinase	173	227	ERD	VFE	184	248	28	21	24	249
	2RBC - <i>A. tumefaciens</i> (putative) ribokinase	184	227	EEA	FE	195	248	27	21	24	257
	2VAR - <i>S. solfataricus</i> 2-keto-3-deoxygluconate kinase	191	227	ERD	EE	202	250	28	21	24	261
	3BF5 - <i>T. acidophilum</i> (putative) ribokinase	144	227	ERD	EKY	155	221	27	21	24	230
	3CQD - <i>E. coli</i> phosphofructokinase-2	183	227	ERD	EA	194	258	27	21	24	259
	1EKQ - <i>B. subtilis</i> 4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole kinase	119	227	EEA	AET	138	192	27	21	24	201
	1KYH - <i>B. subtilis</i> (putative) kinase	145	227	ERD	FR	156	219	28	21	24	219
	1LHP - <i>C. ardeus</i> pyridoxal kinase	140	227	ERD	EL	157	227	27	21	24	230
	1TD2 - <i>E. coli</i> pyridoxamine kinase	142	227	ERD	EL	153	218	28	21	24	227
	1UR0 - <i>T. thermophilus</i> phosphomethylpyrimidine kinase	133	227	ERD	EA	144	204	27	21	24	213
	1V8A - <i>P. hankoshii</i> hydroxyethylthiazole kinase	116	227	ERD	EA	127	189	27	21	24	198
	2AX3 - <i>T. manama</i> (putative) carbohydrate kinase	362	227	ERD	AR	373	425	28	21	24	434
	2DDM - <i>E. coli</i> pyridoxal kinase	155	227	ERD	ET	166	227	27	21	24	236
	2FK7 - <i>H. sapiens</i> pyridoxal kinase	146	227	ERD	EL	157	229	27	21	24	238
	2SB - <i>S. subtilis</i> pyridoxal kinase	137	227	ERD	EQ	148	218	27	21	24	219
	1JX1 - <i>S. typhimurium</i> 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate kinase	135	227	ERD	AE	140	207	27	21	24	210

Figura 6. Alineamiento de secuencia entre miembros de la superfamilia riboquinasa. Se señala el motivo NXXE y GXGD que están involucrados con la catálisis. Los residuos del motivo NXXE están relacionados con la unión de iones fosfato y cationes divalentes, mientras que en el motivo GXGD se encuentra la basa catalítica que activa el hidroxilo aceptor del grupo fosfato (Merino F y Guixé V, 2008).

3. Efecto de iones en la actividad fosfotransferasa de la superfamilia riboquinasa y otras quinasa: aspectos funcionales del motivo NXXE.

Hay dos clases de enzimas que requieren cationes divalentes para su actividad catalítica, las metaloenzimas, que contienen un ion metálico fuertemente unido y que no se disocia, y las enzimas activadas por metal, las cuales ven anulada su catálisis en ausencia del catión. Dentro de estas últimas, las fosfotransferasas son las de mayor relevancia (Parducci R, 2005). El ATP libre no es el verdadero sustrato para estas quinasa, por esta razón requieren de un catión metálico divalente para su actividad (Knowles J, 1980).

Está descrito que la adenosina quinasa de diversas fuentes (Darling J y col, 1999; Fisher M y Newsholme E, 1984; Murray A.W., 1968) y riboquinasa de *E. coli* ven afectada su actividad tanto por iones pentavalentes como por iones Mg^{2+} , unión en la que participa el motivo NXXE (Maj C y col, 2002; Maj C y Gupta R, 2001). Mutantes para los residuos N y E en la AK de *Mesocricetus auratus* resulta en cambios en el efecto que ejercen los iones PO_4^- . Sumado a lo anterior, se advierte una menor inhibición en presencia de Mg^{2+} . Como consecuencia de las mutaciones descritas las propiedades cinéticas de la enzima cambian, sugiriendo que estos residuos están involucrados en controlar la actividad AK a través de la unión de iones Mg^{2+} y PO_4^- en el motivo conservado NXXE (Maj C y col, 2002).

En relación a la influencia del Mg^{2+} sobre la actividad de fosfotransferasas se determinó que en proteínas tirosina quinasa concentraciones entre 5 y 10 mM son necesarias para la actividad máxima. Estas concentraciones son mucho mayores que lo necesario para acomplejar el nucleótido, por lo que se deduce un rol adicional para este catión (Budde R y col, 1993). Específicamente en la proteína tirosina quinasa Csk se ha determinado que además del ión Mg^{2+} necesario para formar el complejo metal nucleótido se necesita de otro ión Mg^{2+} para la activación de la proteína, esto implica que existe un segundo sitio de unión a metal. Además se demostró que es posible sustituir el Mg^{2+} por otros cationes como Mn^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} ya que estos últimos soportan la actividad quinasa en ausencia de Mg^{2+} (Gongkin S y Budde R, 1999).

Las observaciones anteriores indican que los residuos N y E del motivo NXXE participan en la unión de iones PO_4^- y Mg^{2+} al sitio activo de algunos miembros de la superfamilia riboquinasa. Además, en ciertas fosfotransferasas que están clasificadas dentro de esta familia como algunas que no pertenecen a este grupo de quinazas, se ha evidenciado un rol adicional para cationes metálicos divalentes que no forman parte del complejo metal nucleótido. Hasta la fecha no se conoce el papel que llevan a cabo estos residuos en la catálisis y regulación de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*. Además, no se ha estudiado si existe un sitio de unión a un segundo metal en esta enzima.

HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

Hipótesis

“En la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* existe un sitio de unión a Mg^{2+} distinto del sitio de unión para ADPMg con la participación del residuo E295 en tal interacción”.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar la especificidad y regulación de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* por metales divalentes y establecer el rol del residuo E295 en esta conducta.

Objetivos Específicos

1. Purificar y caracterizar cinéticamente la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*.
2. Estudiar el efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*.
3. Analizar el efecto del ADP libre sobre la actividad fosfotransferasa.

4. Establecer el papel del residuo E295, en la catálisis y unión de cationes divalentes, mediante la confección de mutantes sitio específicas para este residuo (E295Q y E295L).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Reactivos

Se obtuvo desde:

Sigma: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, β -mercaptoetanol, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etilsulfónico (HEPES), cloruro de manganeso ($MnCl_2$), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de calcio ($CaCl_2$), dinucleótido de β -nicotinamida y adenina (NAD^+), dodecil sulfato de sodio (SDS) 99%, estándar de bajo peso molecular SigmaMarker low range M3913, persulfato de amonio (APS), seroalbúmina de bovino (BSA).

Merck: ácido clorhídrico (HCl), cloruro de cadmio ($CdCl_2$); cloruro de cobalto ($CoCl_2$), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de potasio (KCl), cloruro de zinc ($ZnCl_2$), etanol absoluto, D(+) glucosa anhidra.

Winkler: cloruro de sodio (NaCl), glicerol, hidróxido de sodio (NaOH), isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) y Tris.

Bio-Rad Laboratories INC: acrilamida 99,9%, Bio-Rad Protein Assay, Chelex 100, columna de intercambio hidrofóbico ter-Butil.

US Biological: ampicilina, cloranfenicol.

Invitrogen: agar seleccionado, Kit de mutación sitio dirigida Gene Taylor ®.

Becton Dickinson and Company: extracto de levadura Bacto™ y triptona Bacto™.

Branson Ultrasonics Corporation: sonicador Branson Digital Sonifier S-450D.

Eppendorf: centrífuga Eppendorf 5810R y sus rotores F-34-6-38 y A-4-62.

GE Healthcare: columna de intercambio iónico HiTrap Q HP.

Gibco BRL – Ultra Pure – Life Technologies: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED).

Hewlett Packard: espectrofotómetro Hewlett Packard 8453.

Millipore: centriplus.

Omega Bio-Tek: kit extractor de plasmidio Plasmid minikit I.

MÉTODOS

1. Medios de Cultivo

1.1 Luria Bertani (LB)

Se añadió 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura sobre 900 mL de agua desionizada. El pH se ajustó con NaOH a 7,0 antes de aforar a 1L y esterilizar.

1.2 SOC

Se adicionó 2 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1M, 0,25 mL de KCl 1 M sobre 197 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 7,0 y luego se esterilizó. Finalmente se añade 1 mL de MgCl₂ 1 M y 1 mL de glucosa 2 M, ambos esterilizados previamente por medio de filtración con tamaño de poro de 0,2 µm.

2. Mutagénesis sitio específica

2.1 Vector

El vector pET-17b de Novagen (Madison, WI, USA) se utilizó para la sobreexpresión del gen de la *PfGk* silvestre y sus mutantes (1365pb). Este vector posee un tamaño de 3306pb y contiene un gen cuyo producto confiere resistencia a ampicilina. El gen la *PfGk* fue clonado entre los sitios de corte de las endonucleasas NdeI y EcoRI.

2.2 Partidores

Los partidores utilizados para introducir las mutaciones en el gen de *PfGk* fueron los siguientes:

Ácido glutámico 295 por Glutamina

5' - GTGTAGGGCTTAACGAGGTACAGCTGGCATCAAT - 3'

3' - CACATCCCGAATTGCTCCATGTCGACCGTAGTTA - 5'

Ácido glutámico 295 por Leucina

5'- GTGTAGGGCTTAACGAGGTACAGCAGGCATCAAT - 3'

3' - CACATCCCGAATTGCTCCATGTCGTCCGTAGTTA - 5'

El triplete que señala ácido glutámico en la secuencia de la glucoquinasa de *P. furiosus* corresponde a **CAG**. En la secuencia de partidores el triplete de bases subrayado corresponde al codón del aminoácido reemplazado y la letra en rojo señala la(s) base(s) sustituida. Los partidores para E295 fueron sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) a través de BiosChile (Chile).

2.3 Reacción de amplificación (PCR)

Para las mutaciones sitio específicas se utilizó el sistema Gene Taylor[®] de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El procedimiento usa como plantilla el plásmido de doble hebra que contiene el gen silvestre de *PfGk* y como partidores dos oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación deseada. La reacción de

amplificación se realizó en un volumen de 50 μ L. La mezcla de reacción contenía amortiguador HiFi 1X, dNTP 0,3 mM, MgSO₄ 1 mM, partidores 0,3 μ M, 25 ng de DNA metilado, 1 U de Platinum®*Taq* High Fidelity de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Las reacciones se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-100. Para la amplificación del plásmido mutante se usó un protocolo que consistía de 20 ciclos de 94 °C por 1 min (desnaturación), 55 °C por 1 min (alineación) y 68 °C por 6 min (extensión). Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

2.4 Cepas

La cepa de *E. coli* BL21 Star™(DE3) pLysS(F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm rne131 (DE3)pLysS (Cam^R)) que posee en su genoma una copia del gen de la RNA polimerasa T7 inducible por IPTG, fue transformada con el plásmido pET-17b (que contiene el gen silvestre de *PfGk*) para la sobreexpresión de la glucoquinasa dependiente de ADP silvestre y mutantes.

La cepa DH5 α -T1^R MAX Efficiency® (F ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA* -argF)U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_k, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA* (confiere resistencia al fago T1)), fue utilizada para la transformación con los plásmidos mutados.

Ambas cepas fueron adquiridas como parte del kit de mutagénesis sitio dirigida Gene Taylor® de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

2.5 Preparación de células competentes

Células de *E. coli* BL21 (DE3) se crecieron durante la noche a 37 °C en 5 mL de medio LB. Con 500 µL de este cultivo se inocularon 50 mL de medio LB, el que se creció a 37 °C con agitación vigorosa en un matraz de 100 mL para facilitar la aireación. Cuando el cultivo de células alcanzó una OD de 0,4 a 580 nm se colocaron en hielo por 10 minutos. Las células se colectaron por centrifugación a 8.000 rpm a 4 °C por 10 minutos en un tubo frío y estéril (centrífuga Eppendorf 5810R rotor F-34-6-38). El sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas en 25 mL de una solución de CaCl₂ 100 mM estéril y fría. Las células fueron incubadas en hielo por 40 minutos y posteriormente se centrifugaron a 8.000 rpm a 4 °C en un tubo frío y estéril, usando el rotor F-34-6-38 de la centrífuga Eppendorf 5810R. El sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas suavemente en una proporción 1/50 de volumen de solución de CaCl₂ 100 mM, fría y estéril. El tubo con las células se dejó en hielo y se sacó luego de 24 horas de tal condición. Luego de este tratamiento, las células son competentes para la transformación.

2.6 Transformación por shock térmico

A 100 µL de células competentes se les agregó 2 µL de una solución de DNA plasmidial y se incubó en hielo por 30 min para permitir que el DNA se adhiriera a las bacterias. Luego, la mezcla se sometió a un shock de temperatura a 42 °C por 30 s y se volvió a colocar en hielo por 1 min. Posteriormente, se añadieron 400 µL de medio LB

tibio (37 °C) y se incubó a 37 °C con agitación por 2 h para permitir la recuperación de las bacterias. Finalmente se sembraron 100 µL de células, en placas que contenían el antibiótico apropiado (ampicilina y cloranfenicol). Las placas fueron incubadas a 37 °C hasta la aparición de colonias.

3. Purificación del DNA plasmidial a pequeña escala

El DNA plasmidial de los clones recombinantes se purificó mediante el uso del kit E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep Kit I de Omega Bio-Tek (Doraville, GA, USA).

4. Secuenciación de mutantes

La secuencia de nucleótidos para cada mutante fue determinada en Macrogen (Japón). Las secuencias fueron analizadas mediante dos programas, DNABaser v2.91 y ClustalX v2.0.12., para verificar la presencia de la mutación y la ausencia de mutaciones no deseadas.

5. Ensayo de expresión de *PfGk* en la transformante *BL21-pET17b*

Para optimizar el proceso de purificación, se realizó un ensayo de expresión del vector que porta la secuencia de *PfGk*. Esta prueba tiene como objetivo determinar el

efecto de la concentración de IPTG y la cantidad de horas necesarias para mejorar el proceso de inducción.

Se realizaron pre-inóculos al 0,1 % v/v en medio LB usando 100 µg/mL de ampicilina, en un volumen final de 5 mL, los que se dejaron crecer por 12 horas. Luego, con el cultivo anterior se inoculó 150 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y se creció hasta alcanzar una OD a 580 nm de 0,4. La expresión de la glucoquinasa silvestre y mutantes se indujo con 0,5 mM y 1 mM de IPTG. Alícuotas de 15 mL fueron recolectadas a distintos tiempos en un rango de 2 a 24 hrs (0,2; 4; 6 y 24 hrs), las cuales se centrifugaron a 8.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente en la centrifuga Eppendorf 5810R con el rotor F-34-6-38.

Las células fueron resuspendidas en 100 mM de Tris-HCl pH 7,8 y 5 mM de MgCl. Luego las bacterias se lisaron con el sonicador BRANSON® Digital Sonifier modelo S-450D (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA), usando 3 pulsos de 10 s con intervalos de 1 min. Al completar esta etapa, las células se centrifugaron a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5810R, usando el rotor F-34-6-38. El sobrenadante, que posee la proteína, se empleó para realizar un gel SDS-PAGE al 11,5 % (el gel separador se compone de acrilamida 11,5 %, SDS 0,1 %, 0,37 M de amortiguador Tris-HCl pH 8,8, APS 0,34 % y TEMED 0,14 %, y el gel concentrador posee acrilamida 4,4 %, SDS 0,1 %, 0,23 M de amortiguador Tris-HCl pH 6,8, APS 0,66 % y TEMED 0,39 %) con su respectivo estándar de peso molecular.

6. Sobreexpresión de Pfgk y las proteínas mutantes

Para obtener bacterias en fase exponencial se inoculó 20 mL de medio LB en presencia de ampicilina y cloranfenicol a una concentración de 100 y 35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente, con una colonia de la cepa BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET-17b que contiene el clon de la *Pfgk* silvestre, el que se incubó toda a 37 °C. Al día siguiente se inoculó al 1 % 1L de medio LB (ampicilina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y cloranfenicol 35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con el cultivo anterior y se incubó a 37 °C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,4 a 580 nm. Para inducir la expresión de la enzima silvestre se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó la incubación a 37 °C toda la noche. Las bacterias inducidas fueron colectadas por centrifugación a 8.000 rpm por 15 min en una centrífuga Eppendorf 5810R usando un rotor F-34-63-8. El mismo procedimiento se realizó para las mutantes E295Q y E295L.

7. Purificación de la Pfgk y las proteínas mutantes

Las bacterias colectadas por centrifugación luego de la inducción, fueron resuspendidas en 50 mL de amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,8, 5 mM MgCl_2 . La suspensión de bacterias fue lisada en un sonicador digital BRANSON® modelo S-450D (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA) mediante la aplicación de pulsos de 30 s de ultrasonido (160 watts) y 1 min de descanso en hielo. El lisado de bacterias fue

centrifugado en una centrífuga Eppendorf® 5810R a 8.000 rpm por 30 min usando un rotor F-34-6-38 a 4°C. La fracción líquida se colocó en un baño a 90 °C durante 30 min y luego se centrifugó durante 15 min a 8.000 rpm. El sobrenadante fue precipitado con 60 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante 1 h a 4 °C con agitación luego de lo cual se centrifugó a 8.000 rpm por 15 min. El sobrenadante es cargado en una columna de interacción hidrofóbica ter-Butil de BioRad ® (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA) previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,8, 5 mM MgCl_2 y 60 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La enzima es eluída mediante un gradiente desde 60 a 0 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las fracciones con actividad glucoquinasa fueron dializadas contra amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,8 y 5 mM MgCl_2 . El dializado se cargó en una columna de intercambio iónico HiTrap Q HP (GE Healthcare Amersham Biosciences, Piscataway USA) equilibrada con amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 y 5 mM MgCl_2 . La proteína se recuperó mediante un gradiente desde cero a 1 M de KCl. Las alícuotas que contenían la enzima fueron dializadas contra amortiguador Hepes 100 mM pH 7,8 y 5 mM MgCl_2 . La actividad específica de la enzima silvestre pura fue de 130 U/mg. El rendimiento fue de aproximadamente 21 mg de enzima por 1 L de cultivo.

Para la purificación de las enzimas mutantes se usó el protocolo descrito para la enzima silvestre, excepto que para seguir la presencia de la enzima se empleó el método de Bradford (Bradford M, 1976) ya que la actividad de las mutantes era muy baja. El grado de pureza obtenido para la enzima silvestre y las mutantes, determinado

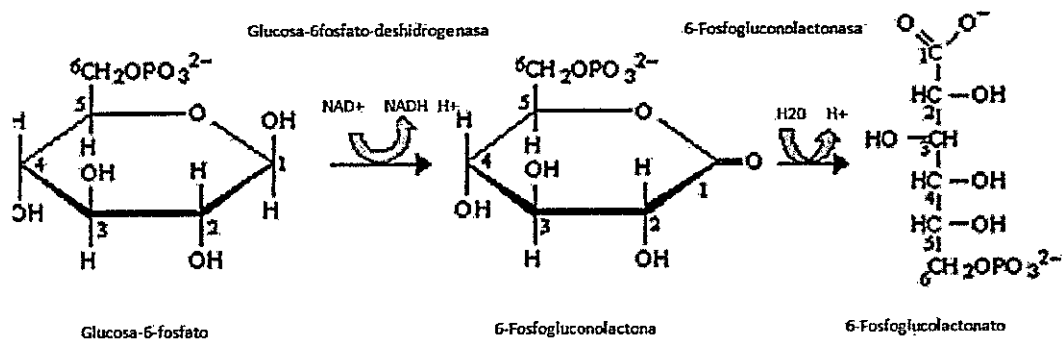
mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes fue mayor al 95 % (programa ProAnalyzer v3.1).

8. Dicroísmo Circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron determinados en un espectropolarímetro. La medición se realizó en el sector del UV lejano usando una celda de 2 mm de paso óptico. Las muestras se prepararon con amortiguador fosfato 15 mM, pH = 7,8 y una concentración de proteína de 0,15 mg/mL. Los datos son presentados como elipticidad por residuo (Centro de Biotecnología Molecular y Biología Estructural. Instituto de Física de São Carlos, Universidad de São Paulo, São Carlos, SP- Brasil).

9. Determinación de la actividad enzimática de la Pfgk

La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente a 40 °C, acoplando la producción de glucosa-6-fosfato a la reducción de NAD⁺, mediante el uso de la enzima auxiliar glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, según el siguiente esquema:



La cuantificación de glucosa-6-fosfato se realizó midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm producido por la reducción de NAD^+ y calculando el número de μmoles de este compuesto usando el coeficiente de extinción molar de $6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kornberg y Pricer, 1953). La mezcla de reacción contenía amortiguador Hepes 100 mM pH = 7,8, NAD^+ 0,5 mM y 1.2 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En los experimentos cinéticos, las concentraciones de glucosa, ADP y metal divalente varían según se indica. La concentración de ADP^{3-} , Me^{2+} y ADP-Me se estimará a partir de la concentración total de ADP^{3-} y Me^{2+} , considerando que la constante de disociación es de $6,91 \cdot 10^{-4}$; $6,6 \cdot 10^{-5}$; $8,3 \cdot 10^{-5}$ y $1,15 \cdot 10^{-3}$ para Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} respectivamente en el siguiente equilibrio:



La concentración de las especies mencionadas será obtenida mediante el uso de la ecuación cuadrática.

$$[\text{MeADP}] = \frac{[\text{ADP}]_T + [\text{Me}]_T + Kd - \sqrt{([\text{ADP}]_T + [\text{Me}]_T + Kd)^2 - 4[\text{ADP}]_T[\text{Me}]_T}}{2}$$

$$[Me^{2+}] = [Me]_T - [MeADP]$$

$$[ADP^{3-}] = [ADP]_T - [MeADP]$$

No se consideró las formas protonadas del nucleótido ya que a pH 7,8 se encuentra escasamente representada.

La reacción se inició mediante la adición de enzima. *Una unidad de enzima (U) se define como la cantidad que cataliza la formación de 1 μ mol de producto por minuto en condiciones experimentales definidas.*

10. Análisis de Datos

Para el cálculo de los parámetros cinéticos los datos experimentales fueron analizados mediante el uso del programa SigmaPlot 10. Este programa también fue empleado para elaborar los gráficos.

Para obtener los modelos de inhibición se utilizó el programa DynaFit v3.28 (Kuzmic P, 1996). Este programa realiza regresiones no lineales mediante el uso de mínimos cuadrados suponiendo la condición de equilibrio rápido. Se evaluaron cuatro modelos: mixto total, mixto parcial, competitivo y no competitivo parcial. Los modelos muestran valores α y β que dan cuenta del efecto que provoca el inhibidor sobre las constantes de equilibrio. El programa discrimina según un estadígrafo (w), el cual da cuenta de la bondad de ajuste entre el modelo y los datos experimentales. Este parámetro, mediante la normalización de probabilidades relativas, señala cual modelo

es el más viable según los datos y modelos propuestos. En este sentido, mientras más cercano a un valor de 1 mejor es el ajuste.

Para el análisis de los datos de la secuenciación de las enzimas mutantes se utilizó el programa DNA Baser y Clustal X.

El grado de pureza de las enzimas se calculó mediante un análisis digital de geles SDS-PAGE con el programa Gel ProAnalyser v3.1.

RESULTADOS

1. Expresión y purificación de la glucoquinasa dependiente de ADP silvestre y mutantes E295Q y E295L.

El tiempo óptimo de inducción de cada proteína se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, teñidos con Azul de Coomassie. En este ensayo se estableció el tiempo óptimo de inducción, el cual resultó ser toda la noche para los tres casos. Las enzimas mutantes fueron purificadas usando el mismo protocolo aplicado a la enzima nativa, a excepción del método de detección, que para las mutantes fue el método de Bradford, debido a la mínima actividad que presentaban (Figura 7; Tabla I).

Para la enzima silvestre se obtuvo una actividad específica de 131 U/mg, mientras que para las enzimas mutantes E295Q y E295L se alcanzó una actividad

específica de 0,5 U/mg y 0,06 U/mg respectivamente. El grado de pureza fue de 95% en los tres casos según el análisis de densitometría (Gel ProAnalyser v3.1).

Tabla I: Purificación de la PfgK silvestre.

	Vol [mL]	Actividad [U/mL]	Actividad Total [U]	Proteína [mg]	Actividad Específica [U/mg]	Concentración [mg/mL]	Rendimiento (%)	F.P
Extracto crudo	50	123	6.150	290	21	5,80	100	1,0
Shock 90°C	50	113	5.650	115	49	2,30	92	2,3
Precipitación (NH₄)SO₂	60	132	7.920	98	81	1,60	128*	3,9
Interacción hidrofóbica	27	108	2.916	25	117	0,93	47	5,6
Intercambio iónico	6	460	2.760	21	131	3,50	45	6,2

(*) Presencia de inhibidores en el extracto crudo lo que lleva a una subestimación de la actividad total en el extracto inicial. F.P = factor de purificación.

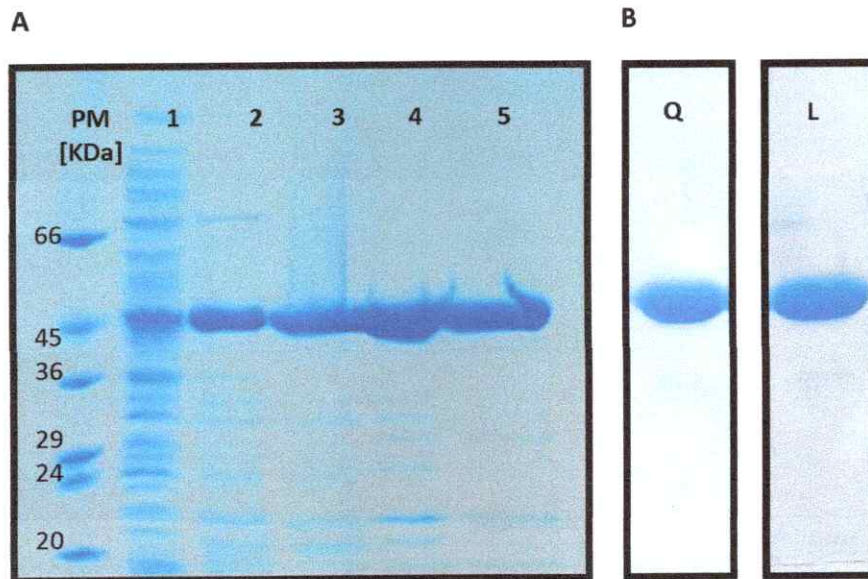


Figura 7. A) Electroforesis en condiciones desnaturalantes de las diferentes etapas de la purificación de la enzima silvestre. (1) Extracto crudo; (2) Shock térmico a 90°C; (3) Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (4) Interacción hidrofóbica; (5) Intercambio iónico. B) Se muestra el último paso de purificación de las enzimas mutantes E295Q y E295L.

2. Dicroísmo circular de la enzima silvestre y las mutantes

Con el propósito de determinar el posible efecto de las mutaciones sobre la estructura secundaria de la enzima, se realizaron estudios de dicroísmo circular para la enzima silvestre y las mutantes. La rotación del plano y la absorción diferencial de los componentes circularmente polarizados de la luz varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose adquirir espectros de estos fenómenos. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en una conformación determinada. Los espectros de dicroísmo obtenido para las enzimas mutantes son similares al espectro obtenido para la enzima silvestre, lo cual sugiere que el efecto de las mutaciones puntuales es irrelevante a nivel de los cambios en el contenido de estructura secundaria de la enzima (Figura 8).

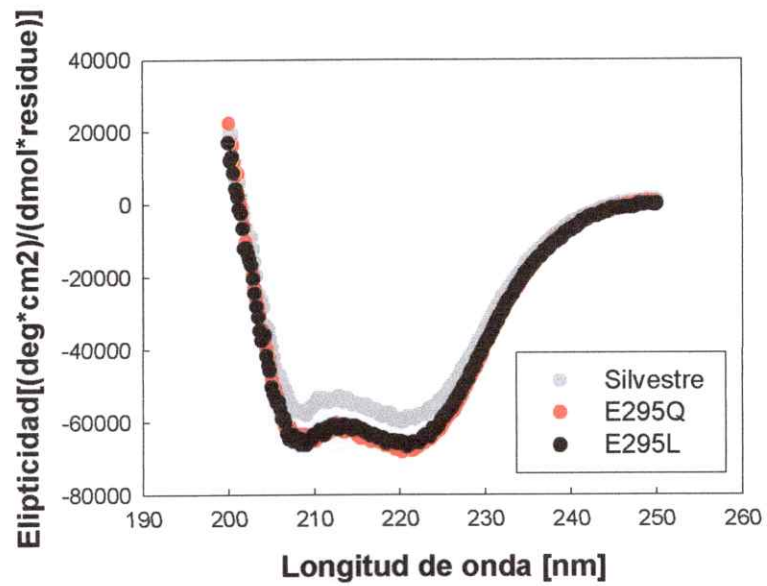
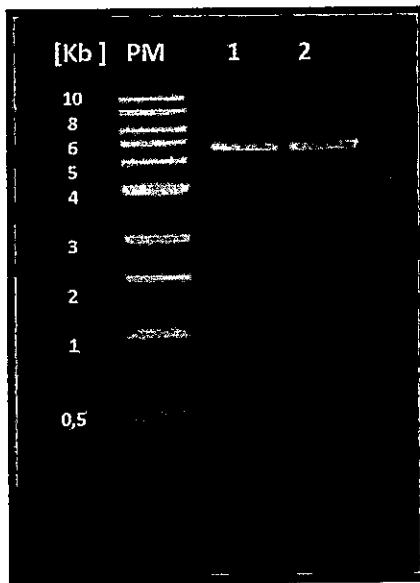


Figura 8. Espectros de dicroísmo circular de la glucoquinasa dependiente de ADP silvestre y las mutantes E295Q y E295L. La concentración de proteína usada fue de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las tres enzimas. Se grafica la elipticidad molar observada en función de la longitud de onda.

3. Mutación sitio dirigida

Para evaluar la importancia del residuo E295 de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* se construyeron dos mutantes puntuales en las que el ácido glutámico fue reemplazado por glutamina y leucina respectivamente. Estas mutaciones cumplen el objetivo de eliminar la carga o la capacidad de formar enlaces de hidrógeno, sin afectar el tamaño de la cadena lateral. Para esto se utilizó el kit GeneTaylor de Invitrogen® que requiere el diseño de partidores que contengan la mutación deseada. El vector de expresión pET-17b con el gen mutante fue transformado en la cepa de *E.coli* DH5 α -T1, a partir de la cual se purificó el plásmido para determinar la secuencia de nucleótidos de cada mutante. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con los programas ClustalX y DNA Baser. Esto nos permitió confirmar las mutaciones puntuales del residuo glutámico 295 por glutamina y leucina. Por otro lado, se descartó la presencia de otras mutaciones en la secuencia (Figura 9).

A



B

Ácido glutámico 295 por Glutamina

5' - GTGTAGGGCTTAACGAGGTACAGCTGGCATCAAT -
3'
3' - CACATCCCGAATTGCTCCATGTCGACCGTAGTTA - 5'

Ácido glutámico 295 por Leucina

5' - GTGTAGGGCTTAACGAGGTACAGCAGGCATCAAT -
3'
3' - CACATCCCGAATTGCTCCATGTCGTCCGTAGTTA - 5'

Figura 9. A) Resultado de la amplificación del gen de la *PfGK* para la mutación del residuo E295. El carril 1 corresponde a la mutante E295Q y el carril 2 a la mutante E295L. El tamaño aproximado del fragmento amplificado es de 4,7Kb. B) Diseño de partidores para los cambios E295Q y E295L. Las letras subrayadas corresponden al triplete del ácido glutámico y las letras en rojo indican la base sustituida.

4. Especificidad por metales divalentes de las enzimas silvestre y mutantes E295Q y E295L.

La glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* cataliza la reacción de fosforilación de glucosa usando ADP como dador de fosforilo. Se evaluó la capacidad de esta glucoquinasa de utilizar diferentes metales divalentes para llevar a cabo la catálisis (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+}). Se determinó que esta enzima emplea preferentemente Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} (Figura 10).

La mutante E295Q exhibe un patrón de especificidad equivalente al observado para la enzima silvestre (Figura 11). La actividad específica de esta enzima es mayor en presencia de Mn^{2+} y Co^{2+} en comparación a lo observado con Mg^{2+} . Además, la actividad relativa determinada con estos metales (considerando la actividad con Mg^{2+} como 100%), es casi el doble de lo obtenido para la proteína silvestre (Figura 13).

En relación a la mutante E295L, el perfil de especificidad por metales es diferente al determinado para la enzima silvestre y la mutante E295Q (Figura 12). Esta quinasa prefiere utilizar Mg^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} ya que la k_{cat} obtenida con cobalto es mucho menor si se compara con la constante catalítica de la enzima silvestre. La mayor actividad de esta proteína mutante se logra con el empleo de Ca^{2+} y Mg^{2+} . En esta mutante, la actividad relativa determinada con Ca^{2+} , es levemente mayor que la obtenida en presencia del resto de cationes divalentes que utiliza (Figura 13).

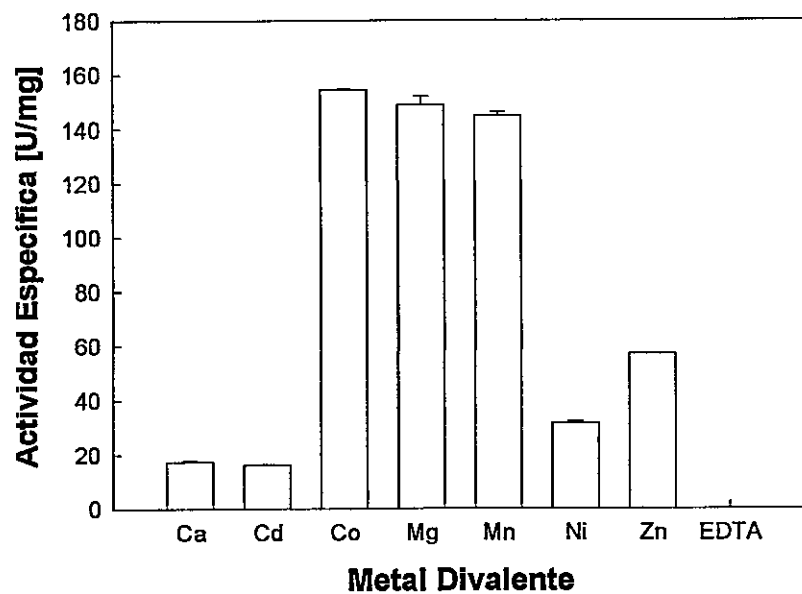


Figura 10. Especificidad por cationes divalentes de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*. El ensayo fue realizado en presencia de ADP 2 mM, metal 3 mM y glucosa 9 mM. Los resultados son expresados como actividad específica (U/mg). El control se realizó en ausencia de metal divalente y con EDTA.

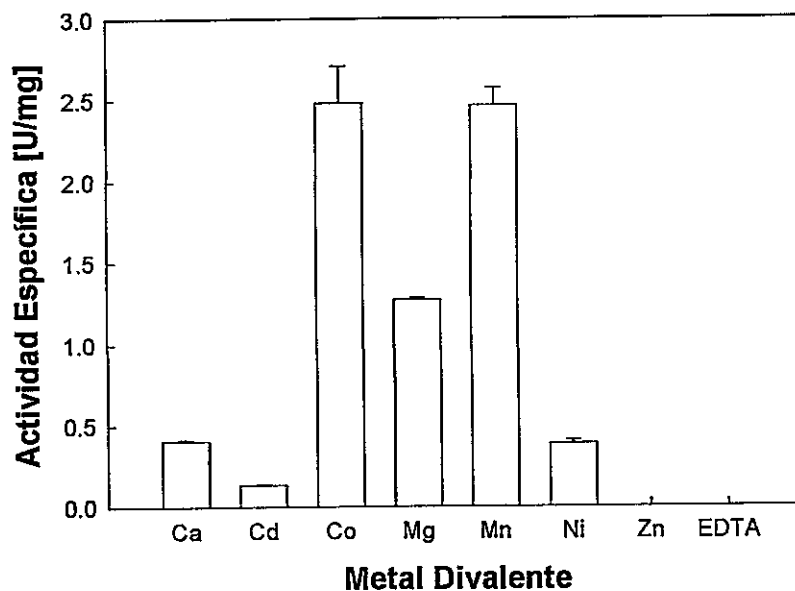


Figura 11. Especificidad por cationes divalentes de la mutante E295Q de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*. El ensayo fue realizado en presencia de ADP 2 mM, metal 3 mM y glucosa 60 mM. Los resultados son expresados como U/mg. El control se realizó en ausencia de metal divalente y con EDTA

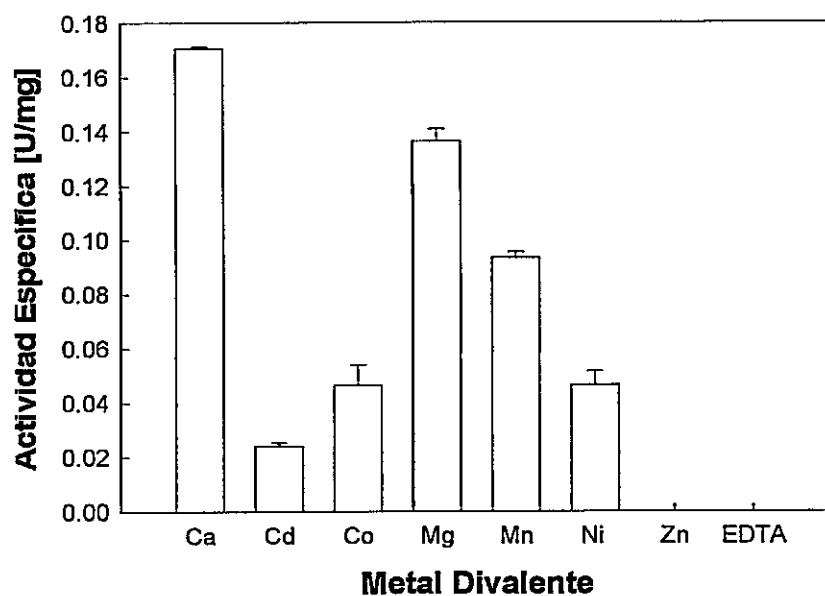


Figura 12. Especificidad por cationes divalentes de la mutante E295L de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*. El ensayo fue realizado en presencia de ADP 2 mM, metal 3 mM y glucosa 60 mM. Los resultados son expresados como U/mg. El control se realizó en ausencia de metal divalente y con EDTA.

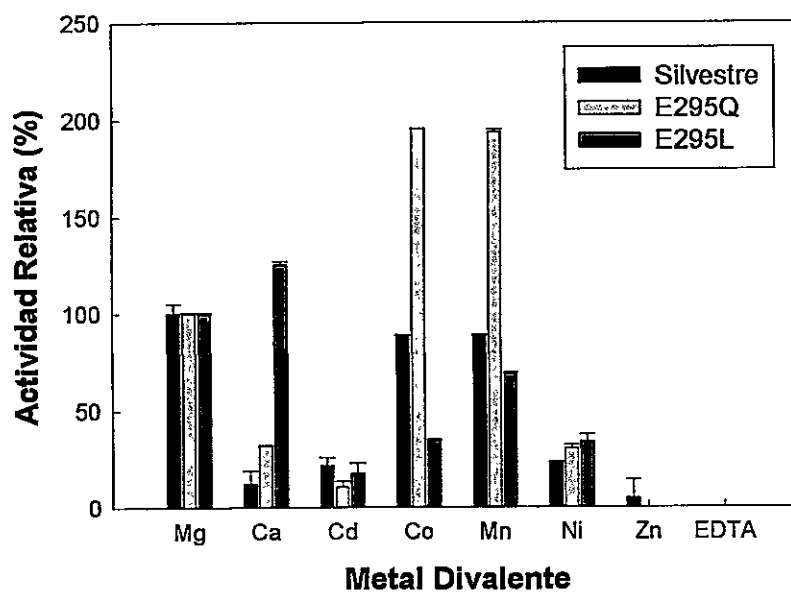


Figura 13. Comparación de la especificidad de cationes. Los ensayos fueron efectuados con una concentración saturante de ambos sustratos. Los resultados son presentados como porcentaje de actividad, considerando la actividad alcanzada con Mg^{2+} como 100 %. El control fue hecho en ausencia de metal y en presencia de EDTA.

5. Determinación de los parámetros cinéticos de la glucoquinasa dependiente de ADP en la cepa silvestre y las mutantes E295Q y E295L.

Con la finalidad de conocer más detalladamente la relación entre el complejo metal nucleótido (ADPMe) y la enzima, se estudiaron los parámetros cinéticos con los distintos cationes que utilizan preferentemente tanto la enzima silvestre como las mutantes.

La k_{cat} de la enzima silvestre, determinada con los diferentes cationes metálicos, presenta valores similares. Sin embargo, se advierte una mayor actividad cuando el metal empleado en la catálisis es Mn^{2+} o Co^{2+} respecto de lo estimado para Mg^{2+} . Por otro lado, se observa que el valor de K_m para el complejo metal nucleótido es esencialmente el mismo con los tres cationes ensayados, lo propio sucede con el valor de K_m para glucosa. El valor de k_{cat}/K_m para ambos sustratos no varía significativamente en presencia de los diferentes metales (Tabla II).

Tabla II. Parámetros cinéticos de glucoquinasa silvestre con los diferentes cationes que emplea para la catálisis.

Metal	K_{mADP} [μM]	K_{mGlu} [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_{mADP} [$s^{-1}/\mu M$]	k_{cat}/K_{mGlu} [s^{-1}/mM]
Mg^{2+}	14±2	0,40±0,005	107±9,8	7,6	268
Mn^{+2}	22±1	0,60±0,03	123±16	5,6	205
Co^{+2}	25±1	0,50±0,02	123±20	4,9	246

El efecto de la mutación del ácido glutámico 295 por glutamina sobre los parámetros cinéticos se muestra en la Tabla III. La proteína E295Q presenta una constante catalítica bastante reducida con los tres metales divalentes que utiliza. La actividad enzimática es cerca del 0,5% de la actividad obtenida para la enzima silvestre cuando usa Mg^{2+} y cerca del 0,9% en presencia de Mn^{2+} o Co^{2+} .

El valor de K_m aparente para el complejo metal nucleótido es aproximadamente cinco veces mayor en presencia de los tres cationes metálicos divalentes (CMD) que el observado en la enzima silvestre (Figura 14). La misma diferencia se encuentra para los valores de K_m aparente de glucosa entre la enzima mutante y la glucoquinasa silvestre con los diferentes metales (Figura 14). El valor de k_{cat}/K_m de la enzima mutante por el nucleótido y glucosa en presencia de los tres CMD resulta en valores similares entre sí. Sin embargo, este valor para el nucleótido y glucosa en la enzima silvestre, es aproximadamente tres órdenes de magnitud mayor que el de la mutante con los tres metales ensayados.

Tabla III. Parámetros cinéticos obtenidos para la mutante E295Q

	Mg^{2+}		Mn^{2+}		Co^{2+}	
	E295Q	Silvestre	E295Q	Silvestre	E295Q	Silvestre
K_{mADP} [μM]	72 \pm 8,3	14 \pm 1,6	119 \pm 3,5	21 \pm 0,6	149 \pm 21	25 \pm 0,6
K_{mGlu} [mM]	1,54 \pm 0,098	0,40 \pm 0,005	2,74 \pm 0,33	0,60 \pm 0,03	2,57 \pm 0,19	0,50 \pm 0,02
k_{cat} [s^{-1}]	0,56 \pm 0,09	107 \pm 9,8	1,10 \pm 0,46	122 \pm 16	1,13 \pm 0,25	123 \pm 20
k_{cat}/K_{mADP} [s^{-1}/mM]	0,0078	7,6	0,0092	5,8	0,0076	4,9
k_{cat}/K_{mGlu} [s^{-1}/mM]	0,36	260	0,40	203	0,44	246

El efecto de la mutación del ácido glutámico 295 por leucina sobre los parámetros cinéticos se muestra en la Tabla IV. La enzima mutante, a una concentración de metal libre 1 mM, presenta una constante catalítica bastante disminuida para los tres metales en relación a lo alcanzado para la enzima silvestre. Esta baja en la actividad es aún más acentuada que lo obtenido para la mutante E295Q, llegando a ser aproximadamente el 0,06 y 0,04 % de la actividad determinada con Mg^{2+} y Mn^{2+} en la enzima silvestre respectivamente.

El valor de K_m aparente para el complejo metal nucleótido es cerca de 7 veces mayor, que lo obtenido para la enzima silvestre, en presencia de los tres cationes, (Figura 14). Para glucosa, se obtuvo una K_m aparente aproximadamente tres veces mayor en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} (Figura 14). El valor de k_{cat}/K_m para ambos sustratos presenta una disminución de cuatro órdenes de magnitud respecto de lo calculado para la enzima silvestre.

Tabla IV. Parámetros cinéticos obtenidos para la mutante E295L

	Mg^{2+}		Mn^{2+}		$Co^{2+}/^*Ca^{2+}$	
	E295L	Silvestre	E295L	Silvestre	*E295L	Silvestre
$K_{m_{ADP}}$ [μM]	68 \pm 12	14 \pm 1,6	149 \pm 20	21 \pm 0,6	167 \pm 6,5	25 \pm 0,6
$K_{m_{Glu}}$ [mM]	1,35 \pm 0,04	0,40 \pm 0,005	1,95 \pm 0,04	0,60 \pm 0,03	0,40 \pm 0,07	0,50 \pm 0,02
k_{cat} [s^{-1}]	0,062 \pm 0,02	107 \pm 9,8	0,049 \pm 0,002	122 \pm 16	0,11 \pm 0,04	123 \pm 20
$k_{cat}/K_{m_{ADP}}$	0,0009	7,6	0,0003	5,8	0,0007	4,9
$k_{cat}/K_{m_{Glu}}$	0,046	268	0,025	203	0,28	246

*Mutante E295L utiliza Ca^{2+} para la catálisis

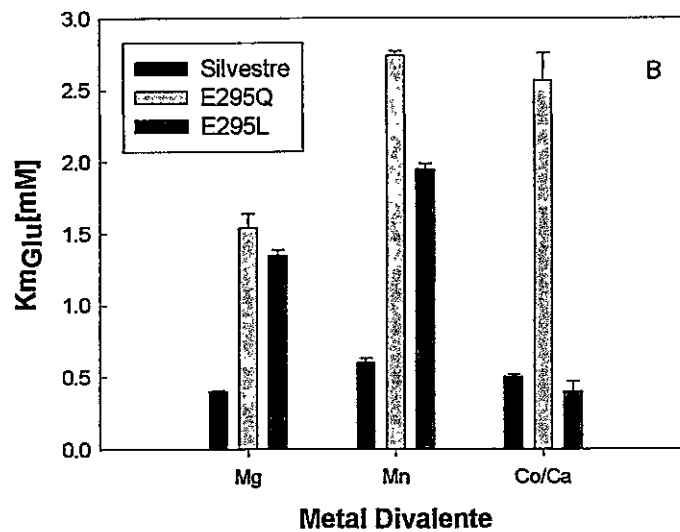
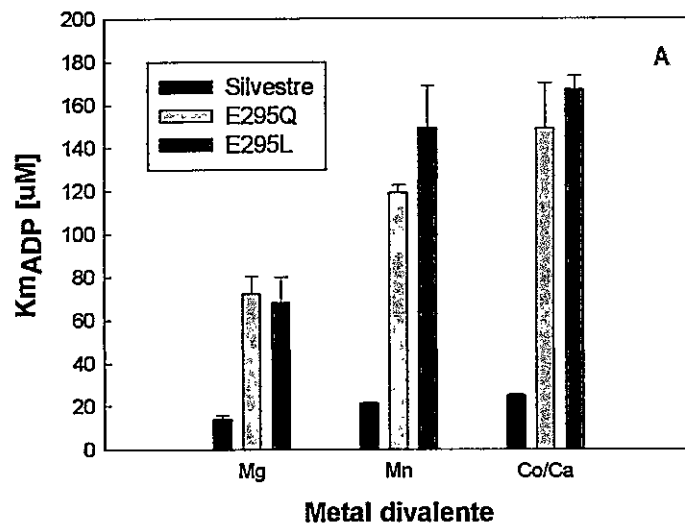


Figura 14. Comparación de los valores de K_m obtenido para las tres enzimas. En el gráfico A se muestra los valores de K_m para ADP y en el gráfico B se muestra los valores de K_m para glucosa

Al comparar los valores de Km aparente entre ambas mutantes vemos que son similares tanto para glucosa como ADP en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} . En cuanto a los valores de k_{cat} , la mutante E295Q presenta una mayor actividad enzimática con los tres cationes metálicos divalentes. El orden de actividad en esta mutante es el siguiente: $Mg^{2+} < Mn^{2+} \approx Co^{2+}$.

6. Efecto del aumento de metal libre sobre la actividad de la enzima silvestre y las mutantes E295Q y E295L de *P. furiosus*.

En enzimas que requieren de un metal para su actividad, un mecanismo general de activación es la unión del metal al nucleótido, lo que genera el verdadero sustrato. Sin embargo, en otros casos se requiere de una concentración de metal mucho mayor que la concentración de nucleótido para alcanzar la máxima actividad, lo que sugiere un papel adicional para este metal (Budde R y col, 1993). Para el caso de algunas enzimas de la superfamilia se ha visto que la unión de un segundo ion Mg^{2+} produce una inhibición de la actividad enzimática, como en el caso de la AK de diversas fuentes, o un aumento de la misma, como en PFK-2 de *E. coli* (Maj C y col, 2002; Maj C y Gupta R, 2001, Parducci R y col, 2006). Estos datos sugieren que la unión de un segundo metal puede ser un rasgo común a todas las enzimas de la superfamilia. Por esta razón, se ensayó el efecto de la concentración de distintos cationes divalentes sobre la actividad de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*. Se observó que al aumentar la

concentración del CMD la actividad de la enzima disminuye. El orden de inhibición mostrado por la glucoquinasa es el siguiente: $Mn^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+}$ (Figura 15).

En la enzima mutante E295Q se observa un aumento de la actividad enzimática al incrementar la concentración de metal libre. El valor de K_a es de 3,1 y 6,1 mM para Mn^{2+} y Mg^{2+} respectivamente (Figura 16). En cambio en la mutante E295L se distingue el efecto contrario, es decir, la actividad enzimática decrece con el aumento de la concentración de metal divalente libre. El valor de IC_{50} es de 0,4 y 0,3 mM para Mg^{2+} y Mn^{2+} respectivamente (Figura 17). Sin embargo, en ambos casos el resultado observado es independiente de la identidad del catión divalente.

El valor de IC_{50} fue de 9,5 mM; 1 mM y 1,8 mM para Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} respectivamente, en la enzima silvestre. Desde los valores de IC_{50} se desprende que la enzima es muy poco sensible a la inhibición por Mg^{2+} libre, en cambio muestra una inhibición significativa con Co^{2+} y Mn^{2+} libre.

Debido a que la enzima silvestre es muy poco sensible a la inhibición por Mg^{2+} libre, en cambio muestra una inhibición significativa con Co^{2+} y Mn^{2+} libre, sólo se consideraron estos dos últimos cationes para realizar estudios cinéticos en relación al mecanismo de inhibición ejercido por estos metales divalentes. El ensayo para determinar el mecanismo de inhibición se efectuó añadiendo metal libre a distintas concentraciones (0,2; 1 y 4 mM) en curvas donde se considera MeADP como sustrato variable. Con este objetivo se realizó un ajuste global considerando cuatro modelos posibles de inhibición (Inhibición competitiva, inhibición mixta parcial, inhibición mixta

total e inhibición no competitiva parcial), en el cual el patrón obtenido corresponde a una inhibición no-competitiva parcial con ambos metales (Segel I, 1975; Cornish-Bowden, 1995) (Tabla V; Figura 18, 19).

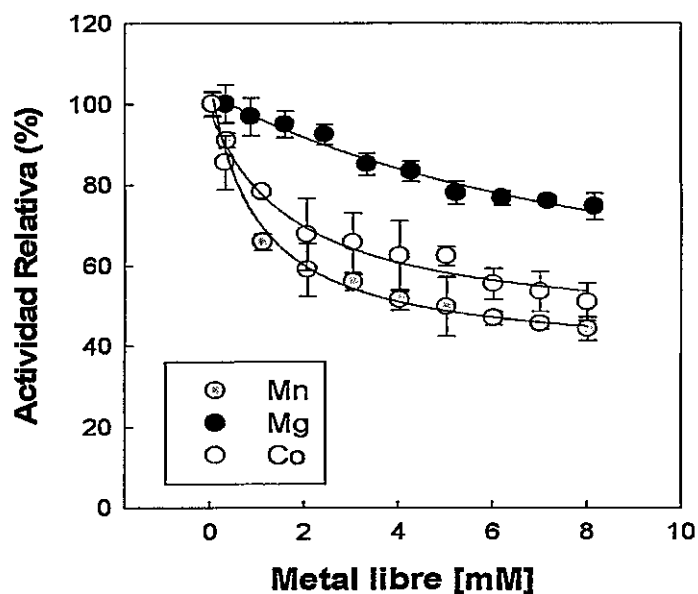


Figura 15. Efecto de la concentración de metal libre sobre la actividad de la enzima dependiente de ADP de *P. furiosus*. La actividad se determinó en presencia de 2 mM de ADP total y 9 mM de glucosa. Los metales divalentes ensayados fueron Mg^{2+} (●), Mn^{2+} (◐) y Co^{2+} (○). Los resultados se expresan como porcentaje de actividad relativa, considerando como 100% la actividad obtenida con la menor cantidad de metal libre ensayada (Ajuste realizado con el programa SigmaPlot a una función hiperbólica en decaimiento).

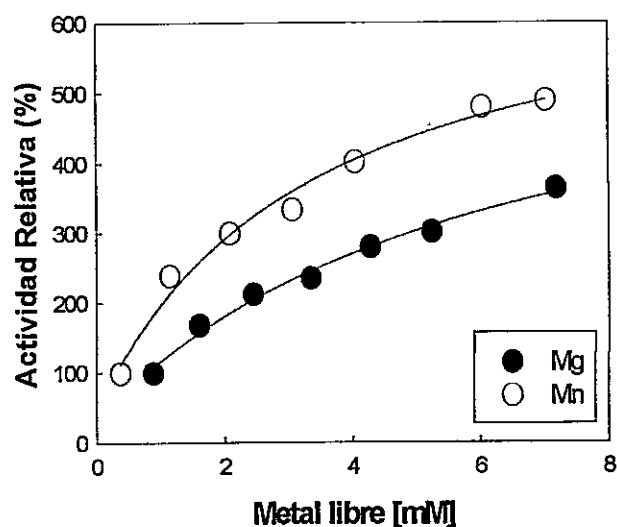


Figura 16. Efecto de la concentración de metal libre sobre la actividad de la enzima mutante E295Q de *P. furiosus*. La actividad se determinó en presencia de 2 mM de ADP total y 60 mM de glucosa. Los metales divalentes ensayados fueron Mg^{2+} (●) y Mn^{2+} (○). Los resultados se expresan como porcentaje de actividad, considerando como 100% la actividad inicial con cada metal divalente. El valor de k_a fue de 6,1 mM y 3,4 mM para Mg^{2+} y Mn^{2+} respectivamente (Ajuste realizado con el programa SigmaPlot a una función hiperbólica).

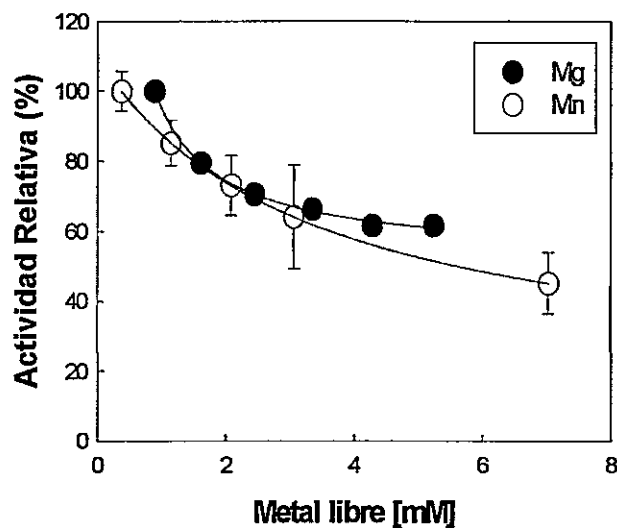


Figura 17. Efecto de la concentración de metal libre sobre la actividad de la enzima mutante E295L. La actividad se determinó en presencia de 2 mM de ADP total y 60 mM de glucosa. Los metales divalentes ensayados fueron Mg^{2+} (●) y Mn^{2+} (○). Los resultados se expresan como porcentaje de actividad, considerando como 100% la actividad inicial con cada metal divalente. El valor de IC_{50} fue de 411 y 334 μM para Mg^{2+} y Mn^{2+} respectivamente (Ajuste realizado con el programa SigmaPlot a una función hiperbólica en decaimiento).

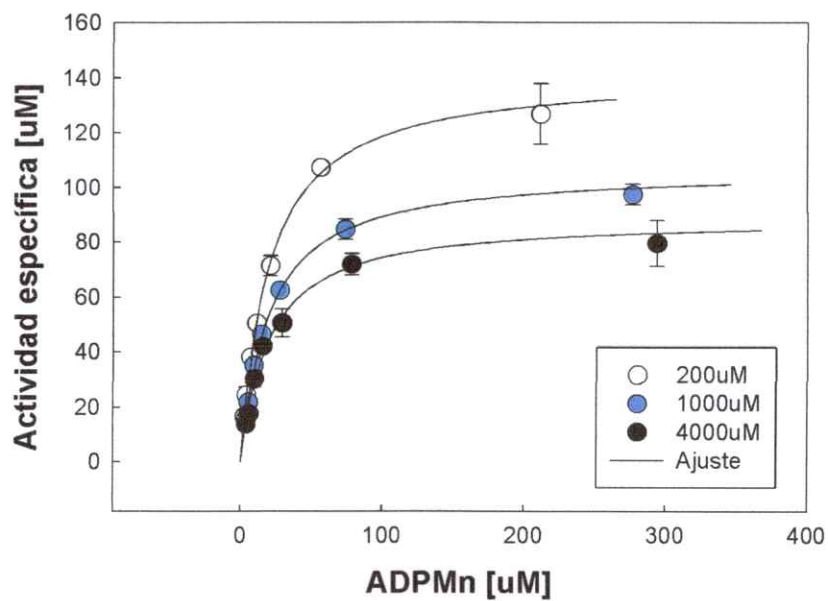
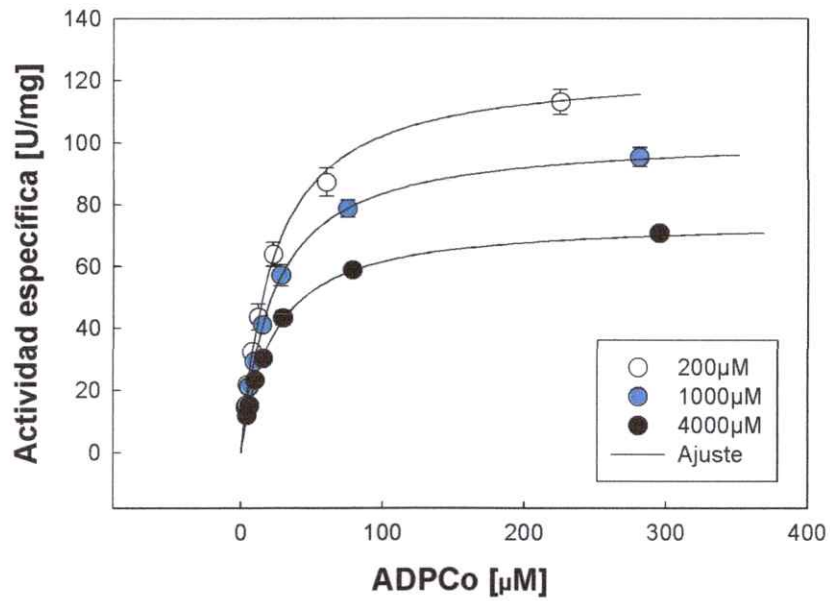


Figura. 18. Inhibición por metal libre en la glucoquinasa silvestre usando MeADP como sustrato variable. La línea continua indica el ajuste realizado con el programa Dynafit.

Tabla V. Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste global de las curvas de Km ADPMe en presencia de glucosa 9 mM a distintas concentraciones de inhibidor (0,2; 1 y 4 mM) usando el programa DynaFit.

Me	Ks [μM]	Ki [mM]	kp [s ⁻¹]	βkp [s ⁻¹]	w
Mn ²⁺	19±0,5	0,4±0,09	172±6	80±3	0,70
Co ²⁺	22±0,8	1,6±0,5	134±6	52±7	0,87

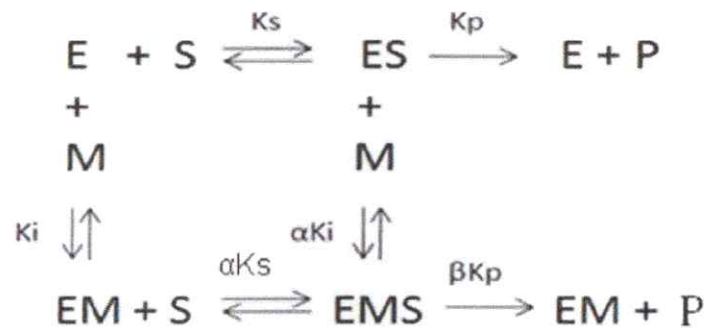


Figura 19. Modelo de inhibición propuesto para la PfgK: Inhibición no competitiva parcial. E: Enzima/glucosa; M: metal divalente (inhibidor); S: MeADP (sustrato); P: producto

7. Efecto del aumento de ADP libre sobre la actividad de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus*.

Además del metal libre, el ADP libre es otra especie importante en el equilibrio que lleva a la formación del complejo metal nucleótido. Por tal motivo se estudió el efecto de la concentración de ADP libre sobre la enzima. Se realizó un experimento con dos concentraciones de Mg^{2+} , con el fin de alcanzar concentraciones saturante y subsaturante del complejo metal nucleótido. Se observa que la enzima es inhibida por ADP libre y que el grado de inhibición depende de la concentración de ADPMg (Figura 20), lo que sugiere una inhibición de tipo competitiva. El tipo de inhibición se determinó realizando experimentos de cálculo de K_m con ADPMg como sustrato variable, donde se añadió ADP libre a distintas concentraciones (1, 3 y 5 mM). Se estableció que el mecanismo de inhibición que ejerce el ADP libre es de tipo competitivo con respecto al sustrato ADPMg ya que el valor de K_m aumenta en función del inhibidor y la velocidad máxima se mantiene constante. El valor de la constante de inhibición fue de 0,9 mM (Figura 21).

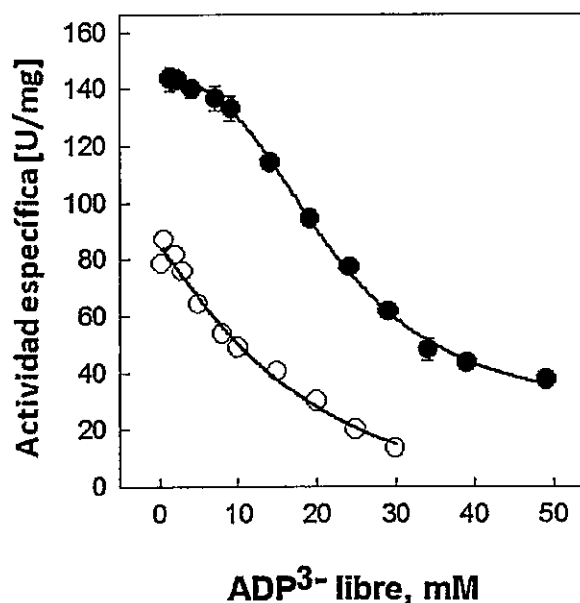


Figura 20. Actividad de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* en función de la concentración de ADP libre a diferentes concentraciones de Mg^{2+} total y en presencia de glucosa 9 mM. (●) Efecto del ADP libre a partir de una concentración de 47 veces K_m del complejo $MgADP$ cuando la concentración total de Mg^{2+} usada fue de 1 mM; (○) Efecto del ADP libre a partir de una concentración del complejo $MgADP$ de 2,9 veces K_m cuando la concentración total de Mg^{2+} usada fue de 0,1 mM. Los resultados se expresan como U/mg.

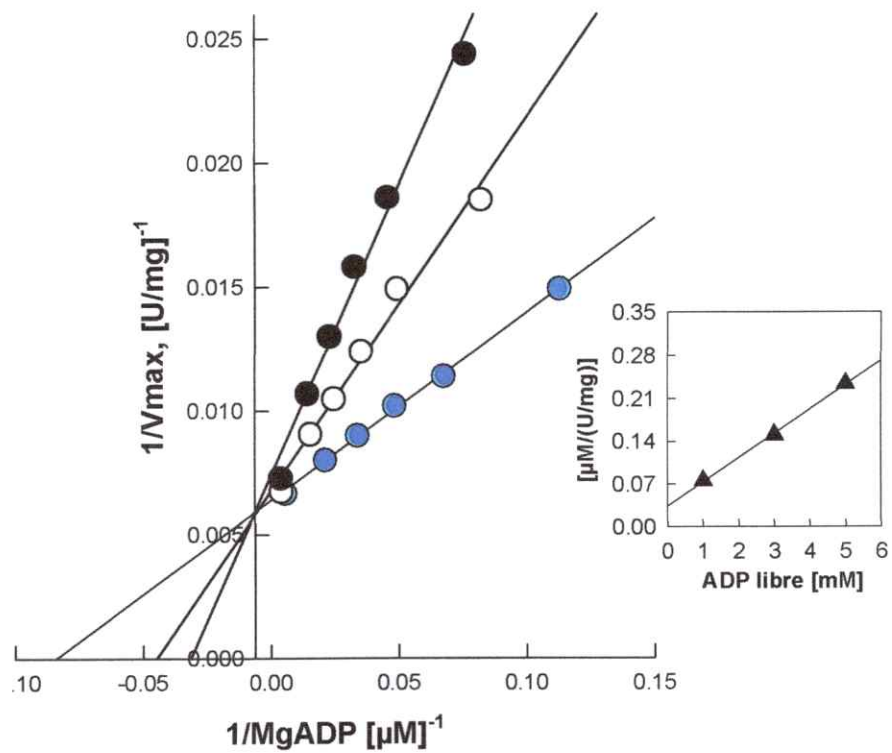


Figura 21. Inhibición por ADP libre de la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* usando MgADP como sustrato variable. Las concentraciones de ADP libre son 1 mM (●), 3 mM (○) y 5 mM (●). La concentración de glucosa fue de 9 mM. Se muestra una gráfica secundaria con el valor de la pendiente () en función de la concentración de ADP libre.

DISCUSIÓN

Las quinasas corresponden a enzimas que transfieren un grupo fosforilo desde el ATP, PPI o ADP a un sustrato que contiene un grupo alcohol, nitrógeno o carboxilo. El sustrato puede ser una molécula pequeña, lípido o proteína. Las quinasas juegan roles indispensables en el metabolismo y son las enzimas mejor estudiadas a nivel estructural y bioquímico. A pesar de que catalizan la misma reacción de transferencia de fosforilos, muestran una gran diversidad en el plegamiento estructural y mecanismos de reconocimiento de sustratos (Cheek S y col, 2005).

Los experimentos realizados para determinar que metales divalentes puede utilizar la glucoquinasa ADP dependiente de *P. furiosus* dieron como resultado que emplea Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} . Existen varias quinasas donde se ha demostrado que el Mg^{2+} puede ser reemplazado en su función tanto por Mn^{2+} como Co^{2+} . Ejemplos de ello lo constituyen la adenosina quinasa de diversas fuentes (Rotllan P y Miras M, 1985; Chang C y col, 1979; Schnebli H y col, 1967), fosfofructoquinasa ATP dependiente de *Thermotoga marítima*, (Hansen T y col, 2002) y *Desulfurococcus amylolyticus* (Hansen T y Schönheit P, 2000) y piruvato quinasa de músculo entre otras (Baek Y y Nowak T, 1981). A pesar de que el Mg^{2+} puede ser sustituido por Mn^{2+} y Co^{2+} , es preferido debido a su afinidad con sustratos que contienen fosfatos. Este hecho es una característica constante en las moléculas biológicas (ADN y ARN), sugiriendo que los sistemas biológicos seleccionaron este ión por su abundancia y alta solubilidad desde los estados

tempranos de la vida (Andreini C y col, 2008). Este ión es muy empleado debido a la estabilización electrostática y activación electrofílica de sustratos a través de la polarización de enlaces P—O y C—O ya que prefiere el oxígeno como donador de electrones. Por otra parte, Co^{2+} generalmente participa en reacciones donde se requiere de un centro redox y escasamente en reacciones de fosfotransferencia. Considerando lo descrito anteriormente se puede concluir que la identidad del catión divalente no es relevante para llevar a cabo la reacción de fosfotransferencia, pero sí su radio iónico y geometría de coordinación.

En la mutante E295Q se encuentra el mismo perfil de especificidad por metales que el determinado para la enzima silvestre, mientras que en la mutante E295L ocurre una modificación. Esta última enzima usa Mg^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} para su actividad catalítica. El Ca^{2+} comparte propiedades similares con el Mg^{2+} como por ejemplo ser estables en el estado de oxidación +2 y prefieren dadores de electrones duros como el oxígeno. Sin embargo, el Ca^{2+} es de mayor tamaño presentando un radio iónico de 1 Å. La diferencia entre sus radios iónicos impone un efecto importante sobre su geometría de coordinación. Mientras que el Mg^{2+} puede adoptar una coordinación octaédrica, el Ca^{2+} es capaz de unir un gran número de ligandos debido a su geometría irregular y comportamiento flexible. Considerando los resultados y antecedentes en relación al uso de metales en quinasas, se puede sugerir que debido al radio iónico del Ca^{2+} y la presencia de leucina en reemplazo de ácido glutámico es probable que se modifique la estructura local de la enzima, generándose una nueva interacción que permita la

entrada de Ca^{2+} y se lleve a cabo la catálisis. Por otro lado, es factible que en esta mutante la modificación estructural local impida la entrada de Co^{2+} . En el caso de que este ión logre ingresar, es probable que utilice su configuración de pirámide cuadrada, la cual no realizan el resto de metales ensayados. Esta configuración sería inapropiada para acomodar los fosfatos en la reacción de transferencia y por tanto la catálisis es ineficiente. En relación a la capacidad catalítica, el reemplazo del residuo ácido glutámico por uno hidrofóbico (leucina) trae como consecuencia una disminución drástica en la k_{cat} respecto de la enzima silvestre. Desde este resultado se infiere que la unión del nucleótido se ve afectada.

Dentro del conjunto de quinasas, las que catalizan la fosforilación de azúcares se dividen en tres familias no homólogas: hexoquinasa, riboquinasa y galactoquinasa (Bork P y col, 1993). Basándose en la conservación del plegamiento estructural de la familia riboquinasa se puede reconocer enzimas homólogas tales como quinasas del metabolismo de las coenzimas, además de glucoquinasas y fosfofructoquinasas dependientes de ADP, las cuales constituyen un conjunto denominado superfamilia riboquinasa. Pertenecen a este grupo de fosfotransferasas la adenosina quinasa (Cook W y col, 2000; Schumacher M y col, 2000), riboquinasa (Park J y col, 2007; Sigrell J y col, 1998), fosfofructoquinasa (Sakuraba H y col 2002; Tuininga J y col, 1999; Ronimus R y col, 1999), piridoxal quinasa (Li M y col, 2002; Safo M y col, 2004-2006; Newman J y col, 2006; Cao P y col, 2006), glucoquinasa dependiente de ADP (Ito S y col, 2003; Tsuge H y col, 2002; Labes A y Schönheit P, 2003), HMPP quinasa (Newman J y col, 2006);

aminoimidazol ribosido quinasa de *Salmonella entérica* (Zhang Y y col, 2004) y THZ quinasa (Campobasso N y col, 2000) entre otras. Estudios sobre la estructura de este grupo de enzimas identificaron dos motivos de secuencia de importancia para la catálisis, GAGD y NXXE (Maj M y col, 2002). Estos se localizan en el sitio activo de la estructura de los miembros de la superfamilia riboquinasa, por lo que se consideran determinantes de la función catalítica de esta familia de quinasa. Varios autores (Maj M y col, 2000) han propuesto al ácido aspártico del motivo GAGD como base catalítica general. Además, se señala que los residuos N y E están involucrados en la catálisis y regulación de la actividad ya que participan en la unión de iones PO_4^- y Mg^{2+} al sitio activo (Maj M y col, 2001; Parducci R y col, 2006). En la glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* los residuos del motivo NXXE corresponden a N292 y E295. Basándose en los antecedentes sobre la participación de estos residuos en la modulación de la actividad enzimática de miembros de la superfamilia riboquinasa, se realizaron mutantes para el ácido glutámico 295 en que éste se reemplazó por glutamina (E295Q) o leucina (E295L). Estas modificaciones nos permitieron evaluar el efecto de la carga y la capacidad de formar enlaces de hidrógeno sobre la catálisis y regulación de la actividad de la glucoquinasa.

En la estructura de la glucoquinasa de *P. furiosus* no se observa un Mg^{2+} unido. Sin embargo, existe un grupo de moléculas de agua que se ha propuesto que participan en la unión con el fosfato β -terminal del ADP. En esta reacción participan residuos aminoacídicos entre los cuales está el ácido glutámico 295 (Ito S y col 2003)

(Figura 3). Tal observación de la estructura cristalina explicaría el hecho de que el cambio en este aminoácido por otro que carece de carga como glutamina o sea apolar como leucina afecte la actividad de la enzima. Vemos que la consecuencia de ambas modificaciones es un aumento en los valores de K_m para ambos sustratos en presencia de los diferentes cationes divalentes. Por otro lado, se determinó una disminución significativa de la constante catalítica en ambas mutantes. Realizando un análisis bastante grueso se puede afirmar que la carga del residuo E295 es más significativa para llevar a cabo la catálisis que la capacidad de formar enlaces de hidrógeno. Se observa que el decaimiento de k_{cat} en la mutante E295Q es de dos órdenes de magnitud respecto de la enzima silvestre y la diferencia entre ambas mutantes es de un orden de magnitud. Suponiendo que el efecto ejercido por la remoción de la carga y la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno es aditivo en la mutante E295L, se puede decir que la mayor parte del efecto observado se debe a la remoción de la carga. Además, el valor de k_{cat}/K_m por ambos sustratos en las dos mutantes, presenta una importante disminución de entre tres y cuatro órdenes de magnitud en relación a lo obtenido con la glucoquinasa silvestre. Estos resultados confirman que el residuo ácido glutámico E295 está involucrado en la reacción de fosforilación y su participación en la catálisis estaría determinada principalmente por la carga del residuo.

Mediante experimentos de aumento de metal libre se pudo determinar que ocurre una disminución parcial en la actividad enzimática en la enzima silvestre. Este resultado indica que existe más de un sitio de unión para el metal divalente en la

enzima. Sumado a lo anterior, a pesar de que la identidad del metal no es importante para llevar a cabo la catálisis, al parecer tendría un papel diferencial en el segundo sitio de unión. Esta afirmación se basa en que el grado de inhibición observado depende del catión del cual se trate. Se ha sugerido que la función de la carga positiva del ión metálico es contrarrestar la carga negativa local formada en el sitio activo durante el curso de la reacción, además aumenta la electrofilicidad del cofactor, lo cual disminuye la energía de activación y estabiliza las especies reactivas (Andreini C y col, 2008; Ito S y col, 2003). La participación de más de un metal divalente para la catálisis también se ha observado en quinasas, tales como proteína quinasa A en la cual se estableció que el primer metal se une a los fosfatos $\beta\gamma$ del ATP y es esencial para la actividad, mientras que el segundo metal se une a los fosfatos $\alpha\gamma$ y reprime el recambio de la enzima (Saylor P y col, 1998). En la quinasa fosforibosilpirofosfato sintetasa se determinó que el segundo metal ajusta la conformación de la proteína o interactúa con el co-sustrato en el sitio activo (Park J y Gupta R, 2008). En otros casos, como en la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, está descrito que requiere de un segundo metal divalente para lograr una catálisis eficiente (Colombo G y col, 1981). Finalmente, se determinó que la proteína quinasa dependiente de AMPc posee dos iones Mg^{2+} en el sitio activo, pero la unión del segundo metal disminuye la actividad y la constante de afinidad para ATPMg (Mildvan A y col, 1985). En relación al efecto del metal libre sobre las quinasas mutantes, se observó que en la mutante E295Q ocurre un aumento de la actividad específica al aumentar la concentración de metal libre, mientras que en la mutante

E295L se observa el efecto contrario. Sin embargo, en ambos casos el resultado observado es independiente de la identidad del metal divalente. Esta diferencia en los efectos producidos por el metal libre sobre las mutantes se puede explicar en cierta medida desde un punto de vista estructural. Probablemente en la mutante E295Q el metal divalente se posiciona de una forma exclusiva que permite la catálisis como en la enzima silvestre, mientras que la otra mutante no logra tal configuración local por lo que su actividad decrece.

El tipo de inhibición que el metal libre ejerce sobre la enzima silvestre, considerando los resultados obtenidos a partir del ajuste global, corresponde a un mecanismo no competitivo parcial. Por otra parte, desde datos de EPR obtenidos en nuestro laboratorio se ha podido establecer que la constante de unión (K_d) del metal a la enzima libre se encuentra dentro del rango micromolar (experimento realizado en la TIGK). Este resultado no está acorde con la K_d calculada según el ajuste global que señala un valor del orden milimolar. Debido a lo anterior se hace necesario considerar nuevos modelos de inhibición.

Finalmente, se encontró que el ADP inhibe de manera competitiva la actividad de la enzima silvestre, mostrando valores de K_i en el orden milimolar. Este resultado está de acuerdo con lo encontrado en otras quinasas en relación al efecto que ejerce el nucleótido donador de fosforilos (Guixé V y Babul J, 1985). Debido a que el valor de la constante de inhibición es relativamente grande en comparación con la K_m de MeADP, se considera que el nucleótido es un inhibidor competitivo pobre. Este resultado

destaca la importancia que tiene el metal divalente en la apropiada posición del nucleótido en el sitio activo de la enzima.

CONCLUSIONES

1. La glucoquinasa dependiente de ADP de *P. furiosus* puede utilizar varios metales divalentes para llevar a cabo la catálisis. Esta promiscuidad en el empleo de metales sugiere que la participación del metal está más relacionada con inducir una geometría adecuada para acomodar los fosfatos más que con sus características químicas.
2. El cambio del residuo E295 del motivo conservado NXXE que se encuentra en el sitio activo produce una disminución significativa de la constante catalítica.
3. Los parámetros cinéticos en la enzima silvestre con los diferentes metales son similares. En cambio en las mutantes los valores de K_m por ambos sustratos aumenta en relación a los obtenidos en la enzima silvestre. Este resultado indica que este residuo es importante para la unión de los sustratos.
4. Mediante experimentos de aumento de metal libre se pudo determinar que ocurre una disminución parcial en la actividad enzimática. Este resultado indica que existe más de un sitio de unión para el metal divalente en la enzima. El mecanismo de inhibición sugerido por el ajuste global es no-competitivo parcial. Sin embargo, se debe evaluar el mecanismo real debido a una incongruencia entre los valores de K_d entregados por el ajuste global y resultados de EPR obtenidos en nuestro laboratorio.

5. El ADP libre inhibe la actividad enzimática de forma competitiva respecto del sustrato MgADP. Este resultado indica que el verdadero sustrato de la enzima es el complejo metal-nucleótido. El valor de K_i obtenido se encuentra dentro del orden milimolar, lo cual muestra que es un inhibidor débil y destaca la importancia del metal para la unión del nucleótido.

REFERENCIAS

- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. y Thornton, J. (2008). Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem.* 13(8):1205-1218.
- Baek, Y. y Nowak, T. (1981). Kinetic evidence for a dual cation role for muscle pyruvate kinase. *Arch Biochem Biophys.* 217(2):491-497.
- Bork, P., Sander, C. y Valencia, A (1993). Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.* 2: 31-40.
- Bradford, M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Budde, R.J., Ramdas, L., Ke, S. (1993). Recombinant pp60c-src from baculovirus-infected insect cells: purification and characterization. *Prep Biochem.* 23(4):493-515.
- Campobasso, N., Mathews, I.I., Begley, T.P. y Ealick, S.E. (2000). Crystal structure of 4-methyl-5- β -hydroxyethylthiazole kinase from *Baillus subtilis* at 1.5Å resolution. *Biochemistry.* 39: 7868-7877.
- Cao, P., Gong, Y., Tang, L., Leung, Y.C. y Jiang, T. (2006). Crystal structure of human pyridoxal kinase. *J Struct Biol.* 154 (3): 327-332.
- Chang, C., Brockman, R.W., y Bennett L (Jr). (1979). Adenosine kinase from L1210 cells. Purification and some properties of the enzyme. *J Biol Chem.* 255(6):2366-2371.
- Chuvikovsky, D.V., Esipov, R.S., Skoblov, Y.S., Chupova, L.A., Muravyova, T.I., Miroshnikov, A.I., Lapinjoki, S. y Mikhailopulo, I.A. (2006). Ribokinase from *E. coli*: expression, purification, and substrate specificity. *Bioorg Med Chem.* 14(18):6327-6332.

- Colombo, G., Gerald, M., Carlson, O y Lardy H (1981). Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (Guanosine 5'-Triphosphate) from Rat Liver Cytosol. Dual-Cation Requirement for the Carboxylation Reaction. *Biochemistry*. 20: 2749-2757.
- Cook, W.J., Pelucas, L.J. y Chattopadhyay, D. (2000). Crystal structure of adenosine kinase from *Toxoplasma gondii* at 1.8Å resolution. *Protein Sci*. 9: 704-712.
- Cheek, S., Ginalski, K., Zhang, H., y Grishin, N.V. (2005). A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct Biol*. 5:6.
- Cheng, G., Bennett, E.M., Begley, T.P y Ealick, S.E. (2002). Crystal structure of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate kinase from *Salmonella typhimurium* at 2,3Å resolution. *Structure*. 10: 225-235.
- Cornish-Bowden, A. (1995) *Fundamentals of enzyme kinetics* (revised edition), Portland Press Ltd, London.
- Currie, M., Merino, F., Skarina, T., Wong, A., Singer, A., Brown, G., Savchenko, A., Caniuguir, A., Guixé, V., Yakunin, A. y Jia, Z. (2009). ADP-dependent 6-phosphofructokinase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *J Biol Chem* 284(34): 22664-71.
- Darling, J.A., Sullivan, W.J Jr., Carter, D., Ullman, B., Roos, D.S. (1999). Recombinant expression, purification, and characterization of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase. *Mol Biochem Parasitol*. 103(1):15-23.
- Dör C., Zaparty M., Tjaden B., Brinkmann H. y Siebers B. (2003). The Hexokinase of the Hyperthermophile *Thermoproteus tenax*. ATP-dependent hexokinase and ADP-dependent glucokinases, two alternatives for glucose phosphorylation in archaea. *J Biol Chem*. 278(21): 18744-18753.
- Dyguda, E., Szeftczyk, W., and Sokalski (2004). The mechanism of phosphoryl transfer reaction and the role of active site residues on the basis of ribokinase-like kinases. *Int. J. Mol. Sci*. 5, 141-153.
- Guixé, V. y Babul, J. (1985). Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for MgATP²⁻. *J Biol Chem*. 260(20): 11001-11005.
- Guixé, V. y Merino, F. (2009). The ADP-dependent sugar kinase family. Kinetic and evolutionary aspects. *IUBMB Life*. 61(7):753-761.
- Fisher, M.N., Newsholme, E.A. (1984). Properties of rat heart adenosine kinase. *Biochem J*. 221(2):521-528.
- Freitag, N., Port, G and Miner, M. (2009). *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature*. 7: 623-628
- Hansen, T., Musfeldt, M., Schönheit, P. (2002). ATP-dependent 6-phosphofructokinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: characterization of an extremely thermophilic, allosterically regulated enzyme (2002). *Arch Microbiol*. 177(5):401-409.

- Hansen, T. y Schönheit, P. (2000). Purification and properties of the first-identified, archaeal, ATP-dependent 6-phosphofructokinase, an extremely thermophilic non-allosteric enzyme, from the hyperthermophile *Desulfurococcus amylolyticus*. Arch Microbiol. 173:103-109
- Ito, S., Fushinobu, S. Yoshioka, I., Koga, S., Matsuzawa, H. Y Wakagi, T. (2001). Structural basis for the ADP-specificity of a novel glucokinase from a hyperthermophilic archaeon. Struture. 9: 205-214.
- Ito, S., Fushinobu S., Jeong J., Yoshioka I., Koga S., Shoun H. y Wakagi T. (2003). Crystal structure of an ADP-dependent gluokinase from *Pyrocossu furiosus*: implications for a sugar induced conformational change in ADP-dependent kinase. J Mol Biol. 331(4):871-883.
- Koga, S., Yoshioka, I., Sakuraba, H., Takahashi, M., Sakasegawa, S., Shimizu, S. y 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: 1079-1085.
- Knowles, J. (1980). Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. Ann. Rev. Biochem. 49:877-919.
- Kornberg, A y Pricer, W.E.Jr (1953). Enzymatic sterification of alpha-glycerolphosphate by long chain fatty acids. J. Biol. Chem. 204: 345-357.
- Kuzmic, P. (1996). Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase. Anal Biochem. 237: 260-273.
- Labes A. y Schönheit P. (2003). ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324. Arch Microbiol. 180(1):69-75.
- Li, M., Kwok, F., Chang, W., Lau, C.K., Zhang, J.P., Lo, S.C.L., Jiang, T. y Liang, D. (2002). Crystal structure of brain pyridoxal kinase, a novel member of the ribokinase superfamily. J Biol Chem. 277(48): 46385-46390.
- Maj, M.C., Singh, B. y Gupta, R.S. (2000). Structure activity in mammalian adenosine kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 275: 386-393.
- Maj, M.C. y Gupta, R.S. (2001). The effect of inorganic phosphate on the activity of bacterial ribokinase. J. Protein Chem. 20: 139-144.
- Maj, M.C., Singh, B. y Gupta, R.S. (2002). Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. Biochemistry. 41(12): 4059-4069.
- Mathews, I.I., Erion, M.D. y Ealick, S.E. (1998). Structure of human adenosine kinase at 1.5Å resolution. Biochemistry. 37: 15607-15620.

- Matte, A., Tari, L.W y Delbaere, L. (1998). How do kinases transfer phosphoryl groups?. *Structure*. 6: 257-294.
- Merino F. y 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.
- Mildvan, A.S., Rosevear, P.R., Fry, D.C., Bramson, H.N., Kaiser, E.T. (1985). NMR studies of the mechanism of action and regulation of protein kinase. *Curr Top Cell Regul*. 27:133-144.
- Murray A.W. (1968). Some Properties of Adenosine Kinase from Ehrlich Ascites-Tumour Cells. *Biochem J*. 106(2):549-555.
- Newman, J.A., Das, S.K., Sedelnikova, S.E. y Rice, D.W. (2006). The crystal structure of an ADP complex of *Bacillus subtilis* pyridoxal kinase provides evidence for the parallel emergence of enzyme activity during evolution. *J Mol Biol*. 363(2): 520-530.
- Ohshima, N., Inagaki, E., Yasuike, K., Takio, K. Y Tahirov, T.H. (2004). Structure of *Thermus thermophilus* 2-keto-3-deoxygluconate kinase: Evidence for recognition of and Open Chain Substrate. *J.Mol.Biol*. 340:477-489.
- Parducci, R.E., Cabrera, R., Baez, M. y Guixé, V. (2006). Evidence for a catalytic Mg²⁺ ion and effect of phosphate on the activity of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2: regulatory properties of a ribokinase family member. *Biochemistry*. 45(30): 9291-9299.
- Parducci, R.E. Tesis 2005.
- Park, J. Burns, K., Kinsland, C. y Begley , T. (2004). Characterization of two kinases involved in thiamine pyrophosphate and pyridoxal phosphate biosynthesis in *Bacillus subtilis*: 4-Amino-5-Hydroxymethyl-2-Methylpyrimidine kinase and pyridoxal kinase. *J Bacteriol*. 186(5): 1571-1573.
- Park, J., y Gupta, R.S. (2008). Adenosine kinase and ribokinase-the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci*. 65(18):2875-2896.
- Park, J., van Koeverden, P., Singh, B. y Gupta R.S. (2007). Identification and characterization of human ribokinase and comparison of its properties with E. coli ribokinase and human adenosine kinase. *FEBS Lett*. 581(17):3211-3216.
- Pauluhn, A., Ahmed, H., Lorentzen, E., Buchinger, S., Schomburg, D., Siebers, B. y Pohl, E. (2008). Crystal structure and stereochemical studies of KD(P)G aldolase from *Thermoproteus tenax*. *Proteins*. 72(1):35-43.
- 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.
- Ronimus, R.S. y Morgan, H.W. (2001). The biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinases from extremophiles. *Extremophiles* 5: 357-373.

- Ronimus, R.S. y Morgan, H.W. (2004). Cloning and biochemical characterization of a novel mouse ADP-dependent glucokinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 315(3):652-658.
- Rotllan, P., y Miras M. (1985). Adenosine kinase from bovine adrenal medulla. *Eur J Biochem.* 151(2):365-371.
- Safo, M., Musayev, F., Hunt, S., di Salvo, M., Scarsdale, N. y Schirch, V. (2004). Crystal structure of the *pdxY* protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 186(23): 8074-8082.
- Safo, M., Musayev, F., di Salvo, M., Hunt, S., Claude, J., Schirch, V. Crystal structure of pyridoxal kinase from the *Escherichia coli* *pdxK* gene: implications for the classification of pyridoxal kinases. *J Bacteriol.* 188(12):4542-4552.
- Sakuraba H. y Ohshima T. (2002). Novel energy metabolism in anaerobic hyperthermophilic archaea: a modified Embden-Meyerhof Pathway. *J Biosci Bioeng.* 93(5):441-448.
- Sakuraba H., Goda S., Ohshima T. (2004). Unique sugar metabolism and novel enzymes of hyperthermophilic archaea. *Chem Rec.* 3(5):281-287.
- Saylor, P., Wang, C., Hirai, T.J. y Adams, J.A. A second magnesium ion is critical for ATP binding in the kinase domain of the oncoprotein v-Fps. (1998). *Biochemistry.* 37(36):12624-12630.
- Schnebli, H.P., Hill, D.L., Bennett, L.L. Jr (1967). Purification and Properties of Adenosine Kinase from Human Tumor Cells of Type H. Ep. No. 2. *J Biol Chem.* 242(9):1997-2004.
- Schumacher, M.A., Scott, D.M., Mathews, I.I., Ealick, S.E., Roos, D.S., Ullman, B., Brennan, R.G. Crystal Structures of *Toxoplasma gondii* Adenosine Kinase Reveal a Novel Catalytic Mechanism and Prodrug Binding. (2000). *J Mol Biol.* 298(5):875-893.
- Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state systems.* John Wiley and Sons, New York.
- Selig, M., Xavier K. B., Santos H., y Schönheit P. (1997). Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch Microbiol.* 167(4):217-232.
- Sigrell, J.A., Cameron, A.D., Jones, T.A. y Mowbray, S.L. (1998). Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure.* 6: 183-193.
- Sigrell, J.A., Cameron, A.D. y Mowbray, S.L. (1999). Induced fit on sugar binding activates ribokinase. *J. Mol. Biol.* 290: 1009-1018.
- Spychala, J., Datta, N.S., Takabayashi, K., Datta, M., Fox, I.H., Gribbin, T. y Mitchell, B.S. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases (1996). *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(3):1232-1237.
- Sun, G., y Budde R. (1999). Substitution studies of the second divalent metal cation requirement of protein tyrosine kinase CSK. *Biochemistry.* 38: 5659-5665.

- 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: 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: 21023–21028.
- Kengen S., de Bok F., Van Loo N., Dijkema C., Stams A. y de Vos W. (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.
- Kengen S., Tuininga J., de Bok F., Stams., A y de Vos W. (1995). Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem.* 270(51):30453-30457.
- Verhees C., Koot D., Ettema T., de Vos W y Van de roost J. (2002). Biochemical adaptations of two sugar kinases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochem J.* 366 (1):121-127.
- Wu, L.F., Reizer, A., Reizer, J., Cai, B., Tomich, J.M. y Saier, M.H. Jr (1991). Nucleotide Sequence of the *Rhodobacter capsulatus* fruK Gene, Which Encodes Fructose-1-Phosphate Kinase: Evidence for a Kinase Superfamily Including Both Phosphofructokinases of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 173(10):3117-3127.
- Zhang, R.G., Grembecka, J., Vinokour, E., Collart, F., Dementieva, I., Minor, W. y Joachimiak, A. (2002). Structure of *Bacillus subtilis* YXKO--a member of the UPF0031 family and a putative kinase. *J Struct Biol.* 139(3): 161-170.
- Zhang, Y., Dougherty, M., Downs, D.M. y Ealick, S.E. (2004). Crystal structure of an aminoimidazole riboside kinase from *Salmonella enterica*: implications for the evolution of the ribokinase superfamily. *Structure.* 12(10): 1809-1821.