
**HISTORIA EVOLUTIVA DE LA ACTIVIDAD BIFUNCIONAL HIDROXIMETIL
PIRIMIDINA QUINASA / PIRIDOXAL QUINASA DE LA FAMILIA DE QUINASAS
DE VITAMINAS DEPENDIENTES DE ATP****FELIPE ALFONSO BRAVO MORAGA
INGENIERO EN BIOINFORMÁTICA****RESUMEN**

Las enzimas desempeñan una gran cantidad de funciones a nivel celular, catalizando reacciones mayormente de carácter específico por algún sustrato. En base a la función que desempeñan y su plegamiento, las enzimas se clasifican en familias y súper familias. En este trabajo estudiamos la familia de quinasas de vitaminas dependientes de ATP, la cual pertenece a la súper familia riboquinasa.

La familia de quinasas de vitaminas presenta grupos de enzimas que son específicas por 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). Interesantemente en la familia de quinasas de vitaminas se encuentra caracterizada una enzima bifuncional codificada por el gen *thiD* de *Bacillus subtilis* (PDB:2I5B) que es capaz de fosforilar de manera inespecífica hidroximetil pirimidina y piridoxal.

En términos de evolución de enzimas, hay dos mecanismos por los cuales las enzimas pueden evolucionar hacia una nueva especificidad; de una forma drástica perdiendo la función anterior y adquiriendo una nueva, o coexistiendo las dos actividades (actividad ancestral y nueva) durante una fase de transición.

Evolutivamente no se tiene conocimiento si la actividad bifuncional de hidroximetil pirimidina quinasa (HMPK) / piridoxal quinasa (PLK) es un estado ancestral o es un rasgo más reciente en la historia evolutiva. En este trabajo propusimos que la actividad bifuncional es de carácter ancestral y que la familia evolucionó hacia la especificidad por hidroximetil pirimidina. Para corroborar esto se reconstruyó por métodos de inferencia filogenética la secuencia ancestral del grupo de las HMPK/PLK bifuncionales, la secuencia ancestral del grupo de las HMPK específicas y la secuencia del último ancestro en común para ambos grupos. Se generaron modelos por homologías para dichos ancestros y se evaluaron las posibles interacciones con los diferentes sustratos mediante *docking*. Al analizar el sitio activo y los residuos que se encontraban a 5 Å del ligando, se pudo inferir que

el último ancestro en común para ambos grupos es semejante a las enzimas específicas, ya que conserva un residuo de glutamina (Gln44), presente en la mayoría de las enzimas específicas por hidroximetil pirimidina, el cual es reemplazado por metionina en la enzima bifuncional de *B. subtilis* (Met44), lo que sugiere que la enzima ancestral es preferente por HMP por sobre PL.

Experimentalmente se sintetizó el gen del último ancestro en común entre el grupo de las HMPK específicas y HMPK/PLK bifuncionales, con el fin de evaluar su capacidad de fosforilar ambos sustratos, PL y HMP. Se realizaron curvas de pH para conocer el intervalo en el cual la enzima presentaba la mayor actividad, correspondiente a pH 6 - 6,5 cuando se usó PL como sustrato, mientras que para HMP, ésta se encontró entre pH 7,5 - 8. Se realizó una curva de saturación de Mg-ATP, para encontrar la concentración saturante de dicho complejo para la enzima ancestral, la cual está sobre los 5 mM, encontrándose además inhibición a concentraciones por sobre 10 mM. Las curvas de saturación para los sustratos PL y HMP mostraron que la enzima posee una constante de Michaelis (K_m) de 28 y 7 mM respectivamente, mientras que los valores de eficiencia catalítica (k_{cat} / K_m) para PL y HMP son de 7 $M^{-1}s^{-1}$ y de 57 $M^{-1}s^{-1}$ respectivamente, teniendo una preferencia por HMP 8 veces superior a la de PL. Estos valores experimentales confirman la suposición del análisis bioinformático de que la enzima es más preferente por HMP que por PL. Estos resultados nos hacen proponer que la actividad bifuncional es una novedad evolutiva, y que la especificidad es el carácter ancestral de la familia. La capacidad de fosforilar ambos sustratos con eficiencias catalíticas similares pudo haber surgido tardíamente en la familia por un evento de evolución paralela, ya que la actividad HMPK es el carácter ancestral.

ABSTRACT

Enzymes play a lot of functions at the cellular level, catalyzing reactions mostly specific for a particular substrate. Based on their role and their fold, enzymes are classified into families and superfamilies. In this paper we study the family of ATP dependent vitamin kinases, which belongs to the ribokinase superfamily.

The family of vitamin kinases has groups of enzymes that are specific for a substrate, such as *Salmonella typhimurium* (PDB: 1JXH) whose function is to phosphorylate hydroxymethyl pyrimidine (HMP) and the enzyme derived from *pdxY* gene of *E. coli* (PDB: 1TD2) that phosphorylates pyridoxal (PL). Interestingly, a bifunctional enzyme from *Bacillus subtilis* encoded by gene *thiD* has been described (PDB: 2I5B), that is capable of non-specifically phosphorylate hydroxymethyl pyrimidine and pyridoxal.

In terms of enzyme evolution, there are two mechanisms by which enzymes can evolve into a new specificity; by dramatically losing a previous function and acquiring a new one, or by coexistence of two activities (ancestral and new activities) during a transition phase.

Evolutionarily it is unknown whether the bifunctional hydroxymethyl pyrimidine kinase (HMPK) / pyridoxal kinase (PLK) activity is an ancestral trait or a more recent event in evolutionary history. In this work we proposed that the bifunctional activity is an ancestral trait and thus the family evolved towards hydroxymethyl pyrimidine specificity. To corroborate this, we reconstructed the ancestral sequence of the bifunctional group of HMPK / PLK, the ancestral sequence of the specific group of HMPK specific and the sequence of the last common ancestor for both groups by means of phylogenetic inference methods. Homology models were generated for these ancestors and possible interactions with its different substrates were evaluated by docking. Upon analysis of the active site and the residues at 5 Å of the ligand, it was possible to infer that the last common ancestor for both groups is similar to the specific enzymes as it retains a glutamine residue (Gln44) present in most hydroxymethyl pyrimidine specific enzymes, which is replaced by a methionine in the bifunctional enzyme from *B. subtilis* (Met44), suggesting that the ancestral enzyme prefers HMP over PL.