

INDICE DE CONTENIDOS

1	MARCO TEORICO.	5
1.1	Evolución de enzimas.	5
1.2	La súper familia riboquinasa.	6
1.3	Familia de quinastas de vitaminas y coenzimas: evidencia de enzimas bifuncionales.	8
1.4	Hidroximetil pirimidina quinasa.	9
1.5	Piridoxal quinasa.	10
1.6	Enzimas con actividad bifuncional HMPK y PLK.	11
2	HIPÓTESIS DE TRABAJO.	15
3	OBJETIVOS.	15
3.1	Objetivo General:	15
3.2	Objetivos Específicos:	15
4	MATERIALES Y METODOS.	16
4.1	Materiales.	16
4.1.1	Vectores.	16
4.1.2	Cepas.	16
4.1.3	Medios de Cultivo.	17
4.1.4	Reactivos químicos generales.	17
4.1.5	Soluciones generales.	17
4.2	Métodos Experimentales.	18
4.2.1	Electroforesis en geles de agarosa.	18
4.2.2	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.	18
4.2.3	Aislamiento de plásmidos.	18
4.2.4	Purificación de fragmentos de ADN mediante geles de agarosa.	19
4.3	Filogenia y Reconstrucción de Secuencias Ancestrales.	19
4.3.1	Búsqueda de secuencias aminoacídicas y alineamiento múltiple.	19
4.3.2	Creación del árbol filogenético.	20
4.3.3	Inferencia de las secuencias ancestrales.	22
4.3.4	Modelamiento por homología de las proteínas ancestrales.	23

4.3.5	<i>Docking</i> de los modelos por homología.	24
4.4	Síntesis, Expresión y caracterización cinética del último ancestro en común para las HMPK específicas y HMPK/PLK Bifuncionales.	25
4.4.1	Síntesis del gen ancestral.	25
4.4.2	Purificación de la proteína ancestral por columna de afinidad.	26
4.4.3	Determinación de la actividad PLK y HMPK.	27
4.4.4	Parámetros cinéticos para Mg-ATP.	27
4.4.5	Determinación del pH óptimo para el ancestro AncC.	28
4.4.6	Determinación de los parámetros cinéticos.	28
5	RESULTADOS.	31
5.1	Filogenia y Reconstrucción de Secuencias Ancestrales.	31
5.1.1	Reconstrucción Filogenética.	31
5.2	Reconstrucción de las Secuencias Ancestrales.	35
5.2.1	Reconstrucción de la secuencia específica por HMP.	35
5.2.2	Reconstrucción de la secuencia bifuncional HMP/PL.	38
5.2.3	Reconstrucción de la secuencia ancestral común.	40
5.2.4	Modelamiento por Homología.	42
5.2.5	<i>Docking</i> de los modelos por homología.	45
5.2.6	<i>Docking</i> de la interacción de los sustratos HMP y PL con el último ancestro en común.	46
5.2.7	<i>Docking</i> de la interacción de los sustratos HMP y PL con el ancestro bifuncional.	47
5.2.8	<i>Docking</i> de la interacción del sustratos HMP con el ancestro específico por HMP.	48
5.3	Resurrección del último ancestro en común para el grupo bifuncional HMPK/PLK y específico para HMPK.	50
5.3.1	Sub clonamiento del gen sintetizado.	50
5.3.2	Expresión y purificación de la proteína ancestral común entre el grupo bifuncional HMPK/PLK y específico por HMP.	52
5.4	Caracterización bioquímica del último ancestro común entre enzimas bifuncionales y específicas por HMP.	54

5.4.1	Curva de pH del último ancestro en común.	54
5.4.2	Curva saturación Mg-ATP del último ancestro en común.	54
5.4.3	Determinación de los parámetros cinéticos para HMP y PL.	55
6	DISCUSIÓN.	58
6.1	Filogenia y reconstrucción de secuencias ancestrales.	58
6.2	Modelos por homología y <i>docking</i> .	59
6.3	Caracterización bioquímica del último ancestro común entre las enzimas específicas por HMP y bifuncionales HMP/PL.	60
7	CONCLUSIONES.	64
8	BIBLIOGRAFÍA.	65
9	PRESENTACIONES A CONGRESOS.	70
10	ANEXOS.	71

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Posibles rutas que permiten la aparición de una nueva función.	6
Figura 2. Familia de quinasas de vitaminas.	7
Figura 3. Motivo NXXE.	8
Figura 4. Árbol filogenético, que representa las agrupaciones de enzimas HMPK, PLK, THZK y HMPK/PLK de diferentes organismos.	9
Figura 5. Reacciones de fosforilación catalizadas por hidroximetil pirimidina quinasas.	10
Figura 6. Síntesis de plp desde vitamina B6, PLK piridoxal quinasa, pnp, piridoxina-5-fosfato oxidasa (Li, 2002).	11
Figura 7. Estructura de la pdxk de <i>B. subtilis</i> .	12
Figura 8. Comparación entre PLK específicas y HMPK específicas con la enzima bifuncional de <i>B. subtilis</i> .	13
Figura 9. Convergencia del análisis de MrBayes MCMC para la reconstrucción del árbol filogenético.	33
Figura 10. Árbol filogenético consenso, generado con el programa <i>MrBayes</i> v3.1.1.	34
Figura 11. Convergencia del análisis de <i>MrBayes</i> para la reconstrucción ancestral de la secuencia específica por HMP.	36
Figura 12. Perfil de probabilidades de la secuencia específica por HMP.	36
Figura 13. Histograma de probabilidad de la secuencia ancestral específica.	37
Figura 14. Análisis de la corrida de <i>MrBayes</i> para la reconstrucción de la secuencia ancestral bifuncional HMPK/PLK.	38
Figura 15. Perfil de probabilidades de la secuencia ancestral bifuncional.	39
Figura 16. Histograma de probabilidades de la secuencia ancestral bifuncional.	39
Figura 17. Análisis de las corridas de mcmc para la reconstrucción de la secuencia ancestral común.	41
Figura 18. Perfil de probabilidades de la secuencia ancestral común.	41

Figura 19. Histograma de probabilidades de la secuencia ancestral común.	42
Figura 20. Alineamiento utilizado para la creación de los modelos por homología.	43
Figura 21. Representación de los tres modelos por homología creados para el ancestro común, específico y bifuncional.	44
Figura 22. <i>Docking</i> del último ancestros en común.	50
Figura 23. <i>Docking</i> del ancestro bifuncional HMPK/PLK.	47
Figura 24. <i>Docking</i> del ancestro específico por HMP.	48
Figura 25. Comparación del sitio activo de la enzima bifuncional de <i>B. subtilis</i> (celeste) y el ancestro común (verde).	50
Figura 26. Comparación del sitio de unión de PL y HMP del ancestro común (verde), con la enzima de <i>Salmonella typhimurium</i> en (azul) específica por hmp y de <i>E. coli</i> (celeste) específica por PL.	50
Figura 27. Gen de la proteína ancestral común optimizado para expresión en <i>E. coli</i> que codifica para la secuencia ancestral.	51
Figura 28. Gel de agarosa para corroborar el sub clonamiento del vector pet-tev en las colonias.	51
Figura 29. Digestión del plásmido de las colonias 2 (D2) y 6 (D6) con enzimas de restricción BamHI y NdeI	52
Figura 30. Purificación de la proteína ancestral.	53
Figura 31. Curvas de pH para ambas actividades de la proteína ancestral.	54
Figura 32. Curva de saturación Mg-ATP.	55
Figura 33. Curvas de saturación para los dos sustratos; HMP y PL.	56
Figura 34. Esquema propuesta inicial.	62
Figura 35. Esquema de resultado observado.	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de <i>B. subtilis</i> thid por los sustratos HMP y PL.	12
Tabla 2. Proteínas con estructuras cristalográficas resueltas.	31
Tabla 3. Tabla con los valores de validación de cada modelo, de acuerdo a su puntaje dope, <i>verify 3d</i> , <i>prosa</i> y <i>procheck</i> .	44
Tabla 4. Se muestra la conformación favorable así como la energía de cada ancestro y su ligando.	45
Tabla 5. Tabla purificación de la enzima ancestral.	53
Tabla 6. Parámetros cinéticos del ancestro común, usando HMP y PL como sustratos.	57