

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	1
1.MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Evolución de enzimas.....	5
1.2 Super-familia riboquinasa.....	5
1.3 Hidroximetil Pirimidina quinasa (HMPKs).....	8
1.4 Piridoxal quinasa (PLKs).....	9
1.5 Enzimas bifuncionales HMPK/PLK.....	10
1.5.1 Enzima bifuncional HMPK/PLK de <i>B. subtilis</i> .....	10
1.5.2 Enzima bifuncional HMPK/PLK de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
1.5.3 Reconstrucción y resurrección experimental del último ancestro en común entre las enzimas HMPK y HMPK/PLK.....	11
2.HIPÓTESIS.....	15
3.OBJETIVOS.....	15
3.1 General.....	15
3.2 Específicos.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 Materiales.....	17
4.1.1 Plásmidos.....	17
4.1.2 Cepas.....	17
4.1.3 Medios de cultivo.....	17
4.1.4 Reactivos químicos generales.....	18
4.1.5 Tampones.....	18
4.2 Métodos experimentales.....	18
4.2.1 Electroforesis en geles de agarosa.....	18
4.2.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	19
4.2.3 Aislamiento de plásmidos.....	19
4.2.4 Transformación de cepas bacterianas.....	19

4.3 Reconstrucción del árbol filogenético de la familia de las quinasas de coenzimas dependientes de ATP. ....	20
4.3.1 Obtención de secuencias homólogas HMPK/PLK. ....	20
4.3.2 Reconstrucción del árbol filogenético de la familia HMPK/PLK. ....	21
4.3.3 Inferencia de la secuencias ancestrales: AncC2 y AncBi. ....	21
4.4 Resurrección experimental del último ancestro en común HMPK/PLK y mutante AncC1 Q45M.....	22
4.4.1 Sobreexpresión de las proteínas ancestrales AncBi/BA y AncC1 Q45M. ....	22
4.4.2 Purificación de la proteína ancestral por columna de afinidad. ....	23
4.5 Caracterización cinética con hidroximetil piridina y piridoxal como sustratos en las enzimas AncBi/BA y AncC1 Q45M.....	23
4.5.1 Determinación de parámetros cinéticos.....	23
4.5.2 Determinación de la actividad HMPK.....	26
4.5.3 Determinación de la actividad PLK. ....	26
4.6 Análisis de la especificidad de sustrato por HMP y PL <i>in silico</i> .....	27
4.6.1 Modelo por homología de las enzimas ancestrales AncC2 y AncBi/BA.....	27
4.6.2 Análisis de los aminoácidos implicados en la catálisis y/o unión de los sustratos HMP y PL mediante <i>docking</i> . ....	28
4.7 Mutagénesis sitio-dirigida: remplazo de glutamina por metionina en el sitio activo del último ancestro común. ....	29
4.7.1 Diseño de oligonucleótidos para la mutante AncC1 Q45M.....	29
4.7.2 Mutagénesis sitio-dirigida mediante PCR. ....	29
4.8 Obtención de la estructura 3D del último ancestro común entre enzimas HMPK y HMPK/PLK.....	30
4.8.1 Cristalización del AncC1. ....	30
4.8.2 Resolución y refinamiento de la estructura. ....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Reconstrucción del árbol filogenético de la familia de las quinasas de coenzimas dependientes de ATP. ....	32
5.2 Reconstrucción de las Secuencias Ancestrales.....	35
5.2.1 Reconstrucción de las secuencias ancestrales AncBi y AncC2.....	35
5.3 Sobre expresión y purificación de las proteínas ancestrales: AncC1 Q45M y AncBi/BA.....	44
5.4 Caracterización cinética con hidroximetil piridina y piridoxal como sustratos de AncBi/BA y AncC1 Q45M.....	46

5.4.1 Curva de saturación para ATP-Mg.....	46
5.5 Modelos por homología de las proteínas ancestrales AncBi/BA y AncC2. .	51
5.6 Análisis de los aminoácidos implicados en la catálisis y/o unión de los sustratos HMP y PL mediante <i>docking</i> .....	54
5.7 Resolución cristalográfica del ancestro común entre HMPK/PLK y HMPK.	60
6. DISCUSIÓN .....	65
7. CONCLUSIÓN .....	68
8. REFERENCIAS.....	69
9. ANEXOS .....	73
9.1 Presentación a congresos.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Enzima bifuncional HMPK/PLK .....	6
Figura 2. Familias de la super-familia riboquinasa.. .....	7
Figura 3. Árbol filogenético de la familia de coenzimas dependiente de ATP. ....	7
Figura 4. Las dos reacciones de fosforilación catalizadas por la enzima HMPK....	8
Figura 5. Formas activa de la vitamina B6 .....	9
Figura 6. Dendograma de la relación evolutiva de PLK y HMPK .....	12
Figura 7. Curvas de saturación para la ecuación de Michaelis-Menten y del modelo de inhibición por sustrato.....	25
Figura 8. Ensayo acoplado PK/LDH.....	26
Figura 9. Reacción de la actividad PLK.....	26
Figura 10. Oligonucleótido directo y reverso para la construcción de mutante Q45M .....	29
Figura 11. Convergencia del análisis de <i>MrBayes</i> para la reconstrucción filogenética. ....	32
Figura 12. Árbol filogenético consenso, generado con el programa <i>MrBayes</i> .....	34
Figura 13. Reconstrucción filogenética obtenida por máxima verosimilitud .....	35
Figura 14. Perfil de probabilidades de las secuencias inferidas por BA y ML.. ....	37

Figura 15. Histogramas de las probabilidades de las secuencias AncBi y AncC2 inferida por el método BA y ML .....	38
Figura 16. Alineamiento de las secuencias ancestrales inferidas utilizando el método bayesiano (BA) y máxima verosimilitud (ML).. .....	41
Figura 17. Gel de agarosa del plásmido pET-TEV con la secuencia Q45M AncC1. ....	42
Figura 18. Alineamiento de secuencia entre el ancestro AncC1 y AncC1 Q45M. ....	43
Figura 19. Cromatograma de elución de la columna HisTrap HP .....	44
Figura 20. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida de proteínas AncBi y AncC1 Q45M .....	45
Figura 21. Actividad ATP-Mg y parámetros cinéticos del ancestro AncBi/BA y AncC1 Q45M.....	47
Figura 22. Actividad piridoxal (PL) y parámetros cinéticos del ancestro AncBi/BA y AncC1 Q45M .....	48
Figura 23. Actividad hidroximetil-pirimidina quinasa (HMPK) y parámetros cinéticos del ancestro AncBi/BA y AncC1 Q45M.....	49
Figura 24. Representación estructural de los modelos por homología ancestrales .....	53
Figura 25. Ligandos HMP y PL optimizados con el método semiempírico PM6... ..	54
Figura 26. <i>Docking</i> del último ancestro en común de enzimas bifuncionales .....	56
Figura 27. <i>Docking</i> del último ancestro común entre enzimas bifuncionales .....	57
Figura 28. Residuos del sitio activo de AncBi/BA en comparación con enzima específica HMPK. ....	58
Figura 29. Residuos del sitio activo de AncBi/BA en comparación con enzimas bifuncionales. ....	59
Figura 30. Estructura cristalográfica del AncC1. ....	62
Figura 31. Residuos del sitio activo de la proteína AncC1 obtenida de la cristalografía.....	63
Figura 32. Residuos del sitio activo de AncC1 en comparación con enzima bifuncionales de <i>Staphylococcus aureus</i> .. .....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos del último ancestro común entre HMPKs y HMPK/PLKs. ....	13
Tabla 2. Identidad de secuencias ancestrales inferidas por BA y ML, con respecto a enzimas HMPKs y HMPK/PLKs. ....	40
Tabla 3. Parámetros cinéticos de las enzimas ancestrales AncC1, AncC1-Q45M y AncBi/BA. ....	50
Tabla 4: Tabla comparativa de las estructuras AncBi/BA y AncC/BA con respecto a enzimas HMPKs y HMPK/PLKs.. ....	52
Tabla 5: Validación de la estructura de los modelos seleccionados de cada ancestro.....	52
Tabla 6: Comparación de los residuos que se encuentran en un radio de 5 Å del sitio de unión a sustrato, en los modelos ancestrales y templados utilizados .....	54
Tabla 7: Energía asociadas al <i>docking</i> con los ligandos HMP y PL.....	55
Tabla 8: Resumen de las estadísticas de recopilación de datos y refinamiento de la estructura de AncC1 .....	61
Tabla 9: Comparación estructural de la estructura cristalográfica AncC1 con respecto a proteínas HMPK y HMPK/PLK depositadas en PDB.....	62