

---

**HISTORIA EVOLUTIVA DE LA ACTIVIDAD PIRIDOXAL QUINASA EN EL GRUPO DE LAS HIDROXIMETIL PIRIMIDINA QUINASAS DE BACTERIAS****EVELIN VALERIA GONZÁLEZ FELIÚ  
INGENIERO EN BIOINFORMÁTICA****RESUMEN**

Las enzimas son las encargadas de catalizar un gran número de reacciones fundamentales a nivel celular. Desde un punto de vista evolutivo, las enzimas que provienen un ancestro común se agrupan en familias y super-familias. Dentro de una familia sus miembros comparten una alta similitud estructural, especialmente en el sitio activo. La plasticidad del plegamiento permite a la enzima reaccionar con diversos sustratos formando de esta manera enzimas promiscuas, una característica altamente ligada a la evolución de proteínas. La familia de quinasas de coenzimas que pertenece a la super-familia de riboquinasas, presenta grupos de enzimas que son específicas para un sustrato, como la enzima de *Salmonella typhimurium* (PDB: 1JXH) que tiene por función fosforilar hidroximetil pirimidina (HMP) y la enzima de *E. coli*, derivada del gen *pdxY* (PDB: 1TD2), que fosforila piridoxal (PL). Se han descrito además dos variantes bifuncionales con la capacidad de fosforilar tanto HMP como PL, formando por tanto una nueva subclase de enzima bifuncionales denominadas enzimas HMPK/PLK. Estas enzimas se encuentran en los organismos *Bacillus subtilis* (PDB: 215B) y *Staphylococcus aureus* (PDB: 4C5N) y están relacionadas filogenéticamente con las enzimas HMPKs. Mediante resurrección de enzimas ancestrales y estudios de cinética enzimática se demostró que el último ancestro en común de enzimas HMPK y HMPK/PLK (AncC1) presenta una promiscuidad por sustrato, siendo capaz de catalizar reacciones con PL y HMP. Sin embargo, la concentración de piridoxal necesaria para la catálisis está fuera del rango de las concentraciones fisiológicas y por lo tanto este ancestro sería específico por HMP. Análisis *in silico* de la proteína ancestral indican que existe una glutamina en el sitio activo de AncC1, la que está presente en las enzimas específicas por HMP y que no se encuentra en las enzimas bifuncionales de *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. En las variantes bifuncionales esta glutamina es reemplazada por metionina en el sitio activo. Basados en estos antecedentes, se propuso que el último ancestro en común del grupo de enzimas bifuncionales HMPK/PLK es

bifuncional y que el cambio desde el ancestro específico AncC1 hacia las enzimas bifuncionales es debido a la mutación de una glutamina por una metionina en el sitio activo de estas enzimas. Para verificar esta hipótesis se realizó la inferencia de las secuencias ancestrales. Utilizando una filogenia actualizada se infirió la secuencia del último ancestro en común de las enzimas bifuncionales HMPK/PLK (AncBi) y la del último ancestro en común entre HMPK/PLK y HMPK (AncC2) utilizando los métodos estadísticos de máxima verosimilitud (ML) y método bayesiano (BA). Se generaron modelos por homología para los ancestros inferidos y se evaluaron las posibles interacciones con los sustratos de PL y HMP mediante *docking*. Además, se realizó una resurrección de la proteína ancestral AncBi/BA para una posterior caracterización cinética y mutación sitio dirigida para construcción de la mutante Q45M de AncC1. Al analizar el sitio activo y los residuos que se encontraban a 5 Å del ligando, se observa que el del AncC2 es semejante al de las enzimas específicas, ya que conserva el residuo de glutamina (Gln45) presente en las enzimas HMPKs específicas de *Salmonella typhimurium* y de *Thermus thermophilus*, el cual es reemplazado por una metionina en las enzimas bifuncionales de *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* y en el ancestro AncBi. Esto sugiere que la enzima ancestral AncC2 es específica por HMP y que AncBi es bifuncional con actividad HMPK/PLK. Las curvas de saturación para los sustratos PL y HMP mostraron que la enzima AncBi posee una constante de Michaelis (Km) de 0.7 y 0.85 mM, respectivamente, mientras que los valores de eficiencia catalítica (*k<sub>cat</sub>/Km*) son de 73 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para PL y de 31 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para HMP, siendo ambos valores muy semejantes por lo que AncBi es una enzima bifuncional. Estos resultados nos hacen proponer que la actividad bifuncional es una novedad evolutiva y que la especificidad es el carácter ancestral de la familia, donde la actividad PLK habría surgido de manera convergente y de manera independiente. La mutación Q45M de AncC1 generó un aumento 21 veces la afinidad por PL con respecto a la enzima AncC1 silvestre. Sin embargo, no se observó un cambio significativo en la especificidad por sustrato, debido principalmente a una disminución en el valor de *k<sub>cat</sub>*. De este modo, la mutante AncC1 Q45M se puede catalogar como un estado intermedio entre el ancestro AncC1 y el ancestro AncBi, haciendo falta otras mutaciones para lograr eficiencias catalíticas equivalentes a AncBi. Adicionalmente, se determinó la estructura del

---

ancestro AncC1 mediante cristalografía y difracción de rayos X, y se analizó la conservación estructural con respecto a las enzimas actuales.

---

## ABSTRACT

Enzymes are responsible for catalyzing many fundamental cellular reactions. From an evolutionary point of view, enzymes that come from a common ancestor are grouped into families and super-families. Family members share high structural similarity, especially at the active site. Folding plasticity allows that enzymes react with various substrates, thereby forming promiscuous enzymes, a feature that is highly linked to the evolution of proteins. Kinase family of coenzymes belonging to the riboquinase superfamily, has groups of enzymes that are specific for a substrate such as the enzyme from *Salmonella typhimurium* (PDB: 1JXH) whose function is to phosphorylate hydroxymethyl pyrimidine (HMP) and the enzyme from *E. coli* codified in the *pdxY* gene (PDB: 1TD2) that phosphorylates pyridoxal (PL). Moreover, two bifunctional variants with the ability to phosphorylate HMP and PL have been described. These bifunctional enzymes form a new subclass called HMPK/PLK enzyme which are present in *Bacillus subtilis* (PDB: 2I5B) and *Staphylococcus aureus* (PDB: 4C5N). These bifunctional enzymes are phylogenetically related to the HMPKs enzymes. By ancestral enzyme reconstruction and kinetic studies we demonstrated that the last common ancestor of HMPK and HMPK/PLK (AncC1) was promiscuous, being able of catalyzing reactions with PL and HMP as substrates. However, pyridoxal concentration of needed for catalysis is far beyond the physiological range, and there for this ancestor as specific for HMP. *In silico* analysis of the ancestral protein AncC1 indicate the presence of a glutamine at the active site which is present in the HMP specific enzymes, but is absent in the bifunctional enzymes from *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. In the bifunctional enzymes this glutamine is replaced by methionine at the active site. Based on this background, it was proposed that the last common ancestor of the bifunctional HMPK/PLK enzymes group is bifunctional and that the change from the specific ancestor AncC1 to the bifunctional enzyme is due to a mutation of glutamine by a methionine at the active site of these enzymes. To verify this hypothesis inference of ancestral sequences was performed. The last common ancestor of bifunctional enzymes HMPK/PLK (AncBi) and the last common ancestor between HMPK/PLK and HMPK (AncC2) were inferred from an updated phylogeny, using statistical methods such as maximum likelihood (ML) 4 and Bayesian method (BA). Homology models were generated for the inferred ancestors and interactions with HMP by PL substrates

were assessed by *docking*. The resurrected AncBi ancestor was characterized kinetically and the AncC1 Q45M mutant was performed by site directed mutagenesis. Analysis of the active site and residues within 5 Å of the ligand shows that the active site of AncC2 is similar to the ones present in the specific enzymes since it retains the glutamine residue (Gln45) present in the HMPKs specific enzymes from *Salmonella typhimurium* and *Thermus thermophilus*. In the bifunctional enzymes from *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and in the AncBi ancestor, this residue is replaced by methionine. This suggests that the ancestral AncC2 enzyme is specific by HMP and that the ancestral AncBi have HMPK/PLK bifunctional activity. The saturation curves of the AncBi enzyme for PL and HMP substrates showed a Michaelis constant ( $K_m$ ) of 0.7 mM and 0.85 mM respectively, while the values of catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) are 73 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> to PL 31 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> for HMP, being both values very similar so the AncBi is a bifunctional enzyme. These results lead us to propose that the bifunctional activity is the evolutionary novelty, and that specificity is the ancestral character of the family, where the PLK activity arises in a convergent and independent manner. The Q45M mutation of AncC1 generated a 21 times increase in the PL affinity with respect to the enzyme wild type AncC1. However a significant change in substrate specificity was not observed mainly due to a decrease in the  $k_{cat}$  value. Thus, the AncC1 Q45M mutant can be classified as an intermediate state between the AncC1 ancestor and the AncBi ancestor, while another mutations will be need to achieve catalytic efficiencies equivalent to AncBi. Additionally, the structure of the AncC1 ancestor was determined by crystallography and X-ray diffraction, and the structural conservation regarding the current enzymes present was analyzed.