



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Profundizando en el mecanismo de la actividad independiente de potasio de las piruvato cinasas de Crenarchaeota

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Gustavo De la Vega Ruiz

Dra. Leticia H. Ramírez Silva

Facultad de Medicina

Comité Tutor

Dra. Rosario Muñoz Clares
Facultad de Química

Dr. Alfredo Torres Larios
Instituto de Fisiología celular

Ciudad de México, mayo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante el desarrollo del trabajo conté con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Este proyecto fue apoyado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México número de proyecto IN215912. Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el apoyo brindado para asistir al cuarto congreso de la rama de fisicoquímica, estructura y diseño de proteínas.

“El buen juicio nace de la buena inteligencia y la buena inteligencia deriva de la razón, sacada de las buenas reglas; y las buenas reglas son hijas de la buena experiencia: madre común de todas las ciencias y las artes”

Leonardo da Vinci

pintor, anatomista, arquitecto, paleontólogo, artista, botánico, científico, escritor, escultor, filósofo, ingeniero, inventor, músico, poeta y urbanista italiano (1452 – 1519).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación recibida.

A la Dra. Leticia H. Ramírez Silva por ser mi tutor principal y por el proyecto de doctorado que me permitió crecer profesional y personalmente.

Al comité tutorial: Dra. Rosario Muñoz Clares y Dr. Alfredo Torres Larios por todas sus enseñanzas y recomendaciones para este trabajo.

Al jurado de tesis Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Dra. Marietta Tuena Sangri, Dr. Juan Luis Rendón Gómez, Dr. Héctor Riveros Rosas y Dra. Adela Rodríguez Romero, gracias por sus observaciones, recomendaciones y correcciones a este trabajo, con las cuáles mejoró enormemente

Un agradecimiento especial a los Doctores Armando Gómez Puyou y Marietta Tuena Sangri, tuve la oportunidad de conocerlos, son un ejemplo de profesionalismo y pasión por el saber.

A las personas que colaboraron en el proyecto: Dra. Gloria Hernández Alcántara, Biol. Nallely Cabrera, Dr. Miguel Costas Basín y Dr. José de Jesús García Trejo.

A todos los Doctores catedráticos de los cursos que tomé y los compañeros del laboratorio, muchas gracias.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein
Físico alemán (1879 – 1955).

Esta tesis está dedicada a mis padres Moisés y Alicia y a mis hermanos Sonia, Moisés y David, gracias por su amor y apoyo. De igual manera a mis sobrinos Montserrath, Hannia, Ian, Anuar, Christian, Moisés, Velentina y Jazmín, gracias por el amor y cariño que siempre he recibido de ustedes y con la promesa de seguir siempre adelante.

Por último quiero dedicarla también a mis amigos de toda la vida: Karis, Lyz, Pepe, Lorena, Ely, Carlos, Lulú, Ernesto, Pablo, Homero, Brenda, Sara, José y Ernesto; a mis amigos de la secundaria Bárbara, Jesús, Ángel, Jorge, Alfonso, Alma, Ana, Blanca, Ezequiel, Diana, Eduardo, Gabriel, Luis, Miguel, Rubi, Susana, Patricia, Antonio, Verónica, Iván, Elisa y Vicente, gracias por acompañarme en esta aventura, por crecer juntos y ser parte de mi vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	6
La piruvato cinasa	6
Los cationes monovalentes en las enzimas	7
El papel del K ⁺ en la actividad de la piruvato cinasa	8
La actividad independiente de K ⁺ en la piruvato cinasa de músculo de conejo	9
El mecanismo cinético de la piruvato cinasa	10
La estructura cristalográfica de la piruvato cinasa	13
El sitio activo de la piruvato cinasa	14
Las piruvato cinasa independientes de K ⁺	16
Phylum Crenarchaeota	20
OBJETIVOS	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
MATERIALES Y METODOS	22
Reactivos	22
Análisis de las secuencias	22
Clonación de la piruvato cinasa de <i>Thermofilum pendens</i> (TpPK)	23
Clonación del dominio B	24
Clonación de las mutantes V70E y V70K	24
Cultivo de las células y purificación de la TpPK	25
Cultivo de las células y purificación del dominio B	26

Cultivo de las células y purificación de las mutantes V70E y V70K	27
Espectrometría de masas de la <i>TpPK</i>	27
Espectropetría de masas del dominio B	27
Ensayo de la actividad de la <i>TpPK</i>	27
Estudios cinéticos	28
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	29
Modelado y análisis de la estructural	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Análisis filogenético	31
Purificación de la piruvato cinasa de <i>Thermofilum pendens</i> y determinación de su peso molecular	35
Propiedades catalíticas de la <i>TpPK</i>	36
Cinética enzimática de la <i>TpPK</i> en presencia de Mg ²⁺ y Mn ²⁺	37
Efecto de los moduladores alostéricos	39
Velocidad inicial de la <i>TpPK</i>	42
Estudios de inhibición sin salida	46
Termoestabilidad de la <i>TpPK</i> analizada por DSC	50
Dinámica molecular del monómero de <i>TpPK</i> y RMPK	55
Análisis comparativo de la estructura de una PK mesófila y una hipertermófila	58
Efecto de los cationes monovalentes en la actividad de la <i>TpPK</i>	65
Caracterización cinética de las mutantes V70K y V70E	66
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72

Abreviaturas

PK	Piruvato cinasa
RMPK	Piruvato cinasa de músculo de conejo
<i>Tp</i> PK	Piruvato cinasa de <i>Thermophilum pendens</i>
<i>Pa</i> PK	Piruvato cinasa de <i>Pyrobaculum aerophilum</i>
V70K	Mutante V70K de la piruvato cinasa de <i>Thermophilum pendens</i>
V70E	Mutante V70E de la piruvato cinasa de <i>Thermophilum pendens</i>
DHL	Deshidrogenasa láctica
PEP	Fosfoenol piruvato
RMN	Resonancia magnética nuclear
DMSO	Dimetil sulfóxido
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactopiranosido
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
BN-PAGE	Gel azul nativo en poliacrilamida
DSC	Calorimetría diferencial de barrido

Resumen

Boyer fue el primero en describir el efecto activador del potasio en la actividad catalítica de la piruvato cinasa (PK) (11). Por mucho tiempo se pensó que la dependencia de K^+ era una característica común a todas las piruvato cinasas. Sin embargo, conforme se caracterizaron más enzimas, se observó que algunas presentaban actividad independiente de potasio. Para entender este comportamiento, Laughlin y Reed exploraron las bases moleculares y encontraron que el Glu117 de la enzima dependiente de potasio era reemplazado por Lys en las enzimas independientes de potasio. Los autores propusieron que este comportamiento independiente de potasio, se debe a la carga positiva de la Lys, que sustituye a la carga positiva del catión, como se comprobó en la mutante E117K. A partir de un estudio filogenético de la piruvato cinasa se encontró que los Eukarya tienen Glu en la posición 117 (numeración correspondiente a la enzima de músculo de conejo), mientras que las Bacteria tienen Glu o Lys y las Archaea pueden presentar otros residuos (41). Un dato interesante fue que dos piruvato cinasas de Archaeas presentan actividad independiente de K^+ , a pesar de poseer serina en la posición 117, un residuo sin carga positiva. El objetivo del presente trabajo fue explicar la actividad independiente de K^+ de las piruvato cinasas de Crenarchaeota, que presentan un residuo sin carga en la posición 117, empleando como modelo de estudio la PK de *Thermofilum pendens*. La actividad de la enzima fue independiente de K^+ ; el mecanismo cinético fue al azar en equilibrio rápido, igual al de la enzima de músculo en presencia de K^+ o al de la mutante E117K en ausencia de K^+ . Por lo tanto, el orden de unión de los sustratos a la enzima de *T. pendens* es independiente de la presencia de una carga interna positiva. Los estudios de estabilidad térmica de esta enzima mostraron dos transiciones calorimétricas, una atribuida a los dominios A y C (T_m

=99.2°C) y la otra asociada al dominio B ($T_m=105.2$ °C). En contraste, la enzima de músculo de conejo presentó una sola transición calorimétrica ($T_m= 65.2$ °C). Los datos de la dinámica molecular mostraron que el dominio B de la enzima hipertermofílica es más estable que el resto de la proteína, con una conformación que prepara a la enzima para la catálisis. Se determinaron las interacciones del dominio B de la piruvato cinasa de *Pyrobaculum aerophilum* y del modelo de *T. pendens* y se compararon con las de la enzima de músculo de conejo. Los resultados muestran que las interacciones intra e inter dominio de las enzimas de Crenarchaeota contribuyen en la alta estabilidad del dominio B, principalmente las interacciones Pi-Pi presentes en el núcleo hidrofóbico. De este modo, el arreglo estructural de la piruvato cinasa de *T. pendens* permite la catálisis independiente de la presencia de una carga positiva.

Abstract

An absolute requirement for K^+ was first described in rabbit muscle pyruvate kinase (RMPK) by Boyer (11). For a long time, it was thought that K^+ dependence was a common feature for all PK. However, as more enzymes were characterized, it was found that some exhibit K^+ -independent activity. To understand this behavior, Laughlin y Reed (42) explored the molecular basis and they found that Glu 117 present in the dependent enzyme, was replaced by Lys in the K^+ -independent enzymes. The authors proposed that K^+ -independent expression is because the positive internal charge by Lys replaces the cation positive charge, as they found in the E117K mutant. From a phylogenetic study of pyruvate kinase, Eukarya have Glu at the corresponding position 117, while Bacteria have either Glu or Lys, and Archaea may possess other residues (41). Interesting is that, two pyruvate kinase characterized so far from Archaea exhibit K^+ -independent activity, albeit having Serine at position 117, a non-positive charge residue. The main goal of this study was to provide information that helps to understand the K^+ -independent activity of Crenarchaeota pyruvate kinases that possess a residue with non-positive charge at the 117 position, using the pyruvate kinase from *Thermofilum pendens* as model of study. The enzyme activity was K^+ -independent, the kinetic mechanism was random order with a rapid equilibrium, which is equal to the mechanism of the rabbit muscle enzyme in the presence of K^+ or the mutant E117K in the absence of K^+ . Thus, the substrate binding order of the *T. pendens* enzyme was independent despite lacking an internal positive charge. Thermal stability studies of this enzyme showed two calorimetric transitions, one attributable to the A and C domains (T_m of 99.2°C), and the other (T_m of 105.2°C) associated to the B domain. In contrast, rabbit muscle enzyme exhibits a single calorimetric transition (T_m of 65.2°C). The

calorimetric and kinetic data indicate that the B domain of this hyperthermophilic enzyme is more stable than the rest of the protein with a conformation that induces the catalytic readiness of the enzyme. B domain interactions of pyruvate kinases from *Pyrobaculum aerophilum* and from *T. pendens* model were compared with those of rabbit muscle enzyme. The results show that intra- and interdomain interactions of the Crenarchaeota enzymes may account for their higher B domain stability, mainly by the Pi-Pi interactions of the hydrophobic core. Thus the structural arrangement of the *T. pendens* pyruvate kinase could allow charge-independent catalysis.

Introducción.

La piruvato cinasa.

La piruvato cinasa (ATP-piruvato 2-O-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.40) cataliza la formación de piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato (PEP), Mg-ADP y un protón (Figura 1). Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas; en la primera ocurre la transferencia reversible del grupo fosfato del PEP al complejo Mg-ADP, dando como producto Mg-ATP y piruvato en su forma enólica inestable (1); en la segunda etapa que es irreversible, el piruvato enólico es estabilizado por un protón, llevándolo a su conformación ceto estable (2). El protón que estabiliza al piruvato es donado por un ión hidronio (3). La reacción se lleva a cabo en presencia de dos equivalentes de un catión metálico divalente (Mg^{2+}) (4-6) y un catión monovalente (K^+) (7-9). La piruvato cinasa de músculo de conejo fue la primera enzima en que se reportó un aumento significativo de su actividad cuando el K^+ estaba presente (7).

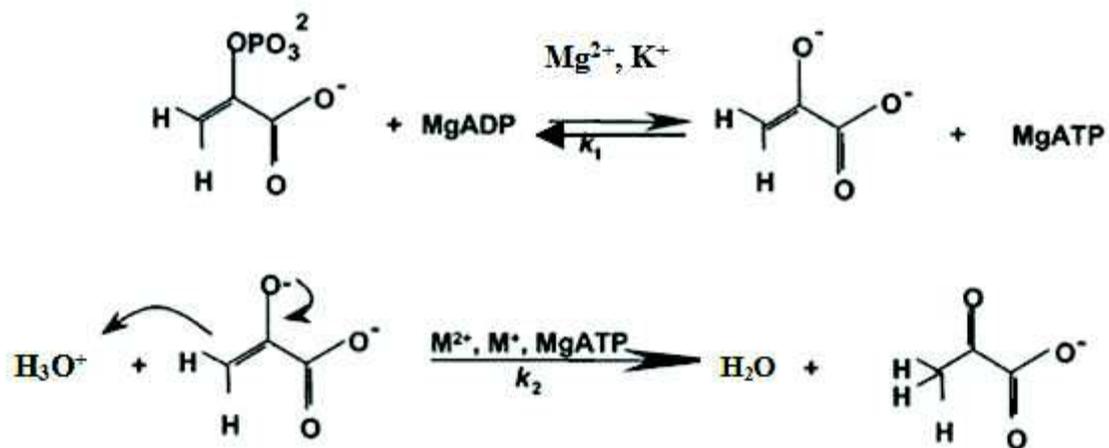


FIGURA 1. Reacción catalizada por la piruvato cinasa

Esta fosforilación a nivel de sustrato representa el último paso de cosecha energética de la glucólisis y como es una reacción altamente exergónica es irreversible bajo condiciones fisiológicas (10). Además de la síntesis de ATP, la piruvato cinasa también produce piruvato, que es un intermediario importante para un numeroso grupo de procesos metabólicos.

Los cationes monovalentes en las enzimas.

Boyer fue el primero en describir el efecto activador del potasio en la actividad catalítica de la piruvato cinasa (11). Pocas décadas después el número de enzimas activadas por un catión monovalente (M^+) aumentó, incluyendo proteínas de plantas y animales (12, 13). Estas enzimas presentan selectividad por algún tipo de M^+ , como se ha observado en los estudios cinéticos, el Na^+ o el K^+ son los preferidos. Por ejemplo, las cinasas y las chaperonas moleculares prefieren K^+ , aunque pueden ser activadas por NH_4^+ y Rb^+ , pero no son activadas por cationes grandes como Cs^+ o pequeños como Na^+ y Li^+ (14). En cambio, las enzimas que requieren Na^+ , como la β -galactosidasa y la proteasa de coagulación, no son activadas por Li^+ ni por cationes grandes como K^+ , Rb^+ o Cs^+ (14).

Para optimizar las funciones catalíticas, las enzimas activadas por M^+ evolucionaron según la abundancia de cationes presentes en su entorno. En el exterior de las células encontramos Na^+ disponible y en el interior K^+ . Este hallazgo muestra que existe una correlación fuerte entre la preferencia por Na^+ o K^+ con la localización intracelular o extracelular de la enzima (14).

Las enzimas activadas por M^+ presentan dos mecanismos: el M^+ actúa como cofactor o como un activador alostérico. Se han podido establecer estos mecanismos a través de las

estructuras cristalográficas. En el primer caso, el M^+ se une al sustrato en el sitio activo, generalmente acompañado por algún catión divalente como Mg^{2+} . En este mecanismo de activación, el M^+ es absolutamente necesario para la catálisis (14). En el segundo mecanismo, el M^+ aumenta la actividad enzimática a través de cambios conformacionales provocados por la unión del M^+ en un sitio fuera del sitio activo y que no tiene contacto directo con el sustrato; en este caso el M^+ no es indispensable para la catálisis (14).

La piruvato cinasa pertenece al grupo de las enzimas que usa el M^+ como cofactor, está acompañada por dos cationes M^{2+} y su presencia aumenta la actividad de la enzima 12500 veces (15).

El papel del K^+ en la actividad de la piruvato cinasa.

A pesar de que desde hace muchas décadas se conoce el aumento significativo de la actividad de la piruvato cinasa en presencia de K^+ , no se han entendido sus mecanismos moleculares en la enzima. De los datos cristalográficos se sabe que el K^+ y dos Mg^{2+} se localizan en el sitio activo. El potasio participa en la coordinación del fosfato del PEP o del fosfato γ del ATP, uno de los Mg^{2+} se coordina con los oxígenos de los carbonos uno y dos del oxalato (que es un análogo del PEP y se emplea en los estudios cristalográficos), el segundo Mg^{2+} está acomplejado con el ATP (16, 15). Los estudios cinéticos muestran que el K^+ induce el arreglo geométrico correcto de los residuos del sitio activo, permitiendo la unión del complejo Mg-ADP independientemente de la presencia de PEP, mientras que en ausencia de K^+ , el Mg-ADP sólo se une a la enzima después de la unión del PEP (17). Debido a que el sitio de unión del Mg-ADP se forma después de que el dominio B ha rotado sobre el dominio A, los datos sugieren que el K^+ , el PEP o ambos contribuyen al descenso del dominio B. (17). Otros estudios cinéticos muestran que la unión del catión divalente aumenta la afinidad por el monovalente. Los datos muestran que el M^+ y el M^{2+}

influyen mutuamente la afinidad del otro (18). Además se observó que la presencia de K^+ y Mn^{2+} la afinidad del PEP aumenta un orden de magnitud (19). A su vez, la distancia del divalente y el monovalente, medidas por RMN, disminuyeron con la adición de PEP, provocando un cambio conformacional en el sitio activo de la enzima. (20, 21). En estudios inmunolectroforéticos también se observaron cambios estructurales de la enzima en presencia de K^+ (22). A pesar de estos estudios, el papel del K^+ en la catálisis de la piruvato cinasa no se ha entendido completamente y los mecanismos moleculares involucrados aún no se conocen con exactitud. Además, no se ha obtenido la estructura cristalográfica de una piruvato cinasa dependiente de K^+ en ausencia del catión, que se pueda comparar con las estructuras obtenidas en presencia del K^+ .

La actividad independiente de potasio en la piruvato cinasa de músculo de conejo.

Como se describió previamente, la piruvato cinasa de músculo de conejo fue la primera enzima descrita que presenta un requerimiento absoluto por K^+ (11). La actividad de la enzima en ausencia de K^+ es de $0.02 \mu\text{mol} / \text{min} \times \text{mg}$, mientras que con potasio se incrementó hasta $250 \mu\text{mol} / \text{min} \times \text{mg}$. Se considera que es un activador esencial de la enzima, activándola 12500 veces (23). A pesar de que el potasio es esencial para la actividad de la piruvato cinasa, se ha observado que la enzima puede expresar actividad independiente de potasio en medios no acuosos, como en micelas invertidas en 3.6% de agua (23) y dimetilsulfóxido al 40% (p/v) (24). En las micelas invertidas la enzima se activa 1650 veces con respecto a la enzima sin potasio en agua, (19.8 ± 2.94 vs $0.012 \pm 0.003 \mu\text{mol} / \text{min} \text{mg}$). Estos resultados sugieren que la poca agua en contacto con la enzima modifica sus características estructurales y su actividad, estabilizando al dominio B (tapa), y permitiendo de esta manera expresar la actividad independiente de potasio (23). Con

respecto al dimetilsufoxido al 40%, los resultados muestran que la enzima presenta características estructurales y catalíticas similares a los de la enzima activada con K^+ , Mg^{2+} y fosfoenol piruvato en un medio con agua (24).

Mecanismo cinético de la piruvato cinasa.

La primera aproximación al mecanismo cinético de la piruvato cinasa de músculo de conejo fue realizada por el grupo de Boyer (25). Con base en la independencia en la unión de ambos sustratos (PEP y Mg-ADP), la inhibición competitiva del ATP con respecto a ambos sustratos y la concordancia entre los valores de K_m obtenidos cinéticamente y los valores de K_d obtenidos directamente por ultracentrifugación, los autores concluyeron que la enzima sigue un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido. Más adelante, Plowman y Krall (26) encontraron que la dependencia de la K_m del ADP con respecto al pH se asemeja a la dependencia de la K_d en función del pH reportada por Mildvan y Cohn (27). La similitud entre las constantes cinéticas y las constantes de disociación sugirieron, de nuevo un mecanismo al azar en equilibrio rápido. Posteriormente, Mildvan y Cohn (28) investigaron el mecanismo cinético de la enzima por medio de ensayos cinéticos de velocidad inicial y de inhibición por producto, así como de unión de ligandos al equilibrio y experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) (velocidad de relajación de los protones del agua). La influencia de la unión del sustrato sobre la velocidad de la relajación de los protones del agua sobre el catión paramagnético Mn^{2+} unido al sitio activo permitió determinar las constantes de afinidad de la enzima por los ligandos. En este estudio, los autores encontraron una correspondencia estrecha entre las constantes de disociación obtenidas en los experimentos de RMN con las obtenidas en los estudios de unión al equilibrio y las obtenidas cinéticamente. Asimismo, los patrones de inhibición no

competitivos, junto con la similitud en las constantes de unión obtenidas por los diferentes métodos, confirman el esquema de cinético de equilibrio rápido y la unión al azar de los sustratos a la enzima. En 1973 Ainsworth y Macfarlane (29) realizaron un estudio cinético detallado de velocidades iniciales e inhibición por producto. Los patrones de velocidad inicial mostraron independencia en la unión de cada sustrato con respecto a la concentración del otro. Los estudios de inhibición por producto muestran que el Mg-ATP es un inhibidor competitivo tanto del Mg-ADP como del PEP, mientras que el piruvato es un inhibidor competitivo del PEP y no competitivo del Mg-ADP. En su conjunto, estos datos confirmaron que la enzima sigue un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido. En contraste, en un estudio cinético del efecto de los cationes mono y divalentes sobre la velocidad de la piruvato cinasa, Melchior (30) encontró una relación no lineal en un gráfico de dobles recíprocos de la velocidad de la reacción contra la concentración de Mg-ADP a diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre. La ausencia de linealidad en este gráfico parece evidenciar que el paso de transfosforilación no es el único paso limitante, indicando un mecanismo al azar pero no en equilibrio rápido. En este mismo sentido, el mecanismo de la enzima se investigó utilizando estudios cinéticos y de medición de flujo así como experimentos de unión al equilibrio y de captura isotópica (31). El término flujo se utiliza para describir la velocidad de conversión de un sustrato a su producto. Si el producto está presente, se puede medir el flujo de las moléculas de productos a las moléculas de sustrato. La velocidad de acumulación del producto será la diferencia entre los flujos y se denomina flujo neto de sustrato a producto. Para medir los flujos es necesario usar sustratos marcados isotópicamente. La unión rápida al azar de los sustratos debe de dar un cociente de flujo igual a la unidad bajo cualquier condición. Los resultados obtenidos muestran que el cociente del flujo de la conversión de ATP a ADP entre el flujo de la

conversión de ATP a PEP describe un incremento hiperbólico hasta un valor máximo de 2.1 con respecto al aumento en la concentración de ADP, pero que no se afecta con la concentración de PEP. Debido a que en el primer caso el cociente es mayor a la unidad, la adición de los sustratos debe involucrar un camino en el que el PEP se une a la enzima en un paso limitante. Sin embargo, los sustratos deben de unirse también al azar a la enzima, como lo indica la falta de efecto del PEP sobre el cociente del flujo. Los experimentos realizados en presencia de sustratos marcados radiactivamente muestran captura isotópica con $[^{32}\text{P}]$ PEP, confirmando que cuando el PEP se adiciona primero a la enzima lo hace en un paso limitante. La captura isotópica no se observó con $[8\text{-}^{14}\text{C}]$ ADP, indicando que la adición de ADP a la enzima libre debe de ser rápida. Asimismo, los experimentos de inhibición con los productos piruvato y ATP muestran patrones competitivos con respecto al PEP. En su conjunto, los datos muestran que la enzima sigue un mecanismo al azar con una vía preferencial ordenada con PEP como primer sustrato a bajas concentraciones de ADP y que la liberación de los productos es rápida y aleatoria. Cabe mencionar que éste es el único estudio que indica que, bajo ciertas condiciones, la PK puede seguir un mecanismo cinético parcialmente ordenado. A este respecto, es relevante mencionar que estudios cinéticos preliminares realizados en ausencia de K^+ en nuestro laboratorio mostraron que la afinidad de la enzima por el ADP depende de la concentración de PEP, indicando que en esta condición el comportamiento cinético de la enzima podría estar alterado. Con el fin de entender el papel del K^+ en el mecanismo cinético de la piruvato cinasa de músculo de conejo, se determinó el mecanismo cinético de la enzima en ausencia de K^+ , encontrándose que sigue un mecanismo ordenado en equilibrio rápido, con PEP como primer sustrato (17).

La estructura cristalográfica de la piruvato cinasa.

La primera estructura cristalográfica de una piruvato cinasa completa fue la de músculo de gato. (32-34). Después siguieron las estructuras de la enzima de músculo de conejo (35), *Escherichia coli* tipo 1 (36), *Saccharomyces cerevisiae* (37), *Leshmania mexicana* (38), eritrocito de humano (39) y músculo de humano (40). En los tres dominios de la vida la estructura de la piruvato cinasa es altamente conservada. Casi todas son homotetrámeros con subunidades de ~ 50 kDa, y cada subunidad consta de tres dominios (A, B y C); algunas piruvato cinasa de eucariontes presentan un dominio N-terminal adicional (34). En la estructura de la enzima de músculo de conejo M1 (Figura 2) (35) el dominio N está formado por los residuos 1-42, que se encuentra organizado en un motivo pequeño hélice-giro- hélice y es seguido por el dominio A, compuesto por los residuos 43-115 y 219-387, este dominio se sitúa en el centro de la estructura, y consta de un motivo barril paralelo $(\beta/\alpha)_8$ altamente conservado. El dominio B, delimitado por los residuos 116-218, se sitúa entre la tercera hebra β y la tercera hélice α del dominio A; está formado por nueve hebras β que forman un barril β . El dominio B se une al dominio A por dos conexiones flexibles que actúan como bisagras y mueven al dominio B hacia el dominio A sobre el sitio activo, como una tapa. Del lado opuesto al dominio B y vecino al dominio A, se localiza el dominio C, delimitado por los residuos 388-530. Este dominio consta de cinco hélices α y cinco hebras β mezcladas. Las hebras 1-4 corren paralelas entre sí, mientras que la quinta hebra se localiza perpendicular a las primeras 4. Este dominio C establece una interacción importante inter-subunidad con el dominio C' vecino. El dominio C forma también contactos intra-subunidad con el dominio A y contiene el sitio de unión al efector alostérico (37). El barril $(\beta/\alpha)_8$ del dominio A participa también en interacciones inter-subunidades, de tal forma que en un tetrámero hay dos dominios A-A' y dos dominios C-C' interaccionando

en la intercara. De este modo la estructura tetramérica de la piruvato cinasa está formada por un dímero de dímeros.

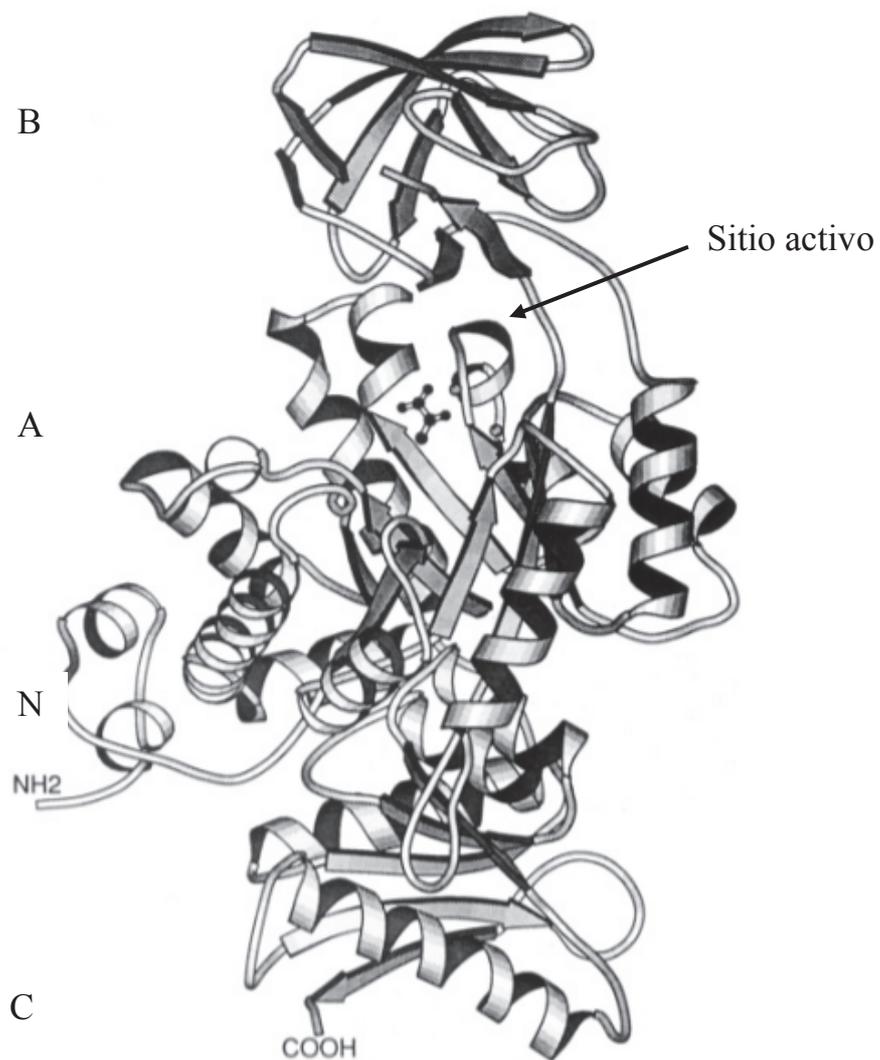


FIGURA 2. Estructura de la piruvato cinasa. Arreglo de los dominios dentro de una subunidad de la piruvato cinasa de músculo de conejo, figura tomada de (35).

El sitio activo de la piruvato cinasa.

El sitio activo de la piruvato cinasa está formado por una hendidura entre los dominios A y B y es bastante conservado (34). En las estructuras de músculo de gato (34) y de conejo M1

(35,16,15) se observa que el catión divalente presenta una coordinación hexavalente, uniéndose a la proteína a través de los carboxilatos del Glu 271 y Asp 295, de los átomos de oxígeno del carbono uno y carbono dos del piruvato, de uno de los oxígenos del fosfato del PEP o el γ -fosfato del ATP y de una molécula de agua.

La coordinación del potasio es también hexavalente, su sitio de coordinación se localiza del lado opuesto al sitio de unión del Mg^{2+} . Está formado por el oxígeno de la carboxiamida de la Asn74, el oxígeno del hidroxilo de la Ser 76, el oxígeno del carboxilato del Asp 112 y el oxígeno carbonilo de la Thr113, además de un oxígeno del fosfato del PEP o el γ -fosfato del ATP y una molécula de agua. La distancia entre el Mg^{2+} y el K^+ es de 5.7 Å. La cadena de trifosfatos del ATP se encuentra doblada debido a la coordinación que los fosfatos α , β y γ que forman con el Mg^{2+} ; la coordinación hexavalente se completa con los oxígenos de tres moléculas de agua. Los cationes inorgánicos Mg^{2+} y K^+ se coordinan con uno de los tres oxígenos del γ -fosfato del ATP. Cuando el dominio B rota para cerrar el sitio activo, las cadenas laterales de tres residuos se mueven varios angstroms desde su posición en la conformación abierta para hacer contacto con el complejo ATP-Mg. El N ζ de la Lys 206 se mueve 10.4 Å a una posición entre los hidroxilos 2' y 3' de la ribosa; el grupo guanidino de la Arg 119 se mueve 6.8 Å para quedar a una distancia de puente de hidrógeno con el β -fosfato del ATP y el carboxilato del Asp 177 viaja 6.8 Å para establecer un puente de hidrógeno con un agua de hidratación del Mg^{2+} del complejo ATP-Mg, como se muestra en la figura 3C. El anillo de la adenina se acomoda en una cavidad que es definida de un lado por la His 77 y la orilla de la Pro 52 por el otro lado. Los sustratos y los iones metálicos se unen en el extremo carboxilo terminal del barril (β/α)₈

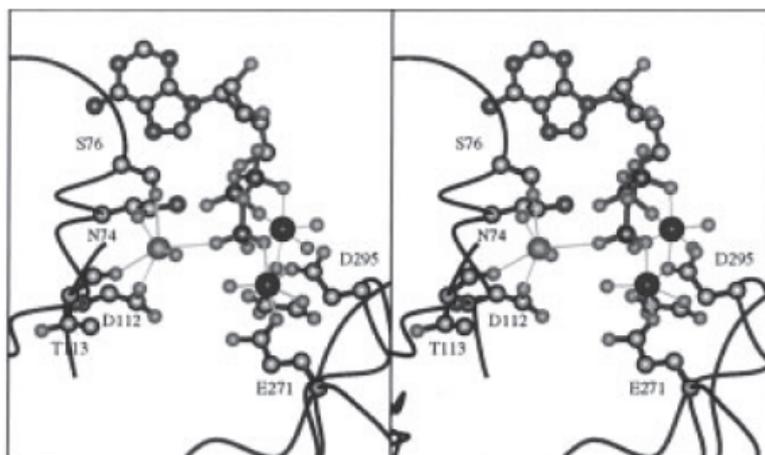


FIGURA 3. Imagen estereoscópica de la coordinación de los cationes en el sitio activo de la piruvato cinasa de músculo de conejo. Los residuos que coordinan al Mg^{2+} son Glu 271, Asp 295 y los oxígenos de los C1 y C2 del piruvato; mientras que los que coordinan al K^+ son Asn74, Ser 76, Asp 112 y Thr113 (15).

Las piruvato cinasas independientes de K^+

Por mucho tiempo se pensó que en todas las piruvato cinasas la dependencia de K^+ era una característica común (41). Sin embargo conforme fueron caracterizadas más enzimas, se observó que la actividad de varias de ellas era independiente de potasio (41). Por tal motivo, Laughlin y Reed (42) exploraron las bases moleculares de la enzima para entender este comportamiento y compararon la secuencia de aminoácidos de la RMPK con dos enzimas de bacterias cuya actividad presentaba independencia respecto del potasio. Estos autores encontraron que el Glu 117 de la RMPK, que se encuentra cerca del sitio de unión

del potasio, y que está localizado en el asa de subida entre el dominio A y el dominio B o tapa, estaba reemplazado por Lys en las dos enzimas de bacterias (Figura 4), por lo que construyeron la mutante E117K y encontraron que presentaba actividad en ausencia de cationes monovalentes. Los autores propusieron que esta expresión independiente de potasio se debe a la carga positiva suministrada por la Lys protonada (42).

```

          101                                     150
Cglutamicum  ...RAVGIL ADLQGFKIRL GRFTDGATV. ..WENGETIR I..TVDDVEG
Ecolitypeii  ...RHVAIL GDLQGFKIRV STFKEGKVF. ..LNIGDKFL LDANLGKGE
Rabbitpk    PILYRPVAVA LDTKGFERT GLIKSGTAE VELKKGATLK ITLDNAYMEK

```

FIGURA 4. Fragmento del alineamiento de las secuencias de piruvato cinasa de *C. glutamicum*, *E. coli* tipo II y Músculo de conejo. En la posición 117 se observa la sustitución del Glu por Lys (42).

Por otro lado, para determinar la abundancia de las piruvato cinasa independientes de potasio, se realizó un estudio filogenético extenso (41). De las 230 secuencias investigadas, 121 contienen Glu en la posición 117 (de acuerdo con la numeración de RMPK), 106 Lys, 2 Ser y una Arg. Es importante señalar que el árbol es dicotómico, es decir, las piruvato cinasa que contienen Glu están separadas de las que contienen Lys. Todas las enzimas del grupo que tienen Glu 117 que se han caracterizado presentan actividad dependiente de potasio, mientras que aquellas con Lys presentan actividad independiente. También se observa que los residuos en las posiciones 113, 114 y 120 covarían de acuerdo al residuo presente en la posición 117. Cuando está presente Glu, Thr113/Lys114/Thr120 se observan en el 80% de los casos, mientras que con Lys Leu113/Gln114/ y un residuo hidrofóbico (Ile,Leu,Val)120 se observan en el 77% de los casos (Figura 5).

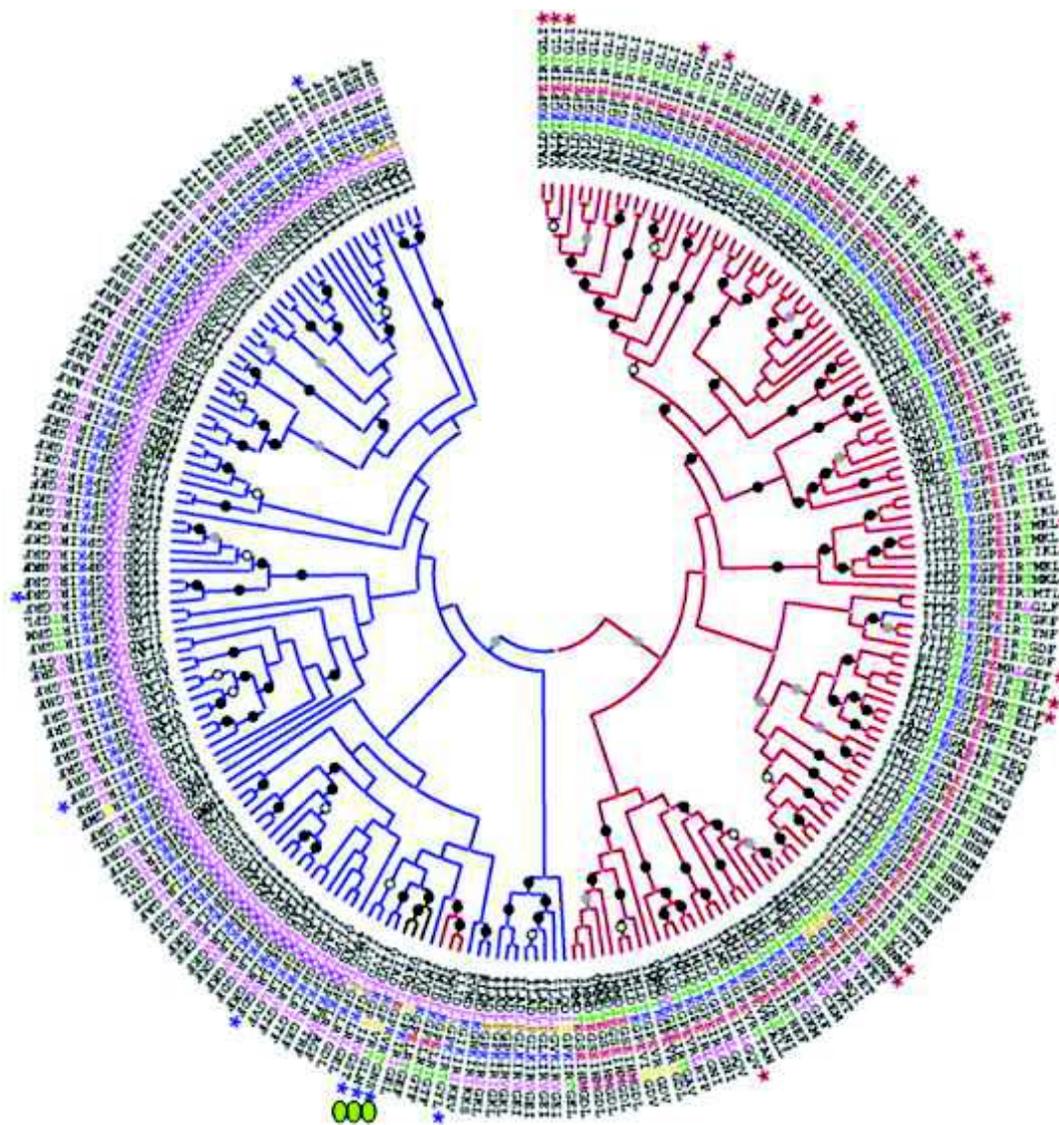


FIGURA 5. Árbol filogenético de la piruvato cinasa. Abriendo una ventana de 15 residuos vecinos a la posición 117 (posiciones 110 a 124); en la rama roja se agrupa las piruvato cinasa que presentan Glu en la posición 117, las que están marcadas con asterisco están caracterizadas y presentan dependencia de potasio. En la rama azul se agrupa las piruvato cinasas con Lys 117; las que están las marcadas con asterisco están caracterizadas y son independientes de potasio. Se observa que los residuos 113, 114 y 120 covarían de acuerdo al residuo presente en la posición 117, estos residuos se localizan en el sitio activo y la posición 120 se localiza en la región del asa que sube al dominio B. En círculos verdes se muestran las piruvato cinasas que presentan ser o arg en la posición 117 (41).

Laughlin y Reed (42) construyeron la mutante E117A de la RMPK y, como en la enzima silvestre, encontraron que su actividad fue absolutamente dependiente de K^+ . Este resultado confirmó la hipótesis del grupo de Reed, que establece que la piruvato cinasa requiere de una carga positiva para catalizar.

Sin embargo, las piruvato cinasas de *Pyrobaculum aerophilum* (PaPK) y *Thermoproteus tenax*, que presentan Ser en la posición 117 correspondiente, son independientes de potasio, a pesar de no poseer un residuo con carga positiva (43, 44). En el árbol filogenético estas enzimas se localizan en el brazo de las enzimas independientes de potasio (41) y pertenecen al subdominio Crenarchaeota del dominio de la Archaeas. El árbol filogenético analizado, incluyó solamente 18 secuencias de piruvato cinasas de Archaea, pero a la fecha el número de secuencias conocidas de estas piruvato cinasas es considerablemente mayor. En contraste con los residuos encontrados en todas las piruvato cinasas de los dominios de Bacteria y Eukarya (Glu117/Lys117), en el subdominio Crenarchaeota se encontraron otros residuos en esta posición. En el presente trabajo se realizó, una actualización del alineamiento de las secuencias de las piruvato cinasas de las Archaea (Fig 6A). Es importante resaltar que en estas secuencias no se observa la co-evolución del residuo 117 con los residuos 113,114 y 120 (41), ni los residuos que unen al potasio se encuentran conservados.

Estos datos sugieren que la actividad independiente de potasio de las piruvato cinasa de las Crenarchaeota es el resultado de un mecanismo diferente al que involucra una carga positiva interna suministrada por el grupo ϵ -amino de una Lys (42). Para explicar cómo funciona una piruvato cinasa que no tiene carga en su residuo 117, se evaluaron las propiedades cinéticas, la estabilidad térmica, y se realizaron estudios de dinámica

molecular, de la piruvato cinasa del hipertermófilo *Thermofilum pendens* (*TpPK*), que presenta un residuo hidrofóbico (Val70) en la posición correspondiente al 117 de RMPK. Los resultados indican que en *TpPK*, el cierre del sitio activo y el arreglo de los residuos involucrados en la unión del nucleótido son independientes de la presencia de una carga positiva interna o de la presencia de K^+ y pueden estar relacionados con la estabilidad de la tapa.

Phylum Crenarchaeota.

En el árbol filogenético actualizado (Fig. 6A) se observa que las especies que presentan residuos diferentes a Glu y Lys en la posición 117 correspondiente, se agrupan en un brazo de la rama de las enzimas independientes de K^+ . Todas las especies de este brazo pertenecen al phylum Crenarchaeota, grupo filogenéticamente y metabólicamente menos diverso que el phylum Euryarchaeota. Las especies viven en ambientes de temperaturas superiores a los 110 °C, por lo que comúnmente son llamados hipertermófilos. Además son capaces de metabolizar azufre inorgánico. Estos organismos presentan una gran variedad de morfologías. Muchos tienen la habilidad de fijar dióxido de carbono como autótrofos o mixótrofos. Estas especies se encuentran frecuentemente en aguas termales y regiones volcánicas activas (45). *Thermofilum pendens*, que se ubica en este brazo de Crenarchaeotas, pertenece al orden Thermoproteales y es un hipertermófilo anaerobio dependiente de azufre. Fue aislado de una fumarola que emite gases sulfurosos en Islandia y forma filamentos delgados largos. Para su crecimiento *T. pendens* requiere un medio complejo y produce CO_2 y H_2S (46, 47).

OBJETIVOS

Objetivo general.

El objetivo de este trabajo es aportar conocimiento que ayude a explicar cómo llevan a cabo la catálisis las piruvato cinasas de Crenarchaeota independientes de K^+ que presentan un residuo sin carga positiva en la posición 117, empleando como modelo de estudio la PK de *T. pendens*.

Objetivos particulares

Construir un alineamiento y realizar un análisis filogenético de las secuencias disponibles de las piruvato cinasa de Archaea.

Clonación, expresión y purificación del producto del gen de la PK de *T. pendens*

Determinar las constantes cinética de la piruvato cinasa de *T. pendens* a concentraciones fijas y variables de sus sustratos PEP, ADP- M^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} , realizando estudios de velocidad inicial en ausencia de M^+ .

Determinar el mecanismo cinético de la piruvato cinasa de *T. pendens* en ausencia de M^+ utilizando como inhibidores sin salida el AMP y el oxalato.

Determinar la activación por efectores alostéricos clásicos como fructosa 1,6 bisfosfato, AMP y ribosa 5 fosfato.

Determinar la estabilidad térmica de la *TpPK* por calorimetría diferencial de barrido.

Obtención y purificación del Dominio B de la PK de *T. pendens*.

Estudiar por modelado y dinámica molecular la estructura y estabilidad de la *TpPK*.

Obtención y purificación de las mutantes V70E y V70K de la PK de *T. pendens*.

Determinar el efecto de sustituir Val70 por Glu o Lys en la catálisis de la PK de *T. pendens*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Reactivos.

Las endonucleasas y la DNA ligasa T4 se adquirieron de New England Biolabs (UK); la Taq DNA polimerasa platinum de Invitrogen life Technologies (MA, USA); la fosfatasa alcalina de camarón de Roche Applied Science, el kit de purificación de plásmidos Miniprep de QIAGEN(N.V.). La cepa de *E. coli* BL21 CodonPlus-pLysS, los vectores pMCSG7, pET-3a y todos los oligonucleótidos fueron adquiridos de Invitrogen. La RMPK y la lactato deshidrogenasa de músculo de puerco (LDH) se adquirieron como suspensiones de sulfato de amonio de Roche Applied Science (Mannheim, Germany); los antibióticos (ampicilina y cloranfenicol), el Mes, el TRIS y las sales de ciclohexilamonio de ADP y fosfoenolpiruvato (PEP), se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (USA). La sal de sodio de NADH fue convertida a sal de ciclohexilamonio por intercambio iónico siguiendo el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich).

Análisis de las secuencias.

Las secuencias de aminoácidos de la piruvato cinasa de las Archaea se obtuvieron por el buscador BlastP del sitio UnitProt (48) (<http://www.uniprot.org>). El alineamiento progresivo de secuencias múltiple se realizó con ClustalX versión 2 (49) (<http://www.clustal.org/clustal2/>). Como guía se construyó un alineamiento estructural utilizando el algoritmo VAST (50). El alineamiento estructural incluyó todas las PK no redundantes depositadas en el Proteín Data Bank (51). En el alineamiento de secuencia múltiple se incluyeron también las secuencias de proteínas no redundantes del análisis filogenético previo (41) y corregidas manualmente usando BioEdit (52)

(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Los análisis filogenéticos se realizaron usando el software MEGA5 (53) (<http://www.megasoftware.net>). Se usaron cuatro métodos para deducir las relaciones filogenéticas: máxima verosimilitud, máxima parsimonia, mínima evolución y vecino más cercano. Para el modelo de sustitución de aminoácidos descrito por Whelan and Goldman (54), se escogió el modelo de sustitución por distribución gama discreta con cinco categorías, debido a que éste da el valor más bajo con el criterio de información Bayesiana y con los valores del Criterio de Información Akaike (55) en MEGA5 (53). El valor del parámetro gamma (parámetro +G = 0.92) se estimó directamente de los datos en MEGA5. La confianza de las ramas internas del árbol filogenético se obtuvo utilizando el método de máxima verosimilitud, determinándose a través del análisis de bootstrap (500 réplicas).

Los logos de secuencia se construyeron usando el servidor WebLogo (<http://weblogo.threeplusone.com/>). Cada logo consiste de un apilamiento de las letras de los aminoácidos. El eje vertical de la gráfica de los logos muestra el apilamiento para cada posición en la secuencia. La altura de las letras dentro de un mismo apilamiento indica la frecuencia relativa de cada aminoácido en esa posición (56).

Clonación de la Piruvato cinasa de *Thermofilum pendens* (TpPK).

El gen de la piruvato cinasa de *T. pendens* (cepa Hrk) se amplificó a partir del DNA genómico por PCR usando los oligonucleótidos FW 5' TACTTCCAATCCAATGCTGCAAAAGTCAAGCTAGTAGCGCG-3' y Rv 5'-TTATCCACTTCCAATGTTACTCGCTCTTCACTCTCTCCACGG- 3'. Por medio del protocolo de ligación independiente de clonación (LIC) (57), el inserto fue introducido al vector de expresión pMCSG7, basado en el sistema pET que contiene una cola de seis

histidinas (His₆) en el extremo amino terminal y un sitio de corte de la proteasa Tobacco Etch Virus (TEV). El vector fue tratado con SspI seguido por la DNA polimerasa T4 en presencia de dGTP y el producto de PCR se trató con la polimerasa en presencia de dCTP. El producto de LIC se transformó en células competentes frescas de *Escherichia coli* XL-Gold. Para verificar la ausencia de mutaciones, el plásmido que contenía el inserto fue aislado y secuenciado.

Clonación del dominio B.

El fragmento que codifica al dominio B fue amplificado por PCR a partir del plásmido de *TpPK*, usando los oligonucleótidos FW 5'-TACCATATGAGGCTTGGAGAG-3' y RV 5'-ATTGGATCCGACG GTCACAGT-3'. El producto del PCR fue clonado en el vector pET-3a, usando dos enzimas de restricción (NdeI y BamHI). El vector pET-3a se transformó en células de *E. coli* XL-Gold. Para verificar la ausencia de mutaciones, los plásmidos fueron aislados y secuenciados.

Clonación de las mutantes V70E y V70K

Las mutantes V70E y V70K se construyeron empleando el método de mutagénesis sitio dirigida de Quick Change, siguiendo los protocolos de Stratagene usando el plásmido de la *TpPK*. Los oligonucleótidos mutagénicos para la V70E fueron Fw 5'-GCTGACCTTCAGGGACCCGAAATCAGGCTTGGAGAGTTCGCC- 3' y Rv 5'-GGCGAACTCTCCAAGCCTGATTTTCGGGTCCCTGAAGGTCAGC-3', mientras que para la mutante V70K se utilizaron los oligonucleotidos Fw 5'-GCTGACCTTCAGGGACCCAAAATCAGGCTTGGAGAGTTCGCC-3' y Rv 5'-GGCGAACTCTCCAAGCCTGATTTTGGGTCCCTGAAGGTCAGC- 3'. El inserto se introdujo en el vector pMCSG7, como se describió en el protocolo de clonación de la WT-PK.

Cultivo de las células y purificación de la *TpPK*.

El medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol se inoculó con células BL21 que contenían al plásmido CodonPlus-pLysS-*TpPK* a 37 °C, hasta alcanzar una absorbencia (A_{600}) de aproximadamente 0.4. La expresión de la enzima fue inducida con 0.5 mM de isopropil 1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) a 15 °C durante toda la noche. Las células de *E. coli* recombinantes fueron suspendidas en KH_2PO_4 50 mM pH 8, imidazol 10 mM, KCl 300 mM y media tableta de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science). Las células fueron lisadas por sonicación con un Sonicador 450 (Branson) por 2.5 min a 40 kHz. La suspensión fue centrifugada a 20,000 X g por 30 min y el sobrenadante fue calentado a 80 °C por 30 min, y la proteína precipitada fue desechada. El sobrenadante fue cargado en una columna His Trap FF y la enzima fue eluída con un gradiente lineal de imidazol (10-500mM). Las fracciones que presentaron actividad de PK (aproximadamente con 250 mM de imidazol), se juntaron y concentraron por filtración en membrana (Centricon 30,000 MWT) y después se desaló en una columna Hi Trap Desalting. Para cortar las colas de histidina (His_6), las fracciones se juntaron y se incubaron con la proteasa Tobacco Etch Virus (TEV) durante 48 h, con una relación 1:30 (*TpPK*:TEV). Después la enzima fue cargada en la columna His Trapp FF. Las fracciones que presentaban la mayor actividad se juntaron y concentraron. En este paso se recuperó menos del 0.5% de la *TpPK*. Por lo tanto, en las purificaciones subsecuentes, se omitió la incubación con la proteasa TEV. La enzima que se unió a la columna His Trap FF fue eluída con un gradiente lineal de imidazol. Las fracciones que presentaron la máxima actividad de PK se juntaron, concentraron (Centricon 30,000 MWT) y desalaron en la columna Hi Trap Desalting. Las fracciones se juntaron y cargaron en la columna DEAE sepharosa y la enzima fue eluída con un gradiente lineal de KCl (0-1M). La pureza de la *TpPK* eluida del gradiente de

imidazol fue del 89% (en este paso, la pureza de la *Tp*PK con y sin las colas His₆ fue similar), mientras que para la enzima obtenida después del paso del intercambio aniónico fue >95%, como se determinó por SDS-PAGE (12.5%). La caracterización de la proteína ESI por espectrometría de masas se realizó en el Research Resources Center de la Universidad de Illinois, Chicago. La enzima se precipitó con sulfato de amonio al 80% de saturación y se almacenó a 4°C. Para determinar el estado de oligomerización de la enzima se corrió un gel nativo azul (BN-PAGE) por toda la noche a 4°C como se describe en (58), usando 150 µg de proteína.

Cultivo de las células y purificación del Dominio B.

El medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol se inoculó con células BL21 que contenían al plásmido CodonPlus-pLysS-*Tp*PK y el cultivo se incubó a 37 °C hasta alcanzar una absorbencia (A_{600}) de aproximadamente 0.4. La expresión fue inducida con 0.5 mM de IPTG a 20 °C y las células fueron cosechadas después de que crecieron durante toda la noche. Las células de *E. coli* recombinantes fueron suspendidas en Tris-HCl 50 mM pH 7.0 y media tableta de inhibidores de proteasas Complete (Roche Applied Science). Las células fueron lisadas por sonicación con un Sonifier 450 (Branson) por 2.5 min a 40 kHz. La suspensión fue centrifugada a 20,000 X g por 30 min. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio a 37% de saturación y se colectó el sobrenadante resultante, mismo que fue precipitado por segunda vez con sulfato de amonio a 80% de saturación. El paquete fue resuspendido y dializado contra Tris-HCl 50 mM pH 7.0. Los últimos pasos de purificación consistieron en cromatografía de intercambio iónico usando DEAE y exclusión molecular Superdex 75. Para localizar la proteína se realizó un gel SDS-PAGE, el cual permitió juntar y concentrar las fracciones con un peso molecular

~10,000 Da. El dominio B presentó una pureza del 95% como se observó en el gel SDS-PAGE al 12.5%.

Cultivo de las células y purificación de las mutantes V70E y V70K

Se siguió el protocolo empleado para la *TpPK*.

Espectrometría de masas de la *TpPK*

A partir del gel utilizado para la electroforesis se cortó la banda de proteína con el peso molecular correspondiente a la *TpPK*. La muestra se digirió en el gel con tripsina y después fue inyectada en el sistema integrado nano-LC-ESI-MS/MS (cuadrupolo/tiempo de vuelo, Ultima API, Micromass, Manchester, UK). Los iones de péptidos obtenidos se analizaron con el programa Mascot (www.matrixscience.com) usando las bases de datos de NCBI nr y EST. Solamente se reportaron las proteínas con un score significativo de iones (>46). Las secuencias de todos los péptidos corresponden a la *TpPK*. Estos experimentos fueron realizados en la Universidad de Northwestern, Evanston, Illinois, Estado Unidos.

Espectrometría de masas del dominio B de la *TpPK*

Se siguió el protocolo empleado para la *TpPK*, con excepción de que fueron realizados por la Dra. Marie Christine Slommiary de la Université des Sciences at Technologies de Lille, Villeneuve d' Ascq, Francia.

Ensayo de la actividad de la piruvato cinasa

Las enzimas libres de sulfato de amonio se obtuvieron como se describió previamente (59). Los contaminantes de la mezcla de reacción NH_4^+ , Na^+ y K^+ estuvieron por debajo del

límite de detección (10 μM) como se indica en (23). La formación de piruvato se midió a 45°C en un sistema acoplado con LDH y NADH (60). Las mezclas de reacción contenían Mes-Tris 50mM, pH 6.0, las concentraciones de los cationes (Mg^{2+} y Mn^{2+}), los sustratos (PEP y ADP), y los inhibidores (oxalato y AMP) se describen en cada experimento. Las concentraciones del complejo Mg-ADP y de Mg^{2+} libre se calcularon con el software CHELATOR (61). Las concentraciones del complejo Mn-ADP y Mn^{2+} libre se calcularon usando la K_d para Mn^{2+} (62). Las concentraciones del PEP ionizado se calcularon considerando un valor de pK de 6.3 (63). Para mantener una fuerza iónica constante de 0.25 M en todos los ensayos de actividad (PEP, Mg-ADP, Mn-ADP, los cationes divalentes libres) se adicionó $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$. En los ensayos de inhibición por oxalato la concentración de LDH adicionada a la mezcla de reacción fue cinco veces mayor para contrarrestar el efecto inhibitorio que tiene el oxalato sobre la LDH. La actividad específica no se incrementó al adicionar 5 y 10 veces la cantidad de LDH. La mezcla de reacción fue incubada por 10 minutos hasta alcanzar la temperatura deseada (45°C) antes de iniciar la actividad con la $Tp\text{PK}$.

Estudios cinéticos

Se determinó la velocidad inicial de la $Tp\text{PK}$ con y sin inhibidores sin salida (oxalato y AMP). Los patrones de velocidad se obtuvieron a varias concentraciones de PEP y concentraciones fijas variables de Mg-ADP. Los estudios de inhibición se obtuvieron variando la concentración de uno de los sustratos con el segundo fijo y a concentraciones fijas variable del inhibidor.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los experimentos se realizaron en un Calorímetro Diferencial de Barrido Valery Plotnikov (VP-DSC) modelo MicroCal (Northampton, MA). Las soluciones de proteína se prepararon con Tris-HCl 50 mM pH 7.6. En la celda de referencia se puso el mismo amortiguador en el que se preparó la enzima. A menos que se indique otra cosa, la concentración de proteína fue de 1 mg/mL y la velocidad de barrido de 1.5 °C/min. Los experimentos se realizaron en un intervalo de temperatura de 25 a 120 °C.

Modelado y análisis estructural.

Para modelar las conformaciones abierta y cerrada de la RMPK, se emplearon los códigos 2G50 y 1A5U respectivamente, mientras que para la *PaPK* se empleó el código 3QTG, esta última es la única estructura de una piruvato cinasa independiente de K⁺ que está reportada hasta el momento. Es relevante mencionar que en la estructura de *PaPK*, a pesar de no poseer un ligando en el sitio activo, se observa densidad electrónica para una de los dos subunidades que se encuentran en la unidad asimétrica, el dominio B se encuentra cercano al dominio A en una conformación semicerrada. Este resultado difiere de lo observado en las enzimas mesófilas, en las que la tapa no se observa en ausencia de ligandos por presentar una alta movilidad.

Se empleó modeller 9.2 (64) para modelar las estructuras de la *TpPK* y la mutante F89I/F108I/F109C/F127L, usando como templado la estructura de la *PaPK* (65); las secuencias de las enzimas *TpPK* y *PaPK* presentaron una identidad del 30.6%. Con Molprobit se validó la estructura del modelo de la *TpPK* (66). Para cuantificar los puentes de Hidrógeno se empleó el módulo Find H-bound de UCSF Chimera versión 1.8.1 (67). Para cuantificar los puentes salinos, primeramente se seleccionaron los átomos

involucrados en este tipo de interacciones (Ng⁺, N3⁺, N2⁺, O2⁻, O3⁻), después se establecieron las interacciones usando el mismo módulo Find H-bound. Las interacciones Pi-Pi y Pi-cación se cuantificaron usando Yasara version 18.9.8 (“Yet Another Scientific Artificial Reality Application,” <http://www.yasara.com>) en el módulo de interacciones vista. Con Ligplot 4.5.3 (68) se identificaron las interacciones específicas entre el dominio A y el dominio B; en el módulo de interacciones de la interfase dominio-dominio se definieron los dominios de la siguiente manera: dominio B 66-164 (*TpPK*), 81-177 (*PaPK*) y 116-223 (*RMPK*); dominio A 1-65 y 165-334 (*TpPK*), 1-80 y 178-346 (*PaPK*) y 43-115 y 224-387 (*RMPK*). Usando AMBER12 se corrieron las simulaciones de dinámica molecular (69). Los modelos se prepararon con “tleap” AMBER FF 12SB empleando el modelo de campo de fuerza y solvente implícito. Brevemente, la energía del sistema fue minimizada con 5000 pasos de inclinación descendente seguida de 5000 pasos de gradientes conjugados. Después, se aumentó la temperatura del sistema de 0 hasta la temperatura de simulación (300, 400 o 500 K) por arriba de 200 ps. La simulación inició después de este paso (50 ns). Para todos los pasos de la simulación se usó un termostato Langevin con una frecuencia de colisión de 1 por picosegundo, y SHAKE se usó solamente para los átomos de hidrógeno con un tiempo de paso de 2 femtosegundos. Todas las simulaciones se corrieron en GPUs (70). El análisis de los contactos nativos se realizó con Carma (71,72).

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis filogenético.

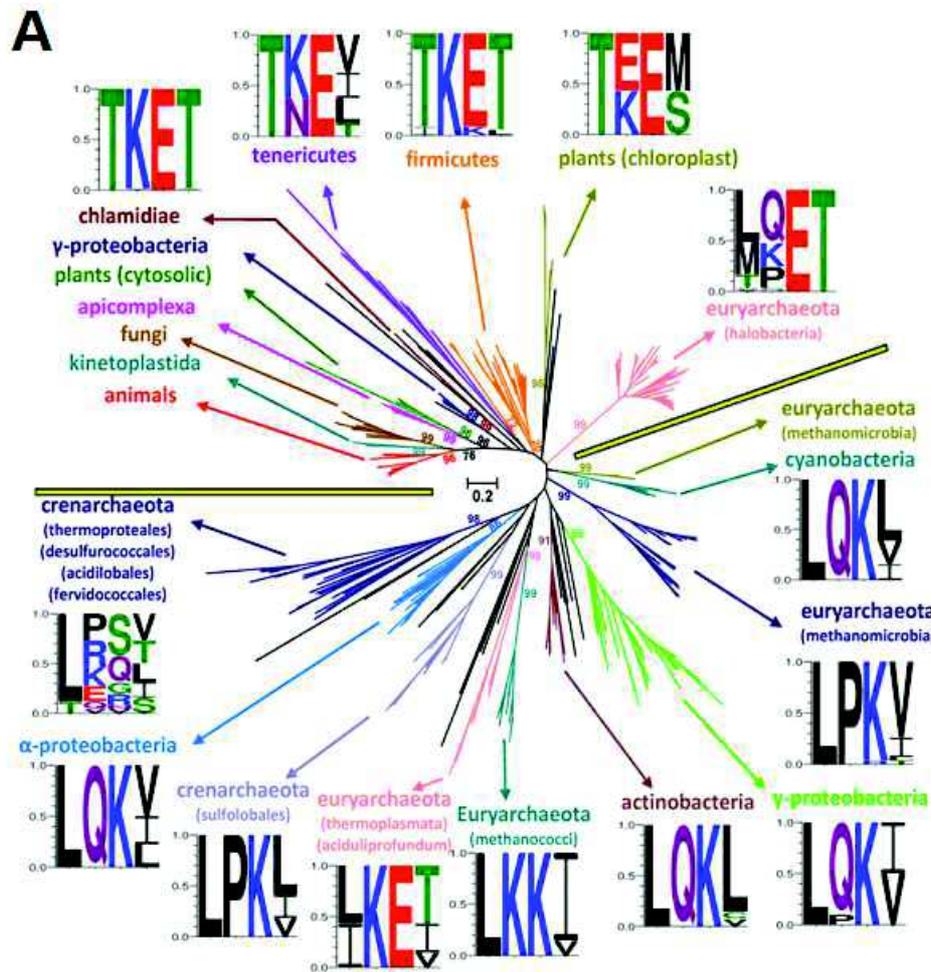
En el análisis filogenético del 2004 (41) se reportaron 18 secuencias de Archaea, de las cuales tres presentaron residuos diferentes a Lys o Glu en la posición 117 correspondiente a la RMPK y se agruparon en la rama independiente de K⁺ (Lys). Estas especies son: *Pyrobaculum aerophilum*, *Termoproteus tenax* y *Aeropyrum pernix* y presentan Ser, Ser y Arg, respectivamente. Con el fin de conocer qué tan frecuente son estas enzimas que presentan residuos diferentes a Lys o Glu, se recuperaron las secuencias de las Archaea reportadas hasta Marzo del 2014 en el NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se realizó un análisis filogenético nuevamente. La búsqueda encontró 191 secuencias nuevas de Archaea y el análisis incluyó un total de 426 secuencias de la piruvato cinasa no redundantes distribuidas en los tres dominios (71 de Eukarya, 151 de Bacteria y 204 de Archaea). Es importante señalar que, sin excepción, las piruvato cinasa de las Archaea corresponden a una copia de gen. La Figura 6A muestra que las secuencias se dividen en dos grupos, como en el primer árbol publicado (41): las que presentan Glu en la posición 117 (dependientes de K⁺) y las que presentan Lys (independientes de K⁺). El análisis de logos reveló que las posiciones 113, 114 y 120 covarían dependiendo del residuo presente en la posición 117. En coincidencia con estudios anteriores (41,42), las piruvato cinasas dependientes de K⁺ presentan T113, K114 y T120, mientras que las piruvato cinasa independientes de K⁺ poseen L113, (P/Q)114 y (L/V/I) 120. Estos residuos se localizan cerca del sitio de unión al K⁺, en la región de la bisagra y están directamente involucrados en el movimiento de la tapa sobre el sitio activo (dominio B).

La *TpPK* se ubica en el grupo de las piruvato cinasas del filo Crenarchaeota, en un brazo que incluye a las secuencias de las enzimas de thermoproteales, desulfurococcales, acidilobales y fervidicoccales (Fig 6A). El brazo se localiza en la rama de las enzimas independientes de potasio. Como característica particular, en este brazo se agrupan todas las enzimas que presentan residuos diferentes a Lys, tales como Ser, Gln, Arg, Asn, Gly y Val, (Fig 6A). La *TpPK* tiene Val 70, mientras que *Pyrobaculum aerophilum* y *Thermoproteus tenax* tienen Ser y son independientes de potasio. Es interesante mencionar que en este brazo de las Crenarchaeota, la covariación de los residuos en las posiciones 113, 114 y 120 no está conservada (6B). De las piruvato cinasa de Crenarchaeota, solamente las *PaPK* y *TpPK* comparten la covariación de los residuos 113, 114 y 120 con la de las enzimas independientes de potasio. Las otras secuencias de piruvato cinasas de este grupo solamente comparten uno o dos residuos de esta firma independiente de potasio. Como se describió previamente (41), en las ramas de las enzimas dependientes e independientes de potasio, los residuos que forman el sitio de unión a potasio están muy conservados (Fig. 6C), con excepción de la Thr 113 que se observa casi exclusivamente en las PKs dependientes de potasio. En el caso de las Crenarchaeota, solamente dos de los cuatro residuos que posiblemente coordinan al K^+ están conservados (O δ 1 de Asn34 y O δ 2 de Asp65), y solamente el 30% de las secuencias tienen el tercer residuo (O γ de Ser36) (Fig 6B). Estos resultados sugieren que la PK de las Archaea no coordina al K^+ . Para visualizar esta región en la estructura de la enzima de *Pyrobaculum aerophilum* (*PaPK*), se comparó el sitio de unión al potasio de la RMPK (1A49, subunidad B), y del sitio putativo de la *PaPK* (3QTG) (Fig 6D). A pesar de no tener las distancias de unión al K^+ en la estructura vacía de la *PaPK*, se observa claramente que en la RMPK las distancias de los átomos de oxígenos que coordinan a la esfera del K^+ son más cortas en comparación con las distancias

de los residuos de la *PaPK* que estarían involucrados en la coordinación del catión monovalente. Además, en la *RMPK* las distancias entre el O δ 2 de Glu117 y el O γ de Ser 76 es 5.1 Å, mientras que en *PaPK* las distancias entre O γ de Ser85 y C β de Ala 50 es 9.3 Å. Estos datos muestran que el Glu117 se encuentra cercano al sitio de unión del potasio y es un residuo clave en la dependencia por el catión monovalente. Por el contrario, en la *PaPK* la posición Ser85 está demasiado lejos como para afectar al sitio del K⁺. Es relevante considerar que en la *RMPK* (1A49, subunidad B), el ángulo de rotación del dominio B con respecto al dominio A es de 41°; esta subunidad presenta la conformación más abierta entre los dominio A y B reportado para la *RMPK* (15), las distancias entre el O δ 2 del Glu117 y el O γ de la Ser 76 es 5.1 Å, y la distancia con el oxígeno del carbonilo de la Thr 113 es de 7.7 Å. Estas distancias son cortas comparadas con las distancias mostradas en la *PaPK*, figura 6D. Aunque no se puede hacer una comparación estricta entre estas dos estructuras debido a la falta de información concerniente al ángulo de rotación del dominio B sobre el dominio A en la *PaPK* (3QTG) (65), la Ser no puede ocupar el mismo sitio que el Glu debido a la diferencia de tamaño de los dos residuos.

Por otro lado, es importante resaltar que con excepción de las Halobacterias (subdominio Euryarchaeota), todas las piruvato cinasa del dominio Archaea están localizadas en el grupo independiente de K⁺. Esta excepción es interesante, porque las halobacteria comprende halófilos extremos que crecen en ambientes hipersalinos (73). Por consiguiente, estas archaea halofílicas acumulan concentraciones molares de KCl en su citoplasma como un osmoprotector (74). De tal modo que muchas enzimas de halófilos extremos, para ser estables y que sus enzimas tengan actividad, requieren la presencia de al menos 1 M de sal (75, 76). Los aminoácidos cargados negativamente, como Glu, estabilizan la interacción

con K^+ . En estos organismos, el potasio se acumula en la superficie de la proteína y esto explica la naturaleza halofílica obligada de estas enzimas (75-77). Por lo tanto, la sustitución de Lys por Glu en la posición 117 puede ser considerada una ventaja en estas archaeas halofílicas.



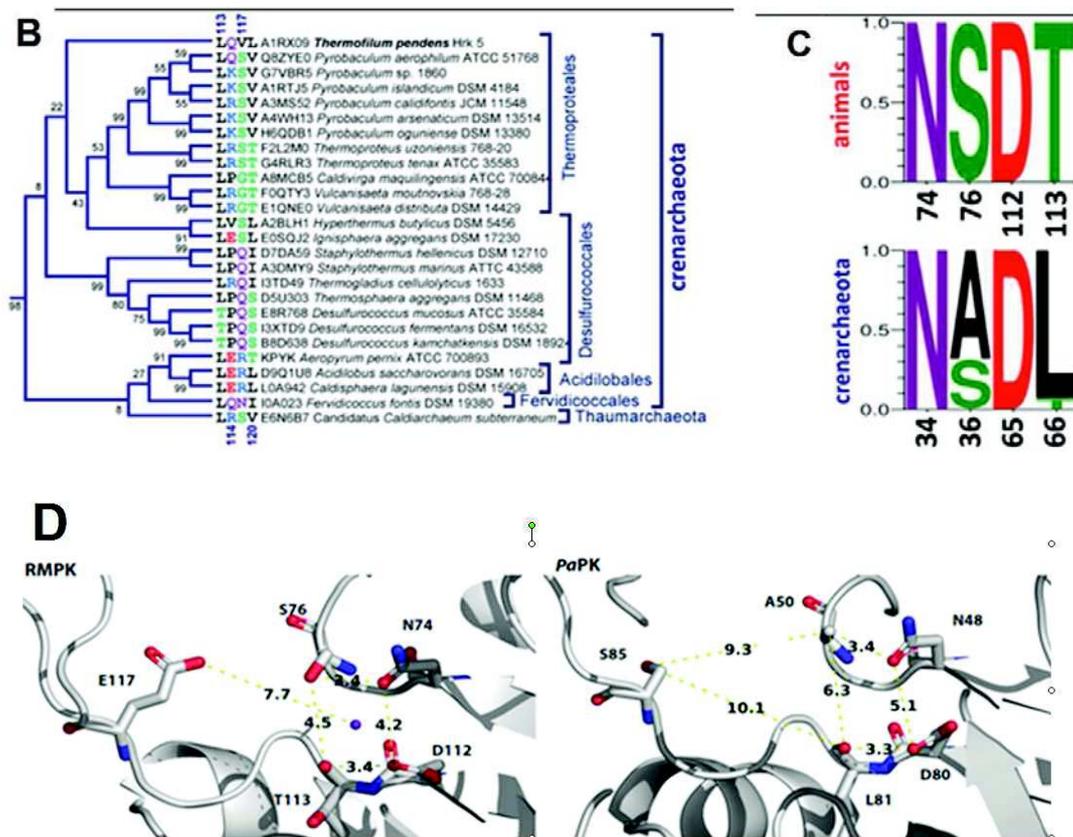


FIGURA 6. Análisis filogenético de las piruvato cinasa y logos de los aminoácidos localizados en la región de la bisagra cerca del sitio de unión a K^+ . **A.** Árbol filogenético sin raíz que incluye todas la secuencias disponibles de la piruvato cinasa del dominio de las Archaea. Se incluyen también como grupos externos, las secuencias de las enzimas de los dominios de las Bacteria y las Eukarya. Las ramas están coloreadas de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen. En el árbol están los logos que muestran la conservación de los residuos 113, 114, 117 y 120 (de acuerdo con la numeración de la RMPK) y están junto a cada grupo taxonómico. **B** Se muestra un brazo de la rama de las enzimas independientes que contiene al subdominio de las Crenarchaeota; la *TpPK* está incluida en este brazo, y se muestran los residuos presentes en las posiciones 113, 114, 117 y 120 (de acuerdo con la numeración de RMPK), así como las especies y los números de acceso. **C** Se muestra el comparativo de los logos de los residuos que coordinan al K^+ en animales (de acuerdo con la numeración de la RMPK) y al subdominio Crenarchaeota (de acuerdo con la numeración de la *TpPK*). **D.** Sitio de unión al potasio en la RMPK (PDB 1A49, subunidad B) y residuos de coordinación hipotéticos del catión monovalente en la *PaPK* (PDB 3QTG). En la RMPK, el potasio se muestra en morado y las distancias del K^+ al O_γ de la Ser 76, $O_{\delta 1}$ de la Asn 74, el $O_{\delta 1}$ del Asp 112 y el oxígeno carbonílico de la Thr 113 son 3.1, 2.6, 2.6 y 2.8 Å, respectivamente (no se muestra en la figura). Las distancias que se muestran son entre los residuos de coordinación y las del $O_{\delta 2}$ del Glu 117 al K^+ (RMPK) o las del O_γ de la Ala50 y el oxígeno carbonílico de la Leu81 (*PaPK*).

Purificación de la piruvato cinasa de *Thermofilum pendens* y determinación de su peso molecular.

Cuando la piruvato cinasa se purificó e incubó en presencia de la proteasa TEV, se obtuvo una recuperación de proteína menor al 0.5 %. Por lo tanto, a menos que se indique, los experimentos se realizaron con la enzima con los 23 residuos adicionales de la His₆. Para

confirmar la pureza de la enzima se realizó un SDS-PAGE y sólo se observó una banda de masa molecular de ~50 kDa (Fig. 7A). El estado oligomérico de la *TpPK* se determinó por BN-PAGE (58); el gel mostró una banda nativa de aproximadamente 200 kDa (Fig 7B), indicando que, como en la mayoría de las PK conocidas, el estado de oligomerización de la *TpPK* es un homotetrámero (15). La espectrometría de masas reportó una relación m/e⁻ de 53,965 Da, del cual 51,340 corresponden al monómero de la *TpPK* y 2,624.7 Da al de las colas His₆ y el sitio de corte de la proteasa TEV.

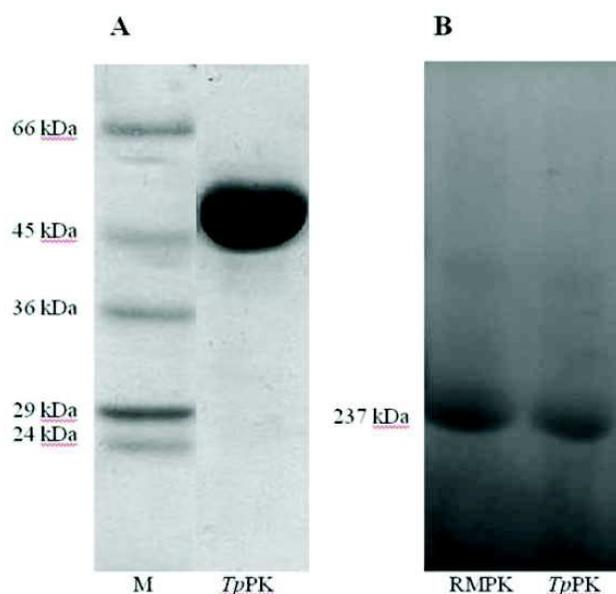


FIGURA 7. A. SDS PAGE y B. BN PAGE de la piruvato cinasa de *Thermofilum pendens*. M, marcador de peso molecular; *TpPK*, piruvato cinasa de *Thermofilum pendens*.

Propiedades catalíticas de la *TpPK*

Para determinar si las colas His₆ afectaban a la actividad de la *TpPK*, se determinaron las constantes cinéticas de la enzima por el complejo Mg-ADP sin y con colas His₆. Las *K_m* obtenidas fueron de 0.092 ± 0.012 mM y 0.14 ± 0.013 mM, y las *V_{max}* de 175 ± 6 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ y 176 ± 5 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$, sin y con cola, respectivamente. De esta manera

descartamos un posible efecto de los 23 residuos extras sobre el comportamiento cinético de la *TpPK*.

Cinética de la *TpPK* en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+}

Los iones metálicos divalentes son esenciales en la transferencia del grupo fosfato del PEP al Mg-ADP, por lo que se estudió su efecto sobre la actividad de la *TpPK* (27). Se exploró el Mn^{2+} , el ión divalente presente en el oceano Archeano en los inicios de la vida, (78), y el Mg^{2+} , este último de relevancia fisiológica. Los ensayos se realizaron en ausencia de cationes monovalentes. Las constantes cinéticas en presencia de estos cationes divalentes se muestran en la Tabla 1. Aunque la actividad máxima fue 4.4 veces mayor con Mg^{2+} que con Mn^{2+} , la $K_{0.5}$ para Mn^{2+} fue 250 veces menor que la K_m para Mg^{2+} y sin un cambio significativo en las K_m s de los sustratos. Este resultado muestra que la *TpPK* prefiere al Mn^{2+} como el catión divalente, y es consistente con la geoquímica del océano de las Archaea (78). La $K_{0.5}$ de la *TpPK* para Mn^{2+} (20 μM), es una de las más pequeñas reportadas a la fecha. En comparación la $K_{0.5}$ para Mn^{2+} de la PK de *Termoproteus tenax* es 800 μM , mientras que la $K_{0.5}$ para Mg^{2+} fue la misma para ambas enzimas (~ 5 mM) (43). Además, la PK de *T. tenax* presentó el mismo valor de V_{max} (45 $\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$) a 50°C, en presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} (43).

TABLA 1.

Constantes cinéticas de la *TpPK* con Mg^{2+} y Mn^{2+} .
 Los datos con Mg^{2+} de la Figura 9 se ajustaron globalmente (regresión no lineal, Origin version 6.0) con la ecuación que describe un mecanismo al azar en equilibrio rápido $v=V_{max}[A][B]/(K_a K_b + K_a [B] + K_b[A] + [A][B])$, donde v presenta la velocidad inicial, A es PEP^{3-} , B es ADP-Mg, K_a y K_b son las constantes de Michaelis-Menten para PEP^{3-} y ADP-Mg respectivamente. Los datos con Mn^{2+} se ajustaron con la ecuación de Hill $v=V_{max}*[S]^n/K_{0.5}^n+[S]^n$. Donde S indica la concentración de sustratos, PEP^{3-} , ADP-Mn o Mn^{2+} .

	Mg^{2+}		Mn^{2+}	
V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$)	183 ± 8		41 ± 1.9	
	K_m (mM)	n	$K_{0.5}$	n
PEP^{3-}	0.38 ± 0.03	1.0	1.0 ± 0.03	1.2 ± 0.04
M^{2+} -ADP	0.16 ± 0.01	1.0	0.2 ± 0.02	1.2 ± 0.3
M^{2+}	5.0 ± 0.28	1.8 ± 0.4	0.02 ± 0.001	1.6 ± 0.2

Efecto con los moduladores alostéricos.

Como se ha reportado para otras PKs independientes de K^+ , la *TpPK* presentó cooperatividad por PEP y los cationes divalentes (43, 44, 79-85). Con el objetivo de determinar si, además de la cooperatividad, la *TpPK* era una enzima alostérica, se determinó si la unión del PEP se modificaba por los moduladores alostéricos clásicos (ribosa 5-P, AMP y fructosa 1,6-bisfosfato). En presencia del complejo Mn-ADP (2 mM) y Mn^{2+} libre (0.2 mM), la adición de ribosa 5-P (5mM) no presentó aumento en la V_{max} , ni se observó efecto en la $K_{0.5}$ del PEP; aunque el número de Hill aumentó 1.5 veces (Tabla 2, figura 8A). En presencia de fructosa 1,6- bisfosfato (10 mM), la $K_{0.5}$ del PEP aumento 4 veces y la V_{max} aumentó 34%, pero no tuvo efecto en el número de Hill (Tabla 3, Fig. 8B). Por otro lado, como se describe en los estudios de inhibición sin salida, el AMP se comportó como un inhibidor competitivo del complejo Mg-ADP con una K_i de 35 ± 1.2 mM. En contraste con las otras piruvato cinasas de archaea hipertermofílicas, que no respondieron a los efectores alostéricos clásicos (43,44), la *TpPK* mostró un cambio en sus parámetros cinéticos en presencia de los efectores. Cabe señalar que las concentraciones de los efectores alostéricos que se emplearon están muy arriba de las concentraciones fisiológicas que comúnmente se encuentran dentro de las células (μ M).

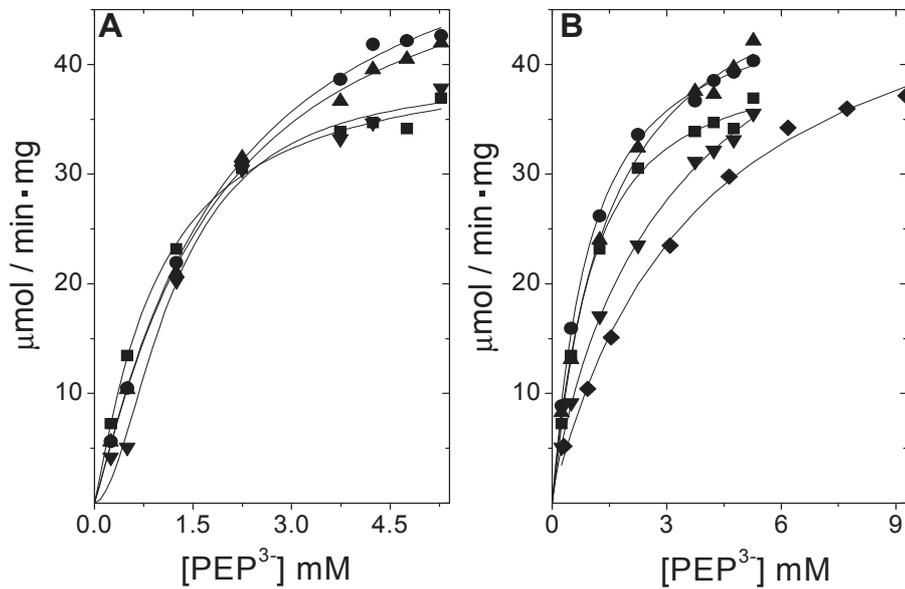


FIGURA 8. Efecto de los moduladores alostéricos ribosa 5-fosfato (A) y fructosa-1,6-bisfosfato (B) a concentraciones diferentes sobre la cinética del PEP³⁻ en la *TpPK*. La mezcla de reacción contiene MES-HCl 50 mM, pH 6.0, NADH 0.2 mM, Mn²⁺ libre, ADP-Mn 3.0 mM y LDH 8 μg/ mL. En el gráfico A, las concentraciones de ribosa 5-fosfato son 0 (■), 0.5 (●), 1 (▲) y 5 (▼). En el gráfico B, las concentraciones de fructosa- 1,6-bisfosfato son 0 (■), 0.5 (●), 1 (▲), 5 (▼) y 10 mM (◆). La reacción se inició con la adición de la piruvato cinasa. Las cantidades de enzima adicionada están en el rango de 0.15 a 1.2 μg/ mL.

TABLA 2. Constantes cinéticas del PEP³⁻ a concentraciones diferentes de Ribosa-5-fosfato. Los datos de la Fig. 2 se ajustaron (regresión no lineal Origin version 6.0) a la ecuación de Hill $v=V_{max}*[S]^n/K_{0.5}^n+[S]^n$. Se muestra la media y desviación estándar de cinco experimentos.

Rib-5-P (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)	$K_{0.5}$ (mM)	n
0	41 \pm 2	0.95 \pm 0.11	1.2 \pm 0.11
0.5	58 \pm 4	1.94 \pm 0.3	1.1 \pm 0.08
1	54 \pm 4	1.81 \pm 0.3	1.12 \pm 0.9
5	39 \pm 2	1.21 \pm 0.2	1.83 \pm 0.3

TABLA 3. Constantes cinéticas por el PEP³⁻ en presencia de una concentración fija variable de Fructosa-1,6-bisfosfato. Los datos de la figura se ajustaron mediante regresión no lineal (Origin version 6.0) a la ecuación de Hill $v=V_{max}*[S]^n/K_{0.5}^n+[S]^n$. Se muestra la media y desviación estándar de cinco experimentos.

Fru-1,6-BP (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)	$K_{0.5}$ (mM)	n
0	41 \pm 2	0.95 \pm 0.11	1.2 \pm 0.11
0.5	47 \pm 2	0.96 \pm 0.08	1.1 \pm 0.06
1	53 \pm 5	1.5 \pm 0.36	0.96 \pm 0.11
5	61 \pm 7	3.9 \pm 1.1	0.86 \pm 0.06
10	55 \pm 6	4 \pm 1.1	0.97 \pm 0.1

Estudios de velocidad inicial de la *Tp*PK.

La RMPK, en presencia de potasio sigue un mecanismo cinético al azar en equilibrio rápido (25, 28, 29); y éste cambia a ordenado en equilibrio rápido cuando el potasio está ausente con PEP como primer sustrato (17). Por otro lado, la mutante E117K presenta un mecanismo cinético al azar en equilibrio rápido en ausencia de K^+ (17). Estos resultados muestran que, en la enzima de músculo, la carga interna positiva o el K^+ induce el cierre del dominio B sobre el sitio activo y el arreglo de los residuos involucrados en la unión del nucleótido, permitiendo la unión al azar del PEP y del Mg-ADP en el sitio activo (17). En este contexto, se determinó el mecanismo cinético de la *Tp*PK en ausencia de catión monovalente y en presencia de Mg^{2+} . Los experimentos se llevaron a cabo a concentraciones variables de uno de los sustratos y a concentraciones fijas variables del otro. Los gráficos doble recíprocos de la velocidad inicial vs las concentraciones variables de PEP ionizado, intersectaron en el eje $1/S$ y a la izquierda del eje $1/v$ (Figura 9A). Cuando se variaron las concentraciones del complejo Mg-ADP, las líneas intersectaron en

el eje $1/s$ y a la izquierda del eje $1/v$ (Fig. 9B). Estos resultados indican dos posibles mecanismos cinéticos, ordenado en estado estacionario o al azar en equilibrio rápido. Las constantes cinéticas obtenidas se resumen en la Tabla 4. Para conocer el mecanismo cinético de la *TpPK* se realizaron los estudios de inhibición sin salida.

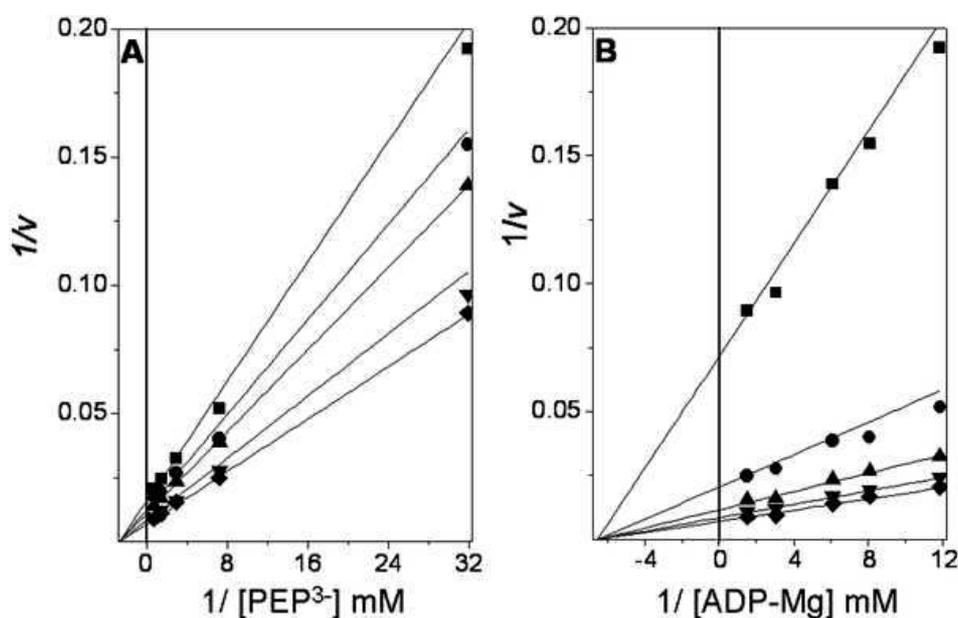


FIGURA 9. Gráficas de dobles recíprocos de la velocidad inicial de la reacción de *TpPK*. El medio de reacción de 3 mL con MES-HCl, 50 mM, pH 6.0, NADH 0.24 mM, Mg^{2+} libre 30 mM y LDH 8 $\mu\text{g/ml}$. En las abscisas de cada gráfica se muestra el recíproco del PEP ionizado y del complejo ADP-Mg respectivamente. **A.** Las concentraciones fijas de ADP-Mg fueron 0.084 (\blacksquare), 0.12 (\bullet), 0.16 (\blacktriangle), 0.37 (\blacktriangledown) y 0.67 mM (\blacklozenge). **B.** Las concentraciones fijas de PEP^{3-} fueron 0.031 (\blacksquare), 0.14 (\bullet), 0.34 (\blacktriangle), 0.69 (\blacktriangledown), y 1.30 mM (\blacklozenge). La concentración de Mg^{2+} libre se mantuvo constante a 30 mM. Para mantener la fuerza iónica se adicionó $(CH_3)_4NCl$ a una concentración final de sal de 0.25M. La reacción fue iniciada con la adición de la *TpPK*. La concentración de *TpPK* fue de 0.32 y 0.16 $\mu\text{g/mL}$ para las tres bajas y las dos altas concentraciones de sustrato, respectivamente.

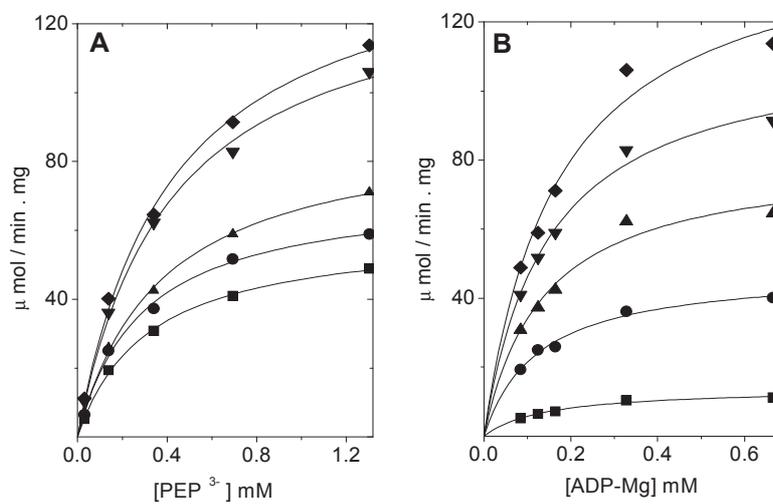


FIGURA 10. Gráficos primarios no lineales para PEP³⁻ (A) y ADP-Mg (B) de la *TpPK*, en la figura 9 A y B se describen las condiciones experimentales.

TABLA 4.

Patrones de intersección, mecanismo cinético y constantes cinéticas de la *TpPK*.

Los patrones de intersección se tomaron de las gráficas de dobles recíprocos de velocidad inicial. Los datos de la Fig. 2 se ajustaron globalmente a la ecuación que describe un mecanismo al azar en equilibrio rápido como se describe en la tabla 1. Los coeficientes de especificidad k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$), están expresados en forma logarítmica.

Patrones de intersección de velocidad inicial		Mecanismo cinético	V_{max}	K_m PEP ³	K_m ADP -Mg	k_{cat}	Log k_{cat}/K_m PEP ³ -	Log k_{cat}/K_m ADP- Mg
$1/v$ versus 1/PEP ³ -	$1/v$ versus 1/ADP- Mg		$\mu\text{mol} /$ $\text{min} \cdot \text{mg}$	mM	mM	s^{-1}	$M^{-1} s^{-1}$	$M^{-1} s^{-1}$
Intersecta n a la izquierda del eje $1/v$ y sobre el eje $1/S$	Intersectan a la izquierda del eje $1/v$ y sobre el eje $1/S$	Al azar en equilibrio rápido	183 ± 8	0.38 \pm 0.03	0.16 \pm 0.01	626	6.22	6.59

Estudios de inhibición sin salida.

Los estudios de inhibición sin salida son herramientas poderosas para dilucidar los mecanismos cinéticos de las enzimas (86). En este trabajo se usó oxalato y AMP como análogos sin salida del PEP (87) y ADP, respectivamente. Los patrones de inhibición de oxalato vs PEP ionizado y Mg-ADP fueron competitivo (Fig. 11A) y no competitivo (Fig. 11B), respectivamente. En presencia de AMP la inhibición con PEP ionizado y Mg-ADP, fue mixta (Fig. 11C) y competitiva (Fig. 11D), respectivamente. Los datos se ajustaron globalmente a las ecuaciones que describen inhibición competitiva lineal, inhibición no competitiva lineal o inhibición mixta lineal. Los patrones y las constantes de inhibición se muestran en la Tabla 5. En conjunto, los datos muestran que el oxalato es un inhibidor competitivo con respecto al PEP, mientras que el AMP es un inhibidor competitivo con el Mg-ADP. Esto indica que los análogos y los sustratos se unen al mismo sitio. Dado que el oxalato es un inhibidor no competitivo con respecto al Mg-ADP, se puede concluir que el oxalato forma un complejo ternario no productivo provocando una disminución de la V_{max} , sin afectar la unión del Mg-ADP. El mismo argumento se mantiene para el AMP con respecto al PEP, excepto que el patrón de inhibición observado (Fig. 5C) fue de tipo mixto con una $\alpha < 1$, afectando la K_i de la inhibición. Esta diferencia indica que el PEP tiene mayor afinidad por el complejo binario enzima-AMP que por la enzima libre. Por lo tanto, estos resultados indican que la *TpPK* sigue un mecanismo cinético al azar en equilibrio rápido, como se reportó para la RMPK en presencia de K^+ (17, 25, 28, 29) o en la mutante E117K-PK en ausencia de K^+ (17). Este hallazgo muestra que el PEP y el Mg-ADP se unen de manera independiente al sitio activo a pesar de no tener una carga interna positiva y de no requerir potasio. Similarmente, se ha demostrado que en presencia de DMSO al 40%, la RMPK sin K^+ sigue un mecanismo al azar en equilibrio rápido (17). Bajo estas condiciones,

la actividad de la enzima es 1000 veces mayor que en un medio acuoso sin K^+ (24). Los estudios cinéticos y espectroscópicos mostraron que en ausencia de K^+ , el DMSO al 40% induce la adquisición de la conformación activa de la enzima (cierre de la tapa) (24,88). Por lo tanto, la carga interna positiva provista por la lisina en las PKs independientes de K^+ no puede explicar la actividad independiente de K^+ observada en la RMPK con DMSO al 40% o en la *Tp*PK en un medio acuoso. Ello sugiere, en concordancia con los datos de la RMPK en DMSO en ausencia de K^+ , que la conformación global de la *Tp*PK contribuye a su actividad catalítica.

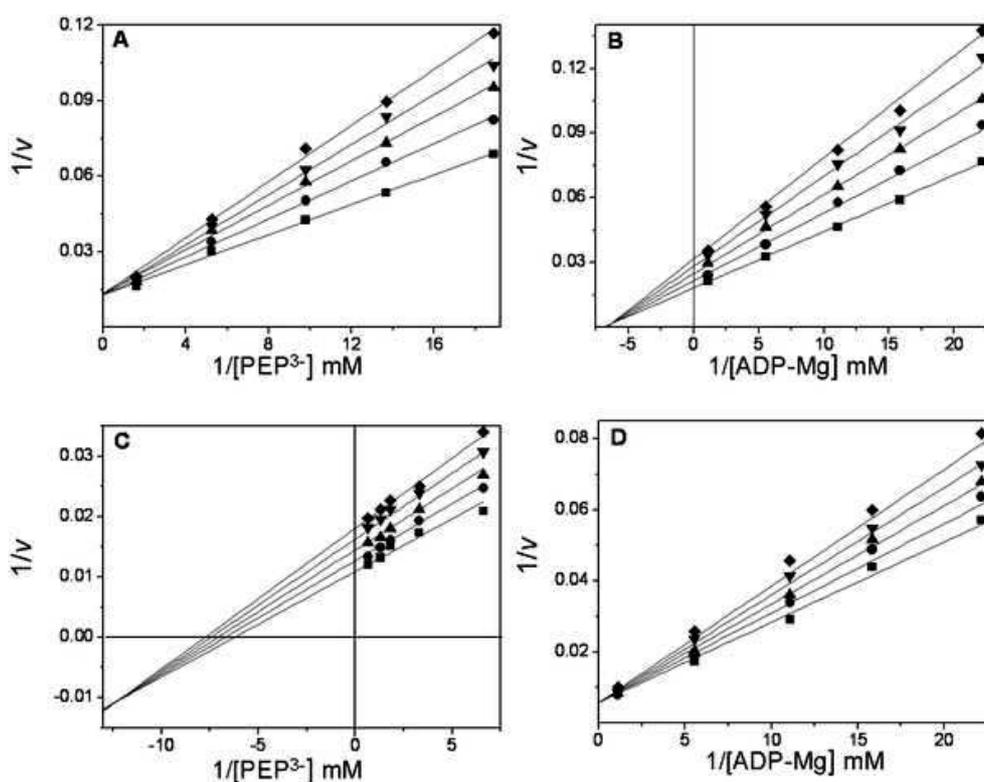


FIGURA 11. Patrones de inhibición sin salida y constantes de inhibición para oxalato y AMP en la *Tp*PK.

Las condiciones experimentales fueron como en la Fig. 2. En las abscisas de cada gráfica se muestra el recíproco de las concentraciones de PEP ionizado o del complejo ADP-Mg. En el gráfico A, las concentraciones variable de PEP³⁻ son 0.054, 0.077, 0.10, 0.22 y 1.1 mM. Las concentraciones de Mg²⁺ y ADP se mantuvieron constantes a 30 mM y 0.2 mM respectivamente. Las concentraciones fijas variables de oxalato fueron 0(■), 10 (●), 20 (▲), 30 (▼) y 40 (◆) μM. En el gráfico B, las concentraciones variables del complejo ADP-Mg son 0.045, 0.063, 0.90, 0.18 y 0.90 mM. La concentración del PEP ionizado se mantuvo constante a 30 mM. Las concentraciones de Mg²⁺ y oxalato fueron como en el gráfico A. En el gráfico C, las concentraciones variables de PEP³⁻ fueron 0.15, 0.30, 0.55, 0.77, and 1.5 mM. Las concentraciones de Mg²⁺ y ADP fueron como en el gráfico A. Las concentraciones fijas variables de AMP fueron 0(■), 4 (●), 8 (▲), 12 (▼) y 16 (◆) mM. En el gráfico D, las concentraciones variables de ADP fueron como en el gráfico B. Las concentraciones de Mg²⁺ y PEP ionizado se mantuvieron constantes a 30 y 5 mM, respectivamente. Las concentraciones fijas variables del AMP fueron 0(■), 8 (●), 12 (▲), 16 (▼) y 20 (◆) mM.

TABLA 5. Patrones de inhibición sin salida y constantes de inhibición para oxalato y AMP en *TpPK*

Los patrones de inhibición se tomaron de los experimentos de inhibición de los dobles recíprocos (Fig. 11). Las constantes de inhibición se calcularon del ajuste de los datos completos con las ecuaciones correspondientes a inhibición competitiva lineal (C) $v=V[S]/(K_m (1+ [I]/K_i) +[S])$, inhibición no competitiva lineal (NC), o inhibición mixta lineal (MT) $v=V[S] / (K_m (1+ [I]/K_i) + [S](1+[I]/\alpha K_i))$, donde $\alpha =1$ and $\alpha < 1$ para NC y MT, respectivamente; K_i es la constante de inhibición.

Inhibidor análogo de PEP ³⁻ : oxalato		Inhibidor análogo de Mg-ADP: AMP		K_i (oxalato) mM	K_i (AMP) mM
<i>1/v versus</i> <i>1/PEP,</i> fijo Mg-ADP	<i>1/v</i> <i>versus</i> 1/Mg- ADP, fijo PEP ³⁻	<i>1/v</i> <i>versus</i> 1/PEP, fijo ADP- Mg	<i>1/v</i> <i>versus</i> 1/ Mg- ADP, fijo PEP ³⁻		
C	NC	MT	C	0.05 ±0.002	35 ± 1.2

Termoestabilidad de la *Tp*PK analizada por DSC.

Como la *Tp*PK proviene de una bacteria hipertermófila, nos interesó estudiar su estabilidad térmica por DSC y compararla con aquella de la enzima de conejo (RMPK), que es mesófila. Se estudió el efecto de la concentración de proteína sobre la *Tm* en un intervalo de 0.1 a 2.0 mg/mL y una velocidad de barrido de 2.5 °C/min. Los resultados muestran que las *Tms* fueron similares e independientes de la concentración de proteína. Este resultado sugiere fuertemente que en el proceso de desnaturalización no existe disociación de las subunidades; adicionalmente no se observó evidencia de agregación en el intervalo de proteína ensayada.

TABLA 6. Efecto de la concentración de proteína sobre la *Tm*. La velocidad de barrido fue de 1.5 °C

Concentración de proteína (mg/mL)	<i>Tm</i> 1 (°C)	<i>Tm</i> 2 (°C)
0.1	99.91	105.91
1	100.02	106.02
2	100.55	106.25

En todos los casos, las transiciones calorimétricas fueron irreversibles, como se observó en las corridas por recalentamiento (no se muestran los datos).

Además, se evaluó el cambio de la T_m a diferentes velocidades de barrido, y se observó que las transiciones dependen fuertemente de la velocidad, en un intervalo de 30 – 150 °C/h, indicando que el proceso de desnaturalización se encuentra bajo control cinético.

TABLA 7. Efecto de la velocidad de barrido sobre la T_m en la $TpPK$. La concentración de proteína fue de 1 mg/mL.

Velocidad de barrido (°C/h)	T_m 1 (°C)	T_m 2 (°C)
30	96.99	103.40
60	98.09	104.77
90	98.82	105.22
150	100.02	106.02

Es relevante mencionar que bajo estas condiciones experimentales, la $TpPK$ presentó dos transiciones calorimétricas (T_{m1} y T_{m2}). Cabe señalar que estas dos transiciones se observaron en la enzima con y sin las colas de histidina (His_6), descartando la posibilidad de que la segunda transición se deba al péptido extra de las colas. Para los experimentos siguientes se trabajó con una concentración de proteína de 1 mg/mL y una velocidad de barrido de 1.5 °C/min. En la Figura 12A se muestran los termogramas de la $TpPK$ obtenidos en ausencia o en presencia de $MnCl_2$ 0.2 mM. Los valores de las dos transiciones de la $TpPK$, sin Mn^{2+} , fueron 99.2 y 105.2 °C; con Mn^{2+} se observó solamente una transición y la T_m aumentó a 108.4 ° C. Estos resultados muestran que la enzima se

estabilizó con Mn^{2+} y el proceso de desnaturalización ocurrió en un solo paso. Es sabido que los iones metálicos que se unen con alta afinidad a sitios específicos de las proteínas frecuentemente estabilizan su conformación (89, 90).

En la figura 12B se muestra la comparación de los termogramas de la *TpPK* (hipertermofílica) con la *RMPK* (mesofílica). En contraste con las dos transiciones de la *TpPK*, la *RMPK* presentó solamente una transición, con una T_m de $65^\circ C$.

Revisando la literatura encontramos que el termograma de la exoglucanasa/xilanasas de *Cellulomonas fimi* presenta un perfil semejante al de la *TpPK* (91). La exoglucanasa/xilanasas presenta dos dominios estructurales, uno es un barril $(\beta/\alpha)_8$ y el otro un barril de hebras β separados por un asa de 22 residuos. Para discernir si la desnaturalización de los dominios es independiente y que cada transición corresponde a uno de ellos, los autores los separaron por proteólisis limitada cortando a la enzima por el asa. Posteriormente se realizaron los experimentos calorimétricos y encontraron que las T_m s de los dominios separados correspondían a las T_m s observadas para la enzima completa, proponiendo que la primera transición corresponde al barril $(\beta/\alpha)_8$ y la segunda al barril de hebras β . De esta manera los autores concluyeron que los dominios de la enzima se desnaturalizan de manera independiente. Debido a que las estructuras de la exoglucanasa/xilanasas y la de la *TpPK* poseen dominios estructurales semejantes, las dos transiciones de la *TpPK* sugieren que los dominios se desnaturalizan de manera independiente; mientras que en la *RMPK* la desnaturalización ocurre de manera global en un solo paso.

Para evaluar si la segunda transición observada en *TpPK* corresponde al dominio B (barril de hebras β), éste se clonó, sobreexpresó y purificó como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La figura 12C muestra que la T_m del dominio B es de $73.5^\circ C$,

mucho menor que la segunda transición de la *TpPK* (105.2°C). Al parecer las interacciones interdominio de la *TpPK* tienen un papel importante en la estabilidad del dominio B. Por lo tanto, el termograma del dominio aislado de la *TpPK* no fue suficiente para explicar la naturaleza de la transición observada a 105.2°C.

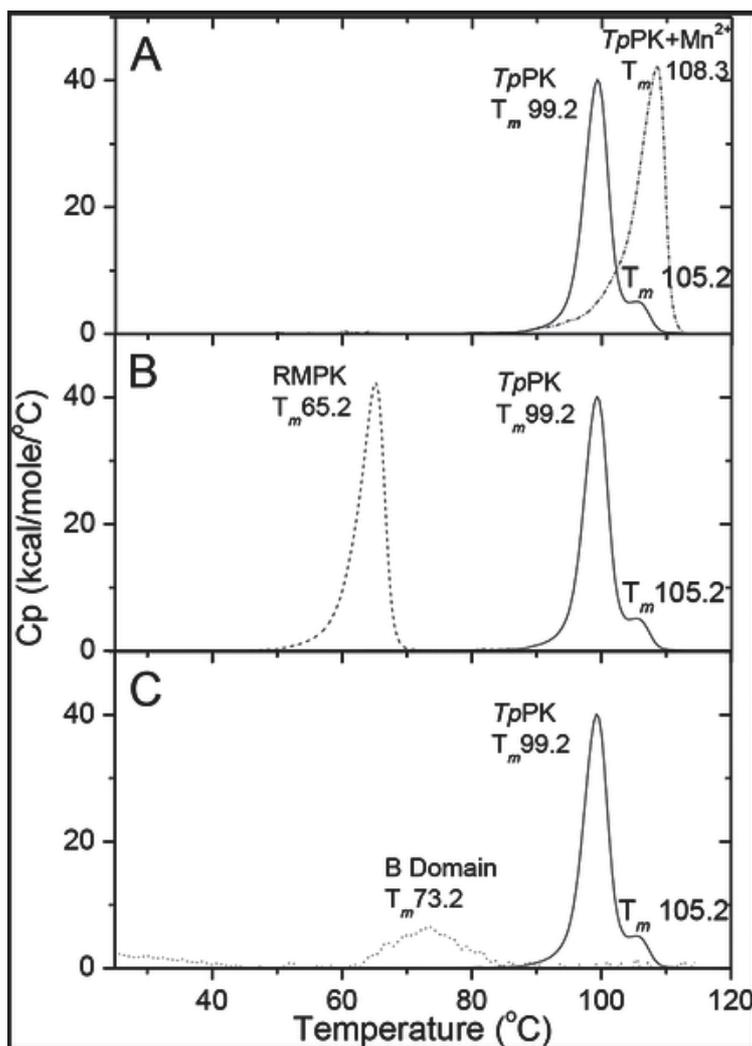


FIGURA 12. Calorimetría Diferencial de Barrido de la *TpPK*. A. *TpPK* sin y con Mn^{2+} 0.2 mM, representado con línea continua, y línea discontinua, respectivamente. B. *TpPK*: línea continua y RMPK línea discontinua. C. *TpPK* línea continua y el dominio B, línea punteada. La concentración de la *TpPK* fue 1.0 mg/mL (19.47 μ M de monómero) y la concentración del dominio B fue 0.18 mg/mL (19.55 μ M de dominio). La velocidad de barrido fue 1.5 °C/min.

Debido a que la segunda transición obtenida a 105.2 °C no coincidió con la del dominio B aislado, se modeló el monómero de la *TpPK* y se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular para comprobar si efectivamente corresponde al dominio B. La validación del modelo de la *TpPK* se muestra en la Tabla 8.

TABLA 8. Validación en Molprobit de la estructura del modelo de *TpPK*

Todos los átomos	Choque entre átomos, todos los átomos	0	100 th percentil
Contactos			
	Rotámetros pobres	0	
Proteína	Fuera del Ramachandran	0.9 %	
Geometría	Favorecidos en el Ramachandran	99.1 %	
	Puntaje del Molprobit	1.65	91 st percentil

Dinámica molecular del monómero de la *TpPK* y la RMPK

La figura 13A muestra por triplicado el curso temporal de los primeros 5 ns de 50 ns totales a 500 K, de los monómeros con las conformaciones cerrada y abierta tanto de la RMPK como de la *TpPK*. La pérdida de los contactos nativos de los carbonos alfa se evaluó con el parámetro Q, que define un valor de $Q=0.7$ como el límite inferior que se establece para una proteína helicoidal de 60 residuos que mantiene la conformación nativa. Por abajo de este valor se considera la pérdida del estado nativo, que se aproxima al estado de globo fundido (92). Se calcularon los valores de Q para los monómeros de la *TpPK* (figura 13A) y de la RMPK (figura 13E), así como para los dominios A, B y C (figuras 13B-13D para la *TpPK* respectivamente, y figuras 13F-13H para la RMPK respectivamente). El análisis de los contactos nativos dentro de los dominios de la *TpPK* vs tiempo, muestra que en los dominios A y C se pierde el 90% de dichos contactos dentro de los primeros 2-3 ns (figuras 13B y 13D). En contraste, el dominio B mantuvo un valor de Q alto (~ 0.65) por arriba de los 2.5 ns (figura 13C).

TpPK

RMPK

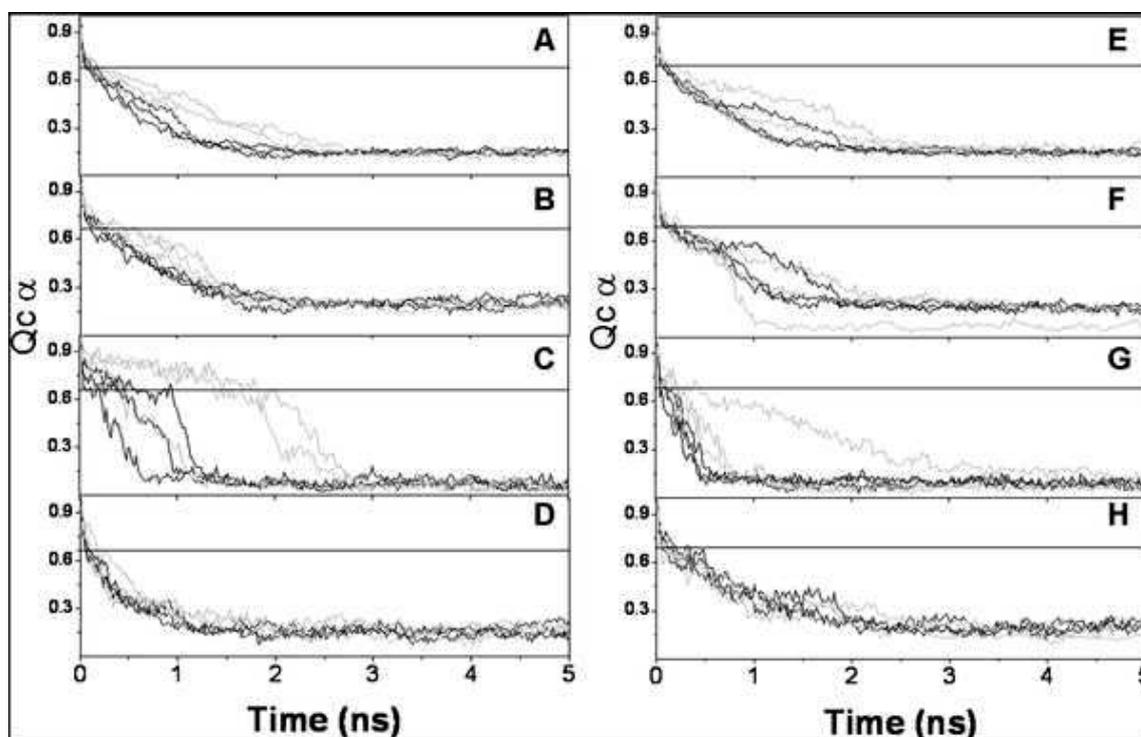


FIGURA 13. Pérdida de los contactos nativos ($Q_{C\alpha}$) vs tiempo, del modelo de la *TpPK* y la RMPK a 500 K. Se muestran los contactos nativos del monómero de la PK y los dominios A, B y C. Las imágenes A a D corresponden a la *TpPK* y las imágenes E a H de la RMPK. Las simulaciones se realizaron en un curso temporal de 50 ns en solvente implícito a 500K. Las simulaciones partieron de dos conformaciones diferentes de la enzima, abierta (líneas negras) y cerrada (líneas grises). Las conformaciones abierta y cerrada de la *TpPK* se modelaron como se describió en Materiales y Métodos. Las conformaciones abierta y cerrada de la RMPK se obtuvieron de (2G50 y 1A5U), respectivamente. Las conformaciones abierta y cerrada de la *TpPK* se obtuvieron de las dinámicas moleculares; se llegó a una conformación abierta y una cerrada y de ahí se partió para realizar las dinámicas moleculares que se muestran en esta figura. Las simulaciones se corrieron por triplicado. Aunque las simulaciones se corrieron de 0 a 50 ns, se muestra solamente el periodo relevante de la transición.

Cabe señalar que en la *TpPK* la mayor estabilidad del dominio B se observó cuando las simulaciones empezaron con la estructura cerrada. Sin embargo, incluso aquellas cuya simulación comenzó con la tapa abierta fueron más estables que su contraparte del monómero de la RMPK. Sólo una simulación de esta última mostró que el dominio B

alcanzó un valor de $Q = 0.2$ en aproximadamente 2.5 ns. El resto se desnaturalizó antes de 1 ns. Estos datos sugieren que la segunda transición calorimétrica de la *TpPK* se puede atribuir a la desnaturalización del dominio B, mientras que en el caso de la RMPK la desnaturalización ocurre en un solo evento global. Cabe señalar que la simulación de la *TpPK* a 300K presentó el dominio B cerrado sobre el dominio A. El mismo fenómeno ocurrió en las tres simulaciones. Con respecto a la RMPK bajo las mismas condiciones, dos de las tres simulaciones terminaron con el dominio B abierto y el otro con la tapa torcida sobre el dominio A.

En la siguiente liga se muestra las simulaciones de la *TpPK* y la RMPK a 500 K.

(https://docs.google.com/file/d/0B57RfHIF7vbNG5KZDg0N0pIS28/edit?usp=drive_web).

Análisis comparativo de una estructura de PK mesófila y una hipertermófila.

En varios artículos sobre la estructura cristalográfica de la RMPK se ha descrito que el dominio B presenta una alta movilidad, que se estabiliza cuando el sitio activo se encuentra parcial o totalmente ocupado. Al respecto, Larsen *et al.* (16) determinaron la estructura de la RMPK en presencia de diferentes ligandos y encontraron cambios en la posición del dominio B con respecto al resto de la proteína. Cuando el sitio activo se encuentra completamente ocupado por los ligandos K^+ - Mg^{2+} -oxalato-Mg-ATP, el dominio B se cierra y presenta un ángulo de 0° . En contraste, cuando el sitio activo está ocupado parcialmente por K^+ , Mg^{2+} y un análogo del PEP, el dominio B puede presentar diferentes ángulos de rotación (11° , 21° o 41°) con respecto al dominio A, indicando que el cierre del sitio activo varía de abierto a totalmente cerrado (16). Por otro lado, en la estructura apo de la piruvato cinasa de músculo de gato, no se observó densidad electrónica para el dominio B (93). Este resultado indica que cuando el sitio activo está completamente vacío, el dominio B se encuentra en movimiento constante y no puede ser modelado debido a la ausencia de densidad electrónica en dicha región. Al respecto, en la estructura de la *PaPK* (3QTG) se encontraron dos características relevantes. En la unidad asimétrica existen dos cadenas polipeptídicas; en la cadena A se observa que la densidad electrónica del dominio B está completa, a pesar de que el sitio activo está vacío. Por otro lado, al sobreponer las estructuras cristalográficas de la RMPK en presencia de K^+ , Mg^{2+} y piruvato (3N25) con la estructura apo de la *PaPK*, se observa que la tapa presenta conformaciones similares. Con este dato nos preguntamos: ¿cómo mantiene su conformación semicerrada la estructura apo de la *PaPK* a pesar de no tener sustratos para estabilizar el dominio B?

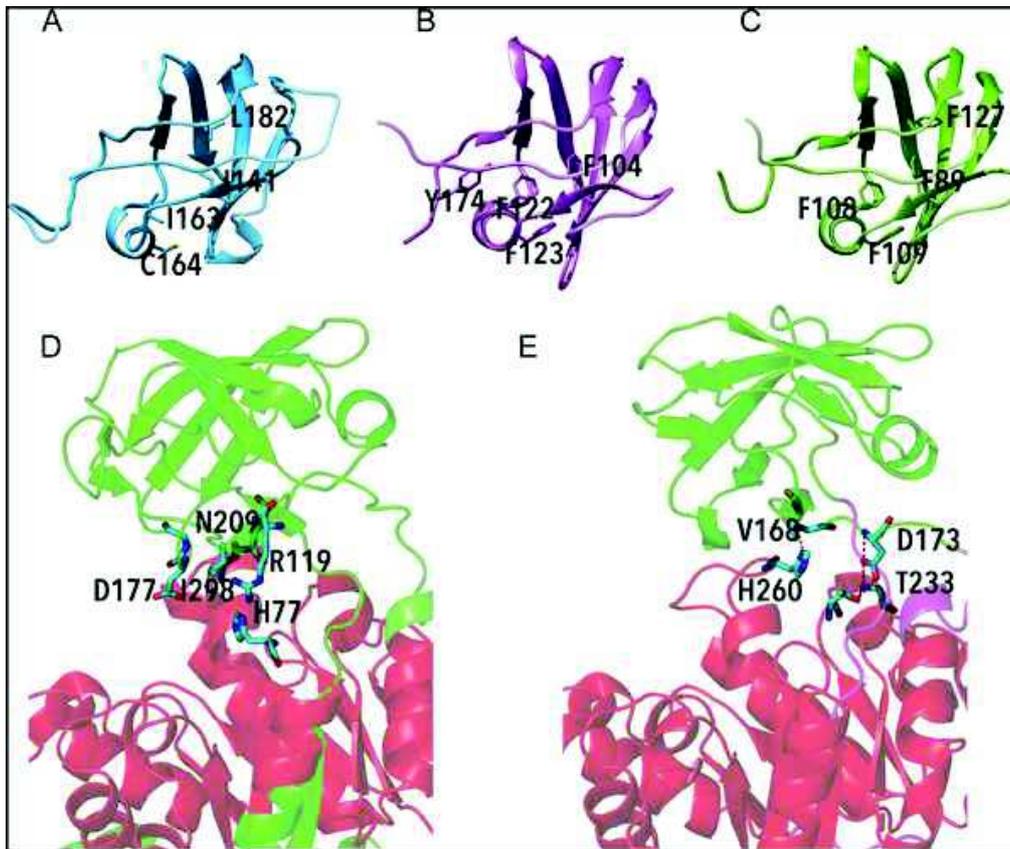


FIGURA 14. Diagramas de listón del núcleo hidrofóbico del dominio B de la RMPK (A), de la PaPK (B) y de la TpPK (C), las interacciones entre los dominios A y B de la RMPK (D) y de la PaPK (E). Los residuos aromáticos del núcleo hidrofóbico se muestran como barras. Los residuos involucrados en las interacciones polares e hidrofóbicas entre los dominios A y B se muestran en palos. Las líneas punteadas rojas resaltan las interacciones polares. Nótese que estas interacciones están ausentes en la RMPK. Esta figura se construyó a partir de las coordenadas de las estructuras de la RMPK (2G50) y de la PaPK (3QNTG). Es importante notar que no se analizaron las interacciones interdominio del monómero modelado de la TpPK, pero fueron determinadas a partir de la estructura de la PaPK para tener un resultado más confiable.

Para responder esta pregunta se comparó el dominio B modelado de la TpPK con el de la PaPK y la RMPK (Fig. 14 A-C). Encontramos que el núcleo hidrofóbico de dicho dominio en los modelos de la TpPK y de la PaPK está formado preferentemente por residuos aromáticos (Phe), mientras que en las posiciones equivalentes del dominio B de la RMPK

se encontraron Ile, Cys y Leu (Fig. 8B y C vs. A). Los residuos de Phe 108, 109 y 89 de la *TpPK* corresponden a las posiciones Phe 122, 123 y 104 de la *PaPK* y a los residuos Ile 163, Cys 164 e Ile 141 de la *RMPK*. Es importante mencionar que estos residuos aromáticos en las enzimas de Crenarchaeota, están altamente conservados (los residuos 89, 108 y 109 están conservados 85 %, 88% y 100 % respectivamente), mientras que en la *RMPK* las posiciones 163, 164 y 141 están sustituidas por residuos alifáticos (Fig 15). Cabe señalar que las posiciones de las fenilalaninas observadas en la *PaPK* y la *TpPK* se encuentran a distancias y ángulos que favorecen las interacciones electrostáticas Pi-Pi cara-lado (Tabla 9). Estas interacciones Pi-Pi le confieren al dominio B una alta estabilidad, debido a que los componentes hidrofóbicos y electrostáticos son generalmente más fuertes que las interacciones electrostáticas entre Phe y cadena lateral hidrofóbica.

Para explorar si estas interacciones Pi-Pi del dominio B contribuyen a la estabilidad y al acercamiento del dominio B sobre el dominio A, se modeló la mutante F89I/F108I/F109C/F127L de la *TpPK*. En esta mutante se reemplazaron los residuos de Phe por aquellos encontrados en las posiciones correspondientes en la *RMPK*. Se realizaron tres simulaciones a 300K.

En contraste con las simulaciones de la *TpPK* silvestre, la mutante mantuvo abierta la tapa en dos de las tres simulaciones, mientras que en la tercera se mantuvo cerrada. Este resultado sugiere que en la *TpPK*, las interacciones Pi-Pi del núcleo hidrofóbico contribuyen a la alta estabilidad del dominio B así como a mantener la conformación semicerrada sobre el dominio A (94).

En la liga siguiente se muestra las simulaciones de las mutantes de la *TpPK* y la *RMPK* a 300 K

<https://drive.google.com/file/d/0B57RfHIF-7vbN1ZiQjNoS0RFbk0/view?usp=sharing>).

También se compararon las interacciones entre los dominios A y B de la RMPK y de la *PaPK*; los resultados se muestran en la Fig. 8D y 8E, respectivamente. Es importante notar que las interacciones presentes en la RMPK son diferentes de las encontradas en la *PaPK*. Las interacciones encontradas en este último se localizan principalmente en la bisagra que une el dominio B al A, manteniendo la conformación semicerrada de la tapa, mientras que en la RMPK estas interacciones no están presentes. La tabla 10 muestra los átomos involucrados en las interacciones y sus distancias. Las interacciones internas del dominio B y aquellas entre los dominios A y B pueden explicar la alta termoestabilidad del dominio B encontrado en los estudios de DSC. Esta alta estabilidad, y la baja movilidad de la bisagra en la enzima hipertermófila, sugiere que este arreglo estructural pudiera permitir la actividad de la *TpPK* en ausencia de una carga positiva. Actualmente se están realizando las construcciones de acuerdo al análisis estructural de la bisagra del sitio activo para evaluar esta hipótesis de trabajo.

TABLA 9. Interacciones Pi-Pi entre pares de fenilalaninas del núcleo hidrofóbico del dominio B de las piruvato cinasas de *Thermofilum pendens* (modelo in silico), y *Pyrobaculum aerophilum* (3QTG).

Las distancias fueron medidas desde centro de masa, definido por los átomos de carbono que forman el anillo aromático. Los ángulos se midieron de los planos formados por los átomos de carbono en cada anillo. Phe 89, 108 and 109 de la *TpPK* corresponden a las Phe 104, 122 and 123 en la *PaPK* y son conservadas 85, 88 y 100%, respectivamente, en todo el phylum Crenarchaeota. Nótese que en los Sulfolobales la posición 109 es generalmente Tyr.

	Residuos que interactúan		Distancia (Å)	Angulo (grados)
<i>TpPK</i>	F89	F127	5.7	87.5
	F89	F108	5.6	51.7
	F108	F109	5.0	87.7
<i>PaPK</i>	F104	F122	5.9	32.7
	F122	F123	5.1	87.7
	F122	F174	6.4	55.1

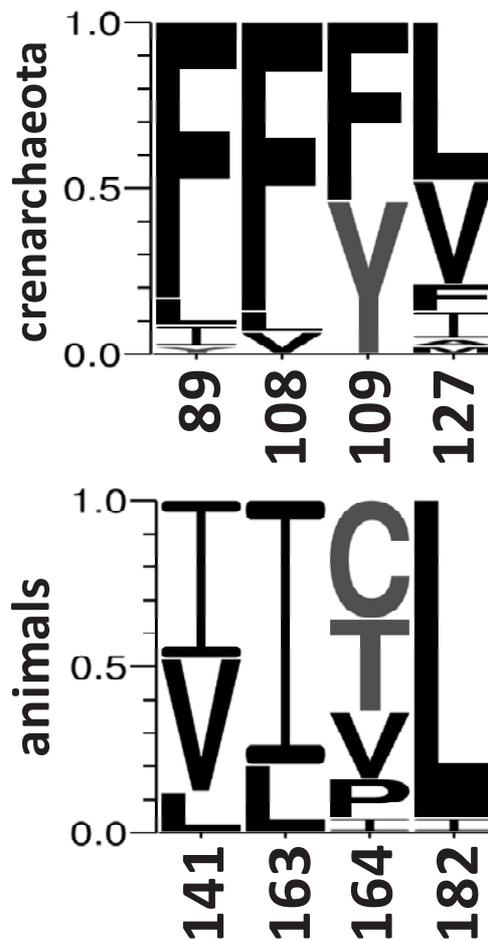


Figura 15. Comparación de los aminoácidos localizados en el núcleo hidrofóbico del dominio B en Crenarchaeota y animales (logos). Se muestran los residuos del núcleo hidrofóbico del dominio B, en las posiciones 89, 108, 109 y 127 (de acuerdo con la numeración de la *TpPK*), y la posición equivalente en animales (de acuerdo con la numeración de la *RMPK*).

TABLA 10. Interacciones entre los dominios A y B de la RMPK (2G50) y de la PaPK (3QTG)

PDB	Donador	Acceptor	Distancia (Å)	Tipo de contacto
2G50	I298-CG2	N209-CG	3.61	Hidrofóbico
	I298-CG2	N209-CB	3.59	Hidrofóbico
	I298-CG2	G178-CA	3.88	Hidrofóbico
	I298-CD1	D177-C	3.52	Hidrofóbico
	I298-CD1	D177-CA	3.72	Hidrofóbico
	R119-CZ	H77-CE1	3.79	Hidrofóbico
3QTG	G235-N	D173-OD2	2.98	Puente de Hidrógeno
	T233-OG1	D173-OD1	2.60	Puente de Hidrógeno
	G171-N	H260-ND1	3.03	Puente de Hidrógeno
	G235-N	D172-CG	3.62	Hidrofóbico
	T233-CB	D1732-CG	3.82	Hidrofóbico
	H260-CE1	V168-CG1	3.51	Hidrofóbico

Se excluyó del análisis la región de la bisagra, ya que se determinó por DynDom

DATOS NO PUBLICADOS.

Efecto de los cationes monovalentes en la actividad de la *TpPK*

A la fecha se han caracterizado tres piruvato cinasas de especies de Crenarchaeota (*Pyrobaculum aerophilum*, *Termoproteus tenax* and *Aeropyrum pernix*) (43,44). Las dos primeras presentan Ser85 y Ser69, respectivamente, y la última Arg72 (correspondientes a la posición 117 de la RMPK); estas enzimas presentan actividad independiente de catión monovalente. En coincidencia con las piruvato cinasas de *Pyrobaculum aerophilum* y *Termoproteus tenax*, la de *Thermofilum pendens* también presenta actividad independiente de catión monovalente, a pesar de no tener un residuo con carga positiva en la posición 117 correspondiente (Val70). Para evaluar si la *TpPK* es activable por los cationes monovalentes, se hicieron ensayos en presencia de NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Na^+ y no se observó aumento de la actividad. (Fig. 16). Esta ausencia de activación por los cationes monovalentes se ha reportado en todas las enzimas independientes de catión monovalente, incluyendo a aquellas que tienen Lys (83,84,85,95), Ser (43,44) o Arg (44), en la posición 117 correspondiente.

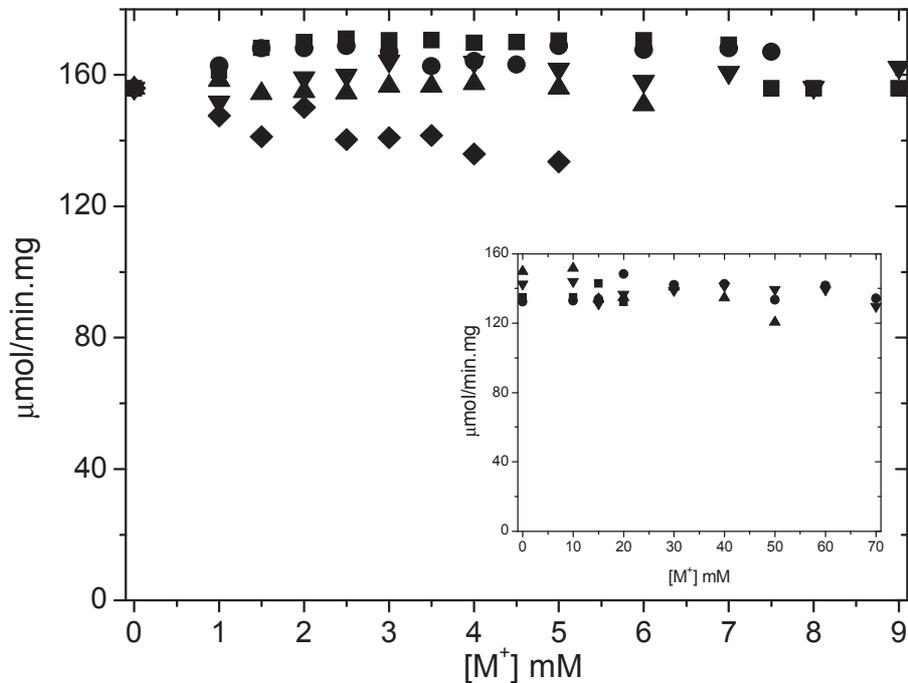


FIGURA 16. Efecto de los cationes monovalentes sobre la actividad de la *TpPK* El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM, pH 6.0, NADH 0.2 mM, Mg²⁺ libre 30 mM y LDH 8 μg/ml. Las concentraciones de PEP ionizado, ADP-Mg y Mg²⁺ libre fueron 3.6, 1.6 y 25 mM, respectivamente. Los M⁺ ensayados fueron NH₄⁺ (■), K⁺ (●), Rb⁺ (▲) Cs⁺ (▼) y Na⁺ (◆) a las concentraciones indicadas. La V_{max} para *TpPK* sin M⁺ fue 156 ± 5 μmol/ min · mg. El inserto muestra la ausencia de efecto a concentraciones mayores de cationes monovalentes hasta 70 mM.

Caracterización cinética de las Mutantes V70K y V70E

De acuerdo con el árbol filogenético (41), las piruvato cinasas independientes de potasio presentan la secuencia consenso L113/Q114/K117/L120 (siguiendo la numeración de la RMPK). La piruvato cinasa de *T. pendens* comparte esta secuencia excepto por la Lys 117 que es sustituida por Val; por consiguiente, aunque los cationes monovalentes no tienen

efecto activador sobre la *TpPK* nativa, la Biol. Nallely Cabrera de IFC construyó las mutantes V70K y V70E para evaluar la contribución de una carga positiva interna, o bien si en presencia de Glu la *TpPK* se activa por K^+ . Los resultados muestran que las mutantes V70K y V70E, sin catión monovalente, muestran actividades 14 y 17 veces menores respectivamente, comparada con la actividad que muestra la enzima silvestre (Tabla 11). Por otro lado, la adición de cationes monovalentes inhibió el 50% de la actividad de la mutante V70K, mientras que la mutante V70E se activó 2, 2.8, 3.3 y 6.9 veces con K^+ , Rb^+ , Cs^+ y NH_4^+ , respectivamente (Figura 17). Sin embargo, la actividad de V70E con amonio es 2.5 veces menor que la actividad de la *TpPK* silvestre. Por otro lado, V70E presentó baja afinidad por los cationes monovalentes comparada con la que muestra la RMPK (la K_m para K^+ , NH_4^+ , Rb^+ y Cs^+ es 2.8, 5.4, 2.9 y 1.2 veces mayor, respectivamente) (96). Las eficiencias catalíticas disminuyeron tres órdenes de magnitud para K^+ , Rb^+ y Cs^+ y dos órdenes para NH_4^+ (Figura 17).

TABLA 11. Constantes cinéticas de <i>Tp</i>PK, las mutantes V70E y V70K con y sin K^+ y NH_4^+.						
Enzima	V_{max} $\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mg}$	K_m (PEP ³⁻) mM	K_m (ADP-Mg) mM	k_{cat}	Log k_{cat}/K_m PEP ³⁻	Log k_{cat}/K_m ADP-Mg
<i>Tp</i> PK	156 ± 4.8	0.3 ± 0.02	0.13 ± 0.06	534	6.2	6.6
<i>Tp</i> PK + NH_4^+	155 ± 4.4	0.3 ± 0.05	0.14 ± 0.01	530	6.2	6.5
V70E	9 ± 0.8	1.5 ± 0.2	0.80 ± 0.10	31	4.3	4.6
V70E + K^+	15 ± 1.0	1.0 ± 0.09	0.60 ± 0.06	51	4.7	4.9
V70E + NH_4^+	59 ± 1.5	0.8 ± 0.03	0.30 ± 0.20	202	5.4	5.8
V70K	11 ± 1.0	3.6 ± 0.57	0.24 ± 0.02	38	4.0	5.2

Los datos fueron ajustados globalmente con la ecuación que describe un mecanismo al azar en equilibrio rápido, como se describe en la Tabla 1. Las condiciones experimentales fueron como en la Fig. 2 excepto las concentraciones de NH_4^+ y K^+ , las cuales fueron de 90 mM para ambos cationes. Las velocidades iniciales de la enzima silvestre y las mutantes se determinaron a concentraciones variables de uno de los sustratos y fijos variables del otro. Los resultados muestran que la carga positiva de la lisina en la mutante V70K afecta la unión del PEP (la K_m para PEP aumentó más de un orden de magnitud (12 veces), mientras que el sitio de unión del Mg-ADP no se afectó. En contraste, en la mutante V70E se reduce la afinidad por el PEP y del Mg-ADP; (5 y 6 veces, respectivamente). La adición

de NH_4^+ a la mutante V70E mejora la unión del PEP y del Mg-ADP 2 y 3 veces, respectivamente. Aunado a lo anterior los resultados muestran que la sustitución de valina por glutámico o lisina afectan la constante de especificidad por el PEP^{3-} y del Mg-ADP, en ambas mutantes. En el caso de V70E y V70E + K^+ dicho parámetro disminuyó dos órdenes de magnitud, mientras que en V70E + NH_4^+ y V70K disminuyó un orden de magnitud con respecto a la *TpPK* (Tabla 11).

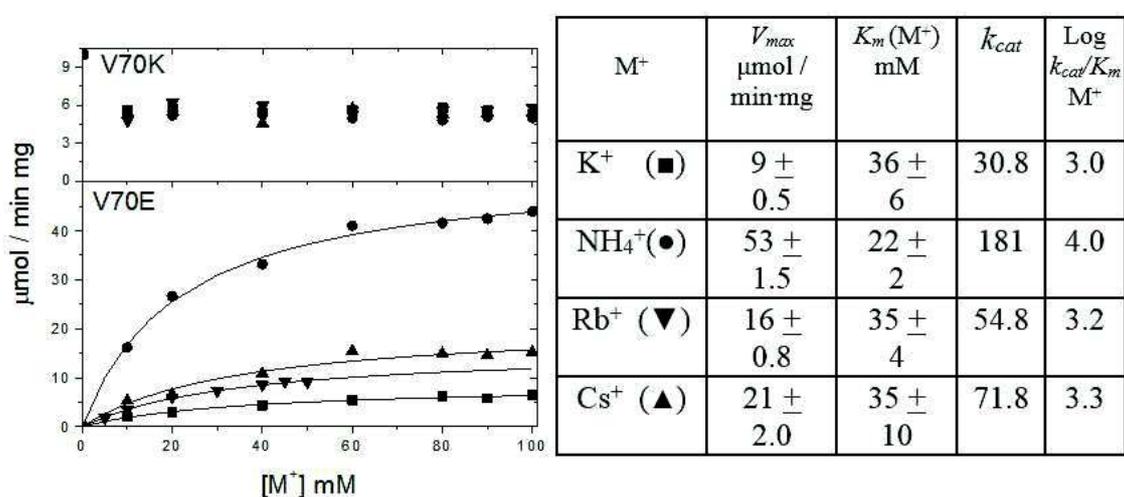


FIGURA 17. Efecto de los cationes monovalentes sobre la actividad de V70E y V70K.

A. Las condiciones experimentales fueron como en la Fig 10 excepto por las concentraciones del PEP ionizado, ADP-Mg y Mg^{2+} libre las cuales fueron 3.6, 1.6 y 25 mM, respectivamente. Para ambas mutantes los M^+ ensayados fueron K^+ (■), NH_4^+ (●), Rb^+ (▼) y Cs^+ (▲). La V_{max} para *TpPK* sin M^+ fue $156 \pm 4.8 \mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mg}$ (no se muestra). B. Constantes cinéticas de la mutante V70E con los cationes monovalentes.

Estos resultados indican que la enzima silvestre es más eficiente como catalizador que las mutantes V70RE y V70K; por lo tanto no requiere de alguna carga positiva para catalizar. Aún cuando la mutante V70E es activable por cationes monovalentes, su actividad máxima

es tres veces menor que la que muestra la enzima silvestre. Es relevante mencionar que, a pesar de que las Crenarchaeotas poseen diversos residuos en esta posición, Glu y Lys no están presentes. En el grupo de las Termoproteales, -grupo al que pertenece *T. Pendens* y *P. aerophylum*-, las PKs poseen principalmente Ser, en la posición correspondiente a la 117, algunas Gly y una Val. Este resultado parece indicar que las PKs de este grupo prefieren residuos neutros. Sin embargo, las Acidolobales presentan Arg en esta posición.

Conclusión:

La *TpPK* es codificada por un gen de copia simple, el cual se relaciona cercanamente con las secuencias del orden Thermoproteales del phylum Crenarchaeota. Estas secuencias están agrupadas en un grupo que incluye PKs de los órdenes Desulfurococcales, Acidilobales, y Fervidicoccales, que poseen aminoácidos distintos a Lys en la posición correspondiente a la 117. Es importante remarcar que, la *TpPK* posee Val70 en esta posición, y que no requiere una carga positiva interna cerca del sitio activo para catalizar. Sin embargo, la enzima sigue un mecanismo cinético al azar en equilibrio rápido, igual al de la RMPK en presencia de K^+ y la mutante E117K en ausencia de K^+ . Estos resultados muestran que en la *TpPK*, el cierre de la tapa del sitio activo y el arreglo de los residuos involucrados en la unión del nucleótido son independientes de la carga positiva interna y/o K^+ . Se analizaron las interacciones no covalentes (puentes salinos, puentes beta, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofobias e interacciones Pi-Pi) presentes en el dominio B de la *PaPK* y las modeladas en la *TpPK*, y se compararon con aquellas presentes en la RMPK. Las interacciones diferentes sugieren que el dominio B de la enzima hipertermofílica es altamente estable. En conjunto, los resultados apoyan la hipótesis de trabajo de que el arreglo estructural del dominio B de la *TpPK* permite la catálisis de la enzima en la ausencia de una carga positiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Seeholzer SH, Jaworowski A, Rose IA. Enolpyruvate: chemical determination as a pyruvate kinase intermediate. *Biochemistry*. 1991;30(3):727-732.
2. Rose IA. Stereochemistry of pyruvate kinase, pyruvate carboxylase, and malate enzyme reactions. *J Biol Chem*. 1970; 245(22):6052-6056.
3. Susan-Resiga D¹, Nowak T. Proton donor in yeast pyruvate kinase: chemical and kinetic properties of the active site Thr 298 to Cys mutant. *Biochemistry*. 2004; 43(48):15230-15245.
4. Gupta RK, Oesterling RM. Dual divalent cation requirement for activation of pyruvate kinase; essential roles of both enzyme- and nucleotide-bound metal ions. *Biochemistry*. 1976; 15(13):2881-7.
5. Gupta RK, Mildvan AS. Structures of enzyme-bound metal-nucleotide complexes in the phosphoryl transfer reaction of muscle pyruvate kinase. ³¹P NMR studies with magnesium and kinetic studies with chromium nucleotides. *J Biol Chem*. 1977;252(17):5967-76.
6. Baek YH, Nowak T. Kinetic evidence for a dual cation role for muscle pyruvate kinase. *Arch Biochem Biophys*.;217(2):491-7.

7. Boyer PD, Lardy HA, Phillips PH. THE RÔLE OF POTASSIUM IN MUSCLE PHOSPHORYLATIONS *J. Biol. Chem.* 1942 146: 673-682.
8. Kayne F. J. (1973) *the enzymes*, 3rd ed., pp 353-382.
9. Nowak T, Suelter C. Pyruvate kinase: activation by and catalytic role of the monovalent and divalent cations. *Mol Cell Biochem.* 1981;35(2):65-75.
10. Nowak T. Structural changes at the active site of pyruvate kinase during activation and catalysis. *J Biol Chem.* 1978;253(6):1998-2004.
11. Kachmar JF, Boyer PD. Kinetic analysis of enzyme reactions. II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase. *J Biol Chem.* 1953; 200(2):669-82.
12. Suelter CH. Enzymes activated by monovalent cations. *Science.* 1970;168(3933):789-95.
13. Evans H. J. and sorger g. j. (1966) *annu. Rev. plant. Physiol.* 17, 47-76.
14. Di Cera E. A structural perspective on enzymes activated by monovalent cations. *J Biol Chem.* 2006; 281(3):1305-8.

15. Larsen TM¹, Benning MM, Rayment I, Reed GH. Structure of the bis(Mg²⁺)-ATP-oxalate complex of the rabbit muscle pyruvate kinase at 2.1 Å resolution: ATP binding over a barrel. *Biochemistry*. 1998 ;37(18):6247-55.
16. Larsen TM, Benning MM, Wesenberg GE, Rayment I, Reed GH. Ligand-induced domain movement in pyruvate kinase: structure of the enzyme from rabbit muscle with Mg²⁺, K⁺, and L-phospholactate at 2.7 Å resolution. *Arch Biochem Biophys*. 1997;345(2):199-206.
17. Oria-Hernández J¹, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Ramírez-Silva L. Pyruvate kinase revisited: the activating effect of K⁺. *J Biol Chem*. 2005 ;280(45):37924-9.
18. Suelter CH, Singleton R Jr, Kayne FJ, Arrington S, Glass J, Mildvan AS. Studies on the interaction of substrate and monovalent and divalent cations with pyruvate kinase. *Biochemistry*. 1966;5(1):131-9.
19. Nowak T, Mildvan AS. Nuclear magnetic resonance studies of the function of potassium in the mechanism of pyruvate kinase. *Biochemistry*. 1972; 11(15):2819-28.
20. Reuben J, Kayne FJ. Thallium-205 nuclear magnetic resonance study of pyruvate kinase and its substrates. Evidence for a substrate-induced conformational change. *J Biol Chem*. 1971; 246(20):6227-34.

21. Raushel FM, Villafranca JJ. A multinuclear nuclear magnetic resonance study of the monovalent-divalent cation sites of pyruvate kinase. *Biochemistry*. 1980;19(24):5481-5.
22. Sorger GJ, Ford RE, Evans HJ. Effects of univalent cations on the immunoelectrophoretic behavior of pyruvic kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1965; 54(6):1614-21.
23. Ramírez-Silva L¹, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. Water-induced transitions in the K⁺ requirements for the activity of pyruvate kinase entrapped in reverse micelles. *Biochemistry*. 1993; 32(20):5332-8.
24. Ramírez-Silva L¹, Ferreira ST, Nowak T, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. Dimethylsulfoxide promotes K⁺-independent activity of pyruvate kinase and the acquisition of the active catalytic conformation. *Eur J Biochem*. 2001 Jun;268(11):3267-74.
25. Reynard, A.M; Hass, L.F; Jacobsen, D.D. & Boyer, P.D. (1961) The correlation of reaction kinetics and substrate binding with the mechanism of pyruvate kinase. *J Biol Chem*. 236, 2277-2283.
26. Plowman, K.M. y Krall, A.R. (1965) A kinetic study of nucleotide interactions with pyruvate kinase. *Biochemistry*. 4, 2809-2814.
27. Mildvan, A.S. y Cohn M. (1965) Kinetic and magnetic resonance studies of the pyruvate kinase reaction. I. Divalent metal complexes of pyruvate kinase. *J Biol Chem*. 240, 238-46

28. Mildvan, A.S. y Cohn M. (1966) Kinetic and magnetic resonance studies of the pyruvate kinase reaction. II. Complexes of enzyme, metal, and substrates. *J Biol Chem.* 241, 1178-1193
29. Ainsworth, S. y MacFarlane, N. (1973) A kinetic study of rabbit muscle pyruvate kinase. *Biochem J.* 131, 223-236.
30. Melchior, J.B. (1965) The role of metal ions in the pyruvic kinase reaction. *Biochemistry.* 4, 1518-1525.
31. Dann, L.G. y Britton, H.G. (1978) Kinetics and mechanism of action of muscle pyruvate kinase. *Biochem J.* 169, 39-54.
32. Stammers DK, Muirhead H. Three-dimensional structure of cat muscle pyruvate kinase at 6 Angstrom resolution. *J Mol Biol.* 1975; 95(2):213-25.
33. Stuart DI, Levine M, Muirhead H, Stammers DK. Crystal structure of cat muscle pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å. *J Mol Biol.* 1979; 134(1):109-42.
34. Muirhead H, Clayden DA, Barford D, Lorimer CG, Fothergill-Gilmore LA, Schiltz E, Schmitt W. The structure of cat muscle pyruvate kinase. *EMBO J.* 1986;5(3):475-81.

35. Larsen TM, Laughlin LT, Holden HM, Rayment I, Reed GH. Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn^{2+} , K^{+} , and pyruvate. *Biochemistry*. 1994; 33(20):6301-9.
36. Mattevi A, Valentini G, Rizzi M, Speranza ML, Seeholzer SH, Coda A. Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. *Structure*. 1995; 3(7):729-41.
37. Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure*. 1998; 6(2):195-210.
38. Rigden DJ¹, Phillips SE, Michels PA, Fothergill-Gilmore LA. The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. *J Mol Biol*. 1999;291(3):615-35.
39. Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, Dolzan M, Galizzi A, Abraham DJ, Wang C, Bianchi P, Zanella A, Mattevi A. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23807-14.
40. Dombrauckas JD, Santarsiero BD, Mesecar AD. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry*. 2005;44(27):9417-29.

41. Oria-Hernández J, Riveros-Rosas H, Ramírez-Silva L. Dichotomic phylogenetic tree of the pyruvate kinase family. K⁺-dependent and independent enzymes. J Biol Chem. 2006; 281: 30717–30724.
42. Laughlin IT, Reed G H. The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117. Arch Biochem Biophys. 1997; 348: 262–267.
43. Schramm A, Siebers B, Tjaden B, Brinkmann H, Hensel R. Pyruvate kinase of the hyperthermophilic crenarchaeota *Thermoproteus tenax*: physiological role and phylogenetic aspects. J Bacteriol. 2000; 182: 2001–2009.
44. Johnsen U, Hansen T, Schönheit P. Comparative analysis of pyruvate kinases from the hyperthermophilic archaea *Archaeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix* and *Pyrobaculum aerophilum* and the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: unusual regulatory properties in hyperthermophilic archaea. J Biol Chem. 2003; 278: 25417–25427.
45. Gupta RS¹, Shami A. Molecular signatures for the Crenarchaeota and the Thaumarchaeota. Antonie Van Leeuwenhoek. 2011;99(2):133-57.
46. Zillig, W., Gierl, A., Schreiber, G., Wunderl, S., Janekovic, D., Stetter, K. O., and Klenk, H. P.. The archaebacterium *Thermofilum pendens* represents a novel genus of the

thermophilic, anaerobic sulfur respiring *Thermoproteales*. Syst. Appl. Microbiol. 1983; 4, 79-87.

47. Richardson P., Anderson I., Woese C., Olsen G., Reich C. “*Thermofilum pendens* Hrk 5: finished genome”. JGI (Joint Genome Institute (2008)

48. UniProt Consortium. Activities at the universal protein resource (UniProt). Nucleic Acids Res. 2014; 42: D191–D198. doi: 10.1093/nar/gkt1140

49. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007; 23: 2947–2948.

50. Madej T, Lanczycki CJ, Zhang D, Thiessen PA, Geer RC, Marchler-Bauer A, et al. MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. Nucleic Acids Res. 2013; 42:D297–D303.

51. Rose PW, Bi C, Bluhm WF, Christie CH, Dimitropoulos D, Dutta S, et al. The RCSB protein data bank: new resources for research and education. Nucleic Acids Res. 2013; 41: D475–D482.

52. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999; 41: 95–98.

53. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28: 2731–2739.
54. Whelan S, Goldman N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol.* 2001; 18: 691–699.
55. Posada D., and Buckley T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol.* 2004; 53: 793–808.
56. Crooks GE, Hon G, Chandonia J M, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 2004; 14: 1188–1190.
57. Stols L, Gu M, Dieckman L, Raffin R, Collart FR, Donnelly MI. A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site. *Protein Expr Purif.* 2002; 25: 8–15.
58. Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.* 1991; 199: 223–231.

59. Kasahara M, Penefsky HS. High affinity binding of monovalent Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem.* 1978; 253: 4180–4187.
60. Büchner T, Pleiderer G. Pyruvate kinase from muscle, in *Methods in Enzymol* (Colowick S. and Kaplan N. Eds.) 1955; vol. 1: 435–440. Academic Press, New York.
61. Schoemakers JM, Visser GJ, Flik G, Theuvenet PR. CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques.* 1992; 12: 870–879.
62. Susan-Resiga D, Nowak T. Proton donor in yeast pyruvate kinase: chemical and kinetic properties of the active site Thr298 to Cys mutant. *Biochemistry.* 2004; 43: 15230–15245.
63. Dougherty TM, Cleland WW. pH Studies of the chemical mechanism of rabbit muscle pyruvate kinase.2. Physiological substrates and phosphoenol- α ketobutyrate. *Biochemistry.* 1985; 24: 5875–5880.
64. Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, et al. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Supplement. 2006; 15: 5.6.1–5.6.30.

65. Solomons TG, Johnsen U, Schönheit P, Davies C. 3-Phosphoglycerate is an Allosteric Activator of Pyruvate Kinase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Biochemistry*. 2013; 52: 5865–5875.
66. Chen VB, Arendall WB III, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. Molprobity: All atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica*. 2010; D66:12–21.
67. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera- a visualization system for exploratory research and analysis *J Comput Chem*. 2004; 25: 1605–1612.
68. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein- ligand interactions. *Protein Eng*. 1996; 8: 127–134.
69. Case DA, Darden TA, Cheatham TE III, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, et al. AMBER 12. University of California, San Francisco; 2012.
70. Goetz AW, Williamson MJ, Xu D, Poole D, Le Grand S, Walker RC. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. *J Chem Theory Comput*. 2012; 8: 1542–1555.

71. Glykos NM. Carma: a molecular dynamics analysis program J Comput Chem. 2006; 27: 1765–1768.
72. Koukos PI, Glykos NM. grcarma: A Fully Automated Task-Oriented Interface for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories, J Comput Chem. 2013; 34: 2310–2312.
73. Kennedy SP, Ng WV, Salzberg SL, Hood L, DasSarma S. Understanding the adaptation of Halobacterium species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. Genome Res. 2001;11(10):1641-50.
74. Deole R, Challacombe J, Raiford DW, Hoff WD. An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content. J Biol Chem. 2013;288(1):581-8.
75. Madern D¹, Ebel C, Zaccari G. Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles. 2000; 4(2):91-8.
76. Mevarech M¹, Frolow F, Gloss LM. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. Biophys Chem. 2000 Aug 30;86(2-3):155-64.
77. Ortega G¹, Laín A, Tadeo X, López-Méndez B, Castaño D, Millet O. Halophilic enzyme activation induced by salts. Sci Rep. 2011;1:6.

78. Dupont CL, Butcher A, Valas RE, Bourne PE, Caetano-Anallés G. History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 107: 10567–10572.
79. Liao CL, Atkinson DE. Regulation at the phosphoenolpyruvate branchpoint in *Azotobacter vinelandii*: pyruvate kinase. *J. Bacteriol*. 1971; 106:37-44
80. Smart JB, Pritchard GG. Regulation of pyruvate kinase from *Propionibacterium shermanii*. *J Gen Microbiol*.1979; 122: 281–288.
81. Kapoor R, Venkitasubramanian TA. Glucose 6-phosphate activation of pyruvate kinase from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem J*. 1981; 193: 435–440.
82. Malcovati M, Valentini G. AMP- and fructose 1,6-bisphosphate activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. 1982; 90: 170–179.
83. Busto F, Del Valle P, Soler J. Some kinetic properties of pyruvate kinase from *Phycomyces blakesleeanus*.*Biochem Cell Biol*. 1988; 66: 148–157.
84. Jetten SM, Gubler ME, Lee SH, Sinskey AJ. Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 2501–2507.

85. Steiner P, Fussenegger M, Bailey JE, Sauer U. Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* pyruvate kinase gene in *Escherichia coli*. *Gene*. 1988; 220: 31–38.
86. Cleland WW. in *The Enzymes*, Vol. 2, 3rd Ed. (Boyer P. D., ed). 1970: 1–65, Academic Press, Inc., New York.
87. Reed GH, Morgan SD. Kinetic and magnetic resonance studies of the interaction of oxalate with pyruvate kinase. *Biochemistry*. 1974; 13: 3537–3541.
88. Ramírez-Silva L, Oria-Hernández J. Selectivity of pyruvate kinase for Na⁺ and K⁺ in water/dimethylsulfoxide mixtures. *Eur J Biochem*. 2003; 270: 2377–2385.
89. Doolittle RF. The multiplicity of domains in proteins. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64: 287–314.
90. Ruiz-Arribas A, Santamaría RI, Zhadan GG, Villar E, Shnyrov VL. Differential scanning calorimetric study of the thermal stability of xylanase from *Streptomyces halstedii* JM8. *Biochemistry*. 1994; 33: 13787–13791.
91. Nikolova PV, Creagh AL, Duff SJ, Haynes CA. Thermostability and Irreversible activity loss of exoglucanase/xylanase Cex from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry*. 1997; 36: 1381–1388.

92. Onuchic JN, Wolynes PG, Luthey-Schulten Z, Socci ND. Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92: 3626–3630.

93. Allen SC, Muirhead H. Refined three-dimensional structure of cat muscle (M1) pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1996; 52: 499–504.

94. Hunter CA, Singh J, Thornton JM. π - π Interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. J Mol Biol. 1991 218: 837–846.

95. Knowles, V. I., Smith, C. S., Smith, C. R., and Plaxton, W. C. Structural and Regulatory Properties of Pyruvate Kinase from the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301. *J. Biol. Chem.* 2001;**276**, 20966- 20972

96. Ramírez-Silva L, Guerrero-Mendiola C, Cabrera N. The importance of polarity in the evolution of the K⁺ binding site of pyruvate kinase. Int J Mol Sci. 2014;15(12):22214-26.