

UCH-FC
DOC-BMCN
Z 25
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**Bases moleculares de la adaptación al frío en enzimas: estudio
comparativo entre homólogos extremófilos de la familia de quinasas de
azúcares dependientes de ADP de arqueas**

RICARDO ANDRÉS ZAMORA BRITO

Santiago, Chile

Noviembre 2016

**BASES MOLECULARES DE LA ADAPTACIÓN AL FRÍO EN
ENZIMAS: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE HOMÓLOGOS
EXTREMÓFILOS DE LA FAMILIA DE QUINASAS DE
AZÚCARES DEPENDIENTES DE ADP DE ARQUEAS.**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al grado de

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

Facultad de Ciencias

por

RICARDO ANDRÉS ZAMORA BRITO

Noviembre 2016

Directora de Tesis

Dra. Victoria Guixé Leguía

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

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

RICARDO ANDRÉS ZAMORA BRITO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 15 de Noviembre de 2016.

Directora de Tesis:

Dra. Victoria Guixé Leguía



.....

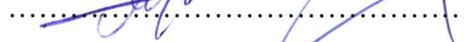
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Francisco Chávez (Presidente)



.....

Dra. Angélica Fierro



.....

Dr. Osvaldo Álvarez



.....

Dr. Danilo González



.....

Para Lucas...

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Ricardo Andrés Zamora Brito. Nací en Santiago de Chile el 14 de Junio de 1983. Durante mis años de colegio adquirí un especial gusto por el estudio de asignaturas científicas. Esto derivó en que en el año 2002 ingresara a estudiar Química a la Universidad de Santiago de Chile. A medida que fui avanzando en la carrera, fui sintiéndome especialmente atraído por la aplicación de la Química en el área biológica. Este hecho se vio reforzado cuando en 4to año curse la asignatura de bioquímica. Una vez titulado y aun con la inquietud de explorar los aspectos biológicos de la química, de surgió la posibilidad de ingresar a estudiar Bioquímica en la misma casa de estudios. Este momento determino mi futuro ahí en mas. Luego de unos años y en busca de nuevos desafíos que me permitieran desarrollarme en el área de las ciencias biológicas, decidí postular, meses antes de titularme de bioquímico, al Doctorado en ciencias, mención biología molecular, celular y neurociencia que imparte la Universidad de Chile, al cual ingrese en marzo de 2012. Un año después y con motivo de la realización de mi primera unidad de investigación llegue al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular a cargo de la Dra. Victoria Guixé. Desde entonces nunca mas deje el laboratorio y es en este lugar donde desarrolle este trabajo de tesis.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Victoria Guixé por permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Su experiencia, y apoyo fueron fundamentales para que este trabajo de tesis pudiera llegar a puerto. Obviamente no puedo dejar de agradecer a mis compañeros de laboratorio que durante todos estos años siempre me brindaron su compañía y palabras de aliento para no caer durante esta larga y muchas veces dura travesía. Víctor C, Ale H, Diego Q, Pablo V, Cesar R, Pablo M, Matías F, María José A, Gabriel V, Felipe G, Juan Carlos V, Rodrigo M, Pablo C, Alonso C, Exequiel M y a quien corresponda, les doy mis mas sinceros agradecimientos. Mis años en la USACH marcaron una huella imborrable y eso me gustaría reflejarlo en la gente que desde esos años siempre ha estado conmigo. En especial me gustaría darle las gracias a Gabriel A, Cristian G, Luis P, Thais G, Carolina B, Lisa M, Ingrid P, David L y Luis L por estar siempre ahí y sin juzgar ni pedir explicaciones, me apoyaron incondicionalmente sin dudar ni cuestionarme. Obviamente no puedo dejar de mencionar a la tía Irma, Don Victor, a la Mary y Jonny. Desde que los conocí me recibieron en su familia y me trataron como un hijo y hermano. Si estoy terminando esta etapa es en gran parte gracias a su incondicional cariño. Finalmente me gustaría dedicar un sentido homenaje a esos que nunca me han abandonado, a esos que pase lo que pase siempre me han acompañado. Esa es mi familia. Si bien no somos muchos, creo que somos los justos y necesarios. A la Fritito y al Gordo les agradezco su incondicionalidad, a la Patita su cariño y a la gabita su tremendo coraje. Son esas cualidades las que he tratado de plasmar a través de mi vida, y sin duda, es la mezcla de todo eso lo que me tiene hoy

escribiendo estas palabras. A Rolo, la Claudita, mi tía Patty, la Valecita y al Zamora. Ustedes son mi otra familia y siempre les estaré agradecido por lo que me han brindado. Para el final dejo lo mejor. Si, lo mejor que me ha podido pasar en la vida. Luquitas, tu llegada cambio mi forma de ver las cosas. Gracias por tu cariño y por existir. Este trabajo y las cosas que vengan son para y por ti. La verdad si no fuera por ti, quizás esto no hubiera sido posible. En resumen, solo puedo dar gracias por tenerlos cerca y poder habido contar con todos ustedes durante todos estos años. Los quiere... El Mora.

PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de esta tesis participé en las siguientes publicaciones:

- Ramírez-Sarmiento, CA., Baez, M., Zamora, RA., Balasubramaniam, D., Babul, J., Komives, EA., Guixé V. 2015. The folding unit of phosphofructokinase-2 as defined by the biophysical properties of a monomeric mutant. *Biophys J.* 108(9):2350-61.
- Santiago, M., Ramírez-Sarmiento, CA., Zamora, RA., Parra, LP. 2016. Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Applications of Cold-Active Enzymes. *Front Microbiol.* 7:1408.

FINANCIAMIENTO

- Proyecto FONDECYT 1110137
- Proyecto FONDECYT 1150460
- Beca para estudios de Doctorado en Chile, CONICYT 2012-2016

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
PUBLICACIONES.....	v
FINANCIAMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
• 1.1 Microorganismos extremófilos.....	1
• 1.2. Estrategias termodinámicas para el aumento de la estabilidad térmica estructural de proteínas y enzimas psicrófilas.....	3
• 1.3. Dinámica del sitio activo, actividad enzimática y temperatura.....	12
• 1.4. Relación actividad-estabilidad en enzimas extremófilas.....	17

• 1.5. Modelos de estudio	21
• 1.6. Superfamilia riboquinasa	23
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS	29
• 3.1. Objetivo General	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
• 4.1. Materiales.....	31
4.1.1. Cepas.....	31
4.1.2. Medios de Cultivo.....	31
4.1.3. Soluciones generales.....	31
4.1.4. Reactivos químicos generales.....	32
• 4.2. Métodos.....	33
4.2.1. Síntesis de genes para enzimas ADP dependientes.....	33
4.2.2. Expresión y purificación de enzimas dependientes de ADP.....	33
4.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	36
4.2.4. Cuantificación de proteínas.....	36
4.2.5. Caracterización cinética.....	36
4.2.6. Caracterización estabilidad térmica.....	39
4.2.7. Caracterización permeabilidad estructural.....	39

4.2.8. Caracterización de la flexibilidad estructural.....	40
4.2.9. Reconstrucción filogenética e inferencia de la secuencia ancestral.....	41
4.2.10. Caracterización <i>in silico</i>	42
5. RESULTADOS.....	44
• 5.1. Filogenia de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP.	44
• 5.2. Caracterización cinética de la enzima psicrófila ADP-GK de <i>M. burtonii</i>. Utilización de glucosa y fructosa-6-P como sustratos.....	48
• 5.3. Actividad glucoquinasa redundante en el orden <i>Methanosarcinales</i> de arquea.....	53
• 5.4. Estudio de la variación de los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y de la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i> con la temperatura.....	56
• 5.5. Estudio de la especificidad por nucleótidos y metales de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> a distintas temperaturas.....	66
• 5.6. Estudio de la especificidad por azúcares de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>.....	71
• 5.7. Caracterización biofísica de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>. Estudio de relación estabilidad-función entre la enzima psicrófila	

ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i>	73
• 5.8. Estudio de permeabilidad estructural en la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i> por apagamiento dinámico de la fluorescencia intrínseca y dispersión de rayos X de ángulo pequeño	76
• 5.9. Estudio de la flexibilidad estructural de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> mediante intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masa.	82
• 5.10. Estudio evolutivo y reconstrucción secuencias ancestrales. Reconstrucción del último ancestro en común entre el orden <i>Methanosarcinales</i> y <i>Methanococcales</i> para la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP	92
• 5.11. Caracterización cinética del último ancestro en común entre los órdenes <i>Methanosarcinales</i> y <i>Methanococcales</i> (Anc MMT). Utilización de glucosa y fructosa-6-fosfato como sustratos	97
• 5.12. Efecto de la inserción de pares iónicos en la estabilidad térmica de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> .. Caracterización biofísica de la mutante cuádruple	104

• 5.13. Estudio de la flexibilidad estructural de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> mediante intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masa	107
• 5.14. Estudio de la variación del parámetro cinético K_m con la temperatura de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y de la mutante cuádruple (MutMbPFK).....	112
• 5.15. Estudio de la dinámica conformacional de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> mediante simulaciones de dinámica molecular	116
6. DISCUSIÓN.....	121
• 6.1. Actividad redundante glucoquinasa (GK) en el orden <i>Methanosarcinal</i>	121
• 6.2. Especificidad por nucleótidos, metales y azúcares.....	123
• 6.3. Variación de los parámetros cinéticos con la temperatura	128
• 6.4. Rigidización sitio activo y cambios conformacionales	133
7. CONCLUSIONES.....	137
8. REFERENCIAS	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de estabilidad termodinámica indicando las diferentes estrategias utilizadas por un organismo mesófilo a través de la evolución para aumentar la temperatura de desplegamiento térmico (T_m) de sus proteínas y enzimas.....	5
Figura 2. Esquema que resume las principales modificaciones entre enzimas psicrófilas y mesófilas.	11
Figura 3. Diagrama para una reacción catalizada enzimáticamente por una enzima psicrófila y una mesófila..	14
Figura 4. Inactivación y desplegamiento de enzimas psicrófilas y mesófilas/termófilas.	18
Figura 5. Árbol filogenético de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP obtenido mediante inferencia bayesiana.	45
Figura 6. Purificación enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>	50
Figura 7. Caracterización cinética de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> a distintas temperaturas..	58
Figura 8. Variación de los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} con la temperatura de enzimas dependientes de ADP adaptadas a distintas temperaturas.....	59
Figura 9. Complejo Mg-ADP.....	66

Figura 10. Dependencia de la actividad PFK y GK de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> con distintos nucleótidos difosforilados y metales..	67
Figura 11. Dependencia de la actividad PFK con distintos metales divalentes para distintas enzimas de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP.....	68
Figura 12. Uso de azúcares como sustrato de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>	72
Figura 13. Actividad y desplegamiento térmico de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i>	74
Figura 14. Apagamiento dinámico de fluorescencia intrínseca para la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. mazei</i>	77
Figura 15. Mapa de cobertura de intercambio relativo hidrógeno-deuterio para la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i>	84
Figura 16. Intercambio relativo H-D para distintos péptidos de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>	85
Figura 17. Intercambio relativo H-D para distintos péptidos de la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i>	86
Figura 18. Intercambio relativo promedio H-D para la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i> a 3 temperaturas diferentes (10°C, 25°C y 40°C).....	88

Figura 19. Ubicación en la estructura de los péptidos que presentan la mayor tasa de intercambio en la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y en la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i>	89
Figura 20. Análisis de la inferencia del ancestro MMT.....	93
Figura 21. Ancestros utilizados para realizar el estudio evolutivo de los pares iónicos en la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP.....	100
Figura 22. Mapeo de los pares iónicos implicados en la estabilidad térmica de las enzimas mesófilas y termófilas de la familia de quinasas dependientes de ADP	101
Figura 23. Curvas de desplegamiento térmico de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la mutante cuádruple de la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>	105
Figura 24. Mapa de cobertura de intercambio relativo hidrógeno-deuterio para la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la mutante cuádruple de la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>	107
Figura 25. Intercambio relativo H-D para distintos péptidos de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> y la mutante cuádruple de la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>	110
Figura 26. Caracterización cinética de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> a distintas temperaturas.	113
Figura 27. Variación del parámetro cinético K_m con la temperatura para la enzima psicrófila, mesófila y la mutante cuádruple.	114

Figura 28. Análisis de componentes principales para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*MbPFK*). 119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i>	52
Tabla 2. Parámetros cinéticos de la enzima termófila ADP-PFK de <i>M. evestigatum</i>	55
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> (<i>Mb</i> PFK), mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i> (<i>Mm</i> PFK) e hipertermófila ADP-GK de <i>T. litoralis</i> (<i>TIGK</i>).	62
Tabla 4. Parámetros termodinámicos de activación para la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> (<i>Mb</i> PFK), mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i> (<i>Mm</i> PFK) e hipertermófila ADP-GK de <i>T. litoralis</i> (<i>TIGK</i>).	64
Tabla 5. Constantes de Stern-Volmer para los apagamientos dinámicos de fluorescencia intrínseca de la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> (<i>Mb</i> PFK) y la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. mazei</i> (<i>Mz</i> PFK).....	78
Tabla 6. Radios de giro para la enzima psicrófila ADP-PFK de <i>M. burtonii</i> (<i>Mb</i> PFK), la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. mazei</i> (<i>Mz</i> PFK) y la enzima mesófila ADP-PFK de <i>M. maripaludis</i>	80
Tabla 7. Probabilidad posterior (PP) para los residuos del sitio activo del último ancestro en común entre el orden <i>Methanosarcinales</i> y <i>Methanococcales</i> (Anc MMT).96	
Tabla 8. Parámetros cinéticos para el último ancestro en común entre los órdenes <i>Methanosarcinales</i> y <i>Methanococcales</i> (Anc MMT).	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina 5-difosfato
ADP-GK	Glucocinasa dependiente de ADP
ADP-PFK	Fosfofructocinasa dependiente de ADP
ADP β S	Adenosina 5'- β -tio-difosfato
ADP-Glc	Adenosina difosfato-glucosa.
AMP	Adenosina 5-monofosfato
Anc M	Último ancestro en común del orden <i>Methanococcales</i>
Anc MMT	Último ancestro en común entre los órdenes <i>Methanosarcinales</i> y <i>Methanococcales</i>
Anc MS	Último ancestro en común del orden <i>Methanosarcinales</i>
Anc MT	Último ancestro en común entre el orden <i>Methanococcales</i> y <i>Thermococcales</i> ,
ASR	Ancestral sequence reconstruction
ATP	Adenosina 5-trifosfato
C α	Carbonos-alfa
C _p	Calor específico
CDP	Citidín 5-difosfato
D ₂ O	Agua deuterada
E _a	Energía de activación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ED	Entner-Dudoroff

EM	Emdem-Meyerhof
ES	Complejo enzima sustrato
ES [‡]	Complejo activado
F6P	Fructosa-6-fosfato
ΔG	Cambio de energía libre de Gibbs
ΔG^{\ddagger}	Cambio de energía libre de activación
GDP	Guanosín 5-difosfato
G6P	Glucosa 6 fosfato
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
Glc	Glucosa
GK	Glucoquinasa
ΔH^{\ddagger}	Cambio de entalpía de activación
h	Constante de Planck
H-D	Intercambio hidrógeno-deuterio
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetanosulfónico
IDP	Inosín 5-difosfato
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilo Dalton
k	Constante específica de rapidez de la reacción
k_B	Constante de Boltzmann
k_{cat}	Constante catalítica
K_m	Constante de Michaelis-Menten
k_{cat}/K_m	Constante de eficiencia catalítica o de especificidad

K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
LB	Luria-Bertani
<i>Mb</i> PFK	Fosfofructoquinasa de <i>Methanococoides burtonii</i>
<i>Mm</i> PFK	Fosfofructoquinasa de <i>Methanococcus maripaludis</i>
Mut <i>Mb</i> PFK	Mutante cuádruple ADP-PFK
<i>Mz</i> PFK	Fosfofructoquinasa <i>Methanosarcina mazei</i>
NAD ⁺	Forma oxidada de Nicotinamida dinucleótido
NADH	Forma reducida de Nicotinamida dinucleótido
NTP	Ensamble isoterma-isobárico
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalante
Pb	Pares de base
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PFK	Fosfofructoquinasa
PIPES	Ácido piperazina-N, N'-bis (2-etanosulfónico)
<i>Ph</i> PFK	Fosfofructoquinasa de <i>Pyrococcus horikoshii</i>
PP	Probabilidad posterior
Q	Desactivar dinámico
R	Constante de los gases
R_g	Radio de giro
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAXS	Dispersión de rayos-X a bajo ángulo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
ΔS^\ddagger	Entropía de activación

TAE	Tampón Tris-ácido acético-EDTA
T _m	Temperatura media a la cual se produce el desplegamiento
T _s	Temperatura a la cual el cambio entrópico del sistema se hace cero
TDP	Timidín 5-difosfato
TEMED	N'-tetrametiletlenamina
TEV	Proteasa del virus del tabaco
TG-SDS	Tris-glicina SDS
TIGK	Glucocuinasa de <i>Thermococcus litoralis</i>
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
UDP	Uridín 5-difosfato

RESUMEN

En este trabajo de tesis se caracterizó la enzima psicrófila dependiente de ADP de *M. burtonii* (MbPFK), la cual es la primera enzima psicrófila caracterizada en la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP. Esta enzima perteneciente al orden de los *Methanosarcinales*, fue caracterizada como una enzima bifuncional, con la capacidad de fosforilar fructosa-6-fosfato (F6P, actividad PFK) y glucosa (Glc, actividad GK). Esta característica bifuncional mostró ser un rasgo común entre los órdenes de arqueas metanogénicas, debido a que solo las enzimas mesófila ADP-PFK/GK de *M. maripaludis* y ADP-PFK/GK de *M. jannaschii*, ambas pertenecientes al orden de los *Methanococcales*, han sido caracterizadas como bifuncionales, mientras que las demás enzimas ADP dependientes de arqueas presentan actividad específica, ya sea PFK o GK. La mayor flexibilidad estructural de la enzima psicrófila fue evaluada analizando la variación de los parámetros cinéticos k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m de esta enzima a distintas temperaturas. Como modelos enzimáticos comparativos se utilizaron la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis*. Los resultados mostraron una variación diferencial de los valores de K_m , encontrándose un aumento exponencial de los valores de K_m con la temperatura para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, ninguna variación para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y un decaimiento exponencial para la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis*. La enzima psicrófila presentó, en todo el intervalo de temperaturas ensayadas, menores valores de K_m y mayores actividades que sus homólogos termoestables. Adicionalmente, es sabido que para realizar el proceso de fosforilación, el cofactor

utilizado por las enzimas de esta familia es Mg^{+2} . Interesantemente, la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, además de utilizar Mg^{+2} , fue capaz de utilizar eficientemente otros cationes divalentes, viéndose incrementada esta capacidad con un aumento de la temperatura. El mismo fenómeno fue observado al evaluar su selectividad por los azúcares. A 10°C, la enzima psicrófila solo es capaz de utilizar glucosa y fructosa-6-fosfato como sustratos, no existiendo actividades relevantes con otros azúcares. Al aumentar la temperatura a 25°C, además de los sustratos mencionados anteriormente, esta enzima fue capaz de utilizar otros monosacáridos e incluso algunos disacáridos. Estos resultados revelaron que la capacidad de catalizar eficientemente reacciones a bajas temperaturas estaba dado por un sitio activo mas flexible, optimizado para presentar menores valores de K_m , hecho que le permite poseer mayores eficiencias catalíticas a estas temperaturas.

Mediante estudios de intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas, se pudo establecer que los determinantes estructurales responsables de la mayor flexibilidad del sitio activo fueron la ausencia en la estructura de la enzima psicrófila de dos pares iónicos en los alrededores del sitio activo. La ausencia de estas interacciones iónicas permitiría la mayor movilidad de segmentos contiguos al motivo de unión del complejo metal-nucleótido. Estas interacciones iónicas sí fueron encontradas en las estructuras de las enzimas mesófilas y termófilas de la familia. La utilización de la metodología de reconstrucción de secuencias ancestrales permitió establecer la ausencia de estas interacciones en el último ancestro en común entre la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (orden *Methanosarcinales*) y la enzima mesófila (orden

Methanococcales) lo que permite establecer, que la alta flexibilidad estructural es un vestigio evolutivo en la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP y que la rigidización del sitio activo en las enzimas mesófilas y termófilas de la familia es una novedad evolutiva. La inserción de estos dos pares iónicos en la estructura de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* rigidizó el sitio activo de esta enzima, haciendo que los parámetros cinéticos de ésta tendieran a ser como los de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*.

ABSTRACT

In this work we characterized the ADP dependent psychrophilic enzyme from *M. burtonii* (*Mb*PFK), which is the first characterized enzyme belonging to the ADP dependent sugar kinases family. This enzyme from the order *Methanosarcinales*, was described as bifunctional, that is able to phosphorylate both fructose-6-phosphate (F6P, PFK activity) and glucose (Glc, GK activity). Bifunctionality has been shown to be a common trait among methanogenic orders from archaea since only the mesophilic ADP-PFK/GK from *M. maripaludis* and ADP-PFK/GK from *M. jannaschii*, belonging to the order *Methanococcales* have been described as bifunctional. In contrast, all the other ADP dependent enzymes from archaea are either PFK or GK specific. The increased structural flexibility of the psychrophilic enzyme was evaluated analyzing the k_{cat} , K_m and k_{cat}/K_m kinetic parameters of this enzyme at different temperatures. As comparative models we employed the mesophilic ADP-PFK from *M. maripaludis* and the hyperthermophilic ADP-GK de *T. litoralis*. The results shown a differential variation of the K_m values; whereas the psychrophilic ADP-PFK from *M. burtonii* shows an exponential increase of the K_m values with temperature, the mesophilic ADP-PFK from *M. maripaludis* shows no variation and the hyperthermophilic ADP-GK de *T. litoralis* presents an exponential decrease of these values with temperature. The psychrophilic enzyme exhibited lower K_m values and greater activity than its thermostable homologs in the entire temperature range tested. Moreover, it is well known that to perform the phosphorylation process these enzymes employed Mg^{2+} as cofactor. Interestingly, the psychrophilic ADP-PFK from *M. burtonii* was able to utilize efficiently others divalent cations besides Mg^{2+} being this capacity increased with an increase in temperature. The same phenome was observed when its selectivity for

sugars was assayed. At 10 °C the psychrophilic enzyme only utilizes glucose only and fructose-6P as substrate with no detectable activity with other sugars. However, at 25 °C, the enzyme is able to phosphorylate other monosaccharides and even disaccharides, besides the substrates mentioned above. These results shown that the ability to catalyze reactions efficiently at low temperatures was due to a more flexible active site, which was optimized to display small K_m values, which allows the enzyme to possess higher catalytic efficiencies at these temperatures.

By using H/D exchange coupled to mass spectrometry we establish that the structural determinants responsible for the increase flexibility of the psychrophilic active site were the absence, in the protein structure, of two ionic pairs in its surrounding. The absence of these interactions would allow greater mobility of segments adjacent to the nucleotide-metal complex binding site since they were present in the mesophyll and thermophile enzymes of the family. By means of the ancestral enzyme reconstruction methodology we determine the absence of these interactions in the last common ancestor between the psychrophilic ADP-PFK from *M. burtonii* (order *Methanosarcinales*) and the mesophilic enzyme (order *Methanococcales*) which establish that the high structural flexibility is an evolutionary vestige in the ADP dependent sugar kinases family and that active site stiffening of mesophilic and thermophilic enzymes is an evolutive novelty. Insertion of these two ionic pairs in the psychrophilic ADP-PFK structure from *M. burtonii* caused the stiffening of the active site, making that the kinetic parameters of this enzyme being like those of the mesophilic ADP-PFK enzyme from *M. maripaludis*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos han sido definidos como aquellos capaces de tolerar condiciones medioambientales extremas como altas o bajas temperaturas, alta acidez y alcalinidad y altas presiones, por mencionar las más comunes. Basados en la capacidad de estos organismos de crecer ya sea solo en condiciones medioambientales extremas o adicional a esto, poder crecer también en condiciones “normales”, los microorganismos extremófilos han sido divididos en dos grandes grupos: extremófilos reales y extremófilos tolerantes (Rampelotto 2013). Más allá del grupo extremófilo al cual se haga referencia, ambos pueden ser encontrados en los tres reinos de la vida (Eukarya, Arquea y Bacteria) (Cavicchioli, R., Siddiqui 2006). Si nos enfocamos en los microorganismos adaptados a vivir en temperaturas extremas, dependiendo de la temperatura del nicho ecológico en el cual estos microorganismos sean metabólicamente activos, éstos pueden ser clasificados como: hipertermófilos, termófilos, mesófilos y psicrófilos. Si el nicho ecológico presenta temperaturas por sobre los 50-60°C, los organismos que lo habitan pueden ser definidos como termófilos. En este grupo generalmente solo se encuentran organismos procariontes capaces de crecer y desarrollarse sobre estas temperaturas. Solo algunos organismos eucariontes han sido categorizados como organismos termófilos (Dyer & Gafford 1961; Guo et al. 2011; Landry et al. 2014). Cuando los organismos son capaces de subsistir en nichos ecológicos que presentan temperaturas por sobre los 80°C, éstos se definen como organismos hipertermófilos; en este grupo principalmente podemos encontrar

organismos procariontes, donde la gran mayoría de los organismos descritos pertenecen al dominio arquea (Elleuche et al. 2014). Si bien los microorganismos termófilos e hipertermófilos han sido objeto hace ya muchos años de una gran cantidad de estudios, en las últimas décadas ha surgido un gran interés por el estudio de microorganismos adaptados a vivir a bajas temperaturas debido a la alta aplicabilidad biotecnológica que poseen sus proteínas y enzimas constituyentes,. A los organismos adaptados a vivir en nichos ecológicos con temperaturas por debajo de los 20°C-25°C se los clasifica como organismos psicrófilos. Los organismos psicrófilos han evolucionado para realizar sus actividades biológicas básicas (metabolismo), a temperaturas generalmente definidas en un intervalo de 0° C a 25° C, aunque también han sido reportados algunos organismos capaces de tolerar temperaturas por debajo del punto de congelación del agua (Cavicchioli 2006). Si bien los microorganismos psicrófilos utilizan la producción de proteínas anti-congelantes (Garnham et al. 2011; Do et al. 2013), de respuesta al frío (Cavicchioli 2006; Giaquinto et al. 2007) y alteraciones en la composición de las membranas lipídicas, como alguno de los principales mecanismos celulares adaptativos, en términos metabólicos, puntualmente enzimáticos, la modificación estructural de sus enzimas ha sido definida como la estrategia adaptativa que les permite operar a temperaturas bajas. Esta adaptación es principalmente atribuida a la alta flexibilidad estructural y baja estabilidad térmica de sus enzimas y proteínas (Siddiqui & Cavicchioli 2006)

1.2. Estrategias termodinámicas para el aumento de la estabilidad térmica estructural de proteínas y enzimas psicrófilas

Actualmente es sabido que las enzimas extremófilas no utilizan una única estrategia adaptativa para estabilizar o desestabilizar su estructura terciaria, sino que usan una combinación de éstas (Razvi & Scholtz 2006). Las estrategias adaptativas utilizadas por las enzimas psicrófilas apuntan principalmente a aumentar la flexibilidad estructural. Nojima y colaboradores (Nojima et al. 1977) propusieron tres estrategias adaptativas para explicar la mayor estabilidad de enzimas termófilas a altas temperaturas. Estas mismas estrategias, pero pensadas de forma opuesta, han sido planteadas para la desestabilización de enzimas psicrófilas a bajas temperaturas (Feller 2010). La primera estrategia para producir un aumento de estabilidad a altas temperaturas consiste en disminuir el calor específico de las enzimas o proteínas (C_p). El calor específico da cuenta del fenómeno de hidratación del que son producto los residuos hidrofóbicos de una proteína durante un proceso de desplegamiento; una disminución en el valor de este parámetro (C_p) es reflejo de la menor exposición de estos residuos al solvente. Esta disminución permite ampliar el intervalo de temperatura de la curva de estabilidad, permitiendo así un aumento en la temperatura a la cual se produce el desplegamiento (T_m) (**Figura 1**, curva morada). La segunda estrategia utilizada para generar una mayor estabilidad estructural es aumentar la temperatura a la cual el cambio entrópico del sistema se hace cero (T_s). Una enzima o proteína logra su máxima estabilidad cuando la contribución entrópica se cancela y solo existe aporte entálpico. Esto permite que la curva de estabilidad se corra hacia la derecha, logrando así mayores T_m y permitiendo el

funcionamiento catalítico de las enzimas y proteínas a mayores temperaturas (**Figura 1**, curva roja). La última y principal estrategia utilizada es aumentar la energía libre de estabilización (ΔG). Este aumento permite “elevar” toda la curva de estabilidad, dando como resultado final una mayor temperatura de desplegamiento térmico (T_m) (**Figura 1**, curva naranja). Como se dijo con anterioridad, las enzimas psicrófilas utilizarían estas estrategias adaptativas pero de forma opuesta a sus homólogos termófilos, para aumentar su flexibilidad estructural y así poder realizar sus actividades a bajas temperaturas.

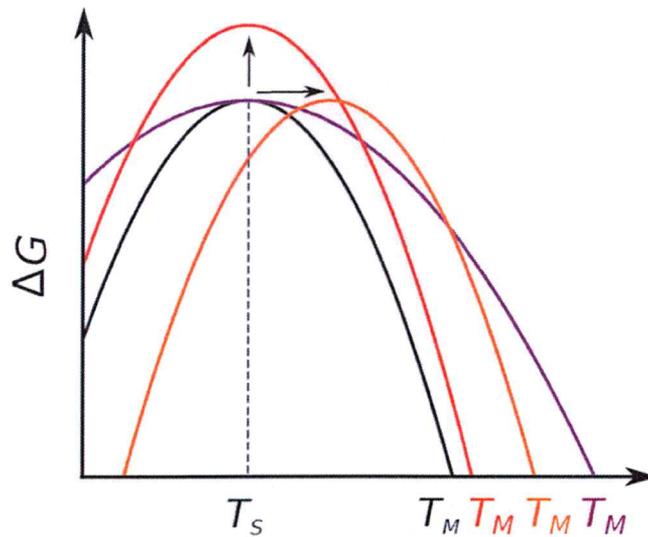


Figura 1. Curvas de estabilidad termodinámica indicando las diferentes estrategias utilizadas por un organismo mesófilo a través de la evolución para aumentar la temperatura de desplegamiento térmico (T_M) de sus proteínas y enzimas. La curva negra representa una proteína mesófila. Las estrategias termodinámicas para el aumento de estabilidad estructural son: disminución C_p (curva morada), aumento T_s (curva roja) y aumento ΔG (curva naranja). Tomado de Sterpone, 2012 (Sterpone & Melchionna 2012).

La diferencia en flexibilidad estructural entre enzimas y proteínas homólogas de organismos extremófilos adaptados a nichos ecológicos que presentan un amplio intervalo de temperaturas ha sido determinada principalmente por experimentos de desactivación dinámica de fluorescencia e intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masa. Los experimentos de desactivación dinámica de fluorescencia intrínseca han mostrado que las enzimas psicrófilas presentan generalmente una mayor permeabilidad estructural. Esta mayor permeabilidad es un índice que puede ser asociado indirectamente a estructuras con una mayor flexibilidad. Estos experimentos se basan en la capacidad de moléculas orgánicas pequeñas de difundir y penetrar estructuras proteicas, a través de colisiones de estas pequeñas moléculas orgánicas con los triptófanos, fluoróforos naturales de las proteínas. Después de un proceso de excitación de estos fluoróforos, estas colisiones producen una disminución en la energía emitida por los fluoróforos para volver a su estado electrónico basal, comparado con la energía que emitirían en ausencia de estas moléculas apagadoras. Si pensamos que estos triptófanos se encuentran en un centro hidrofóbico interno, un mayor apagamiento de la intensidad de fluorescencia, medido en términos de la constante de Stern-Volmer, es indicativo de una estructura más accesible al solvente. Estudios entre homólogos extremófilos de una misma familia de proteínas han mostrado que a bajas temperaturas, las enzimas psicrófilas presentan constantes de Stern-Volmer mayores que las de determinadas para sus homólogos termoestables (Cipolla et al. 2012; D'Amico et al. 2003). Si bien esta metodología experimental permite evaluar indirectamente el grado de flexibilidad de una estructura proteica, ésta no nos da cuenta de cuáles son los segmentos

de la proteína responsables de esta flexibilidad aumentada, y no dice nada acerca de si estos segmentos se encuentran involucrados en los procesos de catálisis enzimática. En este contexto, los experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masa, han sido una poderosa herramienta para determinar la localización de segmentos con flexibilidad aumentada en estudios comparativos entre enzimas extremófilas. Basado en el mismo criterio de permeabilidad que los experimentos de desactivación dinámica de fluorescencia intrínseca, esta metodología utiliza en este caso como sonda de flexibilidad agua deuterada (D_2O). Es sabido que tanto los átomos de hidrógeno presentes en las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos como los presentes en los enlaces peptídicos de una proteína son lábiles y tienen la capacidad de sufrir procesos de intercambio con los átomos de hidrógeno presentes en las moléculas de agua que contiene una solución determinada. Basados en esta propiedad, la exposición de una proteína a una solución de agua deuterada, permite evaluar la exposición y por ende la movilidad de diferentes regiones de una proteína en una condición apo y los cambios en la accesibilidad al solvente de estas regiones, por cambios conformacionales generados por unión de ligandos en el proceso de catálisis. Estudios de homólogos extremófilos utilizando esta metodología han mostrado que segmentos perteneciente al sitio activo o segmentos adyacentes a éste de enzimas psicrófilas, presentan mayores tasas de intercambio hidrógeno-deuterio que las mismos segmentos presentes en homólogos termoestables, reflejando directamente una mayor movilidad y flexibilidad de este tipo de enzimas e indicando que los sitios activos de las enzimas psicrófilas son altamente dinámicos (Svingor et al. 2001; Liang et al. 2004). La

utilización de esta metodología ha permitido establecer que la flexibilización estructural del sitio activo es la principal adaptación estructural responsable de que las enzimas psicrófilas puedan realizar actividades catalíticas a bajas temperaturas.

Si nos basamos en la suposición que las primeras entidades proteicas con actividades catalíticas tuvieron un origen termófilo, es lógico pensar que durante la evolución ocurrieron múltiples tipos de modificaciones estructurales que aumentaron la flexibilidad del sitio activo de las enzimas psicrófilas actuales, pero la pregunta actual es ¿cuáles son las modificaciones estructurales que influyen en el aumento de flexibilidad? Si bien, a nivel de secuencia se pueden apreciar diferencias entre homólogos extremófilos de una misma familia (Saunders et al. 2003), esta información no es suficiente debido a que generalmente estas diferencias son sutiles y establecer si estas corresponden a adaptaciones termales es imposible.

Una herramienta útil para establecer si diferencias en secuencia pueden corresponder a adaptaciones térmicas, es la comparación de estructuras tridimensionales entre homólogos extremófilos, debido a la mayor conservación de la estructura que la secuencia durante la evolución. Aunque la información estructural obtenida de experimentos de difracción de rayos X y RMN de enzimas psicrófilas es escasa, en comparación con la disponible para homólogos mesófilos y termófilos, esta información ha permitido la comparación estructural de homólogos adaptados a distintas temperaturas. Por un lado estos estudios estructurales comparativos han permitido establecer que dentro de una familia de enzimas existen características estructurales comunes entre homólogos extremófilos, que no son atribuidas a adaptaciones

estructurales térmicas, tales como el mantenimiento de un plegamiento común, así como la conservación de residuos implicados en la catálisis (Aghajari et al. 1998). Por otro lado, la determinación experimental de la estructura tridimensional de enzimas psicrófilas ha mostrado que éstas presentan características estructurales propias, tales como una mayor exposición al solvente de sus centros hidrofóbicos, una mayor exposición de estos residuos hidrofóbicos en superficie por una disminución en el número de interacciones tipo puentes de hidrógeno e interacciones aromáticas (Aghajari et al. 2003; Gianese et al. 2001; Saunders et al. 2003), un aumento en la flexibilidad local por cambios en la extensión y composición de lazos conectores de estructuras secundarias implicados en el proceso de catálisis (Violot et al. 2005), un menor número de interacciones iónicas por modificación de residuos cargados en superficie y en sus centros hidrofóbicos, así como una disminución de puentes disulfuros estabilizantes (Maes et al. 1999) (**Figura 2**). Todas estas modificaciones estructurales adaptativas apuntan principalmente a aumentar la flexibilidad local de regiones involucradas en el proceso de catálisis. Una mayor flexibilidad de los componentes del sitio activo o de segmentos cercanos a éste, generalmente es asociada a una disminución de la afinidad de la enzima por sus sustratos. Para enzimas psicrófilas existe una correlación entre el aumento de flexibilidad, disminución de afinidad por sus sustratos y un aumento de la constante k_{cat} . Los valores de K_m reportados para los sustratos naturales de enzimas psicrófilas son generalmente mayores que los obtenidos para sus homólogos mesófilos y termófilos (Cipolla et al. 2012), compensando esto con un concomitante aumento de los valores de k_{cat} . Si bien la optimización de la k_{cat} es el mecanismo evolutivo por

excelencia de las enzimas psicrófilas para generar un aumento en la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) a bajas temperaturas, existen enzimas psicrófilas que durante la evolución mejoraron su eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) no utilizando este mecanismo, sino que optimizando su constante K_m en desmedro de su constante k_{cat} . Aunque los reportes al respecto son escasos, existen enzimas que durante la evolución modificaron su sitio activo para catalizar eficientemente reacciones a bajas temperaturas, por medio de aumentar la afinidad por su sustrato natural en desmedro de optimizar la constante k_{cat} (Lonhienne et al. 2000). Debido a su mayor flexibilidad estructural, las enzimas psicrófilas también suelen presentar una alta promiscuidad por sustratos con un aumento en la temperatura a la cual se realiza el proceso de catálisis. La mayor dinámica del sitio activo de las enzimas psicrófilas, les podría permitir albergar y catalizar sustratos de un mayor tamaño que el que presentan sus sustratos naturales. Esta promiscuidad dependiente de temperatura solo ha sido vista en enzimas psicrófilas, reflejando esto que la flexibilidad de este tipo de enzimas es una ventaja adaptativa de los organismos que las poseen, pudiendo éstos no solo utilizar los sustratos naturales, sino que también poder satisfacer sus necesidades metabólicas utilizando una diversidad de sustratos.

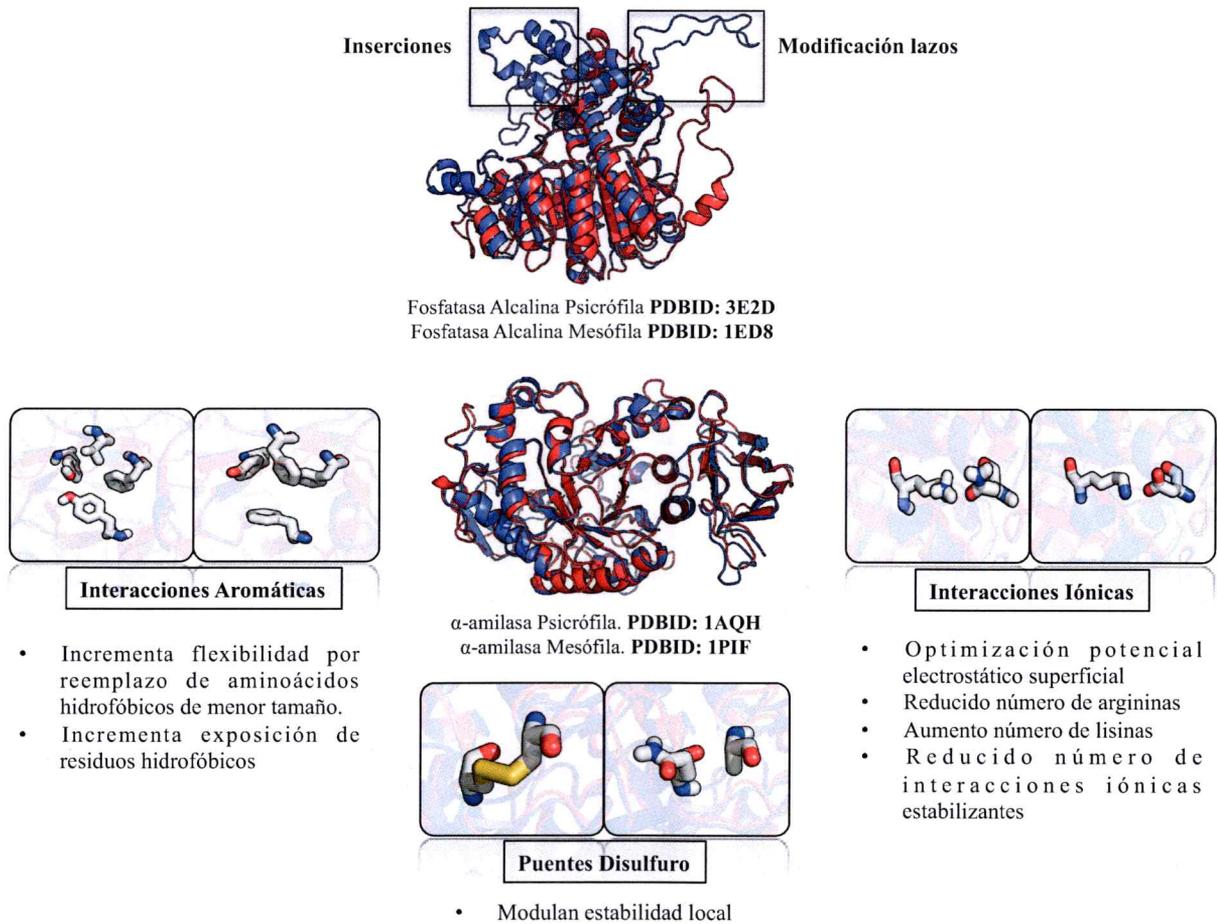


Figura 2. Esquema resumen de las principales modificaciones encontradas entre enzimas psicrófilas y mesófilas.

1.3. Dinámica del sitio activo, actividad enzimática y temperatura

Todas las características estructurales mencionadas anteriormente tienen directa relación con los parámetros cinéticos K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m , puntualmente sobre el como la temperatura afecta la variación de éstos. La velocidad de una reacción química es dependiente de la temperatura del medio de reacción en la cual ésta se desarrolla. Svante Arrhenius en 1889 (Thomas & Scopes 1998), estableció una ecuación que da cuenta de este fenómeno.

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

En esta ecuación k es la constante específica de la velocidad de la reacción, E_a es la energía de activación de esta reacción, A es el factor pre-exponencial o también llamado de frecuencia de colisiones, R es la constante de los gases y T es la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción. La ecuación indica que un aumento de la temperatura para una reacción dada, provocará un aumento exponencial de la constante de velocidad. En biología, las reacciones químicas generalmente son catalizadas por enzimas. Los parámetros cinéticos de estos catalizadores naturales, K_m y k_{cat} , son altamente dependientes de la temperatura del medio en el cual se llevan a cabo las reacciones enzimáticas. Una variación de la ecuación de Arrhenius, presentada por Henry Eyring en 1935 (Eyring 1935), relacionó la variación de los parámetros cinéticos enzimáticos con la temperatura, en el contexto de la teoría del estado de transición (**Ecuación 2**).

$$k_{cat} = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (2)$$

Aquí, k_{cat} es la constante de velocidad de un proceso enzimático, k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck y ΔG^\ddagger la diferencia energética entre el estado basal ES y la forma activada de éste, ES^\ddagger (estado de transición). La ecuación 2 vincula directamente la constante de velocidad de una reacción enzimática (k_{cat}), con los parámetros termodinámicos de activación propios de estas reacciones. En particular, la ecuación 2 permite deducir que para que una disminución en la temperatura a la cual procede una reacción enzimática, no afecte la constante k_{cat} , la energía libre de activación del proceso (ΔG^\ddagger) debería ser menor. Este es el caso de las enzimas psicrófilas. Como se puede observar en la **Figura 3**, las enzimas psicrófilas presentan valores de ΔG^\ddagger menores que las enzimas mesófilas, termófilas e hipertermófilas.

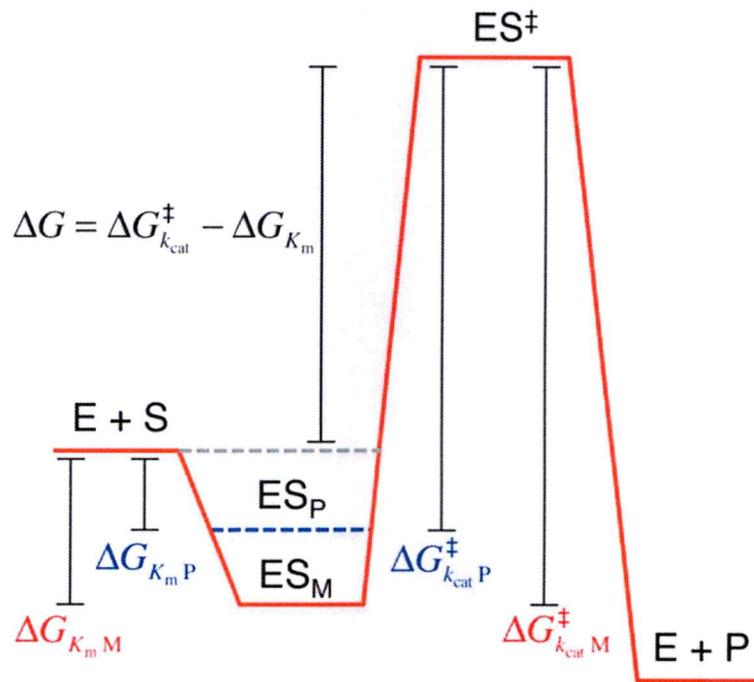


Figura 3. Diagrama para una reacción catalizada enzimáticamente por una enzima psicrófila y una mesófila. El diagrama muestra la variación del ΔG^\ddagger para una reacción enzimática a concentraciones saturantes de sustrato. En azul se muestran los componentes de ΔG asociados a una enzima psicrófila y en rojo los correspondientes a una enzima mesófila.

Los menores ΔG^\ddagger de activación que presentan las enzimas psicrófilas, generalmente se encuentran asociados, en términos cinéticos, a una menor afinidad de las enzimas por su sustrato (complejo ES). Este hecho permite disminuir la barrera energética del estado de transición (complejo activado ES^\ddagger), y de este modo obtener mayores velocidades de reacción (k_{cat}) a bajas temperaturas (**Figura 3**). Por ende, durante la evolución para lograr esta disminución en el ΔG^\ddagger , las enzimas psicrófilas optimizaron su constante k_{cat} en desmedro de su constante K_m . En particular, y de acuerdo a la ecuación 3, la estrategia adaptativa para vencer la escasa energía cinética de su medio de reacción, fue aumentar la dinámica del sitio activo, disminuyendo la cantidad de interacciones estabilizantes de la estructura.

La relación $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ indica que el ΔG^\ddagger de un proceso, se encuentra gobernado por dos componentes: uno entálpico (ΔH^\ddagger) y uno entrópico ($T\Delta S^\ddagger$). Si reescribimos la ecuación 2 en términos de estos dos últimos componentes se tiene que:

$$k_{cat} = \frac{k_B T}{h} e^{(\Delta S^\ddagger/R)} e^{-(\Delta H^\ddagger/RT)} \quad (3)$$

La contribución entálpica ΔH^\ddagger al ΔG^\ddagger de un proceso da cuenta del número de interacciones estabilizantes que deben ser vencidas para que la transición desde el complejo [ES] al complejo activado $[ES^\ddagger]$ suceda. Como es claro en la ecuación 3, una variación en la contribución entálpica será más gravitante que una entrópica a menores temperaturas. Una disminución en este parámetro aumenta directamente los valores de

k_{cat} debido a que la contribución entálpica, ΔH^\ddagger , se encuentra directamente relacionada con la energía de activación según la relación:

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (4)$$

Esta contribución entálpica es menor en enzimas psicrófilas debido a que en sus estructuras estas enzimas presentan un menor número de interacciones estabilizantes del tipo puentes de hidrógeno, Van der Waals y electrostáticas (Siddiqui & Cavicchioli 2006). Todas las enzimas psicrófilas estudiadas presentan menores valores de ΔH^\ddagger y E_a , que sus homólogos mesófilos, termófilos e hipertermófilos (Siddiqui & Cavicchioli 2006; Siddiqui et al. 2013). Estos menores valores indican con claridad que las reacciones que estas enzimas catalizan son menos dependientes de las variaciones de temperatura.

1.4. Relación actividad-estabilidad en enzimas extremófilas

Según lo mencionado en las secciones anteriores, las enzimas psicrófilas presentan una alta flexibilidad estructural, propiedad que les permite funcionar de manera óptima a bajas temperaturas. Esta alta flexibilidad estructural es lograda a expensas de disminuir su estabilidad térmica. En la **Figura 4** se presenta un esquema general que describe la relación existente entre actividad a distintas temperaturas y el estado de plegamiento de enzimas psicrófilas y mesófilas/ termófilas.

La principal diferencia en la relación actividad-estabilidad entre enzimas extremófilas, radica en que las enzimas psicrófilas se inactivan con el aumento de la temperatura antes de comenzar un proceso de desplegamiento global, indicando que la inactivación por temperatura es dependiente de un proceso de desestructuración sitio-específica, la cual debido a la alta dinámica y flexibilidad que presenta, se cree podría ser la región del sitio activo de la enzima o subestructuras cercanas a éste (Siddiqui & Cavicchioli 2006).

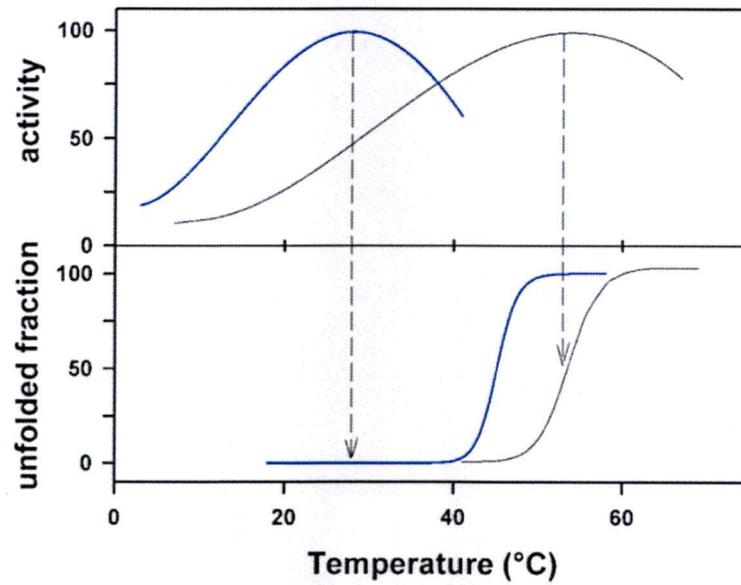


Figura 4. Inactivación y desplegamiento de enzimas psicrofílicas y mesófilas.
 Psicrofílicas (azul), mesófilas (negro). Tomado de Struvay 2012 (Struvay & Feller 2012).

Para entender la dependencia de las actividades catalíticas de las enzimas con la temperatura se han propuesto dos modelos; el modelo clásico y el modelo de equilibrio. El modelo clásico (Daniel et al. 2001; Daniel & Danson 2010), establece que una enzima se inactivará debido a que a la temperatura de inactivación sufrirá un proceso de desplegamiento. Este modelo es satisfactorio para explicar la dependencia con la temperatura de enzimas mesófilas y termófilas pero no explica lo indicado en la Figura 4, donde se muestra que la inactivación catalítica en las enzimas psicrófilas es un fenómeno desacoplado del fenómeno de desplegamiento. El modelo de equilibrio planteado por Daniel y colaboradores (Daniel et al. 2001; Daniel & Danson 2010), indica la existencia de un intermediario inactivo no desnaturalado, que se encuentra en un equilibrio rápido con la forma activa de la enzima a una temperatura determinada, en donde superada esta temperatura, la forma inactiva de la enzima se desnatura de forma irreversible, perdiendo su actividad a tales temperaturas. Este modelo resulta interesante en términos de que se ajusta a lo visto en la **Figura 4**, en donde se puede apreciar que las enzimas psicrófilas, se inactivan, aun manteniendo un estado conformacional plegado. A pesar de lo anterior, ha sido difícil generalizar un mecanismo adaptativo común para todas las enzimas extremófilas, más aun en ausencia de información estructural. El modelamiento por homología ha sido una herramienta útil para casos en que no se cuenta con este tipo de información. La obtención de modelos por homología ha permitido aplicar metodologías de dinámica molecular (Tiberti & Papaleo 2011; Papaleo et al. 2014), las que han mostrado que las enzimas psicrófilas presentan una alta flexibilidad local de elementos de estructura secundaria que se encuentran involucrados

en la mayor termolabilidad presentada por estas enzimas durante el proceso de catálisis enzimática (Kosugi & Hayashi 2012). El uso de estas metodologías computacionales, junto a una variada gama de estrategias experimentales tales como mutaciones sitio-dirigidas (Chandrayan & Guptasarma 2009; Dhaunta et al. 2013), permutaciones circulares y utilización de enzimas quiméricas (Watanabe et al. 2005; Parravicini et al. 2013) han permitido dilucidar algunos determinantes estructurales responsables de la baja estabilidad térmica de las enzimas psicrófilas.

Actualmente, la utilización de metodologías filogenéticas, se ha convertido en una poderosa herramienta para el estudio de la evolución de determinantes estructurales de proteínas y enzimas extremófilas (Hart et al. 2016). La reconstrucción de secuencias ancestrales (ASR por sus siglas en inglés *ancestral sequence reconstruction*), es una metodología ampliamente utilizada para estudiar la evolución de secuencias y estructuras que determinan la función y propiedades de proteínas actuales, mediante la inferencia de las secuencias de los nodos internos (i.e. ancestros) de un árbol filogenético. Para una reconstrucción filogenética a partir de un grupo de proteínas de estructura conocida, un aspecto clave es que los integrantes del grupo de interés presenten homología estructural, dado que de esta forma se puede suponer un origen ancestral común (Boone, David R.; Castenholz 2001). Utilizando la reconstrucción de secuencias ancestrales (Merkl & Sterner 2016) se han realizado estudios sobre especificidad de sustratos, estabilidad térmica, dimerización y otros aspectos regulatorios claves en vías metabólicas de procariontes y eucariontes.

En este trabajo de tesis se utilizaron enzimas provenientes de arqueas extremófilas filogenéticamente relacionadas, con el fin de estudiar utilizando enzimas de una misma familia, aspectos cinéticos y biofísicos concernientes a dilucidar las determinantes estructurales que permiten que enzimas provenientes de arqueas psicrófilas realicen procesos de catálisis a bajas temperaturas. A continuación se presenta una breve descripción de los modelos enzimáticos utilizados en este trabajo.

1.5. Modelos de estudio

Las arqueas han sido clasificadas en dos *phylas* principales: *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*, aunque recientemente se han propuestos dos *phylas* adicionales, el *phylum Nanoarchaeota* que comprende solo dos especies y el *phylum Korarchaeota* que consta de unos pocos organismos no cultivables (Gribaldo & Brochier-Armanet 2006; Martinko et al. 2004). La mayoría de las arqueas presentes en las *phylas* encontradas en la actualidad corresponden a organismos extremófilos. Dentro de éstos, la mayor cantidad de biomasa encontrada sobre la biosfera ha sido de arqueas adaptadas a ambientes fríos (Feller & Gerday 2003). A pesar de lo anterior, dentro del dominio arquea es posible encontrar características celulares y metabólicas generales. En términos celulares, se puede destacar la composición de las membranas lipídicas, las cuales presentan cadenas laterales isoprenoides con enlaces éter en vez de enlaces ésteres como en la mayoría de los demás sistemas biológicos, además de carecer de ácido murámico como constituyente de las paredes celulares, entre otras (Albers & Meyer 2011). En relación al metabolismo, el dominio *Arquea* presenta vías metabólicas

propias respecto a las conocidas en los dominios *Bacteria* y *Eukarya*. Un ejemplo de esto es la presencia de una vía exclusiva para la formación de metano, la cual está presente solo en ciertas arqueas metanogénicas. En arqueas también encontramos modificaciones en las vías metabólicas clásicas, especialmente en las vías del metabolismo de hidratos de carbono. Estudios bioquímicos comparativos sobre el metabolismo de hidratos de carbono en *Arqueas* indican que los organismos de este dominio utilizan versiones modificadas de las rutas encargadas en la degradación de glucosa tanto en la vía de Entner-Dudoroff (ED) como en la vía de Embden-Meyerhof (EM) o glicólisis. Ejemplo de estas modificaciones se presentan en miembros de los órdenes *Thermoproteales*, *Thermoplasmatales* y *Sulfolobales*. Los organismos de estos órdenes utilizan una versión modificada de la vía de ED, donde la etapa de fosforilación se realiza a nivel de los metabolitos 2-ceto-3-deoxigluconato o glicerato, mientras que en ciertos representantes del orden *Thermococcales* se puede observar que en su vía glicolítica (EM), solo cuatro de las diez enzimas responsables de la oxidación de glucosa a piruvato se encuentran conservadas, en relación a lo descrito en organismos bacterianos y eucariontes (Siebers et al. 1997). Los organismos perteneciente a los órdenes *Methanococcales*, *Thermococcales* y *Pirococcales* del *phylum Euryarchaeota* presentan interesantes modificaciones de su vía glicolítica, relacionadas con la fosforilación de glucosa y fructosa-6-fosfato. En organismos eucariontes y bacterias, estas reacciones son llevadas a cabo por quinasas que utilizan ATP como nucleótido dador del grupo fosforilo. En los órdenes de *Arquea* nombrados anteriormente, las quinasas responsables de la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato y de fructosa-6-

fosfato a fructosa-1,6-bifosfato utilizan ADP como nucleótido dador del grupo fosforilo (Kengen et al. 1996; Verhees et al. 2003)

1.6. Superfamilia riboquinasa

Una de las etapas claves en las principales vías metabólicas es la fosforilación de azúcares. Las enzimas conocidas como quinasa de azúcar son las responsables en catalizar la transferencia de un grupo fosforilo a un azúcar aceptor. Estas enzimas han sido clasificadas principalmente bajo dos criterios: el primero basado en un criterio estructural y el segundo basado en la presencia de motivos de secuencia conservados (Park & Gupta 2008). Estos criterios llevaron a dividir a las quinasa conocidas en tres grandes familias: hexoquinasa, galactoquinasa y riboquinasa. En el caso de la familia riboquinasa, debido a la gran diversidad de representantes presentes en la familia, ésta tuvo que ser renombrada como superfamilia riboquinasa. Sus miembros constituyentes se clasificaron según el tipo de aceptor del grupo fosforilo que la quinasa utiliza (azúcar o vitaminas), al dador del grupo fosforilo (ADP o ATP) y de acuerdo a las características estructurales (Merino & Guixé 2008). Por los criterios mencionados anteriormente, la superfamilia riboquinasa ha sido dividida en tres familias (Zhang et al. 2004). La primera familia es conocida como familia de quinasa de vitaminas dependientes de ATP. Estas quinasa catalizan la transferencia de un grupo fosforilo desde una molécula de ATP hacia una molécula precursora de vitaminas como piridoxal o derivado de pirimidina. La segunda familia, la familia de quinasa de azúcares dependientes de ATP, sus miembros catalizan la transferencia de un grupo fosforilo desde una molécula de

ATP hacia un azúcar. La última familia es conocida como familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP. Estas quinasas catalizan la transferencia de un grupo fosforilo desde una molécula de ADP hacia un azúcar. Estructuralmente, en la familia de quinasas de vitaminas todos sus representantes se encuentran constituidos por dos dominios denominados dominio mayor, en el cual se encuentra el plegamiento tipo Rossman y el dominio menor, el cual está formado por una sábana β , la que se encuentra anclada, mediante una topología reentrante, al dominio mayor por la región del plegamiento Rossman. En las quinasas de azúcares dependientes de ADP, el sitio activo se encuentra formado por ambos dominios, y se ha propuesto que el dominio menor actuaría como una cubierta del sitio activo, la que mediante cambios conformacionales inducidos por la unión de ligandos, se cierra sobre el dominio menor, permitiendo así que la catálisis se lleve a cabo (Ito et al. 2001; Ito et al. 2003; Tsuge et al. 2002; M. a. Currie et al. 2009). Las quinasas de la superfamilia riboquinasa, además de exhibir un plegamiento común tipo riboquinasa (Rossman), presentan motivos de secuencia conservados, implicados en el proceso de catálisis. Uno de estos motivos es el motivo **GXGD**, en el cual se encuentra el residuo de ácido aspártico (**D**) que ha sido propuesto como la base catalítica del proceso de fosforilación. Otro motivo conservado en la secuencia es el motivo denominado **NXXE**, donde los residuos de ácido glutámico (**E**) y de asparagina (**N**) aparecen conservados en todas las quinasas de azúcares dependientes de ADP con actividad glucoquinasa (GK) (Guixé & Merino 2009) y que está implicado en la unión del complejo metal-nucleótido (Merino & Guixé 2011). En las quinasas de azúcares dependientes de ADP con actividad fosfofructoquinasa (PFK), el

residuo asparragina (N) es reemplazado por un ácido aspártico (D), por lo que el motivo conservado en estas enzimas es el DXXE. Independiente que exista un cambio en un residuo, este motivo cumple la misma función de unión del complejo metal-nucleótido. Las quinasas de azúcares dependientes de ADP pueden ser clasificadas según la función que cumplan, denominando específicas PFK a las que solo fosforilan fructosa-6-fosfato, específicas GK, si solo fosforilan glucosa, y bifuncionales si son capaces de fosforilar ambas azúcares. En el orden *Thermococcales* se han descrito enzimas específicas tanto PFK como GK (enzimas termófilas) mientras que en el orden *Methanococcales* se encuentran enzimas bifuncionales (enzimas mesófilas y termófilas). Este último orden tiene la característica de presentar enzimas metanogénicas. En el orden *Methanosarcinales* donde también se encuentran organismos metanogénicos, se ha descrito genes que han sido anotados como codificantes de quinasas de azúcares dependientes de ADP. En este orden, no existen organismos reportados como termófilos extremos o hipertermófilos, pudiendo encontrar aquí solo organismos mesófilos, uno categorizado como termófilo moderado y un organismo psicrófilo. Estos organismos presentan genes que codificarían quinasas que han sido anotadas con actividad GK específica y actividad PFK específica. Lo interesante es que uno de estos genes, el que codificaría la quinasa de azúcar dependiente de ADP anotada con actividad GK de *Methanococcoides burtonii*, el único organismo psicrófilo reportado hasta la fecha, presenta una delección en el gen, la cual se ubica en el extremo C-terminal de la quinasa, donde se encuentra el motivo catalítico GXGD, lo cual indicaría que esta enzima es no funcional. Es por esto que en nuestro grupo hipotetizamos que la única quinasa

funcional, es decir, la anotada con actividad PFK sería capaz, además de fosforilar fructosa-6-fosfato, de fosforilar glucosa, supliendo así la no funcionalidad de la enzima con actividad GK trunca. A la fecha, solo dos homólogos con actividad dual han sido caracterizados, ambos pertenecientes al orden de los *Methanococcales*; uno de ellos corresponde a la quinasa termófila con actividad dual PFK/GK dependiente de ADP del organismo *M. jannaschii* (Sakuraba et al. 2002), mientras que la otra es la enzima mesófila con actividad dual PFK/GK dependiente de ADP de *M. maripaludis* (Castro-Fernandez et al. 2014). Con el fin de establecer si esta actividad dual es un rasgo exclusivo del orden *Methanococcales* o una característica presente en otros ordenes metanogénicos, en este trabajo de tesis se utilizaron como modelos para los estudios cinéticos, biofísicos y computacionales la enzima mesófila dependientes de ADP de *Methanococcus maripaludis* y la enzima psicrófila de *Methanococcoides burtonii* pertenecientes a los órdenes *Methanococcales* y *Methanosarcinales*, respectivamente. Otra particularidad de la quinasa de azúcar dependiente de ADP con actividad PFK de *M. burtonii* es que proviene de un organismo psicrófilo, lo que la diferencia de las otras enzimas metanogénicas bifuncionales. Hasta la fecha, ningún homólogo psicrófilo de la superfamilia riboquinasa ha sido caracterizado bioquímicamente y no existe información respecto al efecto de la temperatura sobre las propiedades cinéticas de homólogos extremófilos de la superfamilia en la literatura. Otro aspecto a abordar en esta tesis es la generación de constructos que permitan un cambio en la estabilidad térmica de estas enzimas para entender cómo la rigidización estructural podría estar involucrada en los cambios conformacionales necesarios para realizar el proceso de catálisis. Junto con

esto, tampoco se han realizado estudios biofísicos en homólogos extremófilos de la superfamilia riboquinasa que asocien el estado de plegamiento con la actividad enzimática que permitan confirmar si la capacidad de una enzima psicrófila para realizar catálisis a bajas temperaturas es producto de un fenómeno de flexibilidad local o es producto de un aumento en la flexibilidad global de la estructura.

2. HIPÓTESIS

El desplazamiento de las curvas de actividad y las diferencias en los parámetros cinéticos (K_m , k_{cat} y K_m/k_{cat}) entre una enzima psicrófila y una mesófila filogenéticamente cercanas (quinasas de azúcares dependientes de ADP de *M. burtonii* y *M. maripaludis*), están asociados a cambios en la flexibilidad de segmentos específicos que comprometen regiones del sitio activo o cercanos a éste.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Determinar las modificaciones estructurales que establecen las diferencias de estabilidad, flexibilidad y parámetros cinéticos entre una enzima psicrófila y una enzima mesófila filogenéticamente relacionadas.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterización cinética y biofísica a distintas temperaturas de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* mediante estudios cinéticos en velocidad inicial, dicroísmo circular y espectrometría de masas.
- Evaluar la utilización diferencial de distintos metales divalentes (Me^{+2}) y nucleótidos difosforilados (NDP) en la catálisis a diferentes temperaturas en las enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*.
- Determinación experimental e *in silico* de la permeabilidad y flexibilidad de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* mediante espectroscopía de fluorescencia, espectrometría de masas y metodologías de dinámica molecular.
- Construcción del árbol filogenético de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP e inferencia de la secuencia del último ancestro en común entre los órdenes *Methanococcales* y *Methanosarcinales* mediante inferencia bayesiana.

- Síntesis, expresión y caracterización del último ancestro en común entre los órdenes *Methanococcales* y *Methanosarcinales*, mediante estudios cinéticos en velocidad inicial
- Síntesis, expresión y caracterización de una mutante de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* con dos pares iónicos presentes en enzimas mesófilas y termófilas, mediante estudios cinéticos en velocidad inicial, dicroísmo circular y espectrometría de masas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Cepas

Para los procedimientos de biología molecular (subclonamientos) se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α , la cual presenta un genotipo: F-80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoA^{sup}E44 -thi-1 gyrA96 relA1.

Para la sobreexpresión de proteínas se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(D3), la cual presenta un genotipo fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHI Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ in5.

4.1.2. Medios de Cultivo

El medio Luria Bertani (LB) se preparó utilizando 10 g/L de Bacto-triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl. Luego, se ajustó a pH 7,0 con NaOH 5N y se autoclavó. Las placas LB-agar se prepararon utilizando medio LB y agregando 15 g/L de agar, luego se autoclavó, se enfrió a 50 °C y se le adicionaron los antibióticos esterilizados por filtración.

4.1.3. Soluciones generales

TAE 10X: un litro de solución contiene 48,4 g de Tris, 11,4 mL de ácido acético glacial y 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0.

TG-SDS10X: un litro de solución contiene 30,2 g de Tris, 144,0 g de glicina y 10,0 g de dodecilsulfato de sodio (SDS), se ajusta a pH 8,4 a temperatura ambiente.

4.1.4. Reactivos químicos generales

Los reactivos químicos generales, solución tampón, sales y sustratos glucosa, fructosa-6-fosfato y ADP utilizados para los ensayos enzimáticos fueron adquiridos a la compañía Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, Estados Unidos).

4.2. Métodos

4.2.1. Síntesis de genes para enzimas ADP dependientes

Las secuencias aminoacídicas de la enzima ADP-PFK de *M. burtonii* (Código: Q12WB9) y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (Código: Q6LXQ3) fueron obtenidas de la base de datos UniProt. La secuencia aminoacídica del último ancestro en común entre los órdenes *Methanosarcinales* y *Methanococcales* fue obtenida mediante inferencia bayesiana utilizando la metodología de reconstrucción de secuencias ancestrales. La secuencia de la mutante cuádruple de la enzima ADP-PFK de *M. burtonii* fue generada modificando la secuencia de la enzima psicrófila silvestre mediante diseño racional. Estas secuencias fueron transformadas a secuencias nucleotídica y enviadas a sintetizar a la compañía GenScript (<http://www.genscript.com/>).

4.2.2. Expresión y purificación de enzimas dependientes de ADP

Los genes sintetizados correspondientes a la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, y a la mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, fueron enviados por GenScript en el vector pUC57, el cual presenta resistencia para el antibiótico ampicilina y un sitio de clonamiento múltiple. Los genes fueron subclonados en el vector pET-TEV (pET-28b modificado), entre los sitios de restricción NdeI y BamHI. La modificación consiste en el reemplazo de la secuencia nucleotídica que codifica el sitio de corte de la proteasa trombina presente en el vector pET-28b por la secuencia nucleotídica que codifica el sitio de corte de la proteasa del virus del tabaco (TEV). Para el subclonamiento de los

genes desde el vector pUC57 al vector pET-TEV se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α . Los vectores purificados de esta cepa fueron utilizados para transformar la cepa de *E. coli* BL21. En el caso de los genes del último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales* y la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, éstos fueron recibidos en el vector pEt-15b. Al momento de enviar a sintetizar estos genes, a la secuencia nucleotídica de éstos, se les agregó un epítipo de histidina y un sitio de corte para la proteasa del virus del tabaco (TEV). Por ser un vector de expresión el vector pET-15b, se utilizó directamente para transformar la cepa de *E. coli* BL21. La expresión de las proteínas se realizó utilizando la cepa de *E. coli* BL21. El producto de la transformación fue crecido en 400 μ L de medio LB a 37°C por 1 hora y se sembró en placas de LB-Agar. Las colonias positivas fueron utilizadas para la expresión de las proteínas de interés. Las bacterias transformadas fueron crecidas en 1 L de medio LB con 35 mg/mL de kanamicina a 37°C hasta una OD₆₀₀ de entre 0,8-1,0 para de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, entre 0,4-0,6 para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, entre 0,8-1,0 para la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, y entre 0,5-0,7 para el último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales*. Para inducir la expresión de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y de su mutante cuádruple, los cultivos fueron llevados a la temperatura de inducción (14°C). En este paso se adicionó el inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) considerando una concentración final 1 mM. La inducción fue realizada durante 14-16 horas a 14°C. Para inducir la expresión de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y del último ancestro en

común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales*, los cultivos fueron llevados a la temperatura de inducción (30°C) y se agregó el inductor IPTG a una concentración final 1 mM. La inducción fue realizada durante 14-16 horas a 37°C. Todos los cultivos mencionados fueron centrifugados a 8.000 rpm durante 15 minutos. Las bacterias fueron resuspendidas y sonicadas en hielo utilizando una solución amortiguadora compuesta de Tris-HCl 50mM pH 7,8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5mM e Imidazol 20mM. Los lisados fueron centrifugados por 20 minutos a 18.000 rpm y la fracción soluble fue filtrada utilizando filtros de 20 µm.

El vector pET-TEV y el vector pET-15b modificado, adicionan en el extremo N-terminal de la proteína 6 residuos de Histidinas (epítotope de Histidina). Este epítotope permite la purificación de las enzimas que lo contienen utilizando cromatografía de afinidad por níquel. La fracción soluble fue cargada en una columna de 5 mL de Niquel-Sefarosa (HisTrap, Ge Healthcare), la cual previamente ha sido equilibrada con entre 5-10 volúmenes de columna, con la misma solución amortiguadora con la que se realizó la resuspensión y el proceso de sonicado. Posteriormente, se realizó un lavado de la columna con entre 5-10 volúmenes de columna con la misma solución amortiguadora. A continuación se utilizó un gradiente de 75 mL con una solución de imidazol entre 20 mM y 1 M para eluir la enzima. El epítotope de histidina fue eliminado por corte proteolítico utilizando la proteasa TEV y luego se realizó una segunda cromatografía de afinidad por níquel. La proteasa TEV utilizada, también contiene el epítotope de histidina, por lo que la enzima de interés en este caso es colectada en el frente de la cromatografía.

4.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras se re-suspendieron en una solución que contenía Tris-HCl pH 7,6 60 mM, SDS al 10%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,02%, y fueron calentadas a 100 °C por 5 minutos. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de solución TG-SDS 1X, a una intensidad de corriente constante de 30 mA. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie al 0,1% y desteñidos con una mezcla de metanol 40%, ácido acético 10% y agua.

4.2.4. Cuantificación de proteínas

Para los análisis cinéticos las concentraciones de proteínas fueron determinadas mediante el método de Bradford, empleando albúmina de suero de bovino como estándar. Para los análisis espectroscópicos la concentración fue determinada a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción teóricos de las proteínas, obtenidos desde la herramienta ProtParam de ExPasy Proteomic Server.

4.2.5. Caracterización cinética

La caracterización cinética (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) de la actividad fosfofructoquinasa (PFK) y la actividad glucoquinasa (GK) de las enzimas en estudio se realizó utilizando un ensayo continuo con enzimas auxiliares. La actividad fosfofructoquinasa (PFK) se evaluó acoplado la producción de fructosa-1,6-bifosfato a la producción de NADH utilizando como enzimas auxiliares del ensayo la enzima aldolasa y triosafosfato isomerasa de

músculo de conejo (Kengen, 1994). Las condiciones en los que se desarrollaron los ensayos enzimáticos fueron: amortiguador PIPES 25 mM pH 6,5, NADH 0,16 mM, $MgCl_2$ 5 mM, y concentraciones variables de fructosa-6-fosfato y Mg-ADP. La actividad glucoquinasa (GK) se evaluó acoplando la producción de glucosa-6-fosfato a la producción de NADH utilizando como enzima auxiliar para el ensayo la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*. Las condiciones en los que se desarrollaron los ensayos enzimáticos fueron: amortiguador HEPES 25 mM pH 7,5, NAD^+ 0,5 mM, $MgCl_2$ 5 mM, y concentraciones variables de glucosa y Mg-ADP. La producción y el consumo de NADH (actividad GK y actividad PFK respectivamente), fueron seguidos por los cambios en la absorbancia a 340 nm.

Para la determinación de especificidad por nucleótidos y metales, los ensayos fueron realizados de forma continua tanto para la actividad PFK como para la actividad GK. Para la evaluación de los distintos nucleótidos, el nucleótido ADP fue sustituido en el ensayo por IDP, UDP, CDP, TDP y GDP. La concentración utilizada en todos los casos fue 10 mM del nucleótido ensayado en presencia de $MgCl_2$ 15 mM. Para la actividad PFK las condiciones en las que se desarrollaron los ensayos enzimáticos fueron: amortiguador PIPES 25 mM pH 6,5, NADH 0,16 mM, $MgCl_2$ 15 mM, 10 mM del nucleótido evaluado y concentración saturante de fructosa-6-fosfato.

Para la evaluación de los distintos metales, el catión Mg^{+2} fue sustituido en el ensayo por Co^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} o Ca^{+2} . La concentración utilizada en todos los casos fue de 2 mM del metal ensayado en presencia de ADP 1 mM. Para la actividad GK las condiciones en los que se desarrollaron los ensayos enzimáticos fueron: amortiguador

HEPES 25 mM pH 7,5, NAD^+ 0,5 mM, 1mM ADP, catión divalente 2mM, y concentración saturante de glucosa. Las enzimas auxiliares utilizadas fueron las mismas que se mencionaron para la caracterización cinética. La producción y el consumo de NADH (actividad GK y actividad PFK respectivamente) fueron seguidos espectrofotométricamente por los cambios en la absorbancia a 340nm. Los ensayos de especificidad de nucleótidos y metales fueron realizados a 10°C y 25°C.

Para la determinación de especificidad de especificidad por azúcares fueron realizados de forma discontinua, midiendo el consumo de ADP. En todos los ensayos la concentración del azúcar fue 10 mM. Las condiciones en las que se desarrollaron los ensayos enzimáticos fueron: amortiguador HEPES 25 mM pH 7,0, MgCl_2 20 mM, ADP 25 mM y del azúcar evaluado 10 mM. El tiempo de reacción escogido para realizar el ensayo fue 3 minutos. Después de transcurrido este tiempo, la reacción fue detenida utilizando HClO_4 3% final y la solución neutralizada con NaHCO_3 0,5 M final. Para cuantificar el consumo de ADP, se tomó una alícuota de la mezcla de reacción (20-50 μL) y se utilizó el ensayo piruvato quinasa-lactato deshidrogenasa, en el cual la enzima piruvato quinasa, en presencia de fosfoenolpiruvato, convierte el ADP en piruvato y la lactato deshidrogenasa convierte a su vez el piruvato en lactato, con el concomitante consumo de NADH. Las condiciones en las que se desarrolló la cuantificación de ADP fueron: piruvato quinasa 0,8 U, lactato deshidrogenasa 2,4 U, fosfoenolpiruvato 0,3 mM, KCl 125 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,0, MgCl_2 5 mM y NADH 0,2 mM. El volumen final del ensayo fue 500 μL . El consumo de NADH fue seguido

espectrofotométricamente por los cambios en la absorbancia a 340nm. Los ensayos de especificidad por azúcares fueron realizados a 10°C y 25°C.

4.2.6. Caracterización estabilidad térmica

Para la obtención de las curvas de desplegamiento térmico de las enzimas dependientes de ADP se utilizó la técnica de dicroísmo circular. Los espectros de desplegamiento inducido por calor fueron obtenidos en un espectropolarímetro JASCO J-1500 acoplado a un sistema Peltier para el control de la temperatura, utilizando un flujo constante de nitrógeno. Las mediciones se realizaron siguiendo la señal dicroica a 222 nm, un ancho de banda de 1nm y un tiempo de integración de 16 segundos. Las condiciones en las que los espectros se obtuvieron fueron: amortiguador PIPES 25 mM pH 6,5, MgCl₂ 5 mM y NaCl 500 mM.

4.2.7. Caracterización permeabilidad estructural

Para evaluar la permeabilidad de las enzimas dependientes de ADP se utilizó desactivación dinámica de la fluorescencia intrínseca por acrilamida. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas en los experimentos fueron de 295 nm y 350 nm respectivamente. Adiciones consecutivas de pequeñas cantidades de acrilamida fueron agregadas a la solución tampón que contenía la enzima de trabajo. Después de cada adición y previa estabilización de la señal de fluorescencia, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia. Las constantes de Stern-Volmer fueron calculadas a partir de la ecuación de Stern-Volmer: $F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$, donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia del apagador, respectivamente, K_{sv} es la

constante de Stern-Volmer y $[Q]$ la concentración del apagador. Las condiciones en las que se desarrollaron los experimentos fueron: amortiguador PIPES 25 mM pH 6,5 y $MgCl_2$ 5mM.

4.2.8. Caracterización de la flexibilidad estructural

Para evaluar la flexibilidad de las enzimas dependientes de ADP se utilizó intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas. En primera instancia se realizaron pruebas de digestión. Para la digestión, las enzimas fueron inyectadas en una columna que contenía proteasa pepsina inmovilizada en agarosa. Para optimizar el proceso de identificación de péptidos, la concentración utilizada fue 15 μ M. Los péptidos obtenidos fueron identificados utilizando el software ProteinLynx Global SERVER PLGS 3.0 (Waters), considerando solo los péptidos que poseían un *score* mayor a 7, una abundancia de al menos 3 ppm y que éstos pudieran ser identificables en al menos dos de los tres experimentos realizados. Una vez identificados los péptidos se procedió a realizar los experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio. Para esto la concentración de enzima utilizada para todos los ensayos realizados fue 5 μ M. En todos los experimentos realizados, 5 μ L de cada enzima fueron diluidos en 55 μ L de agua deuterada (D_2O) en tiempos de incubación de 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 y 30 minutos a 10°C, 25°C y 40°C. Para detener las reacciones, un volumen equivalente al de la mezcla de reacción compuesta de cloruro de guanidinio (Gnd-HCl) 2 M y se agregó 1% de ácido fórmico. Las muestras fueron entonces inyectadas en una columna que contenía proteasa pepsina inmovilizada en agarosa y mantenidas en ésta durante 2 minutos a 1°C. Los

péptidos resultantes de la proteólisis fueron separados por cromatografía utilizando una fase móvil de ácido fórmico 0,1% y un gradiente de 7% a 95% de acetonitrilo, durante 7 minutos. Entonces, los péptidos fueron ionizados e introducidos en el espectrómetro de masas (Water, SYNAPT G2 QTOF: time-of-flight) mediante *electrospray*, para su separación y posterior identificación utilizando el software PLGS (Waters). La cuantificación del intercambio hidrógeno-deuterio de cada péptido se realizó utilizando el software DynamX 3.0 (Waters). Las unidades utilizadas para la cuantificación fueron Dalton (Da)

4.2.9. Reconstrucción filogenética e inferencia de la secuencia ancestral

La reconstrucción del árbol filogenético por inferencia bayesiana y la reconstrucción de la secuencia ancestral fue realizado por el método de Bayes jerárquico con el programa MrBayes3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003). Para la reconstrucción del árbol filogenético se extrajeron todas las secuencias aminoacídicas no redundantes disponibles en la base de datos de proteínas no redundantes (nr) mediante PSI-BLAST, utilizando como plantilla las secuencias de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Luego, se realizó un alineamiento estructural con las proteínas de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP a las que se les ha determinado su estructura tridimensional y sobre este perfil se alinearon las secuencias obtenidas mediante PSI-Blast. Además, se realizó un alineamiento basado en estructura en el servidor PROMALS-3D (Pei et al. 2008), analizándose los resultados y editando manualmente las posiciones mal alineadas.

Los análisis con MrBayes se realizaron con 10.000.000 de generaciones, con una frecuencia de muestreo de 1000 y con un “*burn-in*” de 1000 muestras. La reconstrucción de secuencias ancestrales por Bayes jerárquico utilizando aminoácidos se realizó según lo descrito por Hall 2006 (Hall 2006; Hall 2008). Para los análisis bayesianos basados en el alineamiento de aminoácidos se utilizaron modelos de evolución empíricos de acuerdo a lo seleccionado por ProtTest (Abascal et al. 2005).

4.2.10. Caracterización *in silico*

Los modelos por homología de las enzimas dependientes de ADP, fueron sometidos a dinámica molecular clásica utilizando el software NAMD 2.9 (Phillips et al. 2005), empleando el campo de fuerzas CHARMM 27 (MacKerell et al. 1998). Cada modelo por homología fue puesto en una caja de agua y el sistema neutralizado con NaCl 0,2 M. Adicionalmente, se agregó MgCl₂ 5 mM. La minimización de energía del sistema se realizó utilizando 20.000 iteraciones y sin imponer restricciones (Phillips et al. 2005). Los sistemas fueron equilibrados por 10 ns, después de lo cual las simulaciones de dinámica molecular fueron extendidas por 50 ns más. El ensamble utilizado para llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular fue NTP, fijando en 298K la temperatura del sistema y en 1 atmósfera la presión. El paso de tiempo empleado fue 2 fs.

Para identificar movimientos correlacionados de significado funcional se realizó un análisis de componentes principales (PCA). A partir de las trayectorias se generó un nuevo archivo que contenía solo las coordenadas de los carbonos-alfa (C α) de cada residuo para cada proteína. En cada uno de estos archivos todos los movimientos de

rotación y traslación fueron removidos luego de la superposición de cada *frame* de la simulación. Con esas nuevas trayectorias se realizó el análisis de componentes principales usando el programa Carma (Glykos 2006). El análisis permite obtener un conjunto de vectores y valores propios, de forma de disectar el espacio conformacional explorado en la trayectoria en diferentes modos de movimientos o componentes principales. Los vectores propios o componentes principales representan un desplazamiento correlacionado de los residuos de la proteína y cada valor propio representa la amplitud de dicho movimiento. Cada vector propio es ordenado de acuerdo a sus valores propios en orden decreciente describiendo los componentes principales de los movimientos. Si solo unos pocos componentes principales son necesarios para explicar gran parte de la varianza del sistema, los movimientos son altamente correlacionados o colectivos, por el contrario, si se requieren muchos componentes principales para describir la varianza total, es indicativo de que los movimientos son aleatorios. El análisis hecho en Carma permitió obtener el movimiento descrito por cada vector propio en un archivo de trayectoria que fue visualizado y analizado en VMD.

5. RESULTADOS

5.1. Filogenia de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP

En la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP se han realizado muy pocos estudios evolutivos. El objetivo fundamental de nuestro grupo de investigación durante los últimos años, ha sido entender como durante la evolución, las enzimas de esta familia de quinasas han adquirido características estructurales y funcionales que les han permitido funcionar en una gran diversidad de ambientes fisicoquímicos extremos. Con el objetivo de actualizar la información existente y poder identificar organismos adaptados a vivir a bajas temperaturas (organismos psicrófilos), se reconstruyó la filogenia de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP, mediante inferencia bayesiana (ver Materiales y Métodos). Brevemente, se utilizaron todas las secuencias no redundantes de proteínas disponibles en la base de datos de proteínas no redundantes (nr) mediante PSI-Blast. Luego, con las estructuras cristalográficas disponibles para enzimas de esta familia, se realizó un alineamiento estructural de éstas, alineamiento contra el cual se alinearon las secuencias seleccionadas por PSI-Blast. El árbol filogenético obtenido se muestra en la **Figura 5**.

Familias de quinasas de azúcares dependientes de ADP

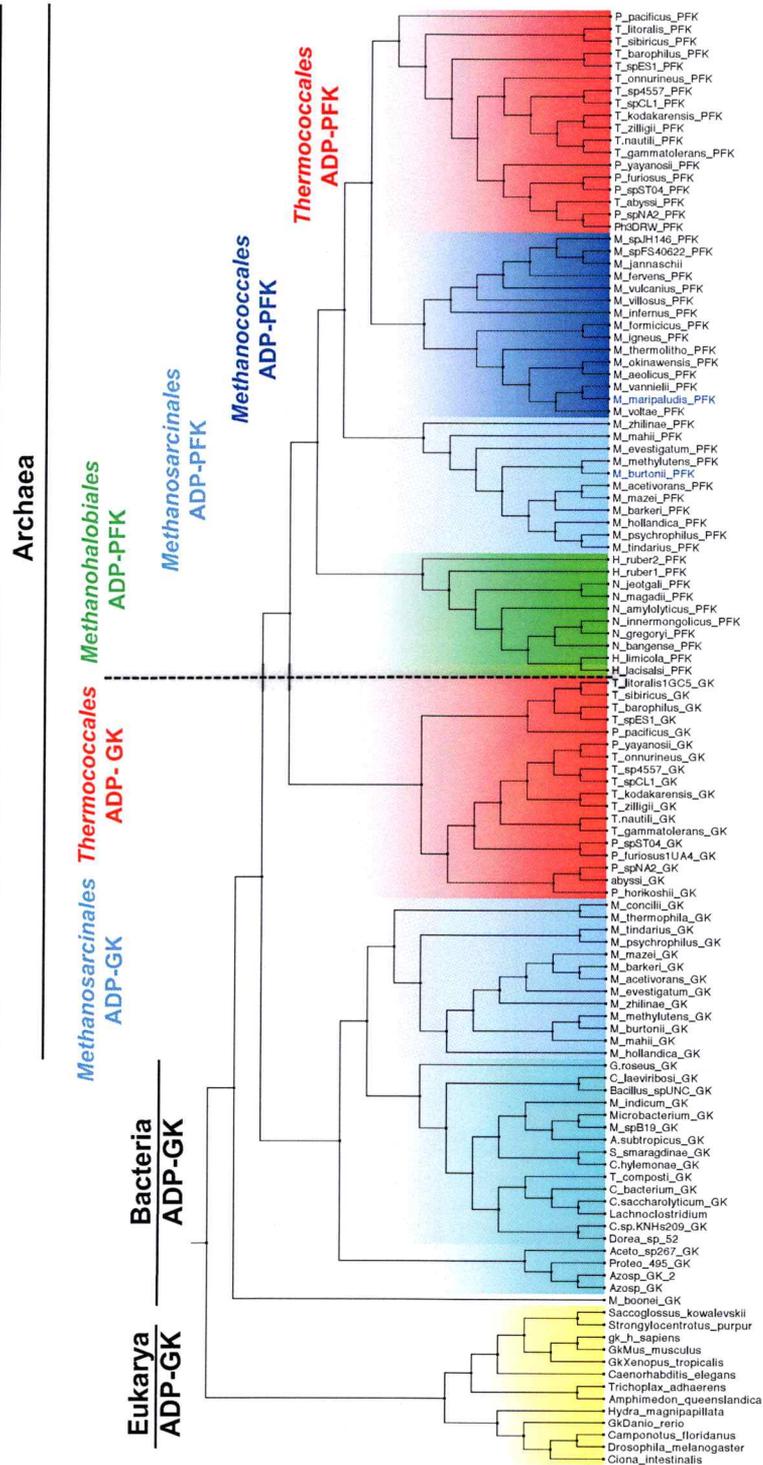


Figura 5. Árbol filogenético de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP. El árbol filogenético fue obtenido mediante inferencia bayesiana.

La reconstrucción del árbol filogenético de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP permitió corroborar que las enzimas de la familia se ordenan de acuerdo a su especificidad por sustrato, es decir, aquellas específicas para fructosa-6-fosfato (F6P), actividad PFK y para glucosa (Glc), actividad GK. En relación a la adaptación a nichos ecológicos con diferentes amplitudes de la variación de la temperatura,, el árbol filogenético reconstruido, muestra que en el orden *Thermococcales* solo se encuentran organismos termófilos e hipertermófilos, mientras que en el orden *Methanococcales*, se observa la presencia de organismos termófilos e hipertermófilos y también organismos mesófilos. A diferencia de los órdenes mencionados anteriormente, en el orden *Methanosarcinales* no se encuentran organismos adaptados a vivir a altas temperaturas. En este orden solo encontramos organismos mesófilos y un termófilo moderado (*M. evestigatum*). A diferencia de todos los demás órdenes, en el orden *Methanosarcinal* podemos encontrar los únicos organismos psicrófilos de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP. Adicionalmente a esto, el uso de una gran cantidad de secuencias para la reconstrucción del árbol filogenético (118 secuencias), permitió apreciar la aparición de quinasas de azúcares dependientes de ADP en bacterias y proteobacterias, las que al igual que las quinasas encontradas en organismos eucariontes, solo presentan actividad GK. También el análisis muestra la aparición de un nuevo orden dentro del grupo arquea con este tipo de enzimas (orden *Halobacteria*), hecho que a la fecha no ha sido reportado en literatura. Los resultados descritos anteriormente permitieron constatar de manera clara que las enzimas de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP se

encuentran presentes en los 3 reinos de la vida. El análisis del árbol filogenético presentado en la **Figura 5**, mostró la aparición de una nueva enzima psicrófila en la familia (ADP-PFK de *M. psychrophilus*), no encontrada en estudios anteriores (Tesis Víctor Castro). Esta enzima, al igual que la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* se encuentra en el orden *Methanosarcinales*, indicando que en este orden, se encuentran principalmente enzimas que necesitarían de una alta flexibilidad estructural para realizar sus procesos catalíticos. Interesantemente, en este grupo también se encuentra a la enzima halófila ADP-PFK de *M. evestigatum*. La presencia de enzimas psicrófilas y halófilas en el mismo orden no es de extrañar, en razón de que algunos autores han indicado que una misma enzima puede ser psicrófila y halófila a la vez, pues para ambas adaptaciones, la característica principal sería una flexibilidad estructural aumentada en comparación a homólogos termoestables (De Santi, 2016). No obstante la aparición de una nueva enzima psicrófila, las enzimas seleccionadas para la realización de esta trabajo de tesis fueron la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* perteneciente al orden *Methanosarcinales* (*MbPFK*) y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* perteneciente al orden *Methanococcales* (*MmPFK*).

5.2. Caracterización cinética de la enzima psicrófila ADP-GK de *M. burtonii*.

Utilización de glucosa y fructosa-6-P como sustratos

El orden *Methanosarcinales* contiene quinasas de azúcares dependientes de ADP con actividad glucoquinasa (GK) y fosfofructoquinasa (PFK) (**Figura 5**). Dentro de este orden podemos encontrar al organismo *Methanococoides burtonii*, organismo que presenta los genes que codifican tanto la enzima con actividad GK como para la enzima con actividad PFK (**Uniprot-GK:Q12WC0** y **Uniprot-PFK:Q12WB9** respectivamente). El gen de la enzima GK presenta una remoción de parte de su secuencia nucleotídica, la cual codifica parte del extremo C-terminal. Esta región se presenta como fundamental para la actividad catalítica de la enzima, debido a que en ella se encuentra el **motivo GXGD**, el cual posee el residuo aspártico que funciona como la base catalítica en la reacción de fosforilación que catalizan estas quinasas. Considerando esta información hemos hipotetizado que el gen no truncado con anotación PFK, codificaría una enzima bifuncional, es decir con actividad PFK y GK, capaz de realizar el proceso catalítico utilizando tanto glucosa (Glc) como con fructosa-6-fosfato (F6P). Para evaluar si el gen funcional PFK codifica efectivamente una enzima con rasgos bifuncionales, se procedió a expresar, purificar y caracterizar la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (ver Materiales y Métodos). La sobreexpresión de la enzima fue llevada a cabo en células BL21 a 14°C y su purificación se realizó a partir de un extracto crudo de estas células mediante cromatografía de afinidad por níquel. El epítipo de histidina presente en el extremo amino-terminal de la enzima, por el cual la proteína es capaz de unirse al níquel, fue removido mediante proteólisis utilizando la proteasa TEV.

La proteasa TEV utilizada, también presenta un epítoto de histidina, por lo que mediante una segunda cromatografía de afinidad por níquel, la proteasa fue inmovilizada en la matriz y la enzima de interés obtenida en el frente cromatográfico. Para corroborar la pureza de la enzima obtenida, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes. La **Figura 6** muestra el gel obtenido, en el cual se puede apreciar que la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* fue purificada a homogeneidad, con una pureza lo suficientemente alta como para realizar su caracterización cinética y biofísica.

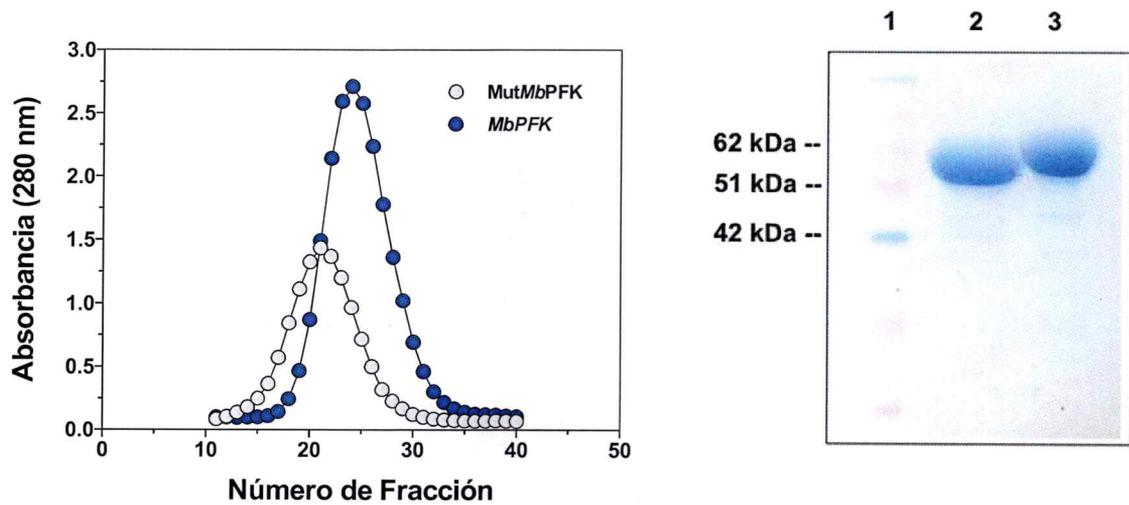


Figura 6. Purificación de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. A) Purificación mediante cromatografía de afinidad por níquel. B) Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE). Carril 1: Estándar de peso molecular, Carril 2: Enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, Carril 3: Mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*.

La caracterización cinética de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* para las actividades PFK y GK fueron realizados a 25°C en razón de que la temperatura óptima de crecimiento de la arquea *M. burtonii*, de la cual proviene esta enzima, es 23°C (Noon, 2003). La **Tabla 1** muestra un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para la actividad PFK y GK. Los valores de la **Tabla 1** muestran que la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* es capaz de catalizar la reacción de fosforilación utilizando tanto glucosa como fructosa-6-fosfato como moléculasceptoras del grupo fosforilo. Si bien la eficiencia catalítica es 4 órdenes de magnitud mayor para la actividad PFK, en comparación con la actividad GK, esta última presenta una eficiencia catalítica significativa, por lo que se puede pensar que esta enzima presentaría actividad bifuncional a nivel fisiológico.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*.

Actividad	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) F6P	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) Glc
PFK	$0,023 \pm 0.008$	$7,9 \pm 0.1$	$3,4 \times 10^5$	---
GK	24 ± 3	$0,91 \pm 0.03$	---	$3,8 \times 10^1$

Las medidas fueron realizadas a 25°C

5.3. Actividad glucoquinasa redundante en el orden *Methanosarcinales* de arquea

Las enzimas termófilas del orden *Thermococcales* son las mejor caracterizadas hasta la fecha entre las quinasas de azúcares dependientes de ADP. Estos organismos presentan dos genes que codifican enzimas con alta especificidad de sustrato, ya sea glucoquinasa (GK) o fosfofructoquinasa (PFK). En otros órdenes de la familia, como el orden *Methanococcales*, también existen enzimas caracterizadas como bifuncionales, tales como la enzima mesófila ADP-PFK/GK de *Methanococcus maripaludis* (Castro-Fernandez et al. 2014)) y la enzima hipertermófila ADP-PFK/GK de *Methanocaldococcus jannaschii* (Sakuraba et al. 2002). Respecto a esta última, se propuso que la bifuncionalidad de estas enzimas sería una característica ancestral dentro la familia. Sin embargo, un estudio filogenético realizado por Merino y col. (Guixé & Merino 2009), mostró que esta característica no era un estado ancestral, sino más bien un estado de transición desde la actividad GK a la actividad PFK (Guixé & Merino 2009). Como se puede apreciar en la **Tabla 1**, la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* se presenta como bifuncional. Al contrario de lo que ocurre en el orden *Thermococcales*, en donde existen enzimas específicas para fosforilar glucosa o fructosa-6-fosfato de forma independiente, y en el orden *Methanococcales*, en donde solo existe un gen el cual codifica una única quinasa con actividad bifuncional, en el orden *Methanosarcinales* todos los organismos presentan dos enzimas, una anotada con actividad GK (trunca e inactiva en el caso de *M. burtonii*) y otra anotada con actividad PFK. Sin embargo, esta última, además de catalizar la fosforilación de fructosa-6-fosfato, también puede catalizar la fosforilación de glucosa (**Tabla 1**). Esta actividad

redundante solo se presenta en este orden de arqueas. Para confirmar la actividad GK redundante en otro miembro de este orden, caracterizamos la enzima termófila ADP-PFK de *Methanohalobium evestigatum*. La **Tabla 2** muestra un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para la caracterización de la actividad PFK y GK de esta enzima. Los resultados confirman que los organismo del orden *Methanosarcinal*, aunque poseen una enzima específica para la fosforilación de glucosa, presentan además una enzima capaz de fosforilar tanto fructosa-6-fosfato como glucosa.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la enzima termófila ADP-PFK de *M. evestigatum*.

Actividad	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) F6P	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) Glc
PFK	$0,034 \pm 0,003$	$9,5 \pm 1,0$	$2,79 \times 10^5$	---
GK	$10,9 \pm 0,8$	$1,93 \pm 0,05$	---	$1,78 \times 10^2$

Las medidas fueron realizadas a 40°C

5.4. Estudio de la variación de los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* con la temperatura

Una de las principales características reportadas sobre enzimas psicrófilas es la alta dinámica y flexibilidad de su sitio activo. Debido a esto, un aumento de temperatura debiera generar una mayor movilidad de los residuos responsables de la unión de los sustratos, lo que por consiguiente provocaría un aumento de los valores de K_m . Existen reportes de que los valores de K_m para las enzimas psicrófilas aumentan exponencialmente con la temperatura, en tanto que para las enzimas termófilas y algunas mesófilas los valores de K_m disminuyen exponencialmente. En esta parte del trabajo, además de la caracterización cinética a diferentes temperaturas de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, se realizó la caracterización de la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis* a distintas temperaturas. La inclusión de la enzima hipertermófila responde al objetivo de observar la variación de los parámetros cinéticos con la temperatura de tres enzimas provenientes de organismos adaptados a nichos ecológicos con temperaturas muy diferentes. La enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis* solo fue utilizada para este tipo de experimentos debido a que por su alta rigidez estructural no pudo ser estudiada con las técnicas biofísicas utilizadas en este trabajo de tesis. La **Figura 7** muestra las curvas de saturación realizadas para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* a distintas temperaturas para la actividad PFK y GK y la variación de los valores de K_m para ambos sustratos. La **Figura 8** muestra la comparación de la variación de los valores de K_m de la

enzima psicrófila con los obtenidos para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis*.

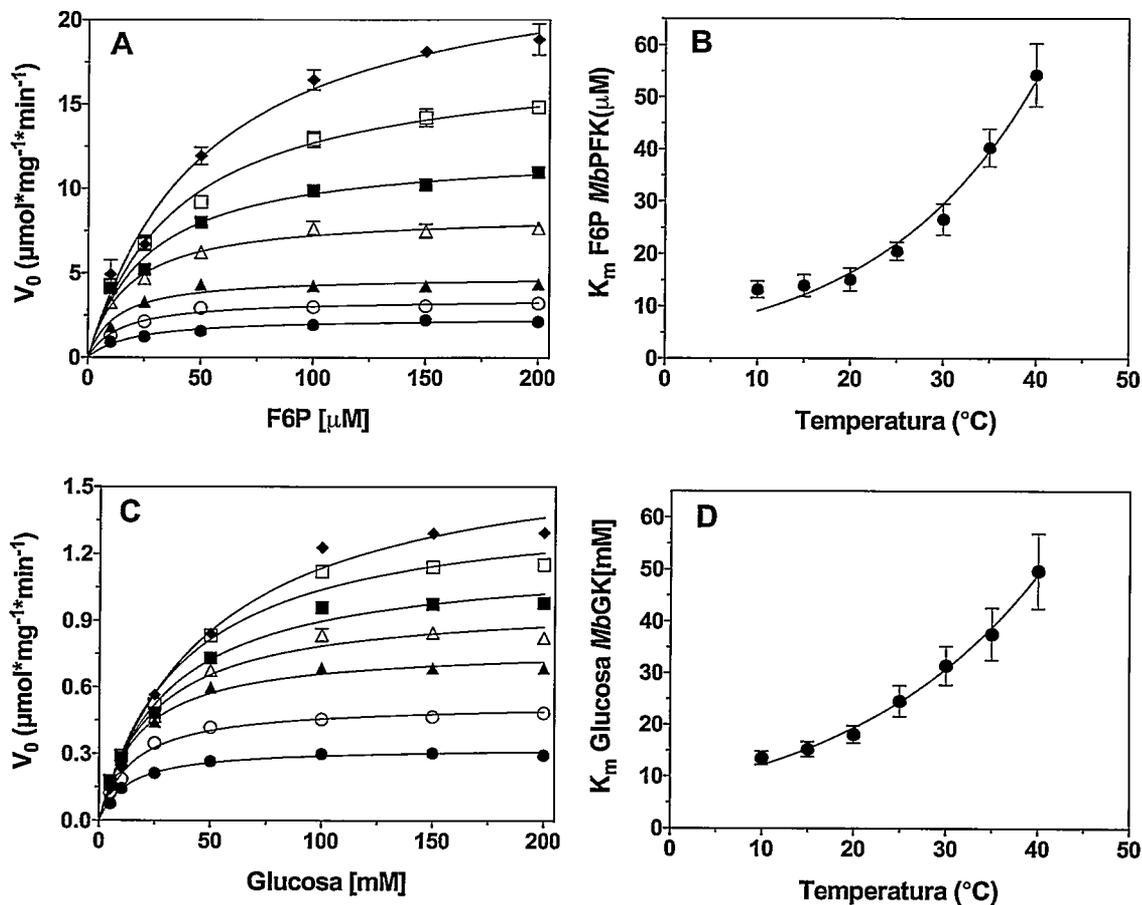


Figura 7. Caracterización cinética de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* a distintas temperaturas. A) y C) Curvas de saturación para la actividad PFK y GK a distintas temperaturas (●: 10°C, ○: 15°C, ▲: 20°C, △: 25°C, ◼: 30°C, □: 35°C, ◆: 40°C). B) y D) Dependencia de la constante K_m con la temperatura para la actividad PFK y GK a distintas temperaturas.

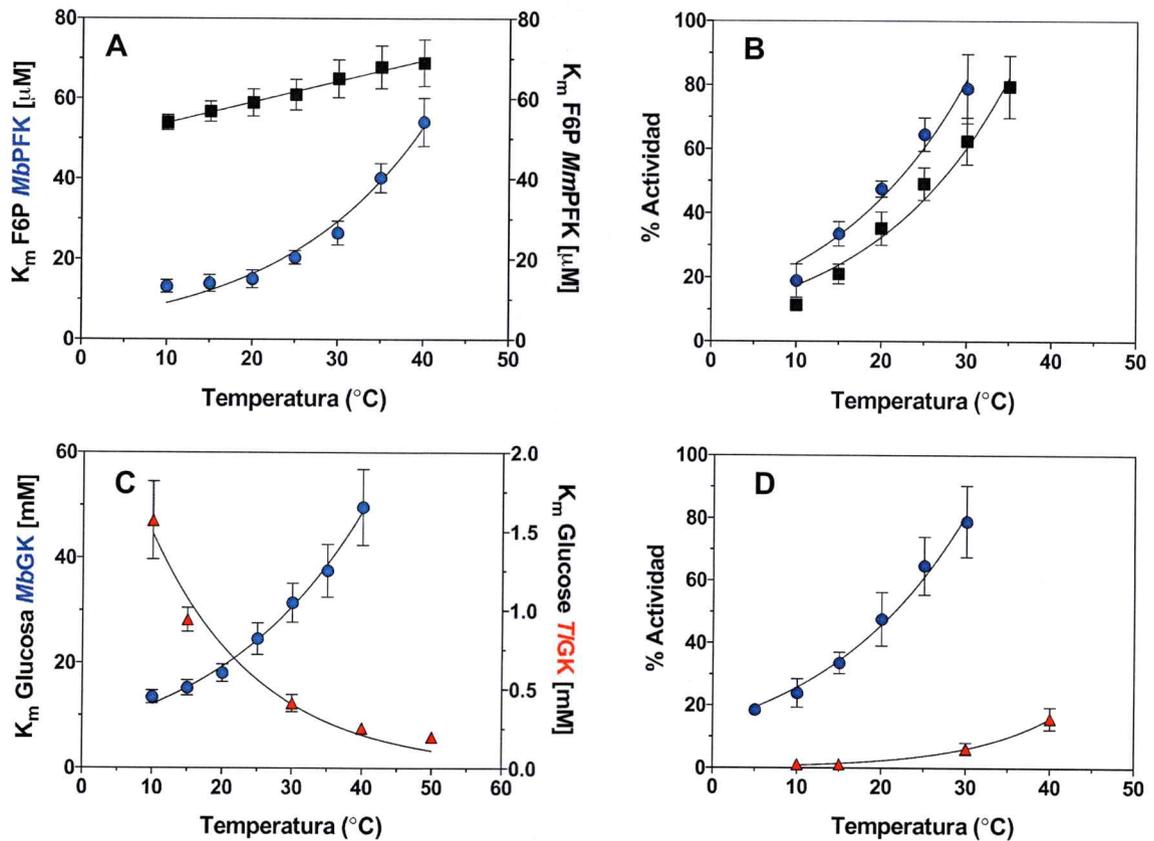


Figura 8. Variación de los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} con la temperatura de enzimas ADP-dependientes adaptadas a distintas temperaturas. A) y C) Dependencia de la constante K_m con la temperatura para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (MbPFK) en azul, para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (MmPFK) en negro y para la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis* (TIGK) en rojo. B) y D) Dependencia de la constante k_{cat} expresada como porcentaje de la actividad máxima. En azul la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (MbPFK), en negro la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (MmPFK) y en rojo la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis* (TIGK).

La caracterización de los tres modelos enzimáticos analizados a diferentes temperaturas muestra que al aumentar la temperatura del ensayo, los valores de K_m para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* aumentan de forma exponencial. Estos resultados se conciben con lo establecido para estas enzimas en literatura, esto es, que estructuralmente las enzimas psicrófilas son más flexibles que sus homólogos termoestables y que un aumento en la temperatura afectaría los contactos del sitio activo con el sustrato o de regiones asociadas a éste involucradas en el proceso de catálisis. Esta flexibilidad aumentada es atribuida a una menor cantidad de interacciones estabilizantes en la estructura de este tipo de enzimas. Como el aumento de temperatura afecta negativamente solo la unión del sustrato en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y no su constante catalítica, se podría hipotetizar que las regiones que presentan un mayor grado de flexibilidad son las relacionadas con el sitio activo o con regiones cercanas a éste. Los candidatos podrían ser los siguientes motivos, los cuales son altamente conservados dentro de la familia: NXNXD, motivo asociado a la unión del azúcar; y los motivos HXE y (D)NXXE, asociados a la unión del complejo metal-nucleótido. En esta familia de enzimas existe otro motivo denominado GXGD, el cual presenta la base catalítica encargada de desprotonar el grupo hidroxilo ubicado en el C1 de la fructosa-6-fosfato o el C6 de la glucosa. Si analizamos los datos de la **Figura 7B** se puede observar que si bien existen diferencias entre la actividad de la enzima psicrófila y la enzima mesófila en el intervalo de temperaturas evaluadas, la mayor eficiencia de la enzima psicrófila a bajas temperaturas estaría dada por la optimización de la constante K_m y no de la constante k_{cat} , como suele ser reportado para enzimas psicrófilas (**Tabla**

3). El aumento de los valores de K_m con la temperatura es un fenómeno general para todas las enzimas psicrofílicas, pero no lo es el presentar valores de K_m menores que sus homólogos termoestables. Lo interesante de la enzima psicrofílica ADP-PFK de *M. burtonii* es justamente esto, la optimización de sus valores de K_m en comparación con los obtenidos para su homólogo, la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. La gran mayoría de los reportes encontrados en literatura sobre enzimas psicrofílicas indican que los valores de K_m para sus sustratos naturales son mayores que los de sus homólogos termoestables, pero siendo sus valores de k_{cat} también mayores, logrando así una mayor eficiencia a bajas temperaturas (ver Discusión).

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*Mb*PFK), mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (*Mm*PFK) e hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis* (*Tl*GK).

Enzima	T (°C)	K _m (μM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹) F6P	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹) Glc
* <i>Mb</i> PFK	10	13 ± 5	2,3 ± 0,2	1,8 x 10 ⁵	---
	25	23 ± 8	7,9 ± 0,1	3,4 x 10 ⁵	---
* <i>Mm</i> PFK	10	54 ± 7	5,1 ± 0,5	9,4 x 10 ⁴	---
	25	62 ± 10	13,0 ± 0,8	2,1 x 10 ⁵	---
* <i>Tl</i> GK	10	1.502 ± 247	6,8 ± 0,2	---	4,5 x 10 ³
	25	451 ± 61	14,6 ± 0,3	---	4,4 x 10 ⁴

*Para las enzimas con actividad PFK, el valor de la constante K_m hace referencia al sustrato fructosa-6-fosfato (F6P). Para la enzima con actividad GK, el valor de la constante K_m hace referencia al sustrato glucosa (Glc). Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

En la **Tabla 3** queda claramente establecido que la capacidad de realizar catálisis a bajas temperaturas de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* es debido a que esta enzima presenta una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) mayor que sus homólogos termoestables a bajas temperaturas. Los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} pueden ser relacionados con los parámetros cinéticos de activación mediante la ecuación de Eyring (**Ecuación 2**). El ΔG de una reacción enzimática puede ser desglosado en un ΔG de activación (ΔG^\ddagger) asociado a la constante k_{cat} y aun ΔG de unión asociado a la constante K_m . Adicionalmente y según la relación expresada en la **Ecuación 4**, el ΔH^\ddagger puede ser obtenido si se conoce la energía de activación del proceso enzimático. Así, con la parte exponencial de las curvas de actividad de la **Figura 8 (8a y 8c)** y realizando una gráfica de Arrhenius, se procedió a calcular la energía de activación (E_a) del proceso de fosforilación para la enzima psicrófila, mesófila y la hipertermófila considerando solo su actividad preferencial (PFK para las enzimas psicrófila y mesófila y GK para la enzima hipertermófila). Con este valor se estimaron los parámetros termodinámicos de activación para analizar si alguno de éstos daba indicios de diferencias en relación a la actividad a bajas temperaturas. En la **Tabla 4** se muestran las energías de activación calculadas para el proceso de fosforilación para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis*.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos de activación para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*MbPFK*), mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (*MmPFK*) e hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis* (*TIGK*).

Enzima	E_a (kcal mol ⁻¹)	T (°C)	ΔG^\ddagger (kcal mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S^\ddagger$ (kcal mol ⁻¹)
<i>MbPFK</i>	10,3 ± 0,2	10	16,0	9,7	-6,3
		25	16,2	9,7	-6,5
<i>MmPFK</i>	10,5 ± 0,1	10	15,6	9,9	-5,7
		25	15,8	9,9	-5,9
<i>TIGK</i>	13,0 ± 0,2	10	15,4	12,4	-3,0
		25	15,8	12,4	-3,4

Los datos de energía de activación fueron calculados considerando los triplicados de k_{cat}

Los resultados de la **Tabla 4** muestran que la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis* es la que presenta una mayor barrera de activación para el proceso de fosforilación en comparación con la enzima psicrófila y mesófila. La similitud en los valores de energía de activación y en los parámetros cinéticos de activación calculados para estas dos enzimas (psicrófila y mesófila) sugieren que solo sería la ausencia de algunas interacciones estabilizantes las que estarían marcando la diferencia en la capacidad de la enzima psicrófila en realizar de manera más eficiente el proceso de catálisis a bajas temperaturas. Antes de estudiar en profundidad los determinantes estructurales involucrados en la capacidad de la enzima psicrófila de catalizar eficientemente el proceso de fosforilación a bajas temperaturas, nos centraremos en el efecto que tiene la temperatura sobre la especificidad de sustrato y cofactores en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*.

5.5. Estudio de la especificidad por nucleótidos y metales de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* a distintas temperaturas

La reacción de fosforilación de azúcares llevada a cabo por las quinasas dependientes de ADP, utiliza específicamente ADP como nucleótido dador del grupo fosforilo y Mg^{+2} como catión estabilizador (Figura 9).

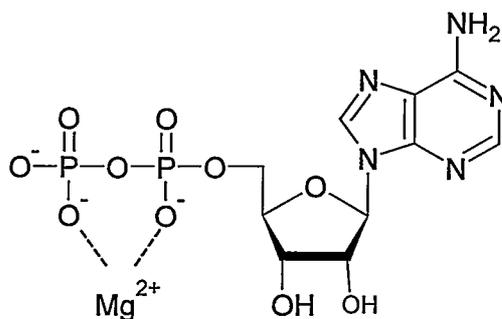


Figura 9. Complejo Mg-ADP

Para evaluar si la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* utiliza ADP y Mg^{+2} de forma específica y explorar la posibilidad de que pueda utilizar otros nucleótidos y metales dependiendo de la temperatura a la cual se realice el ensayo, se realizaron ensayos de actividad con distintos nucleótidos difosforilados y distintos cationes divalentes a distintas temperaturas. Específicamente, los ensayos fueron realizados a dos temperaturas (10°C y 25°C) para evaluar si la temperatura a la cual transcurre la reacción afectaba la selectividad de la enzima. Ambos ensayos son mostrados en la **Figura 10 (A-D)**

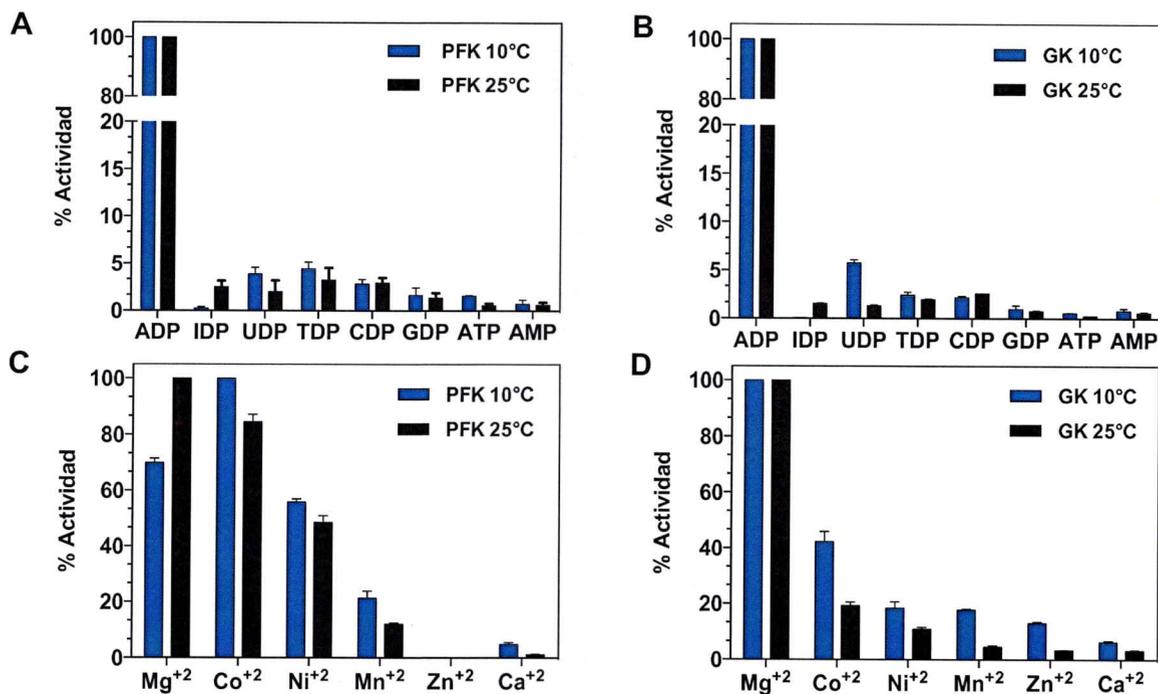
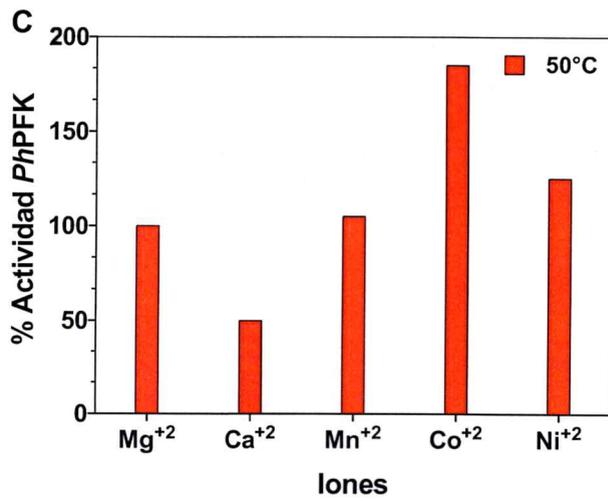
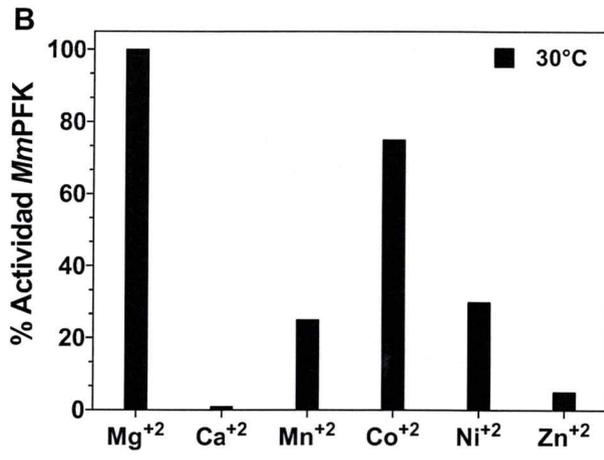
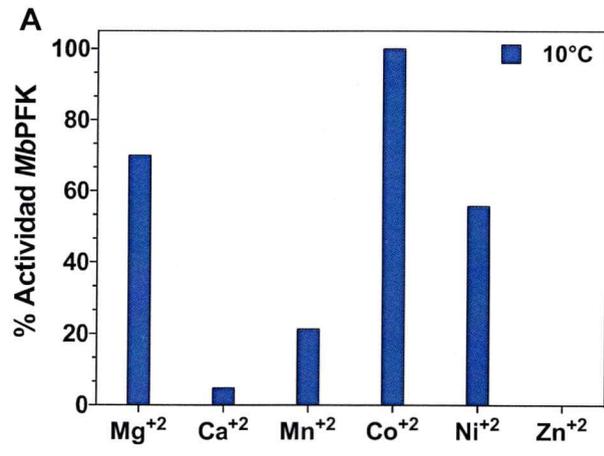


Figura 10. Dependencia de la actividad PFK y GK de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* con distintos nucleótidos difosforilados y metales. A) y B) Dependencia de la actividad PFK y GK de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* con distintos nucleótidos difosforilados y MgCl₂ 15 mM. C) y D) Dependencia de la actividad PFK y GK de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* con distintos cationes divalentes y ADP. Los ensayos fueron realizados a 10 °C y 25 °C. Para el ensayo con diferentes nucleótidos se utilizó una concentración de nucleótido 10 mM en cada caso. Para el ensayo con diferentes metales la concentración utilizada fue 2 mM con ADP 1 mM en el medio.

Los resultados obtenidos para la utilización de nucleótidos difosforilados mostraron que la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* es altamente selectiva por ADP, para las dos actividades evaluadas (PFK y GK). También se pudo observar que la selectividad por el nucleótido ADP no se ve afectada por la variación de temperatura. A su vez, el análisis de la utilización de cationes divalentes mostró que a 25°C, la enzima psicrófila utiliza preferencialmente Mg^{+2} , pudiendo también utilizar cationes como Co^{+2} , Ni^{+2} y Mn^{+2} de forma significativa. Al disminuir la temperatura del ensayo de 25°C a 10°C, la enzima psicrófila invierte su selectividad, utilizando preferentemente a esta temperatura el catión Co^{+2} . La utilización de metales divalentes en enzimas de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP ha sido estudiada con anterioridad en modelos mesófilos, termófilos e hipertermófilos (Castro-Fernández, 2014., Merino, 2012). La comparación de los datos obtenidos para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* con los reportados en literatura, muestra un patrón común en la utilización de metales divalentes (Figura 11).

Figura 11 (Página siguiente). Dependencia de la actividad PFK con distintos metales divalentes para distintas enzimas de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP. A) Enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*Mb*PFK). B) Enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (*Mm*PFK). C) Enzima hipertermófila ADP-PFK de *P. horikoshii* (*Ph*PFK). Los datos de B) y C) fueron adaptados de Castro-Fernández, 2014 y Merino, 2012 (Castro-Fernandez et al. 2014; Merino et al. 2012).



La tendencia observada en la utilización de metales divalentes podría ser explicada principalmente basándonos en dos factores: radio iónico y geometría de coordinación de los metales evaluados. En nuestro grupo de investigación hemos visto que para enzimas de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP, la geometría de coordinación del complejo metal-nucleótido es octaédrica y que la afinidad por éste sería independiente de la identidad del metal utilizado, en tanto que la naturaleza del metal solo afectaría el proceso catalítico. La utilización preferencial de cobalto a 10°C por la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* no se plantea inusual desde una perspectiva evolutiva, debido a que la utilización de este metal sería un vestigio en las enzimas con actividad transferasa, actividad que daría cuenta de la temprana vida en la tierra (Waldron et al. 2009).

5.6. Estudio de la especificidad por azúcares de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*

Si bien la caracterización inicial de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* indicó que ésta es bifuncional, pudiendo fosforilar tanto fructosa-6-fosfato como glucosa, también fue evaluada su capacidad de fosforilar otros azúcares. Para esto, se realizaron ensayos con una amplia batería de azúcares, los cuales incluían monosacáridos y disacáridos. El interés principal radicó en hacer esta evaluación a dos temperaturas (10°C y 25°C) para establecer si el aumento en la temperatura permitía aumentar la flexibilidad conformacional y por ende, la utilización de otros azúcares (**Figura 12**). Los resultados mostraron que un aumento en la temperatura del ensayo vuelve a la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* promiscua, pudiendo fosforilar tanto monosacáridos como algunos disacáridos. Reportes al respecto han mostrado que las enzimas psicrófilas se vuelven altamente promiscuas con un aumento en la temperatura del medio, siendo capaces de albergar sustratos distintos al que catalizan de forma natural, incluso si éstos presentan un tamaño mayor que su sustrato natural. Un ejemplo de esto es la enzima psicrófila α -amilasa de *A. haloplanctis*. Esta enzima muestra promiscuidad por sustrato al aumentar la temperatura del ensayo de 10°C a 25°C (D'Amico et al. 2006).

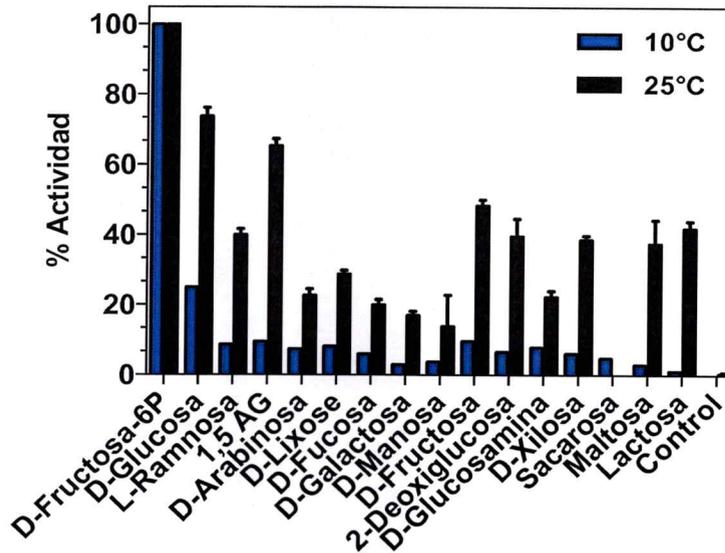


Figura 12. Uso de azúcares como sustrato de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. Los ensayos se realizaron a 10°C y 25°C. La concentración de azúcar utilizada en todos los casos fue 10 mM.

5.7. Caracterización biofísica de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*.

Estudio de relación estabilidad-función entre la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*

En la literatura ha sido descrito que las enzimas psicrófilas son menos termoestables que su contraparte mesófila y termófila, inactivándose a menores temperaturas (Siddiqui, 2006; cipolla), en un proceso no asociado con un proceso de desplegamiento térmico global, sino que más bien un proceso de desestructuración local (Siddiqui, 2005). Este fenómeno de inactivación es comúnmente aceptado para este tipo de enzimas y es diferente a lo observado en enzimas mesófilas y termófilas, en las cuales se ha visto que la inactivación es producida por un proceso de desplegamiento térmico global (Feller, 2010). Para evaluar la estabilidad térmica de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, se realizó una curva de desplegamiento para determinar la temperatura de desplegamiento térmico (T_m). Como punto de comparación se utilizó la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Junto con esto, se realizaron curvas de actividad enzimática para determinar si entre la enzima psicrófila y la enzima mesófila existían diferencias en el estado de plegamiento al producirse la inactivación por temperatura. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 13**.

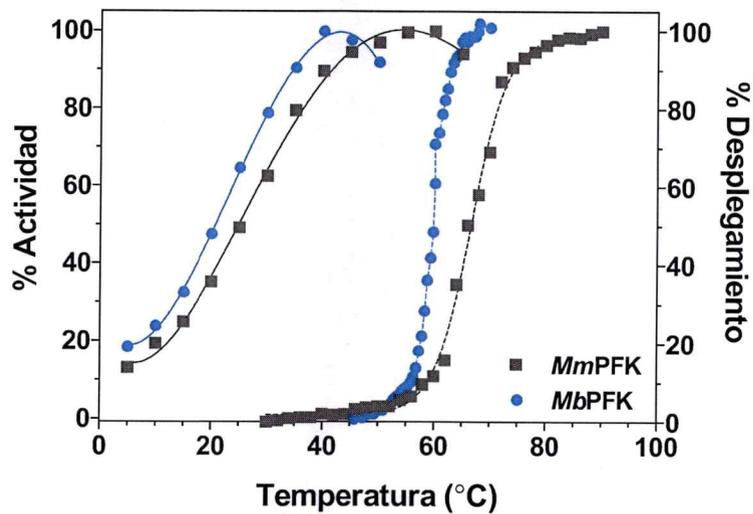


Figura 13. Actividad y desdoblamiento térmico de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Actividad, línea sólida; desdoblamiento, línea punteada.

Los resultados mostraron que los perfiles de actividad versus estabilidad térmica para ambas enzimas fueron distintos. En el caso de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, el proceso de desplegamiento térmico global ocurre a una temperatura mas alta a la cual presenta la mayor actividad y la posterior inactivación, pudiendo esto estar dando cuenta de un fenómeno de desestructuración local (Siddiqui, 2005). En el caso de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* la inactivación de la enzima es producto de un fenómeno de desplegamiento global. Las T_m obtenidas fueron 59°C y 64°C para la enzima psicrófila y mesófila respectivamente. Es interesante hacer notar que esta diferencia de 5° C en las T_m obtenidas, no es la misma que se presenta para las actividades máximas registradas, obteniéndose a 40°C la mayor actividad para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y a 60°C la de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Estos resultados nos permiten indicar que el sitio activo de la enzima psicrófila es más termolábil que el de la enzima mesófila, pero que en términos de termoestabilidad ambas enzimas presentan un comportamiento similar. Estas diferencias nos permite hipotetizar que el sitio activo de la enzima psicrófila podría estar desestructurado a la temperatura de inactivación (> 40° C) o que regiones conectadas a éste, con una flexibilidad mayor, se desestructuran inactivando la enzima. Para comprobar esta hipótesis se evaluó la permeabilidad de ambas enzimas a dos temperaturas diferentes. Posteriormente, se realizaron experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio a tres temperaturas diferentes. Ambas metodologías se utilizaron con el fin de establecer si el comportamiento estructural frente a la temperatura era similar entre estas dos enzimas homólogas.

5.8. Estudio de permeabilidad estructural en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* por apagamiento dinámico de la fluorescencia intrínseca y dispersión de rayos X de ángulo pequeño

Para evaluar la permeabilidad de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* se realizaron estudios de apagamiento de fluorescencia intrínseca con acrilamida. Debido a que la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* no presenta triptófanos que puedan ser utilizados como sondas para sensar la permeabilidad estructural, se realizó una búsqueda dentro de la familia de enzimas dependientes de ADP de un homólogo mesófilo que presentara el mismo número de triptófanos y en la misma localización que los presentes en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. El homólogo elegido fue la enzima mesófila ADP-PFK de *M. mazei*. Los experimentos de apagamiento dinámico de fluorescencia han sido utilizados para estudios comparativos de flexibilidad entre enzimas extremófilas homólogas (D'amico, 2002; Aghajari, 2003; Cipolla, 2012). Una mayor permeabilidad de una estructura proteica da cuenta de forma indirecta de un mayor grado de flexibilidad de ésta (Feller, 2010). Para establecer si la estructura de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* era más permeable que su homólogo termoestable y si esta permeabilidad aumentaba con la temperatura, experimentos de apagamiento dinámico de fluorescencia fueron realizados. Las titulaciones con el apagador dinámico acrilamida de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* se muestran en la **Figura 14** y las constantes de Stern-Volmer calculadas de estos experimentos se muestran en la **Tabla 5**.

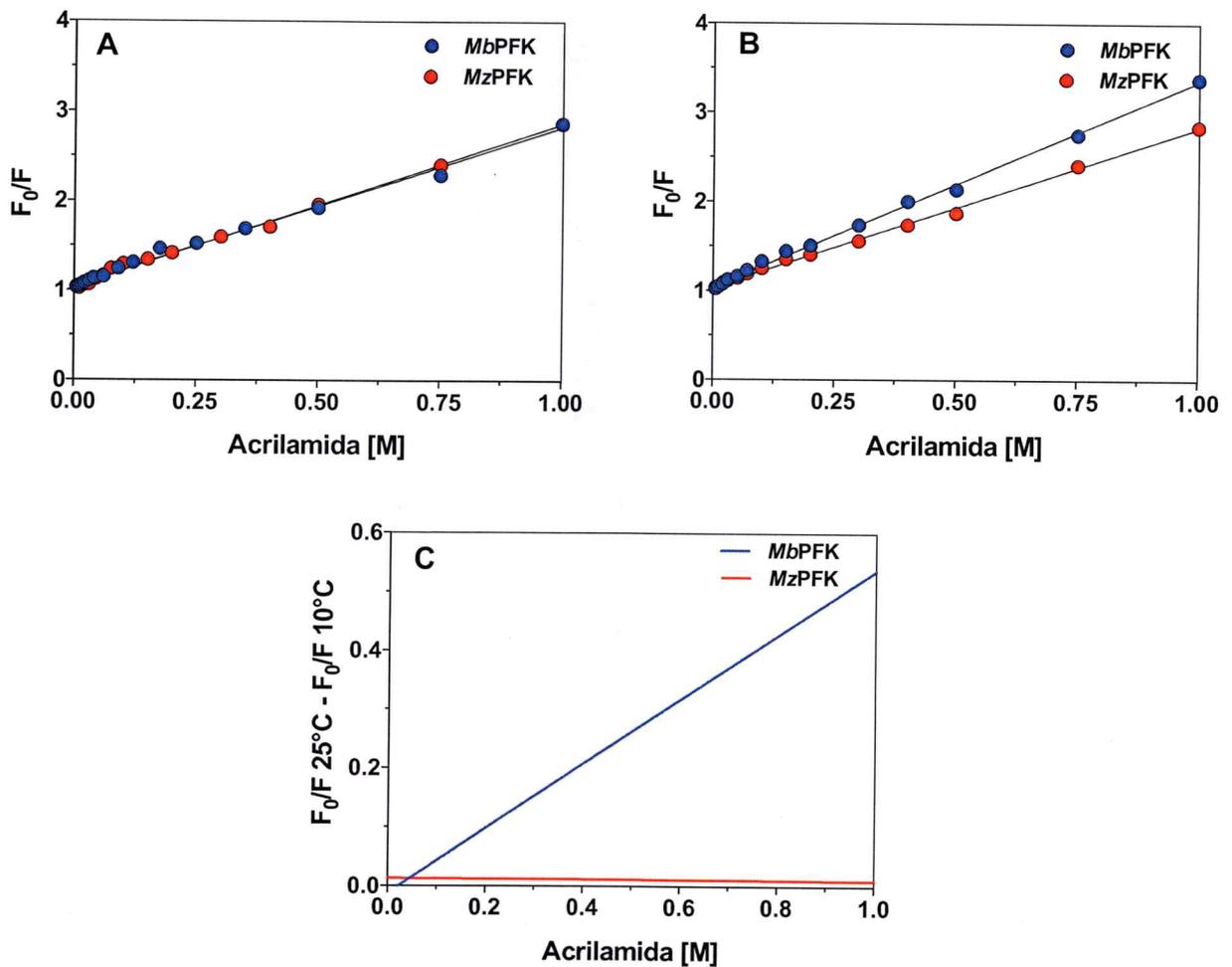


Figura 14. Apagamiento dinámico de fluorescencia intrínseca para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. mazei*. Los experimentos fueron realizados a 10°C (A) y 25°C (B). C) Variación del apagamiento dinámico de fluorescencia intrínseca entre 10° C y 25° C. La longitud de onda de excitación utilizada fue 295 nm y la longitud de onda de emisión fue 334 nm. La constante de Stern-Volmer es la pendiente de la recta F_0/F vs concentración de acrilamida.

Tabla 5. Constantes de Stern-Volmer para los apagamientos dinámicos de fluorescencia intrínseca de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*Mb*PFK) y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. mazei* (*Mz*PFK).

Enzima	T (°C)	K _{sv} (M ⁻¹)
<i>Mb</i> PFK	10	1,77± 0,04
	25	2,31± 0,03
<i>Mmaz</i> PFK	10	1,81±0,03
	25	1,78± 0,03

Los experimentos fueron realizados en triplicado

Los resultados muestran que un aumento en la temperatura provoca una perturbación estructural de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, lo que se ve reflejado en una mayor permeabilidad estructural a 25°C. La enzima mesófila ADP-PFK de *M. mazei* no presenta cambios significativos con el aumento de temperatura, lo que concuerda con su mayor rigidez estructural. Para evaluar si las diferencias en permeabilidad estructural son sinónimo de una expansión estructural de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, producto de un cambio en sus propiedades hidrodinámicas debido al aumento de temperatura, se realizaron experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño. Esta técnica permite determinar de forma gruesa la expansión que puede presentar una estructura debido al cambio en sus propiedades hidrodinámicas. Esta expansión estructural, fue medida en términos de distancia (Radio de giro, R_g). Una mayor permeabilidad estructural debido a un aumento de temperatura podría ser producto de un aumento en tamaño (R_g) debido a la mayor flexibilidad estructural descrita para este tipo de enzimas. Como punto de comparación, las enzimas mesófilas ADP-PFK de *M. mazei* y *M. maripaludis* fueron utilizadas en el estudio. La **Tabla 6** muestra los R_g obtenidos.

Tabla 6. Radios de giro para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*MbPFK*), la enzima mesófila ADP-PFK de *M. mazei* (*MzPFK*) y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*.

Enzima	T (°C)	*R _g (nm)
<i>MbPFK</i>	25	2.77 ± 0.05
<i>MzPFK</i>	25	2.62 ± 0.05
<i>MmPFK</i>	25	2.66 ± 0.06

*Los R_g se calcularon a partir de las curvas de probabilidad de distancias interatómicas utilizando la aproximación de Porod.

El radio de giro calculado para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* es mayor que el calculado para las dos enzimas mesófilas (ADP-PFK de *M. mazei* y ADP-PFK de *M. maripaludis*). Esto datos podrían estar dando cuenta de que la estructura de la enzima psicrófila a 25°C, además de ser más permeable, se encontraría un poco más expandida que las estructuras de sus homólogos mesófilos. Para confirmar si esta mayor permeabilidad y expansión estructural es producto de una mayor flexibilidad estructural, y ver si la variación de los parámetros cinéticos con la temperatura es producto de un fenómeno de flexibilidad local o global de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, se realizaron experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas.

5.9. Estudio de la flexibilidad estructural de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* mediante intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas

Como se mencionó anteriormente, la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* presentan un comportamiento térmico (estructural) diferente (**Figura 13**). Junto con esto, los datos cinéticos indican que existen diferencias en el comportamiento de los sitio activo de las enzimas durante la catálisis a diferentes temperaturas. La enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* se ve altamente afectada por un aumento en la temperatura, lo que se ve reflejado en un aumento exponencial de sus valores de K_m con el aumento de la temperatura (**Figura 13** y **Figura 14**). Este fenómeno estaría asociado a una mayor flexibilidad del sitio activo o de regiones cercanas a éste. Para determinar si existen diferencias de flexibilidad en regiones del sitio activo o asociadas a éste, se realizaron estudios de intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masa. Los experimentos se realizaron para ambas enzimas (psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*) a 10°C, 25°C y 40°C a tiempos de intercambio de 0, 0.5, 1, 2 5, 10 y 30 minutos (ver Materiales y Métodos). Con esta estrategia se quiso explorar el comportamiento estructural de estas enzimas en un amplio intervalo de temperaturas. En la **Figura 15** se muestra el mapa de cobertura logrado para ambas enzimas en código de colores, donde las zonas de menor intercambio se muestran de color azul y las zonas de máximo intercambio se muestran de color rojo.

Figura 15. (Página anterior). Mapa de cobertura de intercambio relativo hidrógeno-deuterio para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* Panel superior, ADP-PFK de *M. burtonii*, panel inferior ADP-PFK de *M. maripaludis* Los intercambios mostrados corresponden al experimento realizado a 25°C con un tiempo máximo de intercambio de 30 min.

Para ambas enzimas se obtuvo una cobertura suficiente para los análisis posteriores, alcanzándose un 93,7% para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y un 86,6% para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Si bien estas enzimas son homólogos estructurales, su identidad de secuencia no supera el 35%, por lo que después de la proteólisis con pepsina, no se obtuvo exactamente el mismo patrón de péptidos para ambas enzimas. Por ende, para realizar el análisis se seleccionaron péptidos homólogos en ambas estructuras, para así poder comparar las mismas regiones de intercambio en ambas estructura.

Cabe destacar que todos los péptidos seleccionados pudieron ser identificados en las distintas temperaturas en que se desarrollaron los experimentos. Los péptidos seleccionados para ambas enzimas son mostrados en la **Figura 15** y los intercambios relativos H-D obtenidos para ellos, a las 3 temperaturas en que se evaluaron las enzimas, son mostrados en la **Figura 16** y la **Figura 17**.

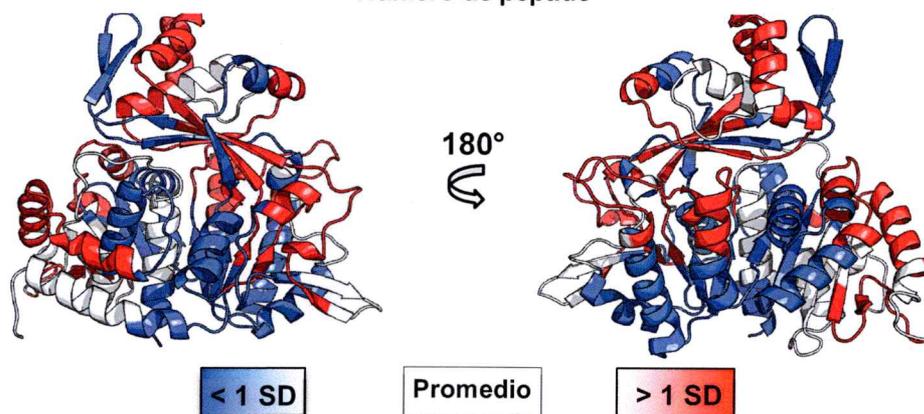
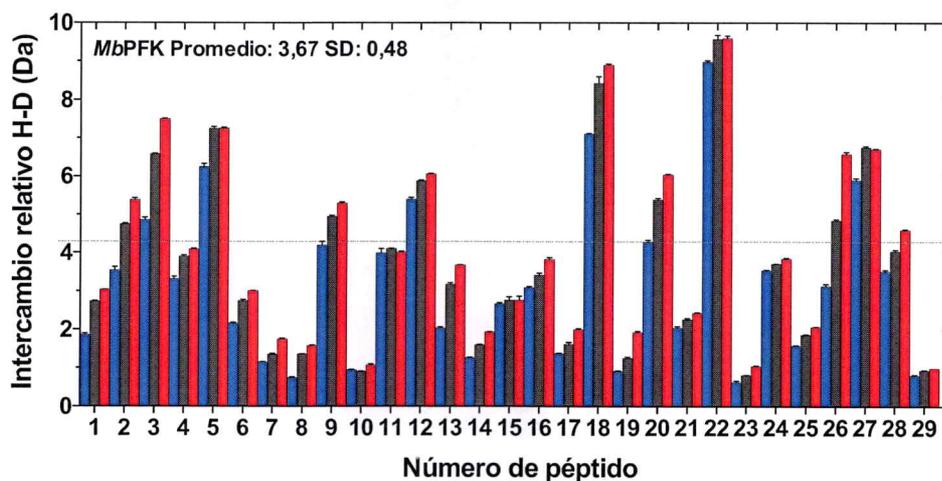


Figura 16. Intercambio relativo H-D para distintos péptidos de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. Los péptidos se identificaron por espectroscopía de masas y el experimento se realizó a 3 temperaturas diferentes (10°C, barras azules; 25°C, barras negras; 40°C, barras rojas). Los resultados son mapeados sobre los modelos por homología de ambas enzimas acorde al código de color indicado, azul para péptidos que presentan un valor menor a una desviación estándar del promedio, rojo para péptidos que presentan un valor mayor a una desviación estándar del promedio y blanco para péptidos que presentan un valor dentro del promedio. Los datos muestran los resultados obtenidos utilizando el máximo tiempo de intercambio.

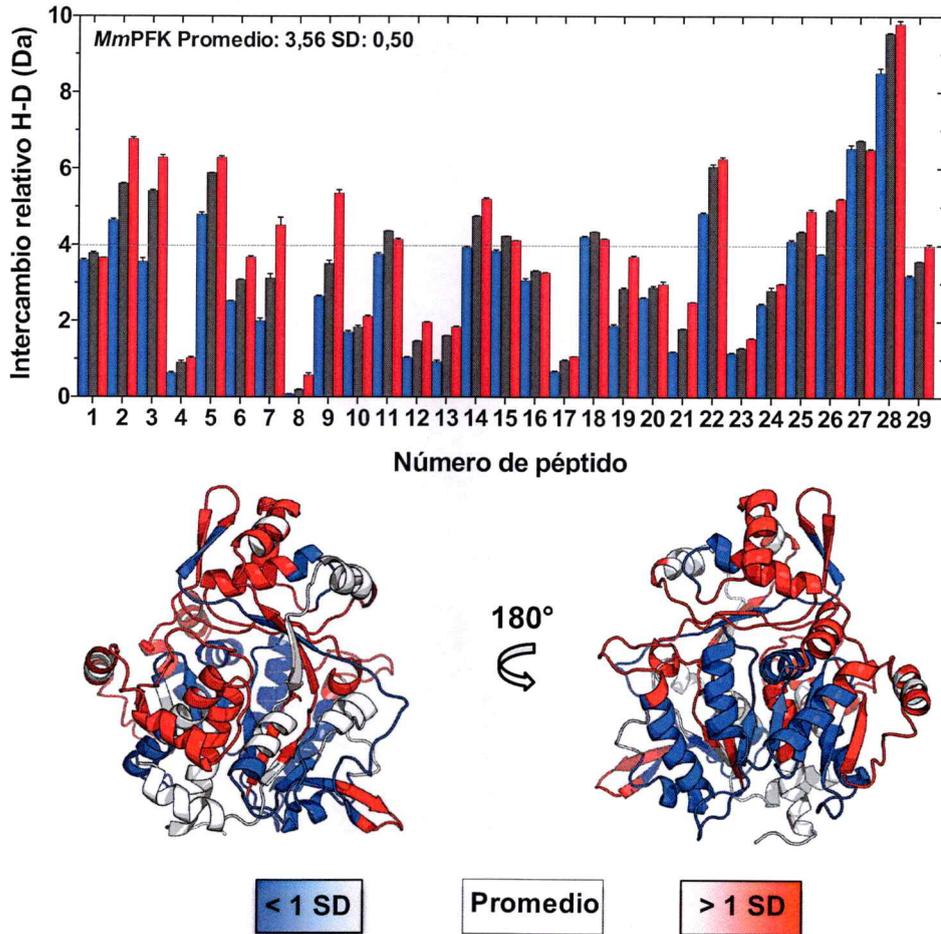


Figura 17. Intercambio relativo H-D para distintos péptidos de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Los péptidos se identificaron por espectroscopía de masas y el experimento se realizó a 3 temperaturas diferentes (10°C, barras azules; 25°C, barras negras; 40°C, barras rojas). Los resultados son mapeados sobre los modelos por homología de ambas enzimas acorde al código de color indicado, azul para péptidos que presentan un valor menor a una desviación estándar del promedio, rojo para péptidos que presentan un valor mayor a una desviación estándar del promedio y blanco para péptidos que presentan un valor dentro del promedio. Los datos muestran los resultados obtenidos utilizando el máximo tiempo de intercambio.

La **Figura 16** muestra que la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* presenta zonas de alta tasa de intercambio a lo largo de toda su estructura (Péptidos 3, 5, 9, 12, 18, 20, 22, 26 y 27), mientras que la **Figura 17** muestra que la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* presenta solo una zona de alta tasa de intercambio ubicada en el extremo C-terminal de su estructura (Péptidos 22, 27 y 28). El análisis de los intercambios relativos H-D de los péptidos de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* muestra que si bien los péptidos donde se encuentran los motivos conservados involucrados en el proceso de catálisis, (NXNXD péptido 2, HXE péptido 19, (D)NXXE péptido 21) no presentan un alto grado de intercambio, los péptidos que flanquean a estos motivos sí presentan una alta movilidad y por ende una alta tasa de intercambio (Péptido 18, 20 y 22). Esto explicaría el por qué un aumento en la temperatura en los ensayos cinéticos provoca un aumento exponencial de los valores de K_m en la enzima psicrófila. Para corroborar si la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, además de presentar una mayor flexibilidad en los péptidos asociados al sitio activo que los presentes en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, también presenta una mayor flexibilidad estructural global, se procedió a graficar los valores promedio de intercambio de todos los péptidos muestreados para ambas enzimas (**Figura 18a**); los péptidos que presentaron un intercambio relativo de 1 desviación estándar por sobre el promedio de intercambio de la enzima (**Figura 18b**) y los péptidos que presentaron un intercambio relativo de 1 desviación estándar bajo el promedio de intercambio de la enzima (**Figura 18c**). La ubicación de los péptidos con mayor tasa de intercambio se muestra en la **Figura 19**.

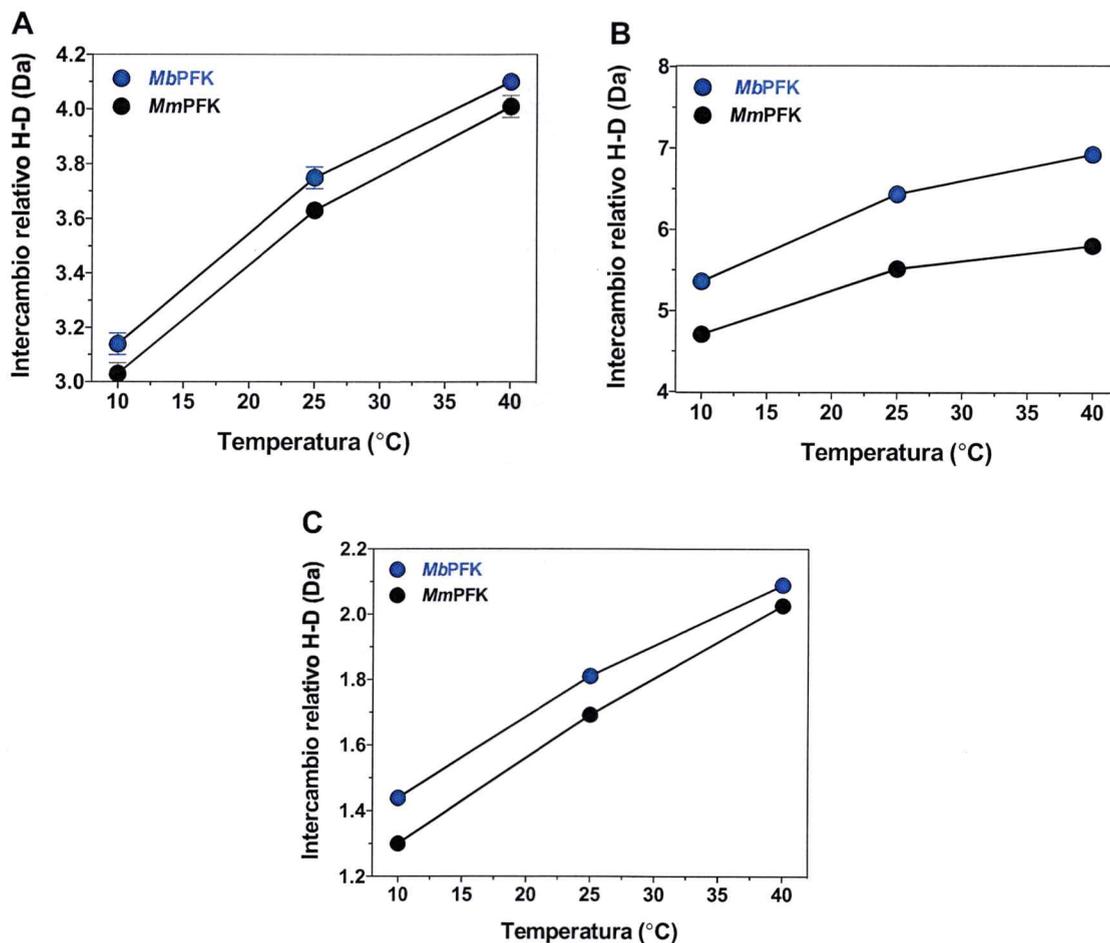


Figura 18. Intercambio relativo promedio H-D para la enzima psicrofílica ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* a 3 temperaturas diferentes (10°C, 25°C y 40°C). A) Intercambio relativo H-D promedio de todos los péptidos mostrados en la Figura 15. B) Intercambio relativo H-D promedio de todos los péptidos que presentan un valor mayor a una desviación estándar del promedio. C) Intercambio relativo H-D promedio de todos los péptidos que presentan un valor menor a una desviación estándar del promedio.

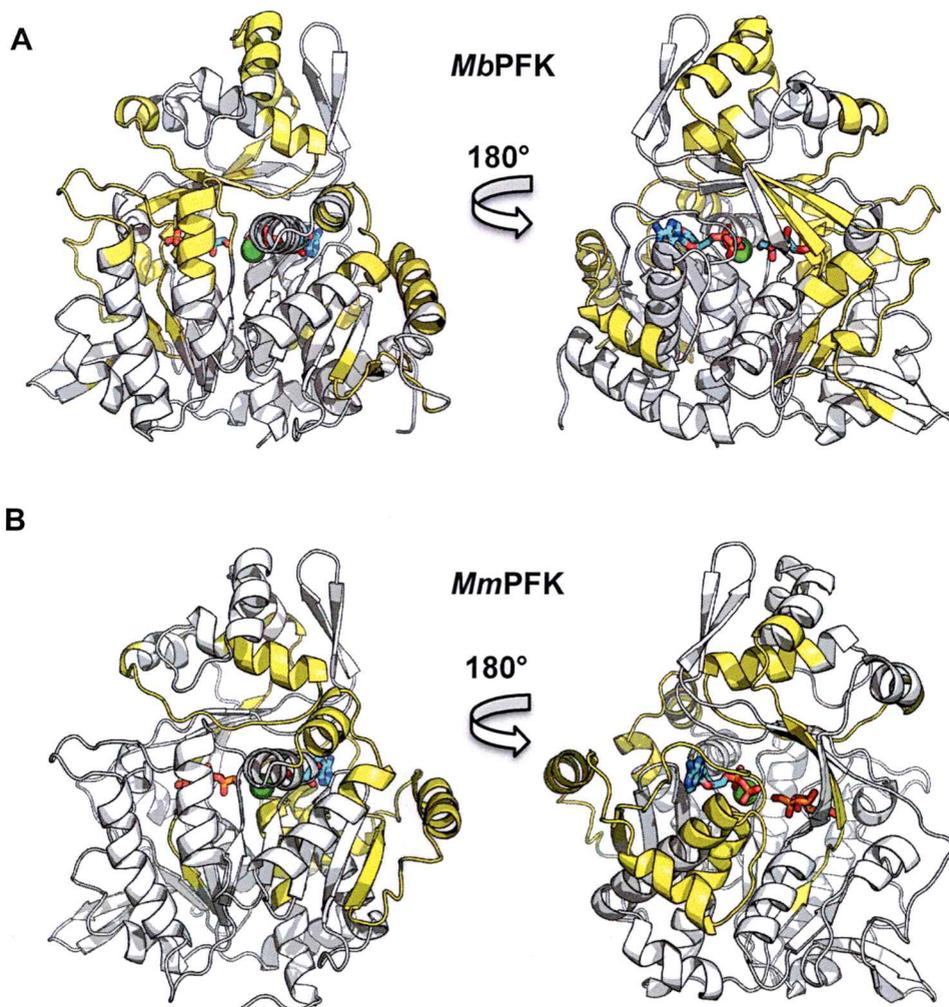


Figura 19. Ubicación de los péptidos con mayor tasa de intercambio en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. A) Enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. B) Enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Los péptidos de mayor intercambio se muestran en amarillo en ambas estructuras.

La literatura indica que una de las principales diferencias estructurales entre enzimas psicrófilas y mesófilas es la presencia de puentes salinos estabilizantes (Saunders, 2003; Siddiqui, 2006).

Al realizar una inspección visual de los modelos por homología de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y comparar las zonas de mayor intercambio relativo H-D en ambas enzimas (**Figura 19**), se pudo apreciar que algunas de las regiones alrededor del sitio activo que presentan una mayor tasa de intercambio en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, no presentan los dos pares iónicos que sí se encuentran presentes en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (**Figura 22**). Estos dos pares iónicos se encuentran conservados en las enzimas ADP-PFK mesófilas, termófilas e hipertermófila de los órdenes *Methanococcales* y *Thermococcales*, pero no en el orden *Methanosarcinales*, orden al cual pertenece la enzima psicrófila en estudio.

El primer par iónico presente en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* corresponde al par LYS322-ASP325. En la posición equivalente, la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* presenta el par ALA336-SER339. Si comparamos los péptidos obtenidos en los experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio que presentan estos residuos (para ambas enzimas el péptido 22), podemos apreciar que la ausencia de este par iónico en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* permitiría una mayor tasa de intercambio relativo H-D de este segmento (intercambio relativo: 9,6 Da), en contraste con la estabilización que presenta esa misma zona en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (intercambio relativo: 9,6 Da). El segundo par iónico presente en la

enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* corresponde al par GLU99-LYS436. Esta interacción iónica se encontraría estabilizando dos péptidos no continuos en la secuencia (péptido 6 y péptido 28). La ausencia de esta interacción en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (ASN110-VAL463) se ve reflejada en que el péptido 5. Este péptido es adyacente a la región donde se encuentra esta interacción en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y presenta una alta tasa de intercambio. El primer par iónico descrito es ejemplo de una estabilización intra-dominio (péptido 22) y el segundo par iónico es ejemplo de una estabilización inter-dominio (péptido 6 y péptido 28). Para evaluar si estas modificaciones estructurales aparecieron o desaparecieron durante la evolución se procedió a reconstruir el último ancestro en común entre la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*.

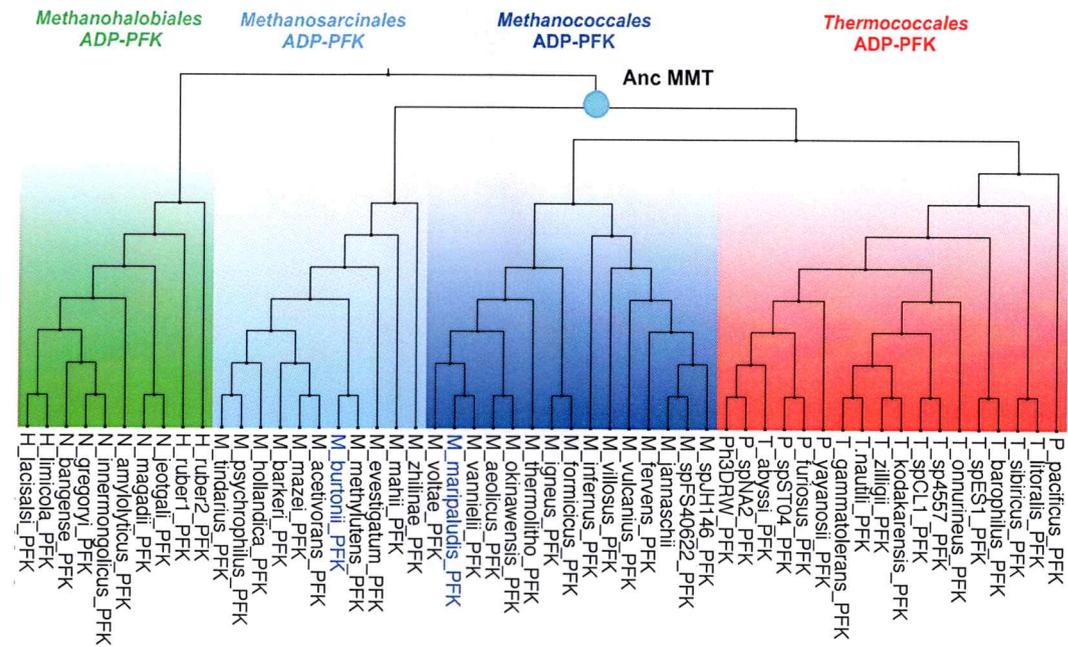
5.10. Estudio evolutivo y reconstrucción secuencias ancestrales. Reconstrucción del último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales* para la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP

Con el fin de evaluar si la ausencia de los pares iónicos es un rasgo conservado o una novedad evolutiva en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, se reconstruyó el último ancestro en común entre esta enzima y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Para esto se utilizó el alineamiento de secuencias aminoacídicas con el cual se reconstruyó el árbol filogenético de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP. La reconstrucción de proteínas ancestrales se realizó utilizando el software MrBayes (ver **Materiales y Métodos**).

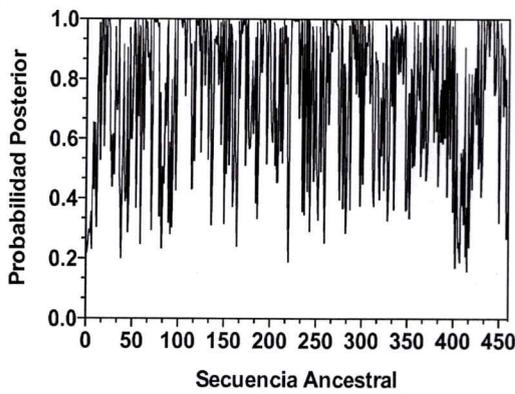
A partir del alineamiento y considerando la topología del árbol filogenético obtenido para la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP (**Figura 5**), todas las secuencias que se encontraban conectadas por medio del nodo interno correspondiente al último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales*, fueron seleccionadas para la hacer la inferencia bayesiana. En la **Figura 20** se muestra el soporte estadístico de la secuencia ancestral inferida. En la **Figura 20.b** se indican las probabilidades posteriores de los residuo asignado a cada una de las posiciones de la secuencia primaria del ultimo ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales* y en la **Figura 20.c**, el histograma con la distribución de éstas probabilidades.

A

Fosfofructoquinasas dependientes de ADP de Arqueas



B



C

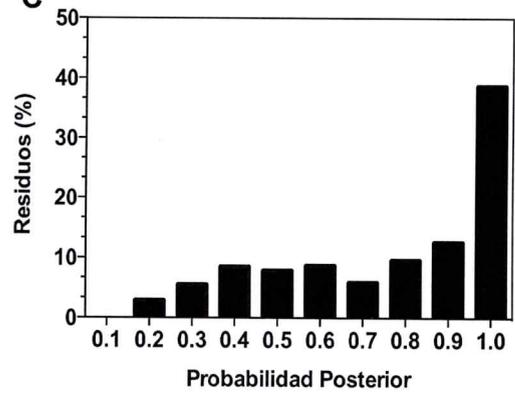


Figura 20. Análisis de la inferencia del ancestro MMT. A) Nodo del último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales* (Anc MMT). B) Probabilidad posterior del residuo respecto a la posición en la secuencia ancestral. C) Histograma de frecuencias de las probabilidades posteriores de la secuencia inferida.

La reconstrucción del último ancestro en común entre los órdenes *Methanosarcinales* y *Methanococcales* (Anc MMT), mostró un soporte estadístico robusto respecto al residuo más probable, obteniéndose un promedio de probabilidades posteriores de $0,76 \pm 0,25$ con una media de 0,86. Al alinear la secuencia del ancestro MMT con el alineamiento utilizado para la reconstrucción del árbol filogenético de la familia de quinasas dependientes de ADP (fosfofructoquinasas), el análisis mostró que el último ancestro en común entre los órdenes *Methanococcales* y *Methanosarcinales* no presenta los 2 pares iónicos presentes en el modelo mesófilo y ausentes en el modelo psicrófilo determinados. La ausencia de estas interacciones estabilizantes en el ancestro MMT y en las enzimas del orden *Methanosarcinales* junto con su presencia en las enzimas mesófilas y (hiper)termófilas del orden *Methanococcales*, permiten sugerir que la presencia de estas modificaciones podría ser una novedad evolutiva. Esto redundaría en un aumento de la estabilidad estructural de estas enzimas, en tanto que su ausencia en el orden *Methanosarcinales* podría ser la clave para explicar la alta flexibilidad local del sitio activo de la enzima psicrófila observada mediante experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio. Para establecer si la ausencia de estas interacciones en el ancestro provoca el mismo efecto que en la enzima psicrófila, se procedió a realizar la caracterización cinética de esta enzima ancestral.

Antes de proceder con la caracterización cinética del ancestro MMT, la secuencia inferida fue analizada en primera instancia en términos de establecer que todos los residuos catalíticamente relevantes, estos son, los residuos de los motivos de unión al azúcar (NXNXD), de unión del complejo metal-nucleótido ((D)NXXE) y el motivo que

presenta la base catalítica (GXGD), además de otros residuos considerados claves para la actividad, estuvieran presentes y presentaran una alta probabilidad posterior. La **Tabla 7** muestra la comparación entre los residuos de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, la mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y del último ancestro en común entre los ordenes *Methanosarcinales* y *Methanococcales*.

Tabla 7. Probabilidad posterior (PP) para los residuos del sitio activo del último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales* (Anc MMT). En azul, rojo y verde se muestran los residuos correspondientes a los motivos NXNXD, GXGD y (D) NXXE respectivamente.

<i>Mb</i> PFK	<i>Mm</i> PFK	Anc MMT	PP
N32	N20	N18	1,00
N34	N22	N20	1,00
D36	D24	D22	1,00
G467	G440	G437	1,00
G469	G442	G439	1,00
D470	D443	G440	1,00
N180	N169	N167	1,00
D309	D297	D294	1,00
E312	E300	E297	1,00
R205	R194	R192	1,00
R211	R200	R198	1,00

5.11. Caracterización cinética del último ancestro en común entre los órdenes *Methanosarcinales* y *Methanococcales* (Anc MMT). Utilización de glucosa y fructosa-6-fosfato como sustratos

Una vez que el último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales* fue sintetizado y purificado a homogeneidad, se procedió a realizar su caracterización cinética. Los objetivos fueron establecer si al igual que las enzimas actuales, el ancestro presentaba bifuncionalidad y una preferencia por la utilización de fructosa-6-fosfato. Además se quería evaluar si la ausencia de los pares iónicos en la estructura del ancestro MMT, provocaba que los parámetros cinéticos de esta enzima tendieran a ser más similares a los determinados para la enzima psicrófila. En la **Tabla 8** se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 8. Parámetros cinéticos para el último ancestro en común entre los órdenes *Methanosarcinales* y *Methanococcales* (Anc MMT).

Actividad	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) F6P	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) Glc
PFK	$0,54 \pm 0,04$	$7,9 \pm 1,3$	$1,5 \times 10^2$	---
GK	$9,8 \pm 1,1$	$4,5 \pm 1,4$	---	$0,5 \times 10^1$

La caracterización cinética del ancestro MMT permitió establecer que este ancestro era una enzima bifuncional, pudiendo catalizar tanto la fosforilación de fructosa-6-fosfato como de glucosa. Este resultado muestra que la bifuncionalidad encontrada en las enzimas con anotación PFK del orden *Methanococcales* y del orden *Methanosarcinales*, es un rasgo que se ha mantenido a través de la evolución y que la novedad evolutiva dentro de las fosfofructoquinasas dependientes de ADP es la aparición de quinasas específicas por F6P. Para el ancestro MMT el valor de la constante K_m para fructosa-6P es 542 μM y para glucosa es de 9,8 mM. Al comparar estos valores con los reportados para otras fosfofructoquinasas caracterizadas de la familia, estos muestran que durante la evolución, la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* han sido capaces de optimizar su sitio activo para la unión de fructosa-6P y no para glucosa, pues el valor de la constante K_m para este último sustrato no muestra una variación significativa entre el ancestro MMT y las enzimas actuales caracterizadas en este estudio.

En cuanto a los pares iónicos, la secuencia inferida para el último ancestro en común entre los órdenes *Methanococcales* y *Methanosarcinales* no mostró la presencia de los aminoácidos involucrados en las interacciones iónicas encontradas en el modelo mesófilo actual. Para evaluar si los pares iónicos realmente son una novedad evolutiva en el orden *Methanococcales*, se utilizaron ancestros de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP previamente reconstruidos en el laboratorio para mapear estas interacciones iónicas a lo largo de la evolución de la familia. Los ancestros utilizados se indican en la **Figura 21**.

Fosfofructoquinasas dependientes de ADP de Arqueas

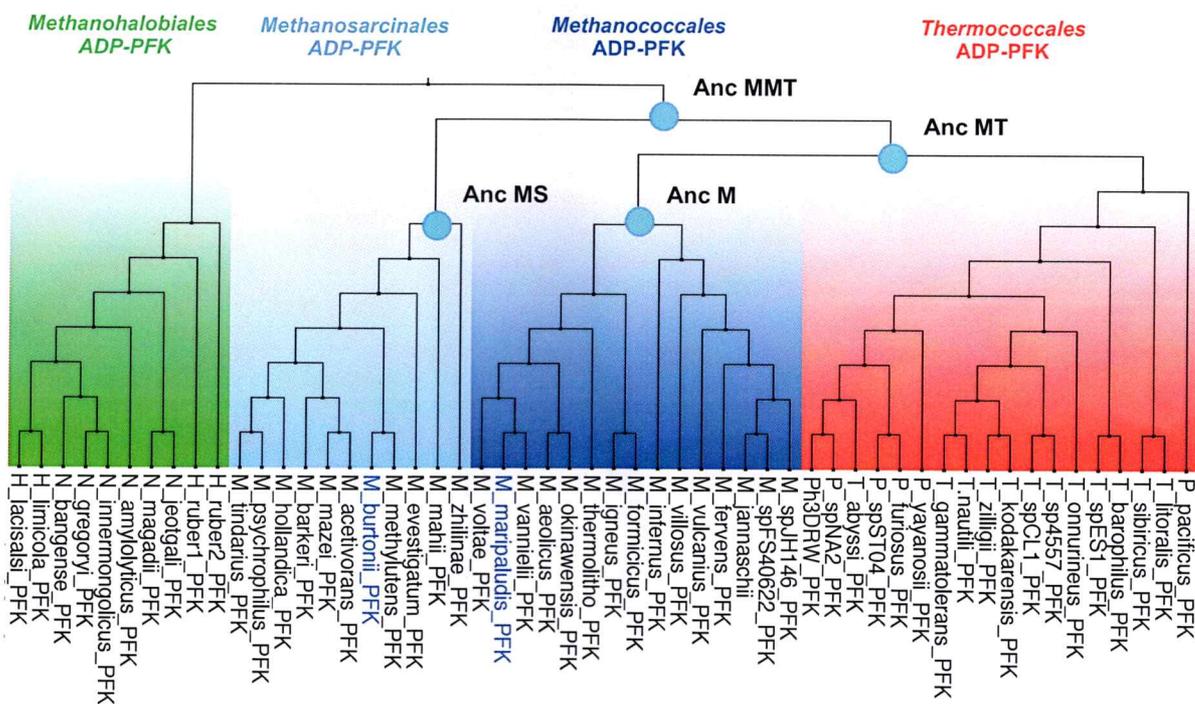


Figura 21. Ancestros utilizados para realizar el estudio evolutivo de los pares iónicos en la familia de quinazas de azúcares dependientes de ADP. Anc MMT: Nodo del último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales*, Anc MT: Nodo del último ancestro en común entre el orden *Methanococcales* y *Thermococcales*, Anc M: Nodo del último ancestro en común del orden *Methanococcales*, Anc MS: Nodo del último ancestro en común del orden *Methanosarcinales*. En azul se indica la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*

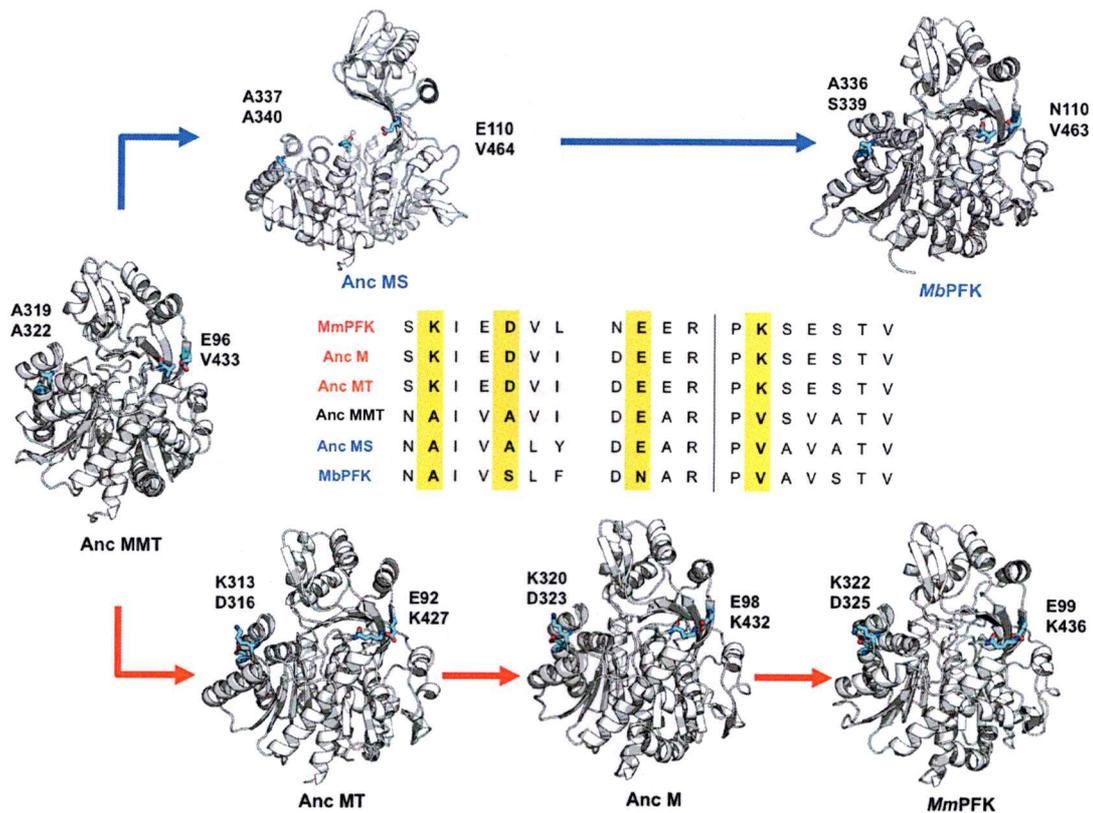


Figura 22. Mapeo de los pares iónicos implicados en la estabilidad térmica de las enzimas mesófilas y termófilas de la familia de quinzas dependientes de ADP. Anc MMT: Nodo del último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales*, **Anc MT:** Nodo del último ancestro en común entre el orden *Methanococcales* y *Thermococcales*, **Anc M:** Nodo del último ancestro en común del orden *Methanococcales*, **Anc MS:** Nodo del último ancestro en común del orden *Methanosarcinales*, **MmPFK:** enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, **MbPFK:** enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*.

La **Figura 22** muestra que los pares iónicos encontrados en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* son una novedad evolutiva, apareciendo consecutivamente durante la evolución en los ancestros MT, M y en la enzima mesófila actual ADP-PFK de *M. maripaludis*, a partir de un nodo interno (ancestro MMT) que no poseía tales interacciones. Por el contrario, el único ancestro entre la enzima psicrófila actual de *M. burtonii* y el ancestro MMT, representado por el ancestro en común del orden *Methanosarcinales* (ancestro MS), no presenta estas interacciones, lo que sugiere que la ausencia de estas interacciones sería crucial para el mantenimiento de la dinámica del sitio activo en las enzimas de este orden. La ausencia de estas interacciones iónicas en las estructuras de las quinasas de azúcares dependientes de ADP con actividad PFK del orden *Methanosarcinales* está de acuerdo con el hecho de que en este orden casi no se encuentran organismos adaptados a vivir a temperaturas elevadas. La mayoría de los organismos del orden *Methanosarcinales* son mesófilos. La única quinasa de azúcares dependiente de ADP con actividad PFK procedente de un organismo termófilo del orden *Methanosarcinales* encontrada en el árbol filogenético reconstruido de la familia, es la enzima termófila ADP-PFK de *M. evestigatum*. Si bien este organismo puede ser considerado un termófilo moderado, hay que tener claridad en que este organismo también se clasifica como un organismo halófilo. En la enzima termófila ADP-PFK de *M. evestigatum*, la ausencia de las interacciones iónicas puede ser entendida en razón de que los sitios activos de este tipo de enzimas necesitan presentar una alta flexibilidad estructural al igual que el de las enzimas psicrófilas. Por lo tanto, para saber si estas interacciones iónicas capaces de rigidizar el sitio activo son capaces también de aportar

en la estabilidad térmica global de la enzima, se procedió a insertar estas interacciones iónicas, en la estructura de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*.

5.12. Efecto de la inserción de pares iónicos en la estabilidad térmica de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. Caracterización biofísica de la mutante cuádruple

Con el fin de ver si la inserción de dos pares iónicos afectaba la estabilidad térmica de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, se generó la mutante cuádruple (MutMbPFK) (ver Materiales y Métodos). En las posiciones 336 y 339 de la secuencia, la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* presenta un residuo de alanina (ALA) y uno de serina (SER), respectivamente. Estos dos residuos aminoacídicos fueron cambiados por una lisina (LYS) y un ácido aspártico (ASP), debido a que son estos residuos los que forman uno de los pares iónicos presentes en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Los otros dos residuos modificados en la enzima psicrófila fueron la asparragina (ASN) ubicada en la posición 110 y una valina ubicada en la posición 463. Estos dos residuos aminoacídicos fueron cambiados por un ácido glutámico y una lisina respectivamente. La evaluación de la estabilidad térmica de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* se realizó mediante curvas de desplegamiento por temperatura, para determinar si la temperatura de desplegamiento térmico (T_m) aumentaba con la incorporación de los dos pares iónicos. Como punto de comparación se utilizó la enzima silvestre psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 23**.

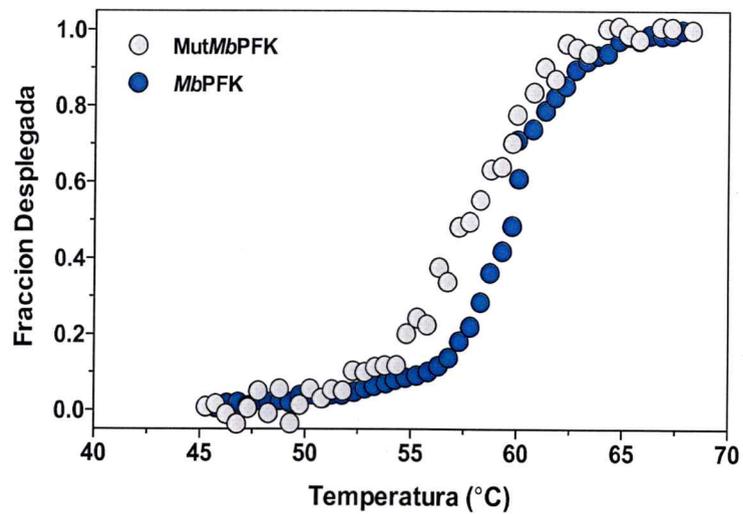


Figura 23. Curvas de desplegamiento térmico de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la mutante cuádruple de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. burtonii*. Las curvas de desplegamiento se construyeron usando los valores de dicroísmo circular medidos a 222nm.

La mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* no vio afectada su temperatura media de desplegamiento, registrando una T_m de 58°C, esto es, un grado menos que el de la enzima silvestre. Si bien la estabilidad global de la enzima no se vio afectada por la inserción de los dos pares iónicos, la cooperatividad del proceso sí. De forma interesante, la cooperatividad del proceso de desplegamiento térmico de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* pasó a ser similar a la mostrada por la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Este cambio de cooperatividad del proceso de desplegamiento podría tener relación con la rigidización del sitio activo o zonas aledañas debido a la inserción de los pares iónicos.

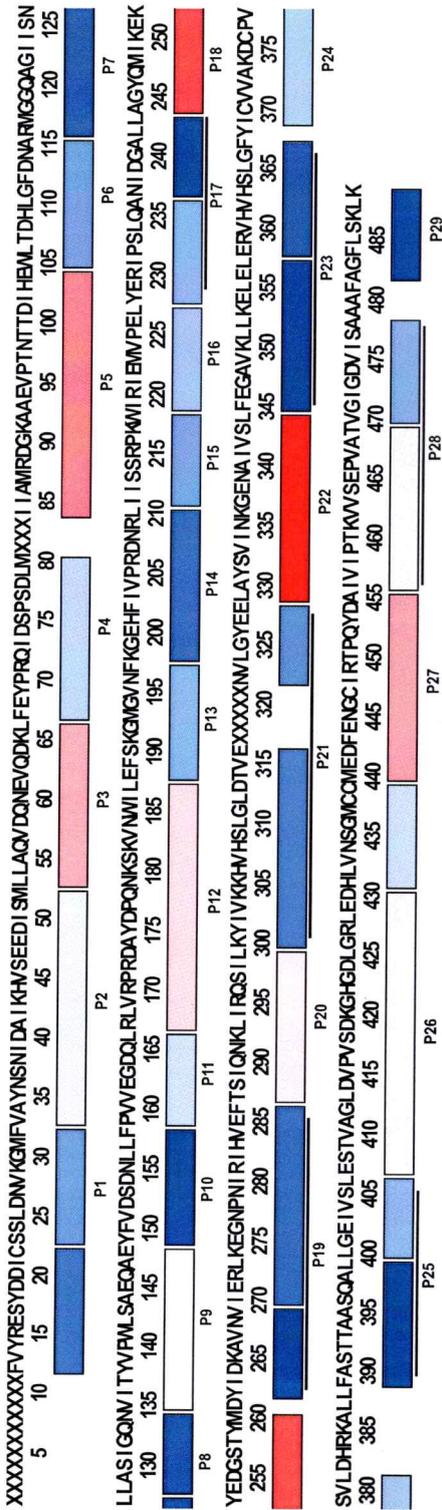
Considerando que la estabilidad global de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* no se vio afectada, el objetivo siguiente consistió en evaluar la flexibilidad de la mutante mediante experimentos de hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas. En particular, nos interesó confirmar si los péptidos que conforman el sitio activo de la enzima psicrófila, que presentaban un alto grado de intercambio relativo en comparación con la misma región en la enzima mesófila, habían disminuido su movilidad.

5.13. Estudio de la flexibilidad estructural de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* mediante intercambio hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas

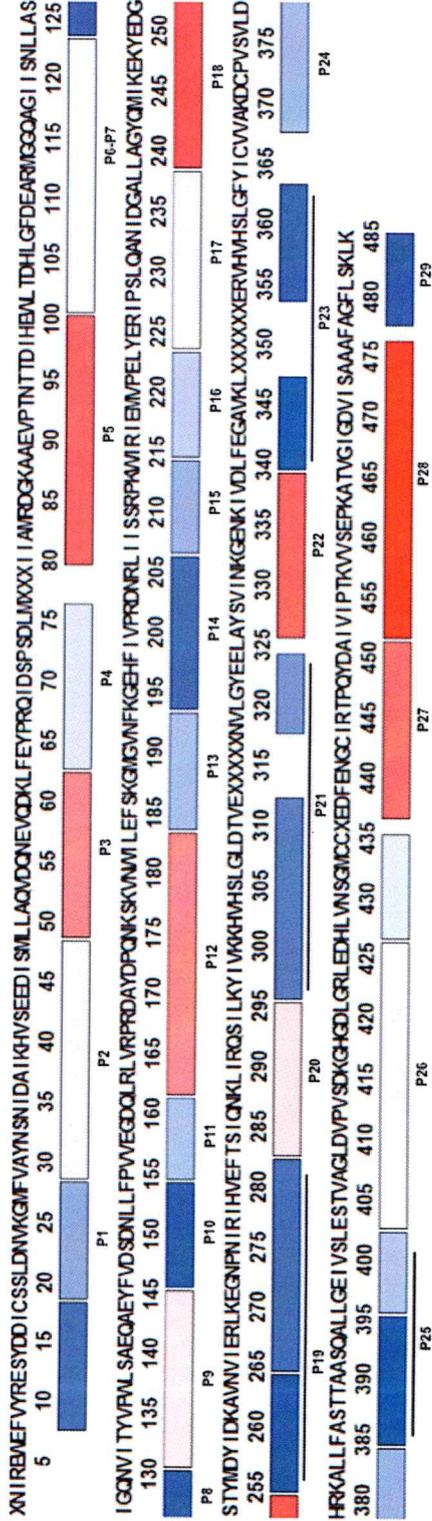
Del mismo modo en que se realizaron los estudios de flexibilidad estructural para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, se realizaron los experimentos para la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. En este caso, los experimentos se realizaron a 25°C y se evaluó si la inserción de los dos pares iónicos en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* provocaba la rigidización del sitio activo o regiones cercanas a éste. Para poder comparar esta mutante con la enzima psicrófila silvestre, se seleccionaron los mismos péptidos de la enzima psicrófila silvestre mostrados en la **Figura 15**. En los casos en que no existieran péptidos de la misma longitud, se consideraron dos péptidos contiguos como uno. En la **Figura 24** se muestra el mapa de cobertura tanto para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la mutante cuádruple de la enzima psicrófila en código de colores, donde las zonas de menor intercambio son de color azul y las de máximo intercambio son de color rojo.

Figura 24 (Página siguiente). Mapa de cobertura de intercambio relativo hidrógeno-deuterio para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la mutante cuádruple de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. burtonii*. Panel superior, ADP-PFK de *M. burtonii*, panel inferior mutante cuádruple ADP-PFK de *M. burtonii* Los intercambios mostrados corresponden al experimento realizado a 25°C con un tiempo máximo de intercambio de 30 min.

MbPFK



MutMbPFK



Para la mutante cuádruple de enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* se obtuvo una cobertura suficiente para los análisis posteriores, alcanzándose 94.4% de cobertura. Considerando que la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la mutante cuádruple son idénticas, salvo en los residuos ASN110, VAL463, ALA336 y SER339, en donde la mutante cuádruple presenta los residuos GLU110, LYS463, LYS336 y ASP339, se seleccionaron péptidos homólogos en ambas estructuras. En la **Figura 25** se muestran los intercambios relativos H-D obtenidos para cada péptido.

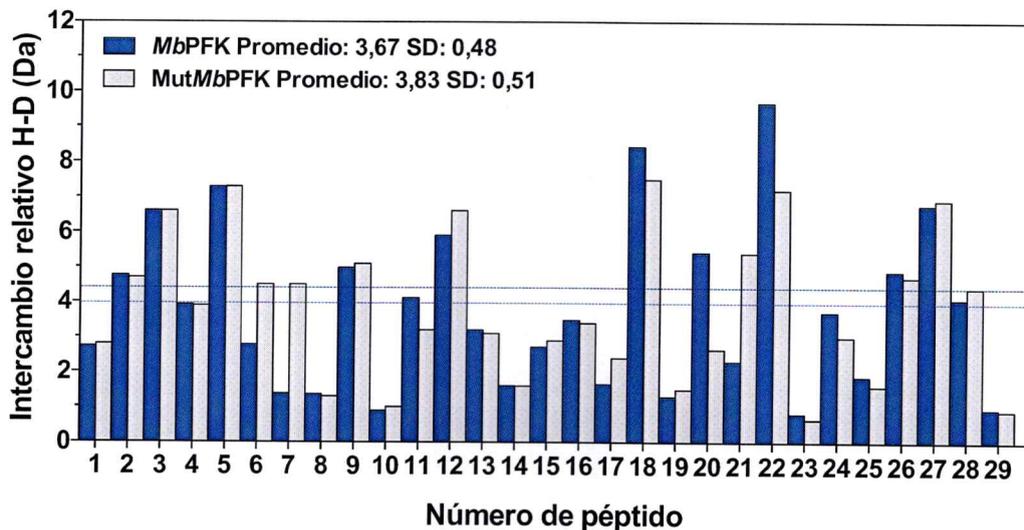


Figura 25. Intercambio relativo H-D para distintos péptidos de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la mutante cuádruple de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. burtonii*. Los intercambio relativo H-D para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*MbPFK*, barras azules) y la mutante cuádruple de enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*MutMbPFK*, barras grises) fueron obtenidos por espectroscopia de masa. Los experimentos fueron realizados a 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 30 min a 25°C.

La **Figura 25** muestra que la inserción de los pares iónicos en la estructura de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* rigidiza el sitio activo de la enzima, logrando disminuir la movilidad y por ende el intercambio relativo H-D de los péptidos 18, 20 y 22, los cuales flaquean los motivos conservados encargados de la unión del complejo metal- nucleótido y azúcar (motivo **NXNXD: péptido 2**, motivo **HXE: péptido 19**, motivo **(D)NXXE péptido 21**). Las interacciones iónicas introducidas no provocan ninguna variación en la tasa de intercambio relativo H-D de los motivos conservados, por lo que se podría suponer que la flexibilidad local aumentada del sitio activo de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* podría deberse principalmente a los péptidos 18, 20 y 22. Debido a que las interacciones iónicas introducidas en la enzima psicrófila provocaron una rigidización del sitio activo, se procedió a caracterizar la mutante cuádruple de enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* a diferentes temperaturas y ver si la rigidización de su sitio activo mostraba un comportamiento cinético (variación de las K_m), similar a la de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*.

5.14. Estudio de la variación del parámetro cinético K_m con la temperatura de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y de la mutante cuádruple (MutMbPFK)

La enzima psicrófila silvestre mostró durante el desarrollo de este trabajo de tesis que un aumento en la temperatura a las cuales se realizaban las curvas de saturación, provocaba un aumento exponencial de los valores de K_m para el azúcar F6P. Para evaluar si la rigidización del sitio activo provocada por la inserción de los 2 pares iónicos (Lys336-ASP339 y GLU110-LYS463) generaba un cambio en la tendencia de este parámetro, se procedió a caracterizar cinéticamente a la mutante cuádruple (MutMbPFK) en el mismo intervalo de temperatura que se usó para la enzima silvestre. Para tales efectos, se consideró la actividad PFK, pues es la actividad preferencial de la enzima psicrófila silvestre.

La **Figura 26** muestra las curvas de saturación para la actividad PFK de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* a distintas temperaturas y la variación de los valores de K_m para el sustrato fructosa-6-fosfato. La **Figura 27** muestra la comparación de la variación de los valores de K_m de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* con los obtenidos para la enzima psicrófila de *M. burtonii* y para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*.

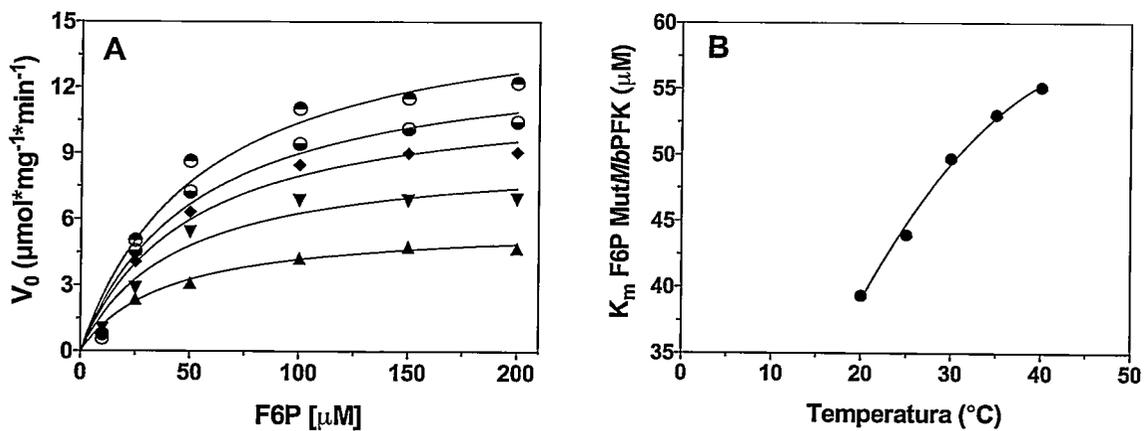


Figura 26. Caracterización cinética de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* a distintas temperaturas. A) Curvas de saturación de la actividad PFK de la mutante cuádruple a distintas temperaturas (▲: 20°C, △: 25°C, ◻: 30°C, ◻: 35°C, ◆: 40°C). B) Variación de la constante K_m con la temperatura para la mutante cuádruple de la enzima psicrófila de *M. burtonii*.

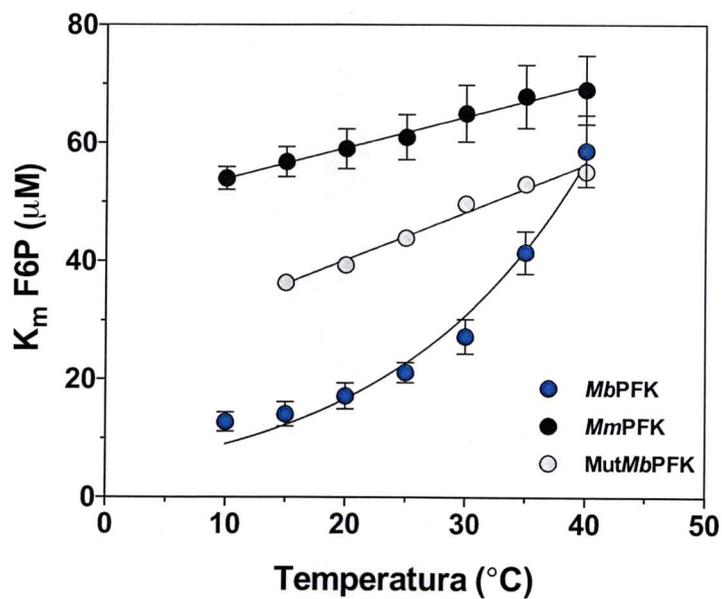


Figura 27. Variación del parámetro cinético K_m con la temperatura para la enzima psicrófila, mesófila y la mutante cuádruple. En azul se muestra la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (MbPFK), en negro la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (MmPFK) y en gris la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (MutMbPFK).

Los resultados de la **Figura 27** muestran que al aumentar la temperatura los valores de K_m para la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* no varían exponencialmente al aumentar la temperatura, sino que tienden a parecerse a la tendencia de la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. El aumento de los valores de K_m se correlaciona con los resultados de los experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio, debido a que la rigidización del sitio activo de la mutante vista en estos experimentos, sería la responsable del cambio observado en la variación de K_m con la temperatura. La pérdida de flexibilidad del sitio activo debido a las interacciones iónicas adicionales a la enzima, reducirían la capacidad de ésta para alojar el azúcar y catalizar su fosforilación de forma adecuada. Si bien las interacciones iónicas no logran por si solas cambiar totalmente el comportamiento cinético de la enzima psicrófila en el intervalo de temperaturas evaluadas, sí generan un cambio significativo que permite establecer que el diseño racional utilizado para generar la mutante fue el adecuado, afectando solo la flexibilidad local del sitio activo, permitiendo de esta manera modificar la tendencia de los valores de K_m de la enzima psicrófila por el azúcar.

5.15. Estudio de la dinámica conformacional de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* mediante simulaciones de dinámica molecular

Hemos visto que la inserción de dos pares iónicos en la estructura de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* no afecta la estabilidad térmica de la estructura y que estos solo modifican la flexibilidad del sitio activo. Pero nada sabemos sobre los efectos de estas modificaciones sobre los cambios conformacionales involucrados en el proceso de catálisis. En la enzima termófila ADP-GK de *T. litoralis*, el mecanismo cinético ha sido establecido como secuencial-ordenado, ingresando primero el complejo metal-nucleótido (ADPMg) y posteriormente el azúcar (glucosa). Un movimiento de semi-cierre del dominio menor es producido por la unión del primer co-sustrato ADP-Mg. Un segundo movimiento, dependiente de la unión del azúcar (en este caso glucosa), termina el cierre del dominio menor sobre el dominio mayor, permitiendo que la catálisis ocurra. Si bien este cambio conformacional de apertura y cierre es aceptado para las enzimas de esta familia de enzimas, nada se sabe en relación a la dinámica de este cambio conformacional. En esta sección, el objetivo fue comparar, mediante simulaciones de dinámica molecular, los cambios conformacionales de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Como segundo objetivo se quiso evaluar si los 2 pares iónicos introducidos en la estructura de la enzima psicrófila, eran capaces de modificar la dinámica de esta enzima. Esto para comprobar si la variación de los valores de K_m producidos por la rigidización del sitio activo, tenían relación con una modificación en el tipo de cambio conformacional.

Como punto de partida para el estudio de la dinámica de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásicas. Las dinámicas fueron realizadas durante 60 ns para cada una de las enzimas. Los análisis que se presentan solo consideran 50 ns, pues se removieron 10 ns correspondientes al tiempo de equilibrado del sistema. Durante el tiempo de simulación la enzima psicrófila mostró un cambio conformacional de apertura y cierre de ambos dominios tipo “*breathing*”, movimiento que se caracterizó por realizarse siempre sobre un mismo eje, variando solo el ángulo entre los dominios. Por el contrario, durante el tiempo de simulación la enzima mesófila mostró un cambio conformacional de apertura y cierre de ambos dominios tipo “*twist*”, movimiento que se caracterizó por no encontrarse centrado en el eje central. Estas diferencias en la forma en que la enzima psicrófila y mesófila realizan sus cambios conformacionales, nunca ha sido descrito para este tipo de enzimas. Al analizar la simulación de la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, pudimos constatar visualmente que la inserción de los dos pares iónicos cambió drásticamente la dinámica conformacional de la enzima psicrófila. La mutante cuádruple de la ADP-PFK de *M. burtonii* presentó un cambio conformacional mixto, tendiendo a parecerse visualmente más al presentado por la enzima mesófila. Más allá de este análisis visual, es sabido que los cambios conformacionales de proteínas y enzimas son gobernados por el aporte individual de diversos movimientos. Para evaluar estadísticamente el aporte de cada uno de estos componentes dinámicos, se realizó un análisis de componente principal (PCA, por sus siglas en inglés *Principal Component Analysis*). Este análisis permite estimar

estadísticamente el aporte de los principales movimientos que componen las trayectorias obtenidas durante las simulaciones de dinámica molecular. De esta forma se determinó el aporte de los componentes mayoritarios para cada una de las dinámicas realizadas. La **Figura 28** da cuenta de los movimientos obtenidos para la enzima psicrófila, la enzima mesófila y la mutante cuádruple.

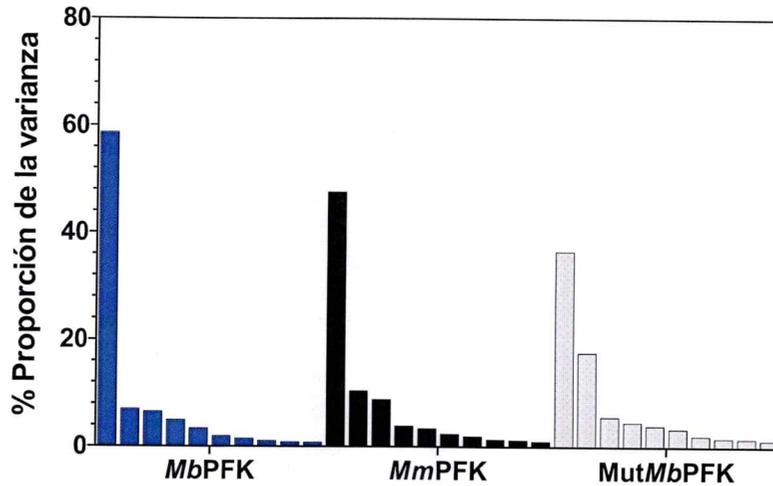


Figura 28. Análisis de componentes principales para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (*MbPFK*). Para cada una de las enzimas estudiadas se muestra el aporte de los mayores 10 componentes principales calculados (barras azules, enzima psicrófila *MbPFK*; barras negras, enzima mesófila *MmPFK*; barras grises, mutante enzima psicrófila *MutMbPFK*).

El análisis de componentes principales mostró que el primer y segundo componente principal obtenido de la simulación de dinámica molecular de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* aportan con un 59% y un 7% a la varianza total del sistema respectivamente, correspondiendo el primer componente principal al cambio conformacional de apertura y cierre tipo “*breathing*”. Para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, el análisis de componentes principales mostró que el primer y segundo componente principal obtenido de la simulación de dinámica molecular aportaron un 48% y un 10% a la varianza total del sistema respectivamente, correspondiendo el primer componente principal al cambio conformacional de apertura y cierre tipo “*twist*”. Al realizar el análisis de componentes principales para la mutante cuádruple de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* efectivamente los resultados indican un cambio en la dinámica de la enzima mutante en relación a la silvestre. Si bien, el primer componente principal corresponde a un cambio conformacional de apertura y cierre tipo “*breathing*”, su aporte a la varianza total del sistema disminuyó drásticamente, desde un 59% en la enzima psicrófila silvestre a un 36% en la enzima psicrófila mutada. Junto con esto, el aporte del segundo componente principal, el cual corresponde a un cambio conformacional de apertura y cierre tipo “*twist*”, aumentó desde un 7% en la enzima psicrófila silvestre a un 18% en la enzima psicrófila mutada. Estos resultados confirman que la inserción de los dos pares iónicos en la estructura de la enzima psicrófila, modifica el comportamiento de esta enzima, en este caso variando su dinámica conformacional.

6. DISCUSIÓN

6.1. Actividad redundante glucoquinasa (GK) en el orden *Methanosarcinal*

En la familia de quinazas de azúcares dependientes de ADP existen enzimas específicas por fructosa-6-fosfato, específicas por glucosa y enzimas que presentan actividad bifuncional. En este trabajo de tesis hemos podido constatar que las enzimas anotadas con actividad PFK del orden *Methanosarcinales*, además de poder fosforilar fructosa-6-fosfato, también son capaces de catalizar la fosforilación glucosa. Estos resultados indican que la bifuncionalidad no es un rasgo exclusivo del orden *Methanococcales*, sino que podría ser entendido como una característica propia de las quinazas de azúcares dependientes de ADP presentes en organismos metanogénicos, como los presentes en el orden *Methanosarcinales*. En arqueas, en el orden *Thermococcales*, un orden no metanogénico, han sido caracterizadas solo quinazas de azúcares dependientes de ADP específicas, ya sea por fructosa-6-fosfato (Tuininga et al. 1999; Ronimus et al. 1999; Hansen & Schönheit 2004; M. a. Currie et al. 2009) o glucosa (Rivas-Pardo et al. 2013; Kengen et al. 1996; Koga et al. 2000; Labes & Schönheit 2003). Además de encontrarse presentes en el dominio arquea, las quinazas de azúcares dependientes de ADP, también pueden ser identificadas en bacterias y eucariontes. En eucariontes solo podemos encontrar glucoquinazas específicas dependientes de ADP (Richter et al. 2016; Ronimus & Morgan 2004). Sin bien en bacterias podemos encontrar los genes codificantes para este tipo de enzimas (**Figura 1**), ninguna quinasa de azúcar dependiente de ADP de este dominio ha sido caracterizada a la fecha. Junto con esto, el análisis del árbol filogenético reconstruido para la superfamilia riboquinasa (**Figura 1**), muestra que los únicos

miembros que presentan los genes por separado para quinasas de azúcares dependientes de ADP con actividad PFK y GK son los organismos de los órdenes *Thermococcales* y *Methanosarcinales* en arqueas. Análisis estructurales basados en alineamientos de secuencias sobre la especificidad de sustratos en la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP realizados en nuestro grupo de laboratorio, han establecido que la principal determinante estructural que dicta que una enzima sea específica o bifuncional es la presencia de ciertos residuos conservados (Castro-Fernández V., 2015). Considerando la numeración de la secuencia de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* estos motivos son: motivo 1: $^{86}\text{G-K-(P/A)-X-(E/A)}^{90}$, motivo 2: $^{179}(\text{I/V})\text{-(N/H)}^{180}\text{-(Y/R)-I-(F/Y)-E}^{184}$ y motivo 3: $^{205}\text{R-F-I-X-X-X(R/D)}$. Las enzimas bifuncionales con actividad PFK y GK como las presentes en el orden *Methanococcales* (*M. maripaludis*) y *Methanosarcinales* (*M. burtonii* y *M. evestigatum*) pueden ser reconocidas por la presencia en la secuencia de los residuos E^{90} , N^{180} y R^{205} , mientras las enzimas específicas PFK y GK presentan los residuos A^{90} , N^{180} y R^{205} y E^{90} , H^{180} y D^{205} respectivamente. Estos estudios estructurales y de secuencia corroboran y sustentan los resultados experimentales de caracterización cinética y de reconstrucción filogenética realizados en este trabajo de tesis, los cuales muestran que solo los organismos metanogénicos de arquea presentan bifuncionalidad y que la redundancia de la actividad GK es exclusiva del orden *Methanosarcinales*. Aunque presentan actividad glucoquinasa, la actividad preferente de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y de la enzima termófila ADP-PFK de *M. evestigatum* es la actividad PFK, presentando valores de K_m para el sustrato fructosa-6-fosfato en el orden μM . Para el sustrato glucosa

los valores de K_m para ambas enzimas se encuentran en el orden mM. Las eficiencias catalíticas para la actividad PFK son aproximadamente 3.000 y 4.000 veces mayores que las eficiencias catalíticas obtenidas para la actividad GK en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima termófila ADP-PFK de *M. evestigatum* respectivamente (**Tabla 1** y **Tabla 2**). A pesar de esto, los valores de eficiencia catalítica para el proceso de fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato de ambas enzimas tendrían significado fisiológico debido a las concentraciones intracelulares de glucosa en estos organismos. Las únicas dos quinasas de azúcares dependientes de ADP bifuncionales descritas pertenecen al orden *Methanococcales* y presentan valores de K_m para glucosa en el orden mM, siendo 40 mM para la enzima mesófila ADP-PFK/GK de *M. maripaludis* (Castro-Fernández, 2014) y 1,6 mM para la enzima hipertermófila ADP-PFK/GK de *M. jannaschii* (Sakuraba, 2002).

6.2. Especificidad por nucleótidos, metales y azúcares

Independiente de la actividad que las quinasas de azúcares dependientes de ADP presenten (específica PFK, específica GK, bifuncional PFK/GK), para realizar el proceso de fosforilación del azúcar todas utilizan ADP y Mg^{+2} . Los resultados sobre especificidad de nucleótidos mostraron que la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* solo es capaz de utilizar el nucleótido ADP, no pudiendo catalizar el proceso de fosforilación con ningún otro nucleótido, ya sean estos mono-, di- o tri-fosforilados (**Figura 10**). Estas quinasas generalmente presentan alta especificidad por ADP, reportándose en algunos casos la capacidad de utilizar otros nucleótidos di-fosforilados

como GDP y CDP (Guixé, 2009). Actualmente, en nuestro grupo de laboratorio nos encontramos estudiando las determinantes estructurales que impiden el uso de ATP a las quinasas dependientes de ADP, hecho que no ha sido esclarecido experimentalmente hasta el momento. Aunque la identidad de secuencia dentro de la familia riboquinasa es baja si se comparan homólogos ADP dependientes y ATP dependientes, el sitio activo de estas quinasas presentan los mismos motivos conservados para realizar el proceso de fosforilación del azúcar ((D)NXXE y GXGD), presentando entonces las quinasas de azúcares dependientes de ADP la hipotética opción de fosforilar ATP. Sin embargo, los estudios bioinformáticos preliminares realizados en nuestro laboratorio utilizando modelos por homología de estas enzimas en presencia de ATP, indicaron que debido a su grupo fosforilo extra, esta molécula queda desacomodada en el sitio activo, no orientando de forma adecuada el grupo fosforilo a la base catalítica, imposibilitando así la ruptura del enlace fosfodiéster.

En cuanto a la utilización de metales, las quinasas de azúcares dependientes de ADP muestran la capacidad de usar distintos cationes divalentes con una alta eficiencia (Figura 10). Esto puede ser entendido desde un punto de vista geométrico. Co^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} como el Mg^{+2} , presentan un número de coordinación 6 y se encuentran unidos a 6 moléculas de agua ($\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_6^{+2}$, $\text{Me} = \text{Co}^{+2}$, Ni^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2}) con una geometría octaédrica (O_h), mientras que solo Ca^{+2} presenta un número de coordinación 8 y una geometría cuadrado antiprisma (D_{4d}). Las distancias de enlace entre los metales y el átomo de oxígeno de la molécula de agua son: 2,08 Å Co-O, 2,05 Å Ni-O, 2,20 Å Mn-O, 2,10 Å Mg-O, 2,46 Å Ca-O y 2,08 Å Zn-O (Persson 2010). Similares propiedades de

distancia de enlaces presentarían los metales en el complejo Me-ADP, en donde dos moléculas de agua del complejo metal-agua (posición ecuatorial), son liberadas para estas posiciones ser ocupadas por los átomos de oxígeno presentes en el nucleótido, manteniendo la misma geometría. El sustrato real de las quinasas de azúcares dependientes de ADP es el complejo metal-nucleótido, por lo que un cambio de geometría podría afectar la catálisis. Es el caso del complejo Ca-ADP, el cual no presenta una geometría octaédrica y además presenta la mayor distancia de enlace, lo cual repercutiría en el porcentaje de actividad mostrado por la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. En el caso de del complejo Zn-ADP, el cual no presentó actividad detectable en el ensayo enzimático, la razón podría estar dada por la baja solubilidad de este complejo. Co^{+2} , Ni^{+2} y Mn^{+2} presentaron los mayores porcentajes de actividad. Esto se explicaría en razón que las distancias de enlace del complejo y la geometría de éstos serían las mismas, pudiendo la enzima acomodar estos complejos metal-nucleótido. Si se analizan los radios iónicos de los metales ensayados, Ca^{+2} presenta el mayor radio iónico (1,12Å) en comparación con el presentado por Mg^{+2} (0,76 Å). Esto afectaría la densidad de carga del metal, pudiéndose afectar la formación del complejo metal-nucleótido. Co^{+2} , Ni^{+2} y Mn^{+2} presentan radios iónicos similares a los que presenta Mg^{+2} , siendo Co^{+2} el más similar (0,74 Å), seguido por Ni^{+2} (0,72 Å) y Mn^{+2} (0,86 Å) (Persson 2010). Estos análisis concuerdan con los resultados experimentales obtenidos en esta tesis, donde sin considerar la actividad lograda con Mg^{+2} , las mayores actividades registradas fueron en forma decreciente Co^{+2} , Ni^{+2} y Mn^{+2} . La utilización de otros metales, adicionales al metal ocupado tradicionalmente por la enzima es una característica común

en enzimas de arqueas (Keppetipola & Shuman 2005; Ownby et al. 2005; Morales et al. 2011). Algunas de estas enzimas incluso presentan mayores actividades que las obtenidas con el metal canónico (Mura et al. 2003; Morales et al. 2011). Este fue el caso de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*. Al realizar los ensayos a 25°C, la enzima psicrófila mostró preferencia por la utilización de Mg⁺², pero al disminuir la temperatura del ensayo la enzima mostró preferencia por la utilización de Co⁺². Como se dijo en la sección resultados, el que enzimas actuales puedan utilizar una gran diversidad de metales, como cofactores de las reacciones que catalizan (principalmente metales de transición), es una característica que ha sido atribuida a un rasgo ancestral de las primeras transferasas, las cuales en la tierra primordial, contaban con mayores concentraciones de metales de transición (Waldron et al. 2009). Esta promiscuidad por el uso de distintos cofactores metálicos también ha sido reportada para el uso de distintos azúcares como sustratos, siendo estos azúcares distintos al sustrato natural. Ejemplo de esto es la glucosa deshidrogenasa presente en las arqueas *Thermoplasma acidophilum* (Smith et al. 1989), *Thermoproteus tenax* (Siebers et al. 1997) y *Haloferax mediterranei* (Bonete et al. 1996), las cuales son capaces de oxidar otros azúcares además de su sustrato natural glucosa. La promiscuidad en enzimas ha sido establecida como una fuente de nuevas actividades, siendo una característica relacionada a estadios tempranos de evolución (O'Brien & Herschlag 1999; Khersonsky & Tawfik 2010). Actualmente, existe controversia si la promiscuidad es efectivamente una característica propia de enzimas de rutas metabólicas primitivas o como ha sido planteado por algunos autores, una adaptación a ambientes extremos (Lamble et al. 2003; Martínez-Núñez &

Pérez-Rueda 2016). Generalmente las enzimas provenientes de organismos extremófilos han sido caracterizadas como enzimas promiscuas en donde las condiciones fisicoquímicas extremas del nicho ecológico estarían influenciando la trayectoria evolutiva de estas enzimas. En este sentido, la enzima *ADP-PFK de M. burtonii* presenta características promiscuas al mostrar una amplia utilización de sustratos azúcares a 25°C (**Figura 12**). Si bien, a 10°C la enzima es capaz de fosforilar solo fructosa-6-fosfato y glucosa, con un aumento en la temperatura del ensayo, esta enzima presente en un organismo psicrófilo muestra la capacidad de fosforilar diferentes azúcares, característica no presente en la enzima mesófila *ADP-PFK de M. maripaludis* (Castro-Fernandez et al. 2014). Esta promiscuidad por la utilización de diferentes sustratos dependiente de un aumento de la temperatura, también ha sido vista en la enzima psicrófila α -amilasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (D'Amico, 2006). Esta enzima utiliza como sustrato natural el polisacárido almidón, y promueve su degradación mediante la hidrólisis de los enlaces α (1,4) presentes en fracciones de amilosa, amilopectina y dextrina que componen el almidón. Estudios realizados sobre la capacidad de esta enzima de usar otros polisacáridos con menor y mayor tamaño y la comparación de este uso con el de su homólogo mesófilo (la enzima α -amilasa de cerdo), mostraron que la enzima psicrófila presenta mayores actividades de degradación de almidón a bajas temperaturas y que un aumento de ésta promueve la utilización de sustratos de mayor tamaño (D'Amico et al. 2002; Siddiqui & Cavicchioli 2006). Esta promiscuidad por sustrato fue atribuida a la mayor flexibilidad del sitio activo de la

enzima psicrófila, propiedad que le permite acomodar de mejor forma sustratos de mayor tamaño (Feller 2010).

6.3. Variación diferencial de los parámetros cinéticos con la temperatura

La variación que presenten los parámetros cinéticos de una enzima con la temperatura dependerá del grado de flexibilidad estructural que presente la enzima en estudio (Siddiqui & Cavicchioli 2006). Es generalmente aceptado que la velocidad de una reacción aumentará exponencialmente con un aumento en la temperatura. En el caso de una reacción catalizada por una enzima, la k_{cat} debería aumentar exponencialmente con la temperatura. Existen algunas enzimas en que el aumento de la k_{cat} no sigue un comportamiento exponencial sino más bien lineal con el aumento de la temperatura. Es el caso por ejemplo de la enzima termófila 3-fosfoglicerato quinasa de *Thermoanaerobacter*, de la hipertermófila β -glucosidasa de *Pyrococcus furiosus* y la hipertermófila enolasa de *Thermotoga marítima*. No obstante, la gran mayoría de enzimas caracterizadas a la fecha, si presentan un aumento exponencial de su k_{cat} . Este es por ejemplo el caso de enzimas como la glucoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis*, la lactato deshidrogenasa de *Bacillus megaterios*, la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Thermotoga marítima* (Wrba et al. 1990) y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de una arqueobacteria (AN1) perteneciente al orden *Thermococcales* (Hudson et al. 1993) por nombrar algunas. Este es también el caso tanto para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, la mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y de la enzima hipertermófila ADP-PFK de *T. litoralis*,

caracterizadas en este trabajo. En relación a la variación del valor de K_m con la temperatura, en la gran mayoría de las enzimas termófilas y mesófilas caracterizadas a la fecha, se ha visto que la constante K_m aumentan con la temperatura y que este aumento presenta un comportamiento exponencial, aunque este comportamiento no siempre sigue los mismos patrones. Un ejemplo de esto es la enzima termófila 3-fosfoglicerato quinasa de *Thermoanaerobacter* sp. Rt8.G4, la cual presenta su máximo de actividad alrededor de los 70°C (Thomas & Scopes 1998). Al evaluar en esta enzima la variación de la K_m con la temperatura entre 40°C y 65°C, ésta no presenta mayores alteraciones, manteniéndose los valores prácticamente constante. Pero al sondear la variación por sobre la temperatura de actividad máxima, la variación de la K_m se torna exponencial (Thomas & Scopes 1998). El mismo patrón de variación fue visto en la enzima mesófila 3-fosfoglicerato quinasa de *Zymomonas mobilis*. Esta enzima presenta su máximo de actividad alrededor de los 60°C. La variación de su K_m es prácticamente mínima, manteniéndose constante el valor hasta esta temperatura. A partir de esta temperatura la variación se torna exponencial con la temperatura (Thomas & Scopes 1998). Otro patrón de variación es encontrar un decaimiento exponencial en los valores de K_m al aumentar la temperatura. La enzima mesófila quitobiasa de *Serratia marcescens* cataliza la hidrólisis quitobiosa, un disacárido de la N-acetilglucosamina (Lonhienne, 2001). Al realizar curvas de saturación a diferentes temperaturas se pudo observar una disminución exponencial en los valores de K_m de esta enzima para quitobiosa. Este hecho fue atribuido a una mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas de la enzima con el sustrato en el sitio activo, las que se ven favorecidas por un aumento de temperatura.

Aquí, el aumento de temperatura estabilizaría las interacciones hidrofóbicas entre el sustrato y los residuos involucrados en la unión de éste (Lonhienne et al. 2001). Por otro lado, la enzima quitibiasa psicrófila muestra un aumento de sus valores de K_m con la temperatura. Esto se explica en razón de que en su sitio activo, a diferencia de su homólogo mesófilo, esta enzima psicrófila reemplazó algunas interacciones hidrofóbicas claves para la unión del sustrato por interacciones iónicas. En este caso, este tipo de interacciones se ven favorecidas con una disminución de la temperatura, lo que le permitiría a esta enzima psicrófila presentar menores valores de K_m a bajas temperaturas, catalizando así de mejor forma la hidrólisis del polisacárido a estas temperaturas. En las enzimas caracterizadas en este trabajo, los valores de K_m en los tres modelos enzimáticos utilizados variaron diferencialmente con la temperatura. La enzima hipertermófila de *T. litoralis* presentó un decaimiento exponencial de sus valores de K_m , la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* no presentó variación y la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* presentó un aumento exponencial de sus valores de K_m . La variación de la K_m de la enzima hipertermófila ADP-GK de *T. litoralis* se justificaría por ser la enzima en estudio con una menor cantidad de residuos hidrofóbicos en su sitio activo expuestos al solvente, lo que le permitiría poder contar con un mayor número de residuos hidrofóbicos para interactuar con el sustrato, interacciones que se verían favorecidas con el aumento de temperatura (Lonhienne, 2001). Adicionalmente, un aumento de la temperatura de reacción podría estar aumentando la flexibilidad estructural de la enzima, optimizando quizás de esta forma una configuración de unión del sustrato, permitiendo esto una disminución de los valores de K_m . La variación casi

nula de los valores de K_m determinados para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, podría estar indicando que en el intervalo de temperaturas ensayados (10°C - 40°C), la estructura del sitio activo no estaría presentando mayores modificaciones para la unión de sustrato. Sin embargo, podría existir la posibilidad de que al igual que en la enzima mesófila 3-fosfoglicerato quinasa de *Zymomonas mobilis* y la enzima termófila 3-fosfoglicerato quinasa de *Thermoanaerobacter* sp. Rt8.G4, la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* presente un aumento exponencial de sus valores de K_m a temperaturas cercanas o sobre la temperatura a la que alcanza su máxima actividad (60°C). El aumento exponencial de los valores de K_m determinados para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (**Figura 7**, **Figura 8**), podría ser explicado en primera instancia por presentar una menor cantidad de residuos hidrofóbicos disponibles en el sitio activo interaccionando con el sustrato (Lonhienne et al. 2001). Esta menor disponibilidad de residuos hidrofóbicos se basa en que las enzimas psicrófilas provenientes de arqueas, evolucionaron hacia estructuras más flexibles, principalmente disminuyendo los residuos cargados presentes en superficie y en sus centro hidrofóbico (Arg, Lys, Glu), así como también aumentando la exposición de residuos hidrofóbicos del sitio activo al solvente (Saunders et al. 2003). La disminución de residuos de arginina conlleva una disminución en la cantidad de interacciones tipo puentes de hidrógeno que pueden ser formados con el solvente, contribuyendo esto a la flexibilización estructural. Varios estudios han mostrado que para compensar la pérdida de cargas en superficie y evitar fenómenos de agregación debidos a la alta viscosidad del medio intracelular a bajas temperaturas, las enzimas de arqueas psicrófilas reemplazaron

estos aminoácidos cargados por una mayor proporción de aminoácidos polares no cargados como Gln y Thr (Saunders et al. 2003). La disminución de residuos cargados conlleva una disminución en los pares iónicos estabilizantes, favoreciendo también esto una mayor flexibilidad estructural. Adicionalmente, las enzimas psicrófilas de arquea muestran una mayor exposición al solvente de los centros hidrofóbicos de sus enzimas. Estas modificaciones estructurales han sido indicadas como fundamentales para disminuir la energía de activación del estado de transición enzima-sustrato en este tipo de enzimas y por ende, son relacionadas al aumento de la eficiencia catalítica a bajas temperaturas de estas enzimas. Si bien se han reportado otras modificaciones estructurales para enzimas psicrófilas de bacterias y organismos eucariontes, no existen los suficientes estudios para asociar estas modificaciones a las enzimas psicrófilas de arqueas. Un ejemplo de esto es que el mecanismo cinético adaptativo general planteado para enzimas psicrófilas es la optimización de sus k_{cat} en desmedro de su K_m (Feller 2010). Si bien esto es ampliamente aceptado, la gran mayoría de los estudios que permiten establecer esto, han sido realizados en enzimas psicrófilas provenientes de bacterias, no pudiendo de esta forma generalizar este mecanismo adaptativo a enzimas psicrófilas de arqueas. En segunda instancia, los experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio realizados en este trabajo de tesis, mostraron que los péptidos que flanquean a los motivos conservados encargados de la unión del complejo ADP-Mg, los péptidos 18, 20 y 22, presentan un mayor grado de flexibilidad en la enzima psicrófila que en la enzima mesófila. La mayor movilidad de estos péptidos estaría condicionando la estabilidad del complejo enzima-sustrato con un aumento en la temperatura. Es un

hecho establecido en la literatura que las enzimas psicrófilas generalmente presentan una mayor movilidad de componentes del sitio activo. La enzima psicrófila alcohol deshidrogenasa de *Moraxella* sp.TAE123, al igual que la enzima psicrófila caracterizada en este trabajo de tesis, presenta un mayor grado de flexibilidad global que su homólogo termoestable. Sin embargo esto responde a un fenómeno de flexibilidad local, puntualmente una mayor movilidad de segmentos asociados al sitio activo, los que permiten paliar la falta de energía cinética a bajas temperaturas, uniendo al sustrato sin necesidad de realizar grandes cambios conformacionales dependientes de temperatura (Liang et al. 2004). Para la enzima psicrófila 3-Isopropilmalato deshidrogenasa, los estudios de intercambio hidrógeno-deuterio también apuntan hacia que una mayor flexibilidad del sitio activo sería la característica responsable de una mayor eficiencia catalítica a bajas temperaturas en esta enzima (Svingor et al. 2001).

6.4. Rigidización sitio activo y cambios en la dinámica conformacional

El análisis de las secuencias aminoacídicas utilizadas para la reconstrucción filogenética mostró que los motivos encargados de unir el complejo metal-nucleótido ((D)NXXE), el azúcar (NXNXD) y el motivo catalítico (GXGD) son conservados en arqueas y solo presenta algunas modificaciones en las enzimas ADP-GK de eucariontes. La reconstrucción del último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y *Methanococcales* y el análisis de los demás ancestros utilizados en este trabajo de tesis indicó que estos motivos se encuentran conservados a lo largo de toda la historia evolutiva de la familia. Su conservación en las enzimas actuales y en los ancestros

relacionados de órdenes con características termófilas, mesófilas y psicrófilas (*Thermococcales*, *Methanococcales* y *Methanosarcinales*) indica que la adaptación de estas enzimas a nichos ecológicos con diferentes temperaturas no involucra directamente modificaciones de los motivos. Al realizar el alineamiento de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y los ancestros indicados en la Figura 21, se pudo establecer la presencia de dos pares iónicos altamente conservados en el orden mesófilo (*Methanococcales*) y termófilo (*Thermococcales*), los que no se encontraron presentes en el orden *Methanosarciinales*. Si bien estas interacciones iónicas no se encuentran presentes en el sitio activo de la enzima (primera capa de coordinación), existen reportes que puntualizan el efecto cinético-estructural que tienen modificaciones estructurales presentes en una segunda esfera de coordinación (Andreini et al. 2009; Shook & Borovik 2010). La introducción de estos dos pares iónicos en la estructura de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (A336K y S339D) no varió la estabilidad térmica global de la enzima mutante, pero si rigidizó el sitio activo, disminuyendo la flexibilidad de éste. Los experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio realizados con la enzima psicrófila mutante mostraron que los pares iónicos introducidos rigidizaron la estructura del sitio activo, disminuyendo la tasa de intercambio de los péptidos que flaqueaban el motivo conservado (D)NXXE. Si bien esta rigidización estructural no logró invertir completamente las tasas de intercambio de estos péptidos en la enzima psicrófila mutante, desde lo observado para los mismos péptidos en la enzima psicrófila silvestre ADP-PFK de *M. burtonii* a lo determinado para la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*, la disminución en flexibilidad

tuvo un efecto directo en la variación de los valores de K_m en la enzima mutante. Los valores de K_m tendieron a aumentar en todas las temperaturas evaluadas, mostrando una tendencia intermedia entre la enzima psicrófila silvestre ADP-PFK de *M. burtonii* y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Por lo tanto, los pares iónicos introducidos en la estructura de la enzima psicrófila, solo tuvieron un impacto local, variando la flexibilidad del sitio activo e indicando que las determinantes estructurales que modularían la adaptación termal de las enzimas presentes en la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP se encontrarían en la segunda esfera de coordinación de estas enzimas y no tendría relación con cambio de residuos en la primera esfera de coordinación (sitio activo). Estas tipo de modificaciones estructurales, además de poder afectar los parámetros cinéticos, han sido descritos afectar la dinámica conformacional de algunas enzimas (Liu et al. 2016). Las simulaciones de dinámica molecular junto con los análisis de componentes principales, indicaron que la introducción de los pares iónicos (A336K y S339D), revirtieron los cambios conformacionales involucrados en el proceso de catálisis. En las enzimas de la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP, ha sido establecido que un cambio conformacional de apertura y cierre es inducido sobre la unión de ligandos, y que este cambio conformacional sería necesario para que el proceso de catálisis pueda ocurrir (Ito et al. 2003; M. A. Currie et al. 2009; Rivas-Pardo et al. 2013). Estas aproximaciones experimentales estructurales dieron cuenta del fenómeno de apertura y cierre pero de manera estática, no abordando la dinámica del proceso. Estudios de intercambio hidrógeno-deuterio acoplados a resonancia magnética nuclear realizados en un homólogo estructural de la superfamilia

riboquinasa, la adenosina quinasa abordaron la dinámica del proceso e indicaron que estos movimientos son dependientes de la temperatura (Wolf-Watz et al. 2004; Krishnamurthy et al. 2009). Aun esto, ninguna publicación ha hecho referencia ni ha puntualizado si enzimas de una misma familia, pero adaptadas a nichos de con diferentes temperaturas, presentaran los mismos tipos de movimientos conformacionales. En este trabajo de tesis se estableció que el movimiento principal encontrado en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* fue un cambio conformacional de apertura y cierre tipo “*breathing*”. Al introducir los pares iónicos, este movimiento vario a un cambio conformacional de apertura y cierre tipo “*twist*”, mismo movimiento que presento la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. En el futuro, se espera poder ampliar este estudio utilizando otros modelos enzimáticos, para establecer si el movimiento tipo “*breathing*” es característico de las enzimas psicrófilas de esta familia o una característica de las enzimas presentes en el orden *Methanosarcinales*, y también poder establecer otras determinantes estructurales claves en la adaptación estructural a diferentes temperaturas.

7. CONCLUSIONES

- La bifuncionalidad en la familia de quinasas de azúcares dependientes de ADP es una propiedad solo encontrada en los órdenes de arqueas metanogénicos (*Methanococcales* y *Methanosarcinales*), las que aunque presentan actividad PFK y GK, presentan una actividad preferente PFK. La bifuncionalidad se encuentra ausente en las quinasas de azúcares dependientes de ADP de los órdenes de arqueas no metanogénicos (*Thermococcales*) y en las enzimas de organismos de bacterias y eucariontes, las cuales solo presentan enzimas con actividad específica PFK o GK.
- Aunque existen diferencias en las actividades enzimáticas a bajas temperaturas entre la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* (orden *Methanosarcinales*) y la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* (orden *Methanococcales*), la energía de activación para el proceso de fosforilación de fructosa-6-fosfato (actividad PFK) es similar para ambas enzimas. La mayor eficiencia para catalizar la fosforilación de fructosa-6-fosfato de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* radica en la optimización de los valores de K_m para este sustrato a estas temperaturas.
- Los menores valores de K_m determinados para la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, además de la variación exponencial de este parámetro cinético con la un aumento de la temperatura, son debido a una mayor flexibilidad local del sitio activo, específicamente de los segmentos que flanquean el motivo conservados de unión del complejo metal-nucleótido ((D)NXXE). Adicionalmente, se pudo observar que la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* presenta a lo largo de toda su estructura, una mayor tasa de intercambio hidrógeno-deuterio en

comparación con la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis*. Esta última solo presenta un alto grado de intercambio en el extremo C-terminal de la estructura, lo cual sería explicado como una compensación entrópica a la mayor rigidez presente en las demás regiones de la estructura.

- La mayor flexibilidad del sitio activo de la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* sería producto de la ausencia de dos interacciones iónicas en la segunda esfera de coordinación de esta enzima. Estas interacciones se encuentran ausentes en el último ancestro en común del orden *Methanosarcinales* y en el último ancestro en común entre el orden *Methanosarcinales* y el orden *Methanococcales*, por lo que la flexibilidad del sitio activo sería un rasgo conservado a través de la evolución y la rigidización del sitio activo una novedad evolutiva en la enzima mesófila ADP-PFK de *M. maripaludis* y en las demás enzimas mesófilas y termófilas del orden *Methanococcales*.
- La inserción de dos pares iónicos en la enzima psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii* no varía la estabilidad térmica de esta enzima sino que afecta puntualmente la flexibilidad del sitio activo. Adicionalmente su inserción en la estructura cambia la dinámica conformacional de la psicrófila ADP-PFK de *M. burtonii*, desde un movimiento de apertura y cierre tipo “*breathing*” a uno tipo “*twist*”.

8. REFERENCIAS

- Abascal, F., Zardoya, R. & Posada, D., 2005. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21, pp.2104–2105.
- Aghajari, N. et al., 2003. Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 50(4), pp.636–647.
- Aghajari, N. et al., 1998. Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 7, pp.564–572.
- Albers, S.-V. & Meyer, B.H., 2011. The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), pp.414–426.
- Andreini, C. et al., 2009. Structural Analysis of Metal Sites in Proteins: Non-heme iron sites as a case study. *Journal of Molecular Biology*, 388(2), pp.356–380.
- Bonete, M.J. et al., 1996. Glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS letters*, 383(3), pp.227–9.
- Boone, David R., Castenholz, R.W. G., 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology* D. R. B. • R. W. C. • G. M. Garrity, ed., Springer New York.

- Castro-Fernandez, V. et al., 2014. Bifunctional ADP-dependent phosphofructokinase/glucokinase activity in the order *Methanococcales*- Biochemical characterization of the mesophilic enzyme from *Methanococcus maripaludis*. *FEBS Journal*, 281(8), pp.2017–2029.
- Castro-Fernandez, V. 2015. Reconstrucción de de enzimas ancestrales: historia evolutiva de la especificidad por sustratos en la superfamilia Riboquinasa (tesis doctoral). Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K., 2006. Cold-adapted enzymes C. L. A. Pandey, C. Webb, C.R. Socol, ed., New York, NY.
- Cavicchioli, R., 2006. Cold-adapted archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 4(5), pp.331–343.
- Chandrayan, S.K. & Guptasarma, P., 2009. Attenuation of ionic interactions profoundly lowers the kinetic thermal stability of *Pyrococcus furiosus* triosephosphate isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(6), pp.905–912.
- Cipolla, A. et al., 2012. Temperature adaptations in psychrophilic, mesophilic and thermophilic chloride-dependent alpha-amylases. *Biochimie*, 94(9), pp.1943–1950.
- Currie, M. a. et al., 2009. ADP-dependent 6-phosphofructokinase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. Structure determination and biochemical characterization of PH1645. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), pp.22664–22671.

- D'Amico, S., Gerday, C. & Feller, G., 2003. Temperature adaptation of proteins: Engineering mesophilic-like activity and stability in a cold-adapted α -amylase. *Journal of Molecular Biology*, 332(5), pp.981–988.
- D'Amico, S., Gerday, C. & Feller, G., 2002. Dual effects of an extra disulfide bond on the activity and stability of a cold-adapted α -amylase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), pp.46110–46115.
- D'Amico, S., Sohier, J.S. & Feller, G., 2006. Kinetics and energetics of ligand binding determined by microcalorimetry: Insights into active site mobility in a psychrophilic α -Amylase. *Journal of Molecular Biology*, 358(5), pp.1296–1304.
- Daniel, R.M. & Danson, M.J., 2010. A new understanding of how temperature affects the catalytic activity of enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10), pp.584–591.
- Daniel, R.M., Danson, M.J. & Eisinger, R., 2001. The temperature optima of enzymes: A new perspective on an old phenomenon. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(4), pp.223–225.
- Dhaunta, N. et al., 2013. Introduction of a thermophile-sourced ion pair network in the fourth beta/alpha unit of a psychrophile-derived triosephosphate isomerase from *Methanococcoides burtonii* significantly increases its kinetic thermal stability. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1834(6), pp.1023–1033.

- Do, H. et al., 2013. Purification, characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a cold-active lipase (CpsLip) from the psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* 34H. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(8), pp.920–924.
- Dyer, D.L. & Gafford, R.D., 1961. Some characteristics of a thermophilic Blue-Green Alga. *Science*, 134(3479), p.616-617.
- Elleuche, S. et al., 2014. Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, pp.116–123.
- Eyring, H., 1935. The Activated Complex in Chemical Reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 3(2), pp 107-115.
- Feller, G., 2010. Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *Journal of physics. Condensed matter: an Institute of Physics journal*, 22(32), 323101 (17 pp).
- Feller, G. & Gerday, C., 2003. Psychrophilic enzymes hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 1(December), pp.200–208.
- Garnham, C.P., Campbell, R.L. & Davies, P.L., 2011. Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), pp.7363–7.
- Gianese, G., Argos, P. & Pascarella, S., 2001. Structural adaptation of enzymes to low temperatures. *Protein Engineering Design and Selection*, 14(3), pp.141–148.

- Giaquinto, L. et al., 2007. Structure and function of cold shock proteins in archaea. *Journal of Bacteriology*, 189(15), pp.5738–5748.
- Glykos, N.M., 2006. Software news and updates carma: A molecular dynamics analysis program. *Journal of Computational Chemistry*, 27(14), pp.1765–1768.
- Gribaldo, S. & Brochier-Armanet, C., 2006. The origin and evolution of archaea: a state of the art. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1470), pp.1007–1022.
- Guixé, V. & Merino, F., 2009. The ADP-dependent sugar kinase family: Kinetic and evolutionary aspects. *IUBMB Life*, 61(7), pp.753–761.
- Guo, J.P. et al., 2011. Isolation of talathermophilins from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* YM3-4. *Journal of Natural Products*, 74(10), pp.2278–2281.
- Hall, B.G., 2008. Reconstructing ancestral sequences. In *Phylogenetic Trees Made Easy*. Sinauer Associate Inc, pp. 165–176.
- Hall, B.G., 2006. Simple and accurate estimation of ancestral protein sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), pp.5431–5436.
- Hansen, T. & Schönheit, P., 2004. ADP-dependent 6-phosphofructokinase, an extremely thermophilic, non-allosteric enzyme from the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324. *Extremophiles*, 8(1), pp.29–35.

- Hart, R., Georgian, E.M. & Salick, J., 2016. Fast and cheap in the fall: Phylogenetic determinants of late flowering phenologies in himalayan *Rhododendron*. *American Journal of Botany*, 103(2), pp.198–206.
- Hudson, R.C., Ruttersmith, L.D. & Daniel, R.M., 1993. Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1202, pp.244–250.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), pp.754–755.
- Ito, S. et al., 2003. Crystal structure of an ADP-dependent glucokinase from *Pyrococcus furiosus*: Implications for a sugar-induced conformational change in ADP-dependent kinase. *Journal of Molecular Biology*, 331(4), pp.871–883.
- Ito, S. et al., 2001. Structural basis for the ADP-specificity of a novel glucokinase from a hyperthermophilic archaeon. *Structure*, 9(3), pp.205–214.
- Kengen, S.W.M., Stams, a. J.M. & De Vos, W.M., 1996. Sugar metabolism of hyperthermophiles. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2–3), pp.119–137.
- Keppetipola, N. & Shuman, S., 2005. Characterization of a thermophilic ATP-dependent DNA ligase from the euryarchaeon *Pyrococcus horikoshii*, 187(20), pp.6902–6908.
- Khersonsky, O. & Tawfik, D.S., 2010. Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annual review of biochemistry*, 79, pp.471–505.

- Koga, S. et al., 2000. Biochemical characterization, cloning, and sequencing of ADP-dependent (AMP-forming) glucokinase from two hyperthermophilic archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Journal of Biochemistry*, 128(6), pp.1079–1085.
- Kosugi, T. & Hayashi, S., 2012. Crucial role of protein flexibility in formation of a stable reaction transition state in an α -amylase catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 134(16), pp.7045–7055.
- Krishnamurthy, H. et al., 2009. Dynamics in *Thermotoga neapolitana* adenylate kinase: ^{15}N relaxation and hydrogen-deuterium exchange studies of a hyperthermophilic enzyme highly active at 30 °C. *Biochemistry*, 48(12), pp.2723–2739.
- Labes, A. & Schönheit, P., 2003. ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324. *Archives Microbiology*, 180(1), pp.69–75.
- Lamble, H.J. et al., 2003. Metabolic Pathway promiscuity in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed by studies on glucose dehydrogenase and 2-keto-3-deoxygluconate aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp.34066–34072.
- Landry, K.S., Vu, A. & Levin, R.E., 2014. Purification of an inducible DNase from a thermophilic fungus. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), pp.1300–1314.

- Liang, Z.X. et al., 2004. Impact of protein flexibility on hydride-transfer parameters in thermophilic and psychrophilic alcohol dehydrogenases. *Journal of the American Chemical Society*, 126(31), pp.9500–9501.
- Liu, Z. et al., 2016. Effects of hinge region natural polymorphisms on Human immunodeficiency virus-1 protease structure, dynamics and drug-pressure evolution. *Journal of Biological Chemistry*, p.jbc.M116.747568.
- Lonhienne, T. et al., 2001. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic antarctic bacterium. *Journal of Molecular Biology*, 310(2), pp.291–297.
- Lonhienne, T., Gerday, C. & Feller, G., 2000. Psychrophilic enzymes: Revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(1), pp.1–10.
- MacKerell et al., 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18), pp.3586–3616.
- Maes, D. et al., 1999. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM). *Proteins*, 453(June), pp.441–453.
- Martínez-Núñez, M.A. & Pérez-Rueda, E., 2016. Do lifestyles influence the presence of promiscuous enzymes in bacteria and archaea metabolism? *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), p.3.

- Martinko, J.M., Madigan, M.T. & Parker, J., 2004. Brock, biología de los microorganismos. , p.1011.
- Merino, F. et al., 2012. Catalytic and regulatory roles of divalent metal cations on the phosphoryl-transfer mechanism of ADP-dependent sugar kinases from hyperthermophilic archaea. *Biochimie*, 94(2), pp.516–524.
- Merino, F. & Guixé, V., 2011. On the Specialization history of the ADP-dependent sugar kinase family. *Gene Duplication*, pp.237–256.
- Merino, F. & Guixé, V., 2008. Specificity evolution of the ADP-dependent sugar kinase family - in silico studies of the glucokinase/phosphofructokinase bifunctional enzyme from *Methanocaldococcus jannaschii*. *FEBS Journal*, 275(16), pp.4033–4044.
- Merkl, R. & Sterner, R., 2016. Ancestral protein reconstruction: Techniques and applications. *Biological Chemistry*, 397(1), pp.1–21.
- Morales, R. et al., 2011. *Methanosarcina acetivorans* C2A topoisomerase III α , an archaeal enzyme with promiscuity in divalent cation dependence. *PLoS ONE*, 6(10): e26903.
- Mura, C. et al., 2003. Structure and function of an archaeal homolog of survival protein E (SurE α): An acid phosphatase with purine nucleotide specificity. *Journal of Molecular Biology*, 326(5), pp.1559–1575.

- Nojima, H. et al., 1977. Reversible thermal unfolding of thermostable phosphoglycerate kinase. Thermostability associated with mean zero enthalpy change. *Journal of Molecular Biology*, 116(3), pp.429–442.
- O'Brien, P.J. & Herschlag, D., 1999. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry and Biology*, 6(4), pp.R91-R105
- Ownby, K., Xu, H. & White, R.H., 2005. A *Methanocaldococcus jannaschii* archaeal signature gene encodes for a 5-formaminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranosyl 5'-monophosphate synthetase: A new enzyme in purine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), pp.10881–10887.
- Papaleo, E. et al., 2014. Structural investigation of the cold-adapted acylaminoacyl peptidase from *Sporosarcina psychrophila* by atomistic simulations and biophysical methods. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(12), pp.2203–2213.
- Park, J. & Gupta, R.S., 2008. Adenosine kinase and ribokinase – the RK family of proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(18), pp.2875–2896.
- Parravicini, F. et al., 2013. Reciprocal Influence of Protein Domains in the Cold-Adapted Acyl Aminoacyl Peptidase from *Sporosarcina psychrophila*. *PLoS ONE*, 8(2): e56254
- Pei, J., Kim, B.-H. & Grishin, N. V., 2008. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic acids research*, 36(7), pp.2295–300.

- Persson, I., 2010. Hydrated metal ions in aqueous solution: How regular are their structures? *Pure and Applied Chemistry*, 82(10), pp.1901–1917.
- Phillips, J.C. et al., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*, 26(16), pp.1781–1802.
- Rampelotto, P.H., 2013. Extremophiles and extreme environments. *Life (Basel, Switzerland)*, 3(3), pp.482–5.
- Razvi, A. & Scholtz, J.M., 2006. Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 15(7), pp.1569–1578.
- Richter, J.P. et al., 2016. The structural and functional characterization of mammalian ADP-dependent glucokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), pp.3694–3704.
- Rivas-Pardo, J.A. et al., 2013. Crystal structure, SAXS and kinetic mechanism of hyperthermophilic ADP-Dependent glucokinase from *Thermococcus litoralis* reveal a conserved mechanism for catalysis. *PLoS ONE*, 8(6): e66687
- Ronimus, R.S., Koning, J. & Morgan, H.W., 1999. Purification and characterization of an ADP-dependent phosphofructokinase from *Thermococcus zilligii*. *Extremophiles*, 3(2), pp.121–129.
- Ronimus, R.S. & Morgan, H.W., 2004. Cloning and biochemical characterization of a novel mouse ADP-dependent glucokinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(3), pp.652–658.

- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), pp.1572–1574.
- Sakuraba, H. et al., 2002. ADP-dependent glucokinase/phosphofructokinase, a novel bifunctional enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), pp.12495–12498.
- Saunders, N.F.W. et al., 2003. Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the antarctic archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. *Genome research*, 13(7), pp.1580–1588.
- Shook, R.L. & Borovik, A.S., 2010. Role of the secondary coordination sphere in metal-mediated dioxygen activation. *Inorganic chemistry*, 49(8), pp.3646–60.
- Siddiqui, K.S., Feller, G., D'Amico, S., Gerday, C., Giaquinto, L & Cavicchioli, R., 2005. The Active Site Is the Least Stable Structure in the Unfolding Pathway of a Multidomain Cold-Adapted α -Amylase. *Journal of Bacteriology*, 187(17), pp. 6197-6205.
- Siddiqui, K.S. et al., 2013. Psychrophiles. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 41(1), pp.87–115.
- Siddiqui, K.S. & Cavicchioli, R., 2006. Cold-Adapted Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), pp.403–433.

- Siebers, B., Wendisch, V.F. & Hensel, R., 1997. Carbohydrate metabolism in *Thermoproteus tenax*: In vivo utilization of the non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway and characterization of its first enzyme, glucose dehydrogenase. *Archives of Microbiology*, 168(2), pp.120–127.
- Smith, L.D. et al., 1989. Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *The Biochemical journal*, 261(3), pp.973–7.
- Sterpone, F. & Melchionna, S., 2012. Thermophilic proteins: insight and perspective from in silico experiments. *Chemical Society reviews*, 41(5), pp.1665–76.
- Struvay, C. & Feller, G., 2012. Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), pp.11643–11665.
- Svingor, Á. et al., 2001. A better enzyme to cope with cold: Comparative flexibility studies on psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic IPMDHS. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), pp.28121–28125.
- Thomas, T.M. & Scopes, R.K., 1998. The effects of temperature on the kinetics and stability of mesophilic and thermophilic 3-phosphoglycerate kinases. *The Biochemical journal*, 330 (Pt 3, pp.1087–95.
- Tiberti, M. & Papaleo, E., 2011. Dynamic properties of extremophilic subtilisin-like serine-proteases. *Journal of Structural Biology*, 174(1), pp.69–83.

- Tsuge, H. et al., 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 Science*, (1), pp.2456–2463.
- Tuininga, J.E. et al., 1999. Molecular and biochemical characterization of the ADP-dependent phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), pp.21023–21028.
- Verhees, C.H. et al., 2003. The unique features of glycolytic pathways in archaea. *The Biochemical Journal*, 375(Pt 2), pp.231–246.
- Violot, S. et al., 2005. Structure of a full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. *Journal of Molecular Biology*, 348(5), pp.1211–1224.
- Waldron, K.J. et al., 2009. Metalloproteins and metal sensing. *Nature*, 460(7257), pp.823–30.
- Watanabe, S. et al., 2005. Elucidation of stability determinants of cold-adapted monomeric isocitrate dehydrogenase from a psychrophilic bacterium, *Colwellia maris*, by construction of chimeric enzymes. *Microbiology*, 151(4), pp.1083–1094.
- Wolf-Watz, M. et al., 2004. Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nature structural & molecular biology*, 11(10), pp.945–9.
- Wrba, a et al., 1990. Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry*, 29(33), pp.7584–7592.

Zhang, Y. et al., 2004. Crystal structure of an aminoimidazole riboside kinase from *Salmonella enterica*: Implications for the evolution of the ribokinase superfamily. *Structure*, 12(10), pp.1809–1821.