

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
MÓDULO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

**Síntesis enzimática en un solo paso de nucleósidos-
5'-mono,-di y trifosfato, mediante un biocatalizador
bifuncional**

Autor: Javier Acosta Bueno

Tutora: Dolores Santa María Gutiérrez

Director externo: Jesús Fernández Lucas

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIO-ORGÁNICA
Junio 2020**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
MÓDULO DE QUÍMICA ORGÁNICA****Síntesis enzimática en un solo paso de nucleósidos-
5'-mono,-di y trifosfato, mediante un biocatalizador
bifuncional****Autor: Javier Acosta Bueno****Tutora: Dolores Santa María Gutiérrez****Director externo: Jesús Fernández Lucas****FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIO-ORGÁNICA****Junio 2020**



Universidad
Europea

LAUREATE INTERNATIONAL UNIVERSITIES

Tutora Dolores Santa María Gutiérrez
Profesor/a del Máster en Ciencia y Tecnología Química
Dpto. de Química Orgánica y Bio-orgánica
Facultad de Ciencias
UNED
Paseo Senda del Rey 9
28040 Madrid

Dr. Jesús Fernández Lucas profesor titular de la Universidad Europea de Madrid (UEM), perteneciente al departamento de Farmacia y Biotecnología.

CERTIFICA:

Que D. Javier Acosta Bueno ha realizado bajo mi dirección en los laboratorios del Grupo de Biotecnología Aplicada (GBA) de la Universidad Europea de Madrid el Proyecto de Investigación titulado “Síntesis enzimática en un solo paso de nucleósidos-5’-mono,-di y trifosfato, mediante un biocatalizador bifuncional”.

Y para que conste a efectos oportunos.

Madrid. 7 de mayo de 2020

Fdo.: Dr. Jesús Fernández Lucas

Tabla de contenido

| | |
|---|-----|
| Índice de abreviaturas: | I |
| Resumen: | III |
| Resumen gráfico | III |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Características de <i>Zobellia galactanivorans</i> | 3 |
| 1.2. Nucleótidos..... | 3 |
| 1.2.1. Características..... | 3 |
| 1.2.2. Ruta de síntesis <i>de novo</i> | 4 |
| 1.2.3. Ruta de salvamento..... | 6 |
| 1.3. Síntesis y aplicaciones de los nucleótidos | 10 |
| 2. Objetivos | 13 |
| 3. Materiales y métodos..... | 14 |
| 3.1. Materiales..... | 14 |
| 3.2. Análisis de la secuencia de <i>ZgHGPRT/AMPK</i> | 14 |
| 3.3. Construcción del modelo tridimensional de <i>ZgHGPRT/AMPK</i> | 14 |
| 3.4. Obtención del plásmido y del microorganismo..... | 15 |
| 3.4.1. Condiciones de cultivo..... | 15 |
| 3.4.2. Proceso de clonación | 15 |
| 3.4.3. Proceso de transformación..... | 16 |
| 3.4.4. Extracción y purificación del plásmido..... | 16 |
| 3.5. Expresión y purificación de <i>ZgHGPRT/AMPK</i> | 17 |
| 3.6. Análisis de ultracentrifugación analítica | 18 |
| 3.7. Ensayo de actividad enzimática | 19 |
| 3.8. Influencia de la temperatura y del pH en la actividad enzimática | 19 |
| 3.9. Determinación de la temperatura de desnaturalización | 19 |
| 3.10. Determinación de la termoestabilidad | 20 |
| 3.11. Influencia de cationes divalentes en la actividad enzimática | 20 |
| 3.13. Estudio cinético de <i>ZgHGPRT/AMPK</i> | 21 |
| 3.14. Método analítico | 21 |
| 4. Resultados y discusión | 22 |
| 4.1. Análisis bioinformático de <i>ZgHGPRT/AMPK</i> | 22 |
| 4.2. Clonaje y purificación del plásmido | 28 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.3. | Producción y purificación de ZgHGPRT/AMPK..... | 29 |
| 4.4. | Ultracentrifugación analítica | 30 |
| 4.5. | Caracterización bioquímica de ZgHGPRT/AMPK..... | 32 |
| 4.5.1. | Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática | 32 |
| 4.5.2. | Efecto del pH sobre la actividad enzimática..... | 33 |
| 4.5.3. | Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática..... | 33 |
| 4.5.4. | Efecto de disolventes orgánicos sobre la actividad enzimática..... | 34 |
| 4.5.5. | Estabilidad térmica | 36 |
| 4.5.6. | Especificidad de sustrato..... | 37 |
| 4.5.7. | Análisis cinético | 38 |
| 5. | Conclusiones | 40 |
| 6. | Bibliografía | 41 |
| 7. | Material suplementario..... | 49 |

Índice de abreviaturas:

Ade: Adenina

ADP: Adenosina-5'- difosfato

AMP: Adenosina-5'- monofosfato

ATP: Adenosina-5'- trifosfato

Cyt: Citosina

GMP: Guanosina-5'-monofosfato

GPRT: Guanina fosforribosiltransferasa

Gua: Guanina

HCl: Ácido clorhídrico

HGPRT: Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa

HPRT: Hipoxantina fosforribosiltransferasa

Hyp: Hipoxantina

IMP: Inosina-5'- monofosfato

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Km⁵⁰: Kanamicina a una concentración de 50 μ g/mL

MD: Dinámica molecular

Mg²⁺: Ión magnesio

MgCl₂: Cloruro de magnesio

NaCl: Cloruro sódico

NDP: Nucleosido-5'-difosfato

NMP: Nucleosido-5'-monofosfato

NTP: Nucleosido-5'-trifosfato

ON: Durante toda la noche

PP_i: Pirofosfato inorgánico

PRPP: 5-Fosfo-alfa-D-ribosa-1-difosfato

PRT: Fosforribosiltransferasa

PSA: Persulfato amónico

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecilsulfato sódico

TEMED: Tetrametiletiléndiamina

Thd: Timina

Ura: Uracilo

UV: Ultravioleta

Xan: Xantina

XMP: Xantosina-5'- monofosfato

XPRT: Xantina fosforribosiltransferasa

ZgHGPRT/AMPK: Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenilato quinasa de *Zobellia galactanivorans*

Resumen:

En la búsqueda de nuevos biocatalizadores para la síntesis de ácido nucleicos, se encontró un buen candidato en una supuesta enzima descrita putativamente con un dominio doble hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT)/ adenilato quinasa (AMPK) de *Zobellia galactanivorans* (ZgHGPRT/AMPK). A este respecto, se informa por primera vez la expresión recombinante, producción y caracterización de una HGPRT/AMPK bifuncional. La caracterización bioquímica de la proteína recombinante indica que la enzima es un homodímero, con alta actividad en el rango de pH 6-7 y en un intervalo de temperatura de 30 a 80 °C. Los experimentos de desnaturalización térmica revelaron que ZgHGPRT/AMPK exhibe una temperatura de fusión aparente (T_m) de 45 °C y una actividad retenida de alrededor del 80% cuando se incubaba a 40 °C durante 240 min. Esta enzima bifuncional muestra una dependencia de los cationes divalentes, con una notable preferencia por Mg^{2+} y Co^{2+} como cofactores. Además, los estudios de especificidad de sustrato revelaron que ZgHGPRT/AMPK es una enzima bifuncional, que actúa como fosforribosiltransferasa o adenilato quinasa dependiendo de la naturaleza del sustrato. Finalmente, para evaluar el potencial de ZgHGPRT/AMPK como biocatalizador para la síntesis de nucleósido-5'-mono-, -di y trifosfatos, se realizó un estudio cinético de ambas actividades (fosforribosiltransferasa y adenilato quinasa) y un análisis del efecto de los disolventes orgánicos sobre la actividad de la enzima.

Resumen gráfico

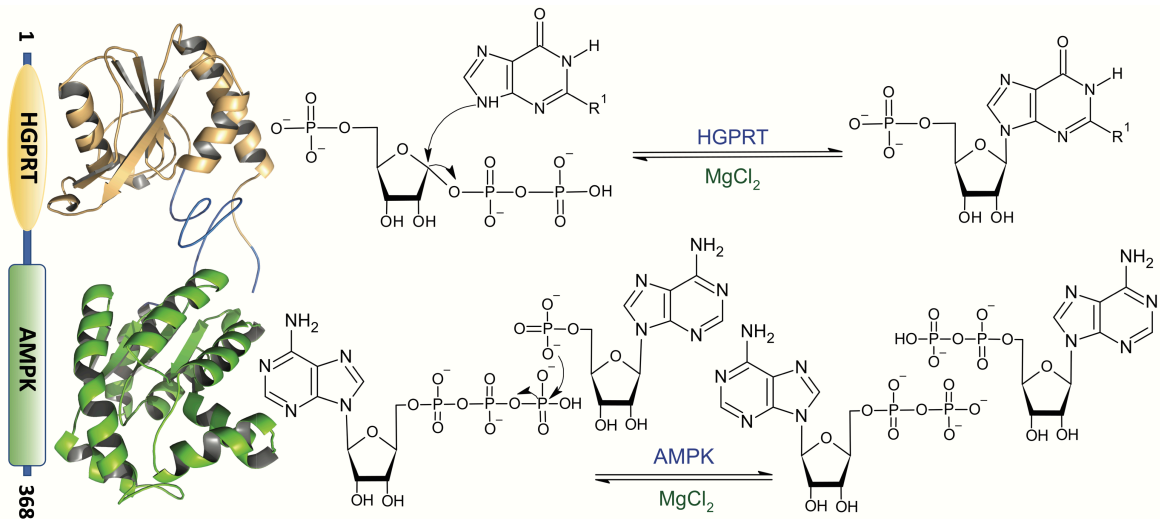


Figura Resumen: Enzima bifuncional hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa/adenilato quinasa de *Zobellia galactanivorans* (ZgHGPRT/AMPK). R^1 : H ó NH_2 ; R^2 : H ó OH.

1. Introducción

La biotecnología se define según la *International Unions of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como la integración de las ciencias naturales y las ciencias de la ingeniería para lograr la aplicación de organismos, células, partes de estos y análogos moleculares para generar productos y servicios para la sociedad. En estrecha relación con las TIC, el desarrollo de la biotecnología como ciencia supone un nuevo paradigma tecno-económico que abarca toda una constelación de innovaciones tecnológica y económicamente interrelacionadas que influyen prácticamente en la totalidad de las industrias. Tanto es así, que la biotecnología industrial o blanca, que es una de las ramas de la biotecnología, dedica pleno esfuerzo a la producción de bienes y servicios en este ámbito. La implementación necesaria de la biotecnología en la industria se ha visto impulsada por la necesidad de optimizar todos los procesos industriales, en los que se busca reducir y eliminar todas las transformaciones químicas contaminantes y reemplazarlos por opciones menos contaminantes ¹. En este sentido, las nuevas tecnologías permiten reducir sensiblemente el impacto medioambiental asociado a los procesos químicos tradicionales como la disminución del gasto energético en un 20 %, de residuos de gases nocivos como el CO₂ en un 50 %, y del agua empleada en un 75 %. Además, se produce un ahorro de entre el 10 al 50 % del capital y los costes operacionales del proceso ². De esta forma, la biotecnología blanca se constituye como una herramienta que favorece y contribuye al cuidado ambiental, lo que permite un desarrollo sostenible tanto social y ambiental como económico.

Desde un punto de vista social, la biotecnología podría desplegarse a lo largo de la cadena de valor, para brindar apoyo al desarrollo de las industrias de base biológica de tal manera que se asegure la sostenibilidad del sector y se reduzcan los impactos ambientales negativos que de otra forma ocurrirían. Con ello, se logra transformar a los países en vías de desarrollo y menos adelantados en industrializados influyendo decisivamente en la crematística del país ³. Por tanto, el papel de la biotecnología va más allá del crecimiento industrial, ya que brinda oportunidades de progreso hacia muchos de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) propuestos por la ONU a través de una economía circular ⁴.

Desde un punto de vista económico, la biotecnología industrial contribuye con más de 300 mil millones de dólares a la denominada economía basada en la biología o bioeconomía ⁵. El sector de la biotecnología industrial se basa principalmente en el empleo de biocatalizadores que son los principales impulsores tecnológicos de la bioeconomía ⁶. Los biocatalizadores se clasifican, generalmente, en cuatro grandes grupos: las células, los extractos celulares, las enzimas y los sistemas multienzimáticos ⁷. Las células, implicadas en procesos fermentativos,

mueven actualmente 127 mil millones de dólares USD ⁵ y se aplican principalmente en procesos largos y complejos que implican varias etapas en la producción. La principal desventaja de estos biocatalizadores es el uso de medios de cultivo complejos junto con la formación de una gran variedad de productos secundarios que dificultan el proceso *downstream* de la purificación del producto. En contraposición, La actividad autocatalítica es una de las principales ventajas de las células ya que permite la regeneración del biocatalizador. No obstante, dicha actividad no siempre es deseada, porque parte de la energía suministrada se emplea en el proceso de replicación y, por lo tanto, el rendimiento disminuye⁷. Para estos procesos es más apropiado el uso de extractos celulares. Por su parte, las enzimas permiten un control más exhaustivo del entorno de la reacción evitando la generación de productos secundarios y facilitando la purificación de los compuestos deseados. En 2013, el mercado mundial de enzimas industriales se valoró en poco más de 4 mil millones de dólares US, mientras que en 2018 se alcanzó alrededor de 7,1 mil millones de dólares US, lo que supone una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 8,2 % ⁵. Sin embargo, la principal desventaja de las enzimas por su naturaleza, es su incapacidad para generar más de una única biotransformación, por lo que su uso está limitado para procesos largos y complejos. Por ello, en los últimos años, se han desarrollado sistemas multienzimáticos que emplean varias enzimas que se hallan consecutivas en la ruta metabólica, donde el producto generado por la primera enzima es el sustrato para la segunda⁸. Estos sistemas multienzimáticos permiten llevar a cabo un mayor número de transformaciones y, por tanto, abarcar procesos más complejos. El principal cuello de botella de estos sistemas radica en la dificultad y lentitud en el proceso de producción y purificación de proteínas ⁹. Para paliar estos problemas se han diseñado sistemas de coexpresión que permiten producir varias enzimas de manera simultánea. Sin embargo, el proceso de transformación de sistemas de coexpresión es difícil ya que requiere el uso de vectores de alto peso molecular, o diferentes plásmidos en cuyo caso es necesario emplear múltiples transformaciones y diferentes marcadores de selección ¹⁰. Para intentar reducir este coste, recientemente se han desarrollado proteínas de fusión que han acaparado una gran atención en la comunidad científica ^{7 11 14}. La formación de estas enzimas multifuncionales permite reducir no solo la complejidad del proceso de clonación, producción y purificación, sino también minimizar el estrés metabólico de la célula huésped derivado del coste energético y material que suponen las anteriores estrategias ¹². No obstante, esta herramienta también se aprecia en construcciones naturales que ocurren en los seres vivos a través de mutaciones. Un ejemplo lo encontramos en este trabajo, donde se pretende caracterizar estructural y funcionalmente una enzima putativa con potencial actividad bifuncional, fosforribosiltransferasa y quinasa, implicada en la síntesis de ácidos nucleicos del microorganismo *Zobellia galactanivorans*.

1.1. Características de *Zobellia galactanivorans*

Zobellia galactanivorans es una bacteria marina Gram negativa aislada por primera vez del alga roja *Delesseria sanguinea* en el mar de Roscoff ubicado entre Francia y Gran Bretaña. Este microorganismo destaca por la degradación activa de carragenanos y agares. Asimismo, *Zobellia galactanivorans* muestra una elevada semejanza con *Zobellia uliginosa* según los análisis de ARN ribosómico 16s¹⁵.

Zobellia galactanivorans pertenece a la familia *Flavobacteriaceae* por lo que crece en forma de bacilos aerobios, no flagelados que se desplazan por deslizamiento. Se presentan de manera aislada o en parejas. Tiene un tamaño medio de entre 3 a 8 μm de longitud y de entre 0,3 a 0,4 μm de anchura¹⁵.

La bacteria crece en el rango de temperatura de entre 13 °C a 45 °C, en el rango de pH de entre 6 a 8,5, y en el rango de concentración salina NaCl de entre 0,0015 M a 1 M. *Zobellia galactanivorans* presenta un tiempo de duplicación de 50 minutos bajo las condiciones óptimas de crecimiento de 35 °C, pH 7 y 0,4 M de concentración de NaCl¹⁵.

Las vías de síntesis de salvamento y *de novo* de ácidos nucleicos no han sido detalladas en *Z. galactanivorans*. Sin embargo, se sabe que, gracias a la secuenciación de su genoma, el bacilo codifica putativamente para las enzimas de ambas rutas.

1.2. Nucleótidos

Los nucleótidos son biomoléculas esenciales que están presentes en todos los seres vivos. Las principales funciones que cumplen estas moléculas dentro de las células están relacionadas con procesos de regulación (coenzimas), de transferencia de grupos fosfato y energía (nucleósido-5'-trifosfato en su forma complejada con metales divalentes, especialmente adenosina 5'-trifosfato o ATP, y guanosina 5'-trifosfato o GTP), señalización celular (nucleótidos cíclicos), de síntesis de ARN o ADN encargados de la transmisión y del almacenamiento de la información genética¹⁶.

1.2.1. Características

La estructura básica de un nucleótido consiste en una pentosa (β -D-ribosfuranosa o 2'-desoxi- β -D-ribosfuranosa), enlazada a través del carbono anomérico C1' a una base nitrogenada (nucleobase) y, unida por el C5' a uno, a dos o a tres grupos fosfato (P_{α} , P_{β} y P_{γ}). La unión de la base nitrogenada con la pentosa tiene lugar a través de un enlace β -N-glucosídico con el N9 de las nucleobases púricas (xantina, hipoxantina, guanina y adenina) o con el N1 de las nucleobases pirimidínicas (uracilo, timina y citosina) (Tabla suplementaria 1)¹⁷.

La unión de la furanosa a la base nitrogenada se denomina nucleósido y, también, son compuestos esenciales que actúan como precursores en la síntesis de nucleótidos, ya que pueden ser fosforilados sobre el grupo hidroxilo (-OH) del C5' mediante nucleósido quinasas. Estas moléculas pueden ser sintetizadas por la célula o incorporadas a través de transportadores específicos ¹⁸. Asimismo, los nucleósidos pueden ser reciclados mediante NDT ¹⁹ o nucleasas ²⁰ que liberan la base nitrogenada de la pentosa en la ruta de salvamento.

Por tanto, los seres vivos pueden sintetizar nucleótidos a través de la ruta de síntesis *de novo*, empleando precursores de bajo peso molecular, o de la ruta de salvamento mediante la degradación de nucleótidos preexistentes. Estas vías biosintéticas esenciales se han convertido en una buena diana terapéutica, ya que pueden actuar como activadores de profármacos quimioterapéuticos en terapias del gen suicida contra agentes infecciosos o el cáncer ¹⁰.

1.2.2. Ruta de síntesis *de novo*

La síntesis de nucleótidos mediante la ruta *de novo* requiere emplear como precursores metabólicos el 5-fosfo- α -D-ribofuranosil-1-pirofosfato (PRPP), amino ácidos, NH_3 y CO_2 ; como energía química el ATP o el GTP; y como poder oxidante el NAD^+ .

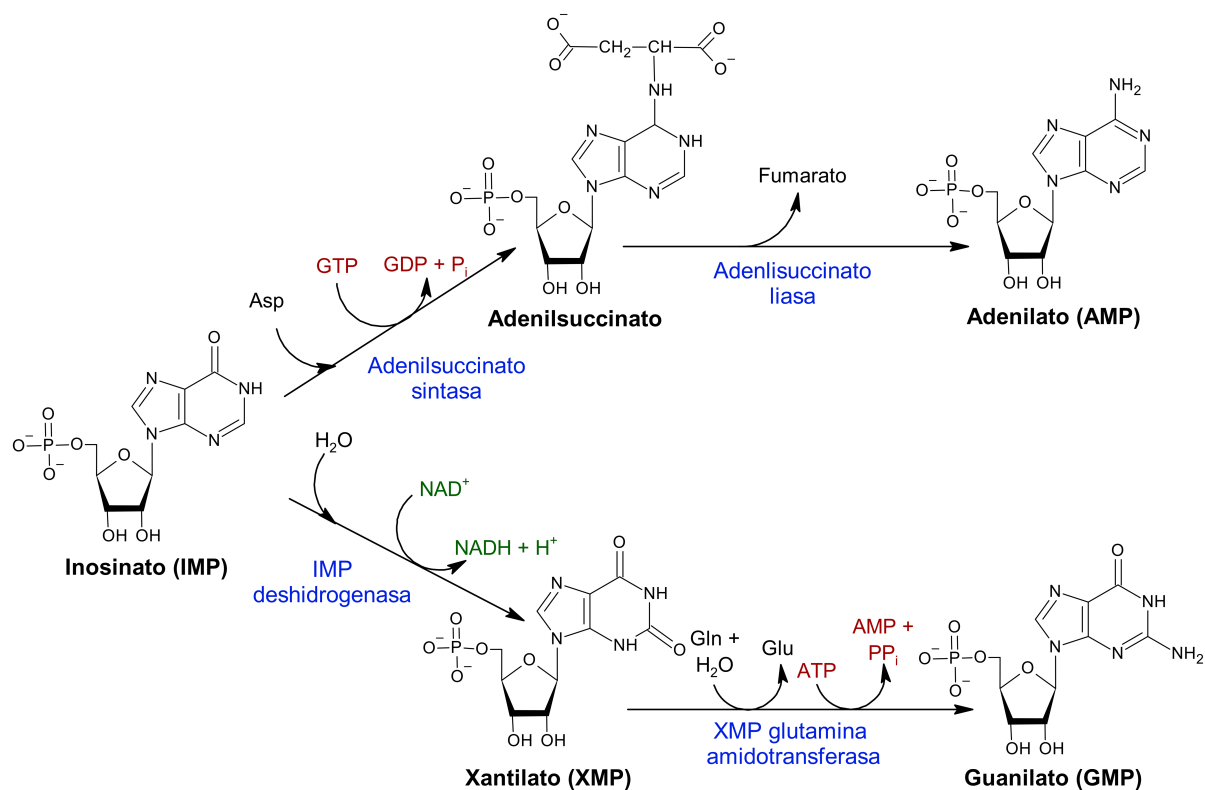


Figura 1: Ruta de síntesis *de novo* de AMP y GMP a partir de IMP. Asp, ácido aspártico; P_i, fosfato inorgánico; Gln glutamina; Glu, ácido glutámico; y PP_i, pirofosfato inorgánico.

El anillo de hipoxantina se genera mediante 11 transformaciones y 5 moléculas de ATP sobre la ribosa-5-fosfato del PRPP dando lugar a la inosina-5'-monofosfato (IMP). Posteriormente, el IMP actúa como precursor en la síntesis de la adenosina-5'-monofosfato (AMP) y de la guanosina-5'-monofosfato (GMP) (Figura 1). A continuación, estos nucleótidos de purina se pueden fosforilar empleando diferentes enzimas nucleósido mono- o difosfato quinasa para generar ADP y GDP y ATP y GTP respectivamente en función de los requerimientos de la célula.

En cambio, en la producción de nucleótidos de pirimidina se sintetiza primero la base nitrogenada orotato a partir de CO₂, glutamina y 2 moléculas de ATP mediante 4 pasos metabólicos. Posteriormente, se produce la unión de esta nucleobase al C1 del PRPP catalizado por una orotato fosforribosiltransferasa (OPRT). El orotidilato (OMP), generado en el paso anterior, puede ser descarboxilado por una OMP descarboxilasa para producir uridilato (UMP). Una vez sintetizado el UMP se puede producir citidilato (CTP) mediante una citidilato sintasa o timidilato (TMP) mediante una timidilato sintasa (Figura 2). A continuación, los diferentes nucleósidos pirimidínicos 5'-mono- di- o trifosfato son regulados mediante fosfatasa o quinasa.

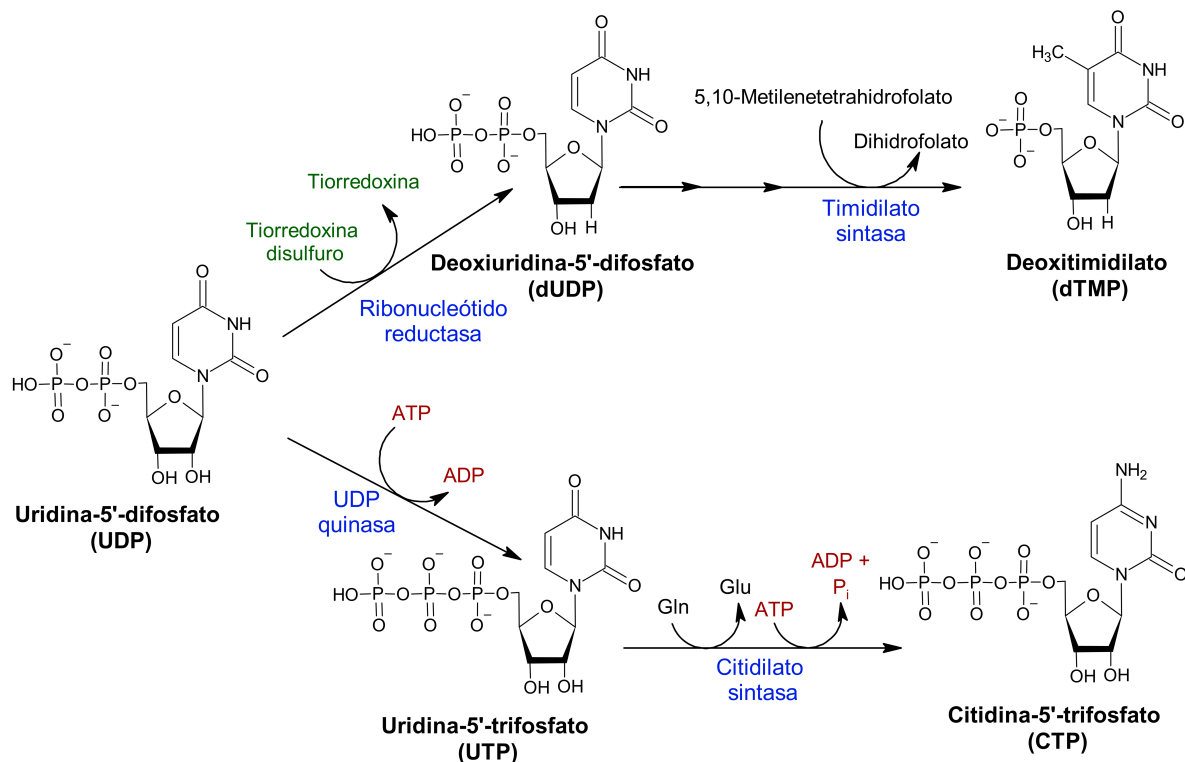


Figura 2: Ruta de síntesis *de novo* de dTMP y CTP a partir de UDP. Cada etapa en la ruta metabólica está indicada con una flecha.

La regulación de ambas rutas se lleva a cabo por retroalimentación negativa. De esta forma, para la síntesis de nucleótidos de purina, el IMP, el GMP y el ATP son inhibidores alostéricos de la glutamina-PRPP amidotransferasa implicada en la primera etapa de la ruta metabólica. Además, la IMP deshidrogenasa y la adenilsuccinato sintasa son inhibidas por GMP y AMP respectivamente, lo que desvía la ruta hacia la síntesis de uno u otro compuesto. De igual forma, la síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos es bloqueada por la inhibición alostérica que produce el CTP y/o UTP sobre la aspartato transcarbamoilasa. Además, las concentraciones de nucleótidos púricos y pirimidínicos se mantienen estables gracias a la capacidad del ATP de bloquear el cambio conformacional de la aspartato transcarbamoilasa inducido por el UTP y/o CTP.

1.2.3. Ruta de salvamento

La ruta de salvamento comprende una serie de rutas de reciclaje a través de las cuales las células satisfacen sus necesidades nucleotídicas mediante fuentes endógenas y/o exógenas de nucleótidos preexistentes. Las principales enzimas implicadas en la ruta de salvamento son 2'-desoxiribosiltransferasas^{19 21 22}, nucleósido fosforilasas^{23 24}, fosforribosiltransferasas (PRTs)^{25 27}, nucleósido-5'-monofosfato quinasas (NMPKs)^{28 29}, y nucleósido quinasas^{30 32} entre otras.

La mayoría de los seres vivos y concretamente los microorganismos emplean tanto la síntesis *de novo* como la ruta de salvamento para satisfacer las necesidades metabólicas de nucleótidos. Sin embargo, en situaciones de estrés metabólico, como en el crecimiento exponencial o de déficit de energía, la ruta de salvamento es la más activa³³. Esto se debe a que la producción de nucleótidos en la ruta de salvamento ocurre en una única etapa y sin gasto energético en lugar de en 7 y 11 transformaciones bioquímicas y con un gasto de ATP de 2 a 4 y de 5 a 6 moléculas para la síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos y púricos respectivamente²⁰. Por lo tanto, la ruta de salvamento es de gran interés para la biotecnología puesto que permite la síntesis de ácidos nucleicos en una sola etapa y sin necesidad de suplementar energía química.

1.2.3.1. Fosforribosiltransferasas

La familia de las fosforribosiltransferasas (PRTs) engloba tanto a las enzimas pirimidina como purina fosforribosiltransferasas. Estas enzimas catalizan la transferencia reversible del grupo 5-fosforibosilo del PRPP a la base de pirimidina o purina respectivamente empleando metales divalentes (generalmente el Mg^{2+} y en menor medida el Ca^{2+}) como cofactores. Las PRTs son

esenciales para la formación de ácidos nucleicos en los organismos ya que son capaces de generar el enlace β -*N*-glucosídico de todos los nucleótidos presentes en el ADN y ARN ^{34 36}.

Existen diferentes mecanismos de reacción de acuerdo con los datos cinéticos experimentales. La hipótesis más aceptada es que la reacción ocurre a través de un mecanismo secuencial ordenado donde primero se une el PRPP y, a continuación, se produce el ataque nucleofílico de la base y posterior liberación del PP_i seguido del correspondiente nucleósido-5'-monofosfato (NMP) ^{25 37 38}. Algunos ejemplos que sustentan esta teoría son las orotato fosforribosiltransferasas (OPRTs) de algunas levaduras ³²; las hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasas (HGPRTs) de *Tritrichomonas foetus* y *Homo sapiens* ^{39 40}; o las uracilo fosforribosiltransferasas (UPRTs) de *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus caldolyticus* y *Escherichia coli* ^{37 38}. Sin embargo, también se ha propuesto un mecanismo cinético secuencial aleatorio para las OPRT de *Salmonella typhimurium* y *Plasmodium falciparum* ^{41 42}. Finalmente, algunas PRTs como la UPRT de *Saccharomyces Cerevisiae* parecen seguir un mecanismo de tipo ping-pong ⁴³.

En cuanto a la estructura cuaternaria de la proteína, las PRTs suelen formar dímeros o múltiplos de dímeros. Esto es debido a que, en la mayoría de los casos, el bolsillo de unión del PRPP • Mg²⁺ en el centro activo de una subunidad se forma por la interacción de un residuo básico de la subunidad vecina en la interfaz del dímero. Sin embargo, solo presentan fenómenos alostéricos algunas PRTs como la de *Sulfolobus shibatae* ⁴⁴ o *E. coli* ⁴⁵. Además, no se ha descrito ningún mecanismo cooperativo en la unión del complejo PRPP • Mg²⁺ en la mayoría de PRTs.

1.2.3.2. Purina fosforribosiltransferasas

Las purina PRTs catalizan la transferencia, en presencia de Mg²⁺, del grupo 5-fosforibosilo del PRPP al N9 de 6-aminopurinas como la adenina (1) para sintetizar adenosina-5'-monofosfato, AMP (5); o de 6-oxopurinas como hipoxantina (2), guanina (3) y xantina (4) para producir inosina-5'-monofosfato, IMP (6), guanosina-5'-monofosfato, GMP (7) o xantosina-5'-monofosfato, XMP (8) respectivamente ⁴⁶ (Figura 3). De este modo, las purinas PRTs se pueden clasificar en función de la especificidad de sustrato en dos clases: las 6-aminopurina PRTs que comprende la adenina fosforribosiltransferasa (APRT) ^{24 44 47}; y las 6-oxopurinas PRTs donde se engloban la hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT), la guanina fosforribosiltransferasa (GPRT), la xantina fosforribosiltransferasa (XPRT), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) e hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa (HGXPRT) ^{48 49}.

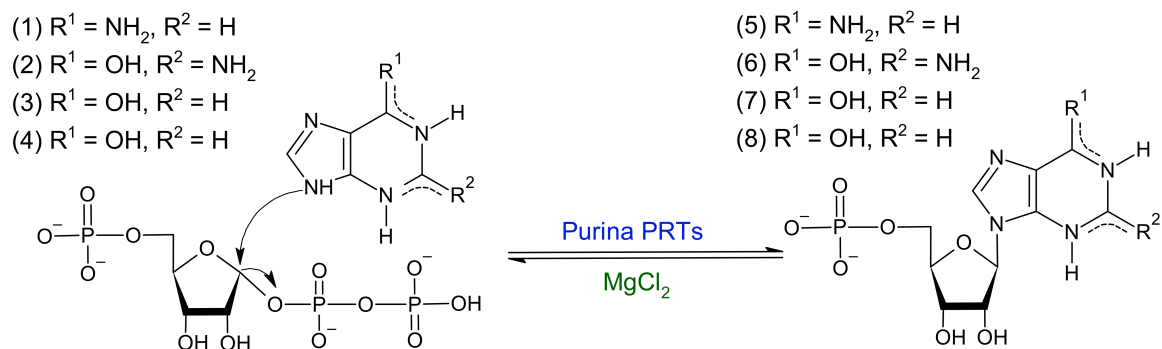


Figura 3: Síntesis en un solo paso de nucleótidos de purinas catalizado por purina fosforribosiltransferasas.

1.2.3.3. 6-oxopurinas fosforribosiltransferasas

En la naturaleza, las purina PRTs sintetizan IMP (6), GMP (7) y/o XMP (8) a partir del PRPP y de una base 6-oxopurínica como Hyp (2), Gua (3) y/o Xan (4) respectivamente, en presencia de Mg²⁺ (Figura 3). Además, se ha demostrado que algunas de estas enzimas son capaces de transformar análogos de 6-oxopurinas como el alopurinol por la HGPRT de *Plasmodium falciparum*⁵⁰; o la 6-mercaptopurina, la 2-amino-6-mercaptopurina, 6-cloropurina, 2-amino-6-cloropurina, 6-bromopurina o 2-amino-6-bromopurina por la HPRT de *E. coli*^{48 49}.

Las enzimas hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasas (EC 2.4.2.8, HGPRT), pertenecen a la familia de las 6-oxopurina fosforribosiltransferasas y como su propio nombre indica, su especificidad preferente es hacia hipoxantina y guanina. Además, son las enzimas más abundantes²⁷ e importantes para la síntesis de nucleótidos de 6-oxopurina en la ruta de salvamento³⁶. Por tanto, desde un punto de vista biotecnológico, las HGPRTs han acaparado una gran importancia tanto en la síntesis de agentes quimioterapéuticos como activadores de profármacos y dianas terapéuticas en sí mismas para el tratamiento de parásitos como *Trypanosoma brucei*⁵¹, *Leishmania donovani*⁵² o *E. coli*⁵³.

1.2.4. Nucleósido-5'-monofosfato quinazas

Las nucleósido-5'-monofosfato quinazas son enzimas que actúan tanto en la ruta de síntesis *de novo* como en la ruta de salvamento de los nucleótidos. Estas enzimas catalizan la transferencia reversible, en presencia de metales divalentes, del grupo γ-fosforilo de un nucleósido-5'-trifosfato (NTP), que actúa como donador, al grupo α-fosforilo de un NMP que actúa como aceptor, dando lugar a dos moles de nucleósido-5'-difosfato (NDP) por cada mol de cada sustrato¹⁰ (Figura 4). La función principal de las NMPKs consiste en mantener constante el equilibrio entre las concentraciones de NMP, NDP y NTP dentro de la célula³³.

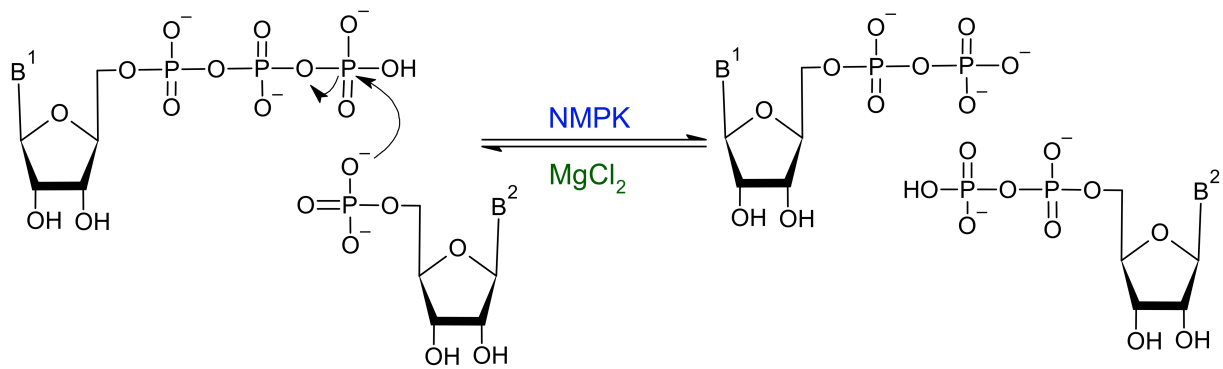


Figura 4: Mecanismo catalítico de las NMPKs. B¹= Suele ser adenina y B²= cualquier nucleobase en función del tipo de NMPK.

Se han propuesto dos mecanismos diferentes de reacción para las NMPKs en función de los datos experimentales: uno de transferencia doble o indirecta y otro de transferencia sencilla o directa. En el primero, la reacción ocurre a través de un intermedio de enzima fosforilada, donde el NTP dona el grupo γ -fosforilo a un residuo de la proteína (normalmente a la histidina), que finalmente es transferido desde la enzima al NMP⁵⁴. Por otro lado, en la transferencia sencilla o directa, es necesario que tanto el NMP como el NTP estén unidos simultáneamente a la enzima para se produzca la transferencia directa del grupo fosforilo desde el NTP al NMP⁵⁴. Como ejemplos cabe destacar la adenosina monofosfato quinasa (AMPK) de *Mycobacterium tuberculosis*⁵⁵ o la uridina monofosfato quinasa (UMPK) de *Dictyostelium discoideum*⁵⁶. Los últimos estudios indican que la transferencia directa es la hipótesis más acertada y proponen también que la entrada de los sustratos debe realizarse de manera aleatoria^{57 58}. Además, también se ha descrito que la unión del complejo NTP • Mg²⁺ favorece la unión del NMP y viceversa, por lo que se puede considerar que las NMPKs tienen un comportamiento cooperativo en la unión de los sustratos^{59 60}.

Las NMPKs se pueden clasificar en función de la especificidad por el aceptor del grupo fosfato (NMP). De esta forma, existen 5 tipos diferentes: las uridina monofosfato quinasas (UMPK) específicas de UMP (EC 2.7.4.4)⁶¹, las timidina monofosfato quinasas (TMPK) específicas de dTMP (EC 2.7.4.9), las citidina monofosfato quinasas (CMPK) específicas de CMP/dCMP (EC 2.7.4.14)⁶², guanosina monofosfato quinasas (GMPK) específicas de GMP/dGMP (EC 2.7.4.8)⁶³, y adenosina monofosfato quinasas (AMPK) específicas para AMP/dAMP (EC 2.7.4.3)⁶⁴. Por lo general, el donador del grupo fosfato es el ATP, sin embargo, también se han descrito NMPKs que aceptan otros donadores como el GTP en el caso de a AMPK de *Plasmodium falciparum*⁶⁵, o TTP, UTP, dGTP, GTP, dCTP, CTP y dATP en el caso de la AMPK6 de *Homo sapiens*⁶⁶.

1.2.4.1. Adenosina monofosfato quinasas

Las adenosina monofosfato quinasas (AMPKs) son enzimas que se clasifican dentro de la familia de las NMPKs. Estas enzimas catalizan la síntesis reversible de 2 moles de ADP mediante la transferencia del grupo γ -fosforilo del ATP al fosfato α del AMP, empleando 1 mol de cada sustrato en presencia de Mg^{2+} (Figura 4). La principal función de las AMPKs en los organismos es mantener constantes los ratios de ATP, ADP y AMP, así como regular el balance de energía celular ⁶⁷.

En la secuencia general de las AMPKs se pueden encontrar 3 dominios diferentes: i) el dominio de unión del AMP (*AMP binding site*, AMPbs), que engloba también parte de la unión del ATP; ii) el dominio central (*CORE*) posee los aminoácidos necesarios para facilitar la catálisis, además, proporciona estabilidad a la proteína; iii) el dominio LID que se pliega sobre el centro activo aislándolo y generando un entorno hidrofóbico que evita la hidrólisis y promueve la actividad fosfotransferasa ⁶⁷. Atendiendo a la longitud del LID, las AMPKs se pueden clasificar en AMPKs de LID corto que se encuentran fundamentalmente de levaduras, bacterias y mitocondrias; o de LID largo que están presentes mayoritariamente en células eucariotas ^{33 68}.

1.3. Síntesis y aplicaciones de los nucleótidos

Por su papel estructural en el ADN y ARN, los análogos de nucleósidos y nucleótidos se han utilizado como agentes terapéuticos frente a diversos tipos de enfermedades ²⁵. Pero el espectro de acción de los análogos de nucleósidos y nucleótidos no solo se limita a la industria farmacéutica, sino que también han sido empleados en la industria alimentaria como potenciadores del sabor. Por ejemplo, el GMP y el IMP se emplean como aditivos en la comida asiática para potenciar el sabor *umami*. Estos aditivos permiten reducir el contenido de sal en los alimentos sin renunciar al sabor, por lo que puede ser un buen sustituto para evitar posibles problemas cardíacos y circulatorios ⁶⁹. Las principales fuentes de nucleótidos en el ser humano incluyen la síntesis *de novo*, la recuperación a través de mecanismos de salvamento e ingestas dietéticas. Aunque la producción endógena sirve como la principal fuente de nucleótidos, las fuentes exógenas son esenciales para la competencia inmune, el desarrollo intestinal y la recuperación. Los nucleótidos de la dieta tienen un papel marcado en las células que proliferan rápidamente donde son necesarias para una función óptima. En consecuencia, los nucleótidos de la dieta se consideran condicionalmente esenciales en presencia de diversos estreses fisiológicos, incluidos el crecimiento y el desarrollo, la recuperación de una lesión, infección y ciertos estados de enfermedad. Además, se ha demostrado que la

suplementación de nucleótidos en la fórmula infantil mejora la maduración y el desarrollo del tracto intestinal, así como la función inmune ⁷⁰.

Adicionalmente, en los últimos años, los nucleótidos se han empleado como biomoléculas versátiles para la construcción o regulación de nanomateriales funcionales, lo cual ha estimulado el interés en los investigadores por este campo de la ciencia. La elección de los nucleótidos para generar nanosistemas funcionales con características novedosas y avanzadas se basa en sus propiedades únicas como la diversidad estructural, los sitios de unión múltiple, la capacidad de autoensamblaje, la estabilidad, la biocompatibilidad y la quiralidad. Las diversas aplicaciones abarcan desde la detección, la bioimagen y la administración de medicamentos hasta imitar la antena de captación de luz (*light-harvesting antenna complex*), la construcción de puertas lógicas y más ⁷¹. Por ejemplo, el grupo de Kunar sintetizó un hidrogel poroso mediado por GMP que contenía nanoestructuras de β -FeOOH que muestra una liberación controlada, baja toxicidad, estabilidad y propiedades magnéticas, lo que implica su potencial para aplicaciones biológicas ⁷².

Como resultado, la actual demanda de nucleótidos en las diferentes industrias está creciendo y la producción de nucleótidos ha sido estudiada ampliamente, por lo que es muy importante el contar con métodos de producción novedosos, eficaces y, en lo posible, respetuosos con el medio ambiente.

Los nucleótidos se pueden producir utilizando métodos químicos y biológicos, incluida la reacción enzimática y la fermentación. La síntesis química de nucleótidos se realiza rutinariamente por la 5'-fosforilación del precursor nucleosídico una, dos o tres veces (NMP, NDP y NTP respectivamente). A menudo requiere el uso de reactivos químicos (cloruro de fosforilo, POCl_3 o pentóxido de fósforo, P_2O_5), condiciones ácidas y solventes orgánicos, que son caros y perjudiciales para el medio ambiente ^{73 74}. Desafortunadamente, la vía para sintetizar nucleósidos precursores procede a través del acoplamiento de la nucleobase al grupo de la ribosa. En este sentido, estas metodologías necesitan la activación del grupo glucosilo y grupos protectores en la base heterocíclica y la fracción de azúcar, así como un control exhaustivo de la región y estereoselectividad del enlace glucosídico C-N ⁷⁵. De esta manera, la síntesis química de los nucleósidos generalmente incluye varios pasos de protección-desprotección y el uso de reactivos químicos y solventes orgánicos. En consecuencia, estas rutas sintéticas generalmente proporcionan rendimientos pobres o moderados, baja pureza del producto y están asociadas con condiciones de reacción severas y problemas de eliminación de desechos.

El uso de enzimas como catalizadores industriales (biotecnología blanca) puede proporcionar un esquema sintético novedoso y directo, así como metodologías adecuadas y eficientes para

desarrollar procesos industriales sostenibles. Como resultado, se pueden obtener productos de alta calidad mediante procesos competitivos desde el punto de vista económico y tecnológico. Por lo tanto, el uso de enzimas en la síntesis orgánica (biocatálisis) está aumentando, particularmente cuando la producción industrial tiene que lidiar con un alto impacto ambiental, en un intento por lograr una "química sostenible". En este marco, la síntesis enzimática de nucleótidos es un campo atractivo ya que las biotransformaciones muestran muchas ventajas en comparación con los métodos químicos, como reacciones de un recipiente (*one-pot*) en condiciones suaves, alta estereo- y regioselectividad, y una tecnología ecológica. Además, en las últimas décadas, se ha implementado una tendencia, por parte de la Comisión Europea, hacia la búsqueda de técnicas más sostenibles para el medio ambiente, afirmando que el cambio debe producirse a través de opciones enzimáticas dadas sus ventajosas características ⁷⁶. Por ello, la síntesis química de nucleótidos está siendo reemplazada por enfoques enzimáticos o quimioenzimáticos. Con este fin, también se han utilizado muchas enzimas diferentes como catalizadores valiosos para la síntesis mono o multi-enzimática de nucleótidos ⁷⁵, incluidas las nucleósidos quinasas (NKs) ⁷⁷, fosfotransferasas ácidas (AP/PTasas)⁷⁸, 5'-fosfodiesterasas ⁷⁹ nucleobase fosforribosiltransferasas (PRTs)⁴⁹ o nucleósido monofosfato quinasas (NMPKs) ⁸⁰. Sin embargo, a pesar de los grandes beneficios que presenta el uso de enzimas multifuncionales en comparación con los sistemas multienzimáticos, es la primera vez que se describe una enzima bifuncional con actividad PRT y NMPK.

2. Objetivos

El principal objetivo del presente trabajo consiste en el desarrollo de un nuevo biocatalizador bifuncional para la síntesis de diversos tipos de nucleótidos con diferentes aplicaciones en una gran variedad de industrias como la farmacéutica, investigación, y alimentaria. Para ello, se propone estudiar sobre la familia fosforribosiltransferasa y sobre nucleósido monofosfato quinasas.

Dicho objetivo general se llevará a cabo a través de los siguientes objetivos específicos:

- Búsqueda *in silico* de un biocatalizador
- Caracterización bioinformática de la proteína
- Producción de la enzima de interés.
 - Transformación del vector clonado de interés en *E. coli*
 - Producción y purificación de la proteína recombinante
- Caracterización bioquímica de la enzima
 - Determinación del efecto de la temperatura en la actividad enzimática
 - Determinación del efecto del pH en la actividad enzimática
 - Efecto de diversos cofactores en la actividad enzimática
 - Determinación de la especificidad de sustrato
- Estudio de los parámetros cinéticos de la reacción
- Determinación de la termoestabilidad del biocatalizador
- Estudio del efecto de disolventes orgánicos en la actividad enzimática

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Los reactivos del medio de cultivo celular se compraron en Difco (St. Louis, EE. UU.). El tampón acetato de trietilamonio fue proporcionado por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Todos los demás reactivos y disolventes orgánicos fueron adquiridos de Synta (Madrid, España). Los nucleótidos, nucleósidos y nucleobases fueron proporcionados por Carbosynth Ltd. (Compton, Reino Unido).

3.2. Análisis de la secuencia de ZgHGPRT/AMPK

Para conocer las especies con las que comparte una mayor similitud, se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de ZgHGPRT/AMPK, contra una base de datos no redundante donde se encuentran todas las secuencias traducidas de PDB, GenBank, CDS, PIR, SwissProt, CDS, PIR y PRF excluyendo muestras ambientales de proyectos WGS. Para ello se empleó la matriz BLOSUM62 con el algoritmo blastp⁸¹ y un umbral esperado de 10 con un tamaño de palabra de 3.

La predicción de dominios funcionales se llevó a cabo a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante el algoritmo PSI-BLAST integrado en la herramienta DomPred de PSIPRED⁸². Posteriormente se detectaron las regiones altamente conservadas de cada dominio funcional mediante un alineamiento múltiple de secuencia empleando la herramienta Clustal Omega⁸³, emparejando secuencias con una cobertura superior al 88 % y una identidad de secuencia entre un 35 y un 45 %. Los resultados del alineamiento fueron analizados posteriormente con la herramienta ESPript⁸⁴.

Finalmente, para la predicción de la posible estructura secundaria de la proteína se utilizó el programa JPred4⁸⁵.

3.3. Construcción del modelo tridimensional de ZgHGPRT/AMPK

Los modelos de cada dominio catalítico se construyeron por homología empleando el servidor Swiss-Model⁸⁶, utilizando las mejores plantillas de estructuras 3D de proteínas conocidas. En este sentido, la HGPRT de *Leptospira interrogans* (código PDB 4QRI) y la estructura AMPK de *Geobacillus stearothermophilus* (código PDB 1ZIN) se seleccionaron como plantillas. Se construyó un modelo 3D de ZgHGPRT/AMPK completo mediante el ensamblaje de los mejores modelos por homología para ambos dominios, HGPRT y AMPK, utilizando simulaciones Monte Carlo de intercambio de réplicas integradas en el servidor *Domain*

Enhanced Modeling ⁸⁷. Finalmente, se realizó un acoplamiento proteína-proteína usando ClusPro ⁸⁸ para construir la estructura cuaternaria de la proteína. PyMOL ⁸⁹ se utilizó para la visualización de estructuras, edición molecular y preparación de figuras.

Finalmente, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular (MD) del complejo ligando-receptor utilizando el paquete de programas AmberTools16 ⁹⁰. Para ello, la proteína se sumergió en una caja de aguas TIP3P 12.0 y se neutralizaron las cargas con NaCl previamente calculadas mediante el campo de fuerzas ff14SB ⁹¹. La parametrización de los ligandos se realizó mediante el programa Antechamber y Parmchk empleando el método de cargas de Gasteiger. La simulación se ejecutó mediante 4 etapas: minimización, calentamiento (100 ps), equilibrado (50 ps), y producción (30 ns).

3.4. Obtención del plásmido y del microorganismo

3.4.1. Condiciones de cultivo

El crecimiento de *Escherichia coli* BL21(DE3) se llevó a cabo en el medio de cultivo Luria Bertani (LB) que contiene NaCl (5 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y triptona (10 g/L) a pH 7,5. El medio sólido (LB-agar) se forma tras añadir un 2 % (p/v) de agar al medio LB líquido. Tanto el medio líquido como el medio sólido de LB se suplementó con kanamicina a una concentración final de 50 µg/mL disuelto en H₂O (Km⁵⁰). Las condiciones de incubación en medio sólido se fijaron a una temperatura de 37 °C durante aproximadamente 16 horas (*Overnight, ON*) y en medio líquido a una temperatura 37 °C y con una agitación orbital de 250 rpm manteniendo una aereación de 2:3 del volumen.

Todos los medios de cultivo y materiales de microbiología se esterilizan en un autoclave bajo unas condiciones de 1 kg/cm² de presión y 121 °C de temperatura durante 20 minutos.

3.4.2. Proceso de clonación

El gen *hgprt/ampk* (NCBI Reference Sequence: WP_013993825.1), fue proporcionado por Genscript (Piscataway, United States). El vector recombinante pET28b-ZgHGPRT/AMPK se construyó mediante la clonación del gen de interés entre las dianas de restricción *NdeI* y *EcoRI* del vector de expresión pET28b(+), generando una proteína de fusión con una etiqueta de 6 histidinas separada de la proteína de interés por una secuencia de corte con trombina. En el vector recombinante, la expresión del gen *hgprt/ampk* se halla bajo la influencia del promotor T7 que se encuentra regulado por la expresión constitutiva del represor *lacI*. Además, este vector posee el gen de resistencia a kanamicina que permite seleccionar los clones que se han transformado correctamente.

3.4.3. Proceso de transformación

Se emplearon células de *E. coli* BL21(DE3) para la incorporación y expresión del vector recombinante. Estas cepas son deficientes en las proteasas *OmpT* y *Lom*⁹² por lo que se disminuye el riesgo de proteólisis durante el proceso de expresión y purificación.

Las células supercompetentes de *E. coli* BL21(DE3) fueron preparadas a partir de un cultivo de esta cepa crecido previamente en un preinóculo de LB durante 16 h. Tras alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8, se centrifugó el cultivo durante 10 minutos a 5.000 rpm y 4 °C. El precipitado o *pellet* se sometió posteriormente a un tratamiento de 0,1 M de CaCl₂ durante 30 minutos en hielo. Finalmente se guardaron alícuotas de las células resuspendidas en 0,1 M de CaCl₂ y 15 % de glicerol en una cámara de -80 °C hasta su uso.

Para llevar a cabo el proceso de transformación por choque térmico de Sambrook⁹³, se preparó una disolución de 0,01 µg/µL de ADN recombinante comercial con una suspensión de células a una DO₆₀₀ de 0,72. Dicha disolución se incubó en hielo durante 30 minutos, seguido de 30 segundos a 42 °C, y 5 minutos más en hielo. A continuación, las células se diluyeron 1:6 en medio LB y se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante 2 horas y 30 minutos. Finalmente, las células se sometieron a selección en placa Petri mediante LB-agar con Km⁵⁰ a 37 °C ON.

Por último, se generó un *stock* de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el vector recombinante pET28b-ZgHGPRT/AMPK mediante una suspensión al 20 % de glicerol congeladas a -80 °C.

3.4.4. Extracción y purificación del plásmido

La extracción del vector recombinante pET28b-ZgHGPRT/AMPK se llevó a cabo mediante el kit comercial de extracción Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit #7326100. Una vez extraído el plásmido de interés, se calculó la concentración de ADN espectrofotométricamente a través del NanoDrop® fijando la longitud de onda (λ) a 260 nm con el programa *Nucleic Acid*.

Para conocer la pureza y la integridad del vector, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % con 0,015 µL/mL de redsafe®. Las muestras cargadas contenían 1-2 µg del plásmido purificado o del plásmido comercial o 2 µL de marcador Lambda DNA/HindIII, 2 µL de buffer de carga 5X en un volumen final de 10 µL. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE (1X). Finalmente, se reveló el gel en un transiluminador UV.

3.5. Expresión y purificación de ZgHGPRT/AMPK

La proteína ZgHGPRT/AMPK fue expresada en *Escherichia coli* BL21 (DE3) cultivado a 37 ° C en medio LB líquido suplementado con kanamicina (50 µg/ml). La sobreexpresión de proteínas se indujo agregando 0,5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al cultivo en fase exponencial (DO₆₀₀ de 0,8) durante una incubación de 4 horas. Luego, las células se recolectaron por centrifugación a 3.800 g y 4 °C, y el sedimento resultante se resuspendió en 10 mM de tampón fosfato sódico a pH 7. Los extractos crudos se prepararon por disrupción física de la membrana celular de la suspensión bacteriana usando un sonicador digital. Para ello, se aplicaron 10 pulsos de 30 segundos con ciclos de 0,5 segundos y con una amplitud de onda del 40 % para los dos primeros, del 30 % para los tres siguientes, y del 20 % para los cinco últimos. El lisado celular se centrifugó a 16.500 g y 4 °C durante 30 minutos y se descartaron los restos celulares (*debris* celular).

El lisado limpio se cargó en una columna HisTrap FF de 5 ml (GE Healthcare) equipada dentro del equipo BioLogic LP (*Low Pressure*), preequilibrada en el tampón de unión (20 mM de tampón Tris-HCl a pH 7,5, con 100 mM de NaCl y, 20 mM de imidazol). Las proteínas unidas se eluyeron usando un gradiente lineal de imidazol (de 20 a 500 mM en 120 minutos) con un flujo de 1 mL/min. La detección de proteínas del eluido se llevó a cabo mediante un detector UV acoplado al equipo BioLogic LP. Las fracciones que contenían la proteína ZgHGPRT/AMPK se identificaron mediante SDS-PAGE, se agruparon, se concentraron y se cargaron en una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) equipada dentro del equipo ÄKTAprime plus, pre-equilibrada en 20 mM de tampón fosfato sódico a pH 7 a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones con la proteína de interés fueron identificadas por SDS-PAGE.

La electroforesis por SDS-PAGE se llevó a cabo mediante un gel discontinuo (gel concentrador o *stacking* y gel separador o *running*) en condiciones desnaturalizantes (Tabla 1)⁹⁴. Las muestras contenían 4 µL de tampón de carga y 16 µL de proteína, y se emplearon 2-4 µL de marcador Protein PrecisionPlus. La carrera electroforética se realizó en cubetas de BioRad a un voltaje constante de 100-120 V. La tinción del gel se produjo incubando durante 20 minutos con la solución de tinte (azul brillante de Coomassie G250 0,012 % (p/v), 50 % metanol y 10 % ácido acético glacial) y durante 16 horas con la solución de desteñido (40 % metanol y 10 % ácido acético glacial). Posteriormente, el gel se reveló con el programa Image lab™ en el equipo ChemiDoc de Bio-Rad.

Tabla 1: Componentes de SDS-PAGE⁹⁴. A+B significa acrilamida al 30% y bisacrilamida al 0,8% (p/v). El tampón Tris-HCl tiene una concentración de 2,5 M y un pH de 6,8 para el gel concentrador y el tampón de ruptura; y una concentración de 1 M y un pH de 8,8. La concentración de glicerol y 2-ME es del 100 %. SDS significa dodecilsulfato sódico; PSA, persulfato amónico; 2-ME, 2-β-mercaptoetanol; TEMED, N,N,N',N'-tetrametilendiamina; Azul BrPh, azul de bromofenol.

| Gel discontinuo | | | Tampón de carrera | | Tampón de ruptura | |
|------------------|--------------|-----------|-------------------|----------|-------------------|----------|
| Materiales | Concentrador | Separador | Materiales | Cantidad | Materiales | Cantidad |
| H ₂ O | 1,925 mL | 1,2 mL | H ₂ O | 1 L | H ₂ O | 7,25 mL |
| A+B | 0,405 mL | 2,325 mL | | | Glicerol | 1 mL |
| Tris-HCl | 0,125 mL | 2,1 mL | Tris-HCl | 3,02 g | 2-ME | 0,5 mL |
| SDS 20% | 12,5 μL | 28,5 μL | Glicina | 14,41 g | Tris-HCl | 0,25 mL |
| TEMED | 5 μL | 6 μL | | | SDS 20% | 1 mL |
| PSA 10% | 12,5 μL | 30 μL | SDS | 1 g | Azul BrPh | 0,2 μg |
| Volumen | 2,5 mL | 5,7 mL | Volumen | 1L | Volumen | 10 mL |

El proceso de concentración se realizó por centrifugación en filtros Amicon® a 5.000 g y 4 °C. La concentración de la proteína ZgHGPRT/AMPK se determinó espectrofotométricamente por absorción UV $\lambda = 280$ nm en un NanoDrop® usando un $\epsilon_{280} = 22.350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁹⁵.

3.6. Análisis de ultracentrifugación analítica

Los experimentos de velocidad de sedimentación para ZgHGPRT/AMPK se llevaron a cabo en Tris-HCl 20 mM (pH 8, 20 °C, 50.000 g) usando una ultracentrífuga analítica Optima XL-I (Beckman-Coulter Inc.) equipada con un sistema de detección de absorbancia UV-VIS y de interferencia Raleigh, un rotor An-60Ti y piezas centrales estándar de doble sector (paso óptico de 12 mm) de carbón Epon. Los perfiles de sedimentación se registraron a 292 nm. Las distribuciones del coeficiente de sedimentación se calcularon mediante el método de límites de mínimos cuadrados de la velocidad de sedimentación utilizando el modelo de ecuación de distribución continua $c(s)$ Lamm implementado por SEDFIT 14.7g.

Las desviaciones de la línea base se midieron a 200.000 g. La distribución del coeficiente de sedimentación aparente, $c(s)$ y los coeficientes de sedimentación se calcularon a partir de los datos de velocidad de sedimentación utilizando SEDFIT⁹⁶. Los coeficientes de sedimentación

experimental se corrigieron a las condiciones estándar (agua, 20 °C y dilución infinita) utilizando el software SEDNTERP para obtener los valores estándar correspondientes ($S_{20, w}$)⁹⁷. Las masas moleculares promedio en peso aparente (MW) correspondientes se determinaron a partir de las masas flotantes, considerando los volúmenes específicos parciales de la proteína (0,4 mg/ml) obtenida de la composición de aminoácidos utilizando el programa SEDNTERP⁹⁸.

3.7. Ensayo de actividad enzimática

El ensayo estándar de la actividad fosforibosiltransferasa se realizó incubando 6,5-13 µg de enzima purificada con una solución de 40 µL que contiene 2 mM de PRPP, 2mM de Hyp, 2,4 mM de MgCl₂ en 50 mM de Tris-HCl pH 8 a 50 °C y 300 rpm durante 5-10 minutos. Después de esto, la enzima se inactivó incubando la reacción durante 5 minutos en un baño de hielo con 40 µL de metanol. Posteriormente se sometió a 95 °C durante 5 minutos más y se centrifugó a 9.000 g durante 5 minutos. Tras una dilución 1:2 en agua, se analizó y midió cuantitativamente la cantidad de producto por HPLC.

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y el error máximo fue ≤ 2%. Una unidad de actividad, U (µmol / min), se definió como la cantidad de enzima (mg) que produce 1 µmol/min de nucleótido en las condiciones del ensayo.

3.8. Influencia de la temperatura y del pH en la actividad enzimática

La temperatura óptima de la enzima se determinó en condiciones del ensayo estándar de la actividad fosforibosiltransferasa en un rango de 20-80 °C. Para la determinación del pH óptimo se llevó a cabo un experimento manteniendo las condiciones estándar del ensayo de actividad manteniendo la temperatura óptima. El pH de la reacción se evaluó mediante diferentes tampones 50 mM de concentración: citrato de sodio (pH 4–6), fosfato de sodio (pH 6–8.5), MES (pH 5.5-7), Tris-HCl (pH 7-9) y borato de sodio (pH 8-11).

3.9. Determinación de la temperatura de desnaturalización

La temperatura de fusión (T_m) se midió usando fluorimetría de barrido diferencial en un Rotor Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences). Para este propósito, ZgHGPRT/AMPK se diluyó a una concentración final de 20 µM y se mezclaron 18 µL con 2 µL de Naranja SYPRO diluida 100x (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las muestras se calentaron en un rango de 35-95 °C a razón de 1 °C/min. La señal fluorescente se midió con filtros de excitación y emisión de 460 y 510 nm, respectivamente⁹⁹. La T_m se aproximó al pico de fusión obtenido de un gráfico que traza

la primera derivada negativa de la curva de fusión con respecto a la temperatura ($dRFU/dT$ vs T), donde RFU representa unidades de fluorescencia relativas.

3.10. Determinación de la termoestabilidad

ZgHPRT/AMPK se almacenó a 4 °C y -80 °C en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7 durante 365 días. Periódicamente, se tomaron muestras y se evaluó la actividad enzimática. La estabilidad de almacenamiento se definió como la actividad relativa entre la primera y las reacciones sucesivas. Además, se estudió la estabilidad térmica incubando 6,5 µg de enzima pura en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7, durante 240 minutos a diferentes temperaturas (40-60 °C).

3.11. Influencia de cationes divalentes en la actividad enzimática

Para determinar el efecto de los cationes divalentes sobre la actividad de ZgHPRT/AMPK, se agregaron diferentes sales divalentes ($MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $CoSO_4$ y $CaCl_2$) a la mezcla de reacción a diferentes concentraciones (2-20 mM). La reacción se realizó usando el ensayo estándar de actividad en las condiciones óptimas de pH y temperatura previamente determinadas. A este respecto, se incubaron 6,5 µg de enzima pura en una solución de 40 µL que contenía 2 mM de PRPP, 2 mM de Hyp y 2-20 mM de sales divalentes, en 50 mM de tampón fosfato sódico pH 7 a 50 °C y 300 rpm, 5- 10 minutos.

3.12. Influencia de disolventes orgánicos sobre la actividad enzimática

Para determinar el efecto de los disolventes orgánicos sobre la actividad enzimática, se analizó la actividad de la fosforribosiltransferasa en presencia de diferentes disolventes orgánicos próticos (metanol, etanol, isopropanol, glicerol, etilenglicol y propilenglicol) y apróticos (acetonitrilo, acetona, cloroformo, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido y acetato de etilo). Con este fin, se añadieron 6,5 µg de enzima pura a una solución de 40 µL que contenía 2 mM de PRPP, 2mM de Hyp, 2,4 mM de $MgCl_2$ en tampón de fosfato de sodio 50 mM pH 7, en presencia de disolventes orgánicos al 20 %. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 5-10 min (300 rpm).

3.13. Estudio de la especificidad de sustrato

Para evaluar el potencial de ZgHPRT/AMPK como catalizador bifuncional, se analizaron las actividades fosforribosiltransferasa y adenilato quinasa.

Por un lado, la actividad de fosforibosiltransferasa de ZgHGPRT/AMPK se probó contra diferentes nucleobases de purina y pirimidina en diferentes condiciones. A este respecto, se usó como tampón, 50 mM de fosfato sódico a pH 7 para las reacciones con hipoxantina, adenina, citosina, uracilo o timina, mientras que 50 mM de Tris-HCl pH 8 se usó como tampón para las reacciones con guanina y xantina.

Por otro lado, se analizó la interconversión de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) para evaluar la actividad de la adenilato quinasa. Con este fin, se añadieron 13 µg de enzima purificada a una solución de 40 µL que contenía 3,2 mM de ATP y 3,2 mM de AMP (o 6,4 mM de ADP), 12 mM de MgCl₂ en 50 mM de tampón fosfato sódico a pH 7.

Las mezclas de reacción se incubaron a 50 °C y 300 rpm durante 10-20 min.

3.14. Estudio cinético de ZgHGPRT/AMPK

Se determinaron los parámetros cinéticos en el estado estacionario, K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M , tanto para las actividades fosforibosiltransferasa como fosfotransferasa. El análisis cinético del dominio funcional HGPRT se realizó a concentraciones variables de un sustrato (0,5-17,2 mM para Hyp y, 0,5-17,2 mM para PRPP), fijando la concentración del otro sustrato a un nivel de saturación constante (5 mM), durante 10-15 minutos. Se siguió un enfoque idéntico para el análisis cinético de la actividad de fosfotransferasa (0,5-10 mM para AMP y, 0,5-10 mM para ATP) usando 3,2 mM como concentración de saturación constante. Los parámetros K_M aparente, k_{cat} y k_{cat}/K_M , se determinaron por regresión no lineal suponiendo un modelo basado en la ecuación de la cinética de Michaelis-Menten. La k_{cat} se calculó teniendo en cuenta una masa molecular de 43.775,81 Da⁹⁵. Los cálculos se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8¹⁰⁰.

3.15. Método analítico

La producción de nucleótidos se midió cuantitativamente usando un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con una columna ACE EXCEL (5 µm CN-ES 250 × 4,6 mm) equilibrado con acetato de trietilamonio al 100% a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min con un detector UV λ=254 nm. Los tiempos de retención para los compuestos naturales de referencia (abreviados de acuerdo a las recomendaciones de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB) fueron los siguientes: adenina (Ade), 10,4 min; adenosina-5'-monofosfato (AMP), 5,5 min; adenosina-5'-difosfato (ADP), 4,4 min; adenosina-5'-trifosfato (ATP), 3,8 min; guanina (Gua), 4,8 min; guanosina-5'-monofosfato (GMP), 3,2 min; hipoxantina (Hyp), 4,5 min; inosina-5'-monofosfato (IMP), 3,0 min; xantina (Xan), 4,4 min; citosina (Cyt), 3,9 min; uracilo (Ura), 4,1 min; timina (Thy), 7,2 min; timidina-5'-monofosfato (TMP), 4,4 min.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis bioinformático de ZgHGPRT/AMPK

El análisis bioinformático del gen *hgprt/ampk* indica que la expresión del mismo daría como resultado una proteína de fusión que alberga 387 aminoácidos con un peso molecular de casi 44 KDa. Este gen de 1.161 pares de bases se encuentra codificado en el genoma de *Zobellia galactanivorans* (NC_015844.1) como una proteína de 368 aminoácidos descrita putativamente como HGPRT/AMPK. Para confirmar la existencia de ambos dominios catalíticos en una misma proteína se realizó un estudio *in silico* de la secuencia de aminoácidos. De esta forma, se demostró que el dominio funcional PRT se ubica dentro de los primeros 197 aminoácidos desde el extremo N-terminal y que el dominio de la superfamilia de las AMPKs se localiza a partir del aminoácido 200^{101 102} (Figura 5).

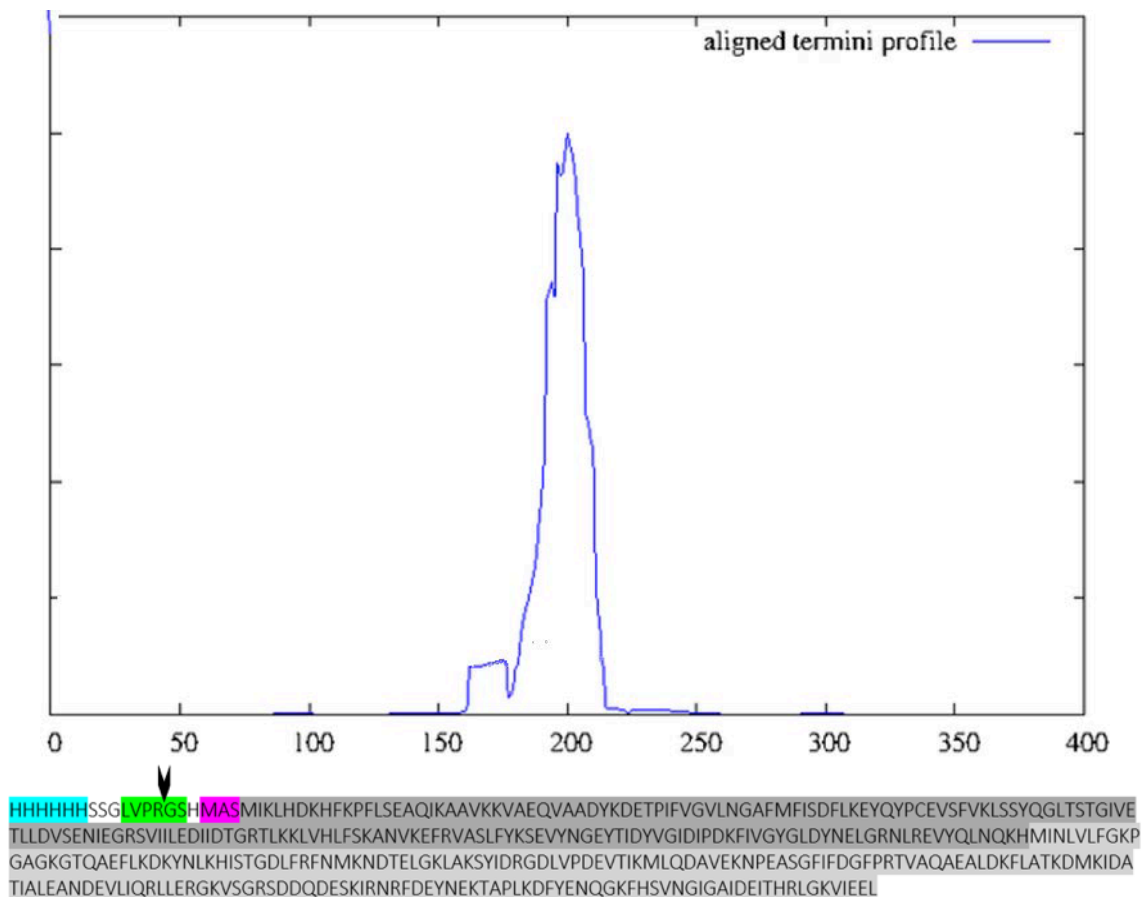


Figura 5. Perfil de la probabilidad de una región interdominio en la secuencia de ZgHGPRT/AMPK desde el N-terminal al C-terminal. La secuencia en azul muestra la etiqueta de histidina, la secuencia en verde, la región de corte de trombina; en rosa, la región traducida de corte con *NdeI*; en gris oscuro la predicción del dominio funcional PRT de tipo I; en gris claro la predicción del dominio funcional AMPK.

El alineamiento múltiple de secuencia del dominio funcional PRT de la proteína ZgHGPRT/AMPK muestra una gran similitud con una 6-oxopurina PRT de tipo I. Este dominio catalítico posee 4 regiones altamente conservadas implicadas en la unión de los sustratos a la enzima. El loop-PP_i, comprendido entre los aminoácidos 41 y 54, facilita la unión del grupo pirofosfato del PRPP; el loop-flexible, contenido entre los aminoácidos 66 y 90, protege el centro activo favoreciendo la catálisis; el loop-PRPP alojado entre los aminoácidos 97 y 108 que favorece la unión del PRPP a través de los grupos hidroxilo C2-OH y C3-OH de la ribosa; y el bolsillo de purina, incluido entre los aminoácidos 150 y 155, que facilita la unión de la base nitrogenada (Figura 6) ¹⁰³.

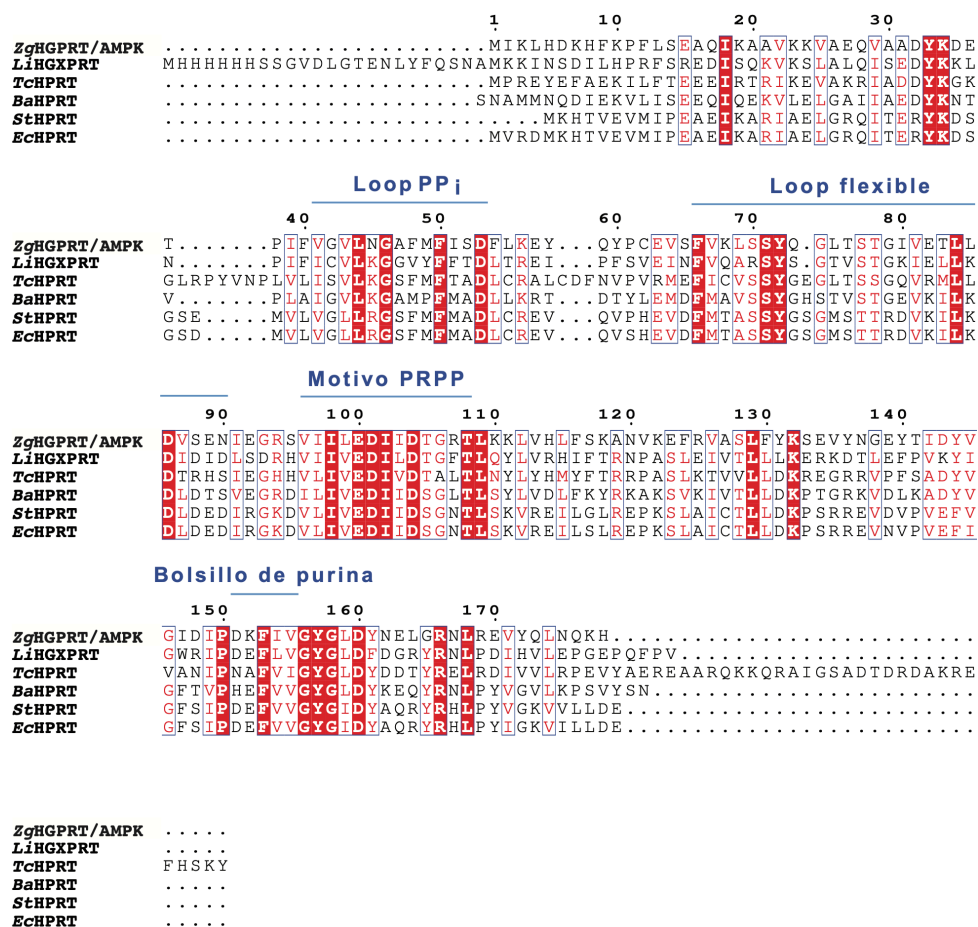


Figura 6. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de PRTs específicas de 6-oxopurinas de *Zobellia galactanivorans* (ZgHGPRT/AMPK), *Leptospira interrogans* (LiHGXPRT, código PDB 4QRI), *Trypanosoma cruzi* (TcHPRT, código PDB 1P19), *Bacillus anthracis* (BaHPRT, código PDB 6D9Q), *Salmonella typhimurium* (StHPRT, código PDB 1J7J), y *Escherichia coli* (EcHPRT, código PDB 5KNR).

En base a la predicción de estructura terciaria, el dominio catalítico HGPRT presenta dos dominios estructurales diferentes denominados *Hood*, que se caracteriza por dos β-láminas

unidos por un loop; y *CORE* que posee 4 β -láminas, flanqueadas por 3 α -hélices. La estructura secundaria del *CORE* se une mediante 4 loops: el loop-PP_i situado entre β -2 y α -2; el loop flexible ubicado entre β -3 y β -4; y el loop de unión al PRPP localizado entre β -5 y α -3 (Figura suplementaria 1). Por tanto, la estructura secundaria del dominio PRT coincide con la descrita para otras PRTs ²⁵.

Con respecto al dominio AMPK, los motivos típicos de las adenosina monofosfato quinasas están presentes en la secuencia de aminoácidos ZgHGPRT/AMPK (Figura 7): i) el loop-P (también conocido como motivo Walker A) ubicado entre los aminoácidos 8-16, que adopta una forma de bucle específica que permite el alojamiento del grupo fosfato del ATP, ii) el dominio de unión a AMP (AMPBs) en la posición 31-60, que asegura que el grupo adenina del adenilato se distinga selectivamente de otras bases nitrogenadas, y iii) el dominio LID posicionado entre los aminoácidos 128-147, que muestra una alta movilidad que permite el aislamiento del sitio activo y, por lo tanto, genera un entorno hidrófobo que evita la hidrólisis y promueve la actividad de fosfotransferasa ⁶⁸. Al igual que otras AMPK, la proteína ZgHGPRT/AMPK muestra la secuencia GFPR entre los aminoácidos 86-89 que contribuye al plegamiento y estabilización de la misma ¹⁰⁴.

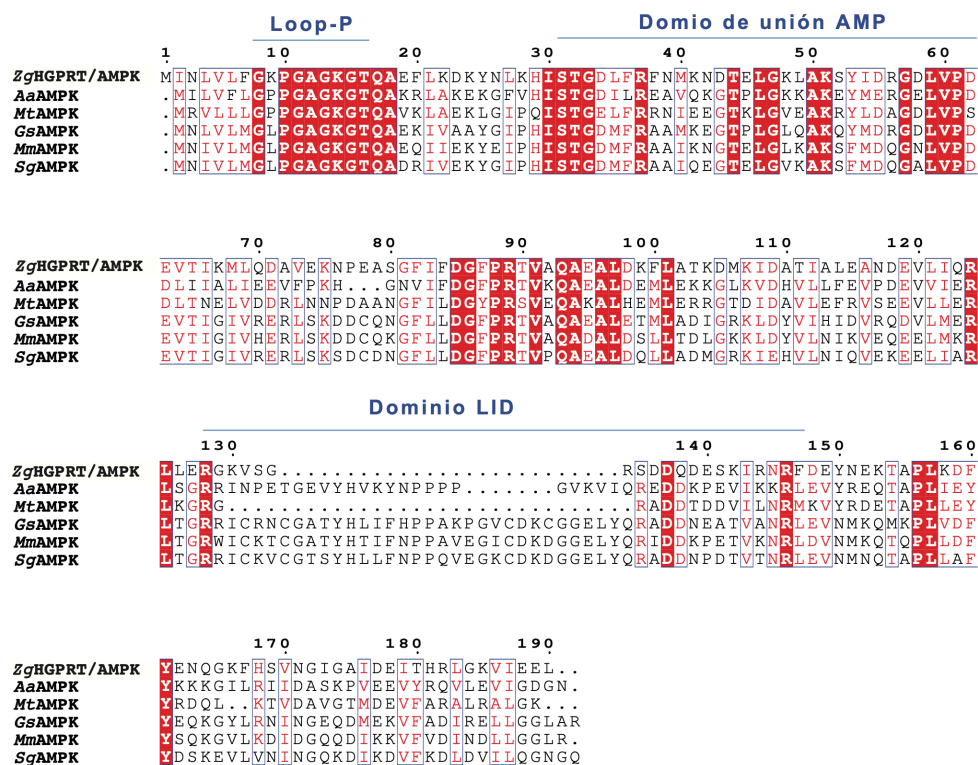


Figura 7. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de AMPK de *Zobellia galactanivorans* (ZgHGPRT/AMPK), *Aquifex aeolicus* (AaAMPK, código PDB 2RGX), *Mycobacterium tuberculosis* (MtAMPK, código PDB 1P4S), *Geobacillus stearothermophilus*

(GsAMPK, código PDB 1ZIN), *Marinibacillus marinus* (MmAMPK, código PDB 3FB4), *Sporosarcina globispora* (SgAMPK, código PDB 5X6J).

Las AMPK se pueden clasificar atendiendo a la longitud del dominio LID en AMPK de LID corto o largo. En este sentido, la proteína ZgHGPRT/AMPK presenta un dominio LID de tipo corto que consta de 22 residuos. La delección en las AMPKs de LID corto implica una peor estabilidad y disminuye la especificidad por el donador de grupos fosfato, ya que incluye el motivo de unión Cys-X5-His-X15-Cys-X2-Cys que permite la unión de metales divalentes como Fe^{2+} , Zn^{2+} , o Co^{2+} ¹⁰⁴.

El plegamiento de la estructura secundaria del dominio catalítico AMPK presenta una disposición α/β de 5 β -láminas rodeadas por varias α -hélices ¹⁰⁵ (Figura suplementaria 2). Esta predicción pone en evidencia una carencia de las β -láminas 6 a 8 que se alojarían dentro del dominio HGPRT. Por otro lado, el dominio estructural *Hood* carece de una α -hélice que esta presente en el dominio AMPK, por lo que parece haber cierta complementariedad estructural entre ambos dominios catalíticos. En este sentido, la predicción de la estructura terciaria de la proteína muestra una α -hélice, perteneciente al dominio catalítico quinasa, a menos de 4 Å sobre los *loops* del centro activo del dominio HGPRT (Figura 8A). Estas interacciones parecen ayudar a la correcta orientación de los *loops* y de los sustratos en posición catalítica, por lo que favorece la estabilidad de la proteína así como su actividad ^{106 107}. Además, también se vislumbra cierta cercanía de las dos β -láminas del dominio estructural *Hood* próximas al dominio catalítico AMPK. Estas interacciones se mantienen constantes gracias a la rigidez que presenta la región interdominio o *linker* (Figura 8B). Esta región consta de 10 aminoácidos (REVYQLNQKH) que se caracterizan por ser residuos con carga y polares sin carga, similares a otros dominios de unión de proteínas multidominio ^{108 109}. Además, los residuos de Arg, Glu y Gln presentes en el conector actúan como espaciadores rígidos para evitar interacciones desfavorables entre ambos dominios ¹¹⁰.

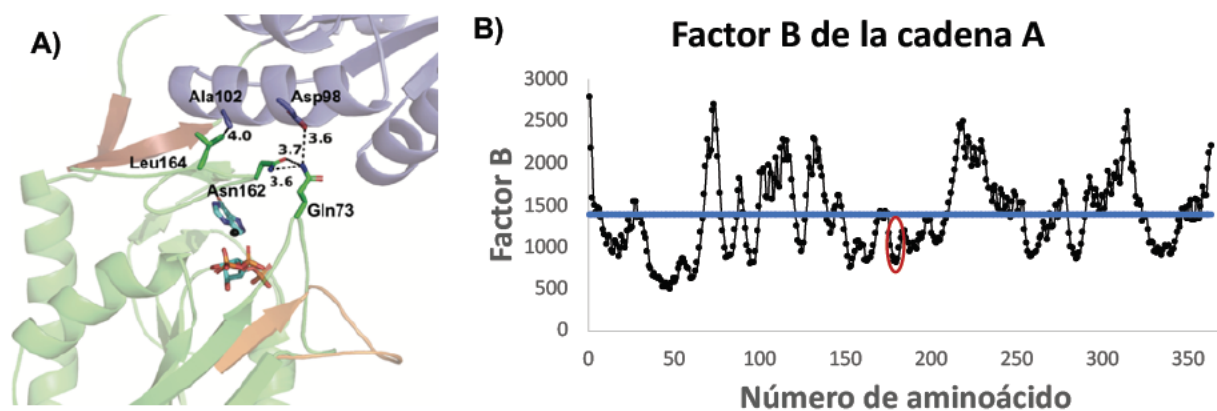


Figura 8. A) Posibles interacciones entre el *loop* flexible, la región cercana al bolsillo de la purina del dominio HGPRT con una α -hélice del dominio AMPK que presuntamente puede

actuar como parte del dominio *Hood*. En verde se muestra la estructura terciaria del dominio HGPRT de *Zobellia galactivorans* en *cartoon*. En azul, se muestra la estructura terciaria del dominio AMPK de *Zobellia galactivorans* en modo *cartoon* (PyMol). En rojo se muestran dos β -lámina próximas al dominio AMPK. En naranja se muestra el *loop* flexible en posición abierta. **B)** Fluctuación atómica promedio de cada residuo de la cadena A de la proteína ZgHGPRT/AMPK, tras 50 ns de simulación. La línea azul indica la flexibilidad media de la proteína. El círculo rojo señala los residuos del *linker*.

La construcción del modelo de la estructura tridimensional de la proteína se realizó a partir de la predicción del plegamiento de la secuencia lineal de aminoácidos con métodos mixtos de *ab initio* y utilizando como molde estructuras resueltas por cristalografía. La consistencia del modelo se evaluó mediante el servidor VERIFY3D¹¹¹ logrando una calificación positiva. Además, se mapeó cada uno de los aminoácidos de la proteína en el diagrama de Ramachandran (Figura suplementaria 3) obteniendo que el 91,7 % de los aminoácidos cumplen con dichas restricciones de manera muy favorable, un 7,6 % de manera favorable, un 0,3 % en la región permitida, y solo un 0,3 % de los aminoácidos están en la región desfavorecida. Finalmente, se llevó a cabo una dinámica molecular en 4 pasos bajo condiciones óptimas de ensayo. Primero, una etapa de minimización de la energía, seguido de una etapa de calentamiento a 50 °C, una etapa de equilibrado y una etapa de producción (Figura 9).

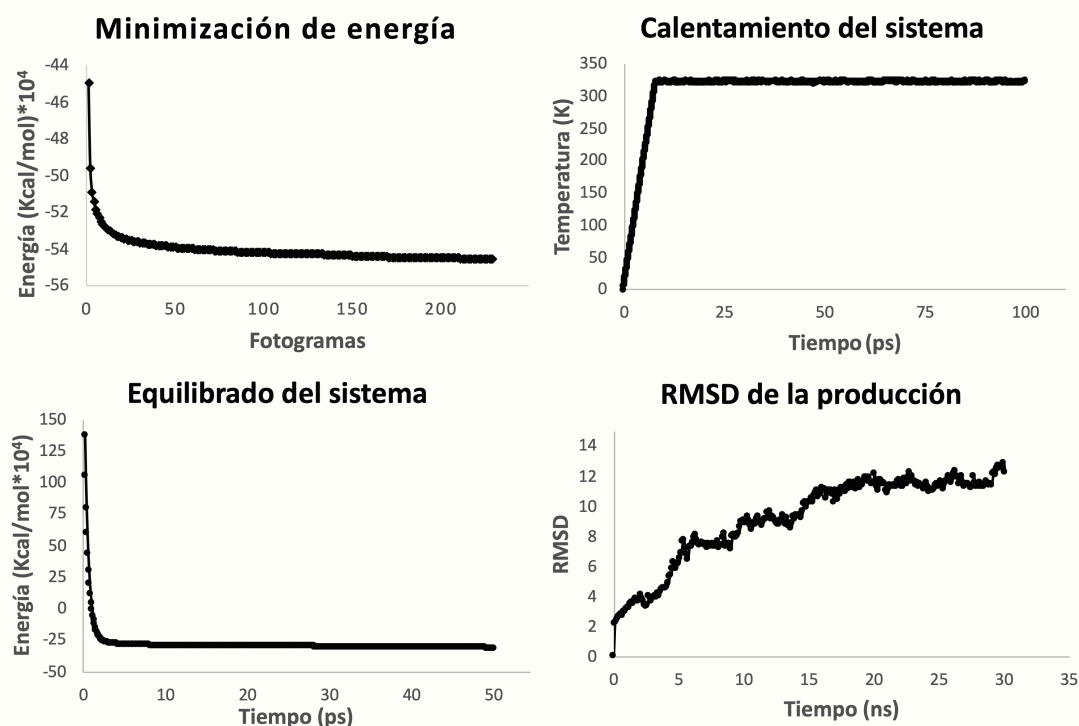


Figura 9. Evaluación del transcurso de la MD.

Además, esta simulación permitió identificar las posibles interacciones que se establecen entre los ligandos y el receptor. En este sentido, la Figura 10A muestra las interacciones del centro activo del dominio HGPRT con la hipoxantina y el PRPP; mientras que la Figura 10B muestra las interacciones del centro activo del dominio AMPK con el AMP y el ATP. Los aminoácidos implicados en estas interacciones coinciden con los descritos para llevar a cabo ambas reacciones catalizadas^{55 112 113}. Por un lado, la reacción en el dominio HGPRT ocurre mediante el Asp104 en dos etapas: i) El Asp104, fijado por la Tyr72, se postula como aceptor del hidrógeno del N7 de la base púrica, lo que conduce a un ataque nucleofílico del N9 de la base al C1 del PRPP; ii) posteriormente, el ácido es desprotonado por el grupo pirofosfato que se libera de la reacción de sustitución. El Glu100 y el Asp101, altamente conservados en la secuencia, actúan atrayendo electrostáticamente los grupos hidroxilo del C2 y C3 del PRPP, así como ayudando a estabilizar el ion ribooxocarbenio cargado positivamente en el estado de transición; la Phe153 estabiliza el estado de transición mediante una interacción de π -catión; la Arg166 se une al grupo fosfato estabilizando la carga electrostática de este grupo. Por otro lado, la reacción en el dominio AMPK transcurre en una sola etapa mediante el ataque nucleofílico del oxígeno del grupo fosfato del AMP al fósforo del fosfato y. Para que la reacción tenga lugar es necesario que el grupo trifosfato del ATP se encuentre en línea con el grupo fosfato del AMP (conformación *in-line*), por lo que los residuos del centro activo deben proporcionar un entorno con carga positiva. Los aminoácidos que más influyen en este sentido son la Arg37 y la Arg146 que neutralizan la carga del fosfato del AMP; por su parte, la Lys14, la Arg128 y la Arg134 neutraliza junto con el ión Mg^{2+} neutralizan las cargas negativas del grupo trifosfato del ATP.

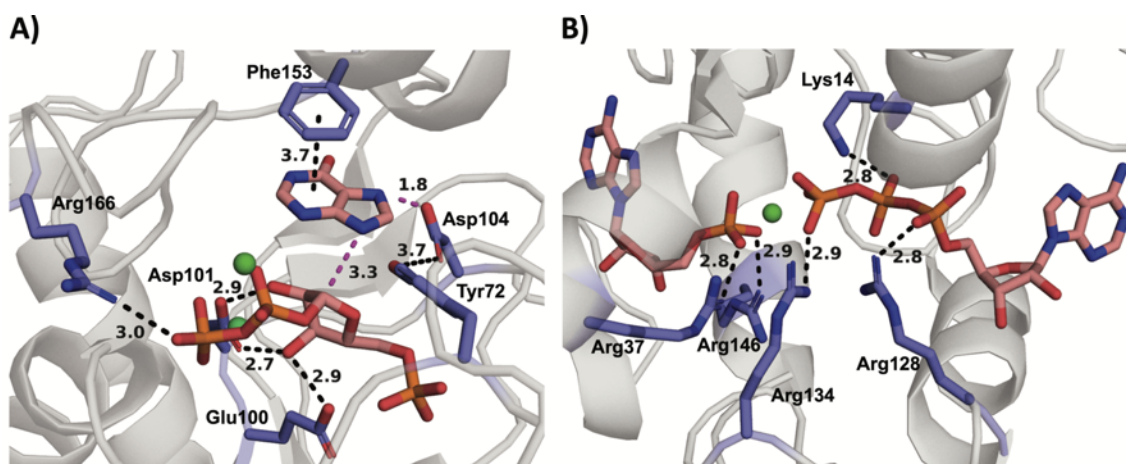


Figura 10. A) Centro activo del dominio HGPRT de *Zobellia galactanivorans* complejoado con hipoxantina, PRPP y Mg^{2+} . **B)** Centro activo del dominio AMPK de *Zobellia galactanivorans* complejoado con AMP, ATP y Mg^{2+} . Las líneas negras discontinuas indican las interacciones y los números reflejan la distancia en ángstrom entre los residuos (mostrado como sticks azules)

y los ligandos (mostrado como sticks rosas y el magnesio en spheres verde). Las líneas magentas discontinuas indican las interacciones implicadas directamente en la reacción.

La secuencia de aminoácidos de ZgHGPRT/AMPK comparte una elevada identidad con la proteína putativa AMPK de *Zobellia uliginosa* (NCBI Reference Sequence: WP_076455813.1). Además, también muestra una semejanza significativa con otras AMPKs de organismos psicófilos como *Flavobacteriaceae bacterium* (WP_100872335.1), *Pricia antarctica* (WP_091866983.1) y *Maribacter antarcticus* (WP_084273500.1), mesófilos como *Euzebyella marina* (WP_121850785.1), *Maribacter polysiphoniae* (WP_109649676.1); e incluso, termófilos como *Pseudozobellia thermophila* (WP_072995071.1) (Tabla suplementaria 2). Por lo que, probablemente ZgHGPRT/AMPK sea capaz de operar en un amplio rango de temperatura.

4.2. Transformación y purificación del plásmido

El análisis de la correcta integración del plásmido pET28b-ZgHGPRT/AMPK en las células *E. coli* BL21(DE3) se llevó a cabo gracias al crecimiento de dichas células en el medio selectivo LB sólido suplementado con kanamicina.

La presencia del gen *hgprt/ampk* (NCBI Gene ID: 10978410) en el interior de las células se determinó mediante el análisis del tamaño molecular del vector. Para ello, tras la extracción y purificación del plásmido mediante el kit comercial Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep, se realizó una carrera electroforética en gel de agarosa donde se cargó el marcador Lambda DNA/*Hind*III, que proporciona bandas de entre 0,125 Kb y 23 Kb, el plásmido antes de transformar y el vector purificado. El análisis del gel mostró 3 bandas en cada carril correspondientes con la forma circular, lineal y superenrollado del ADN. La banda de la forma lineal apareció próxima a la banda de 6,56 Kb del marcador, compatible con las 6,27 Kb del vector clonado, y no se vio ninguna banda próxima a 5,37Kb compatible con el vector vacío, por lo que se puede afirmar que el plásmido contiene el gen de interés. Además, se puede afirmar una buena integridad y pureza de la muestra ya que se apreciaban bandas sin velos y bien definidas.

Para garantizar la ausencia de proteínas y contaminantes procedentes de los tampones de extracción del plásmido, se analizaron los ratios de absorción 260/280 y 260/230 obteniendo 1,8-2 y 2,0-2,2 respectivamente. La concentración del plásmido purificado fue de 141,3 ng/ μ L, calculado a través de la absorbancia a 260 nm.

4.3. Producción y purificación de ZgHGPRT/AMPK

La proteína de interés se observó en la fracción soluble del extracto tras la sonicación de las células y la posterior centrifugación de la suspensión como se demuestra en el gel de la Figura 12; donde además se aprecia que no existe expresión en cuerpos de inclusión.

El extracto soluble se purificó por cromatografía de afinidad inmovilizado en metal iónico (IMAC) seguido de una cromatografía de exclusión molecular en equipos de cromatografía líquida conectados *off line*. Ambos procesos se monitorizaron a través de la absorbancia a 280 nm del eluido (Figura 11). En el perfil de la primera cromatografía se observa un fuerte aumento de la absorbancia durante la etapa de lavado que se corresponde con la elución de las proteínas no unidas a la columna (FT, *flow-through*), seguido de un ligero aumento de la absorbancia que corresponde con la proteína de interés (Figura 11A). En el perfil de la cromatografía de exclusión molecular se observan diferentes picos (Figura 11B) que fueron analizados por SDS-PAGE, confirmando que la absorbancia a 280 nm de mayor intensidad coincide en tamaño molecular con la proteína de interés de 44 KDa ubicado entre las bandas de 37 y 50 KDa (Figura 12).

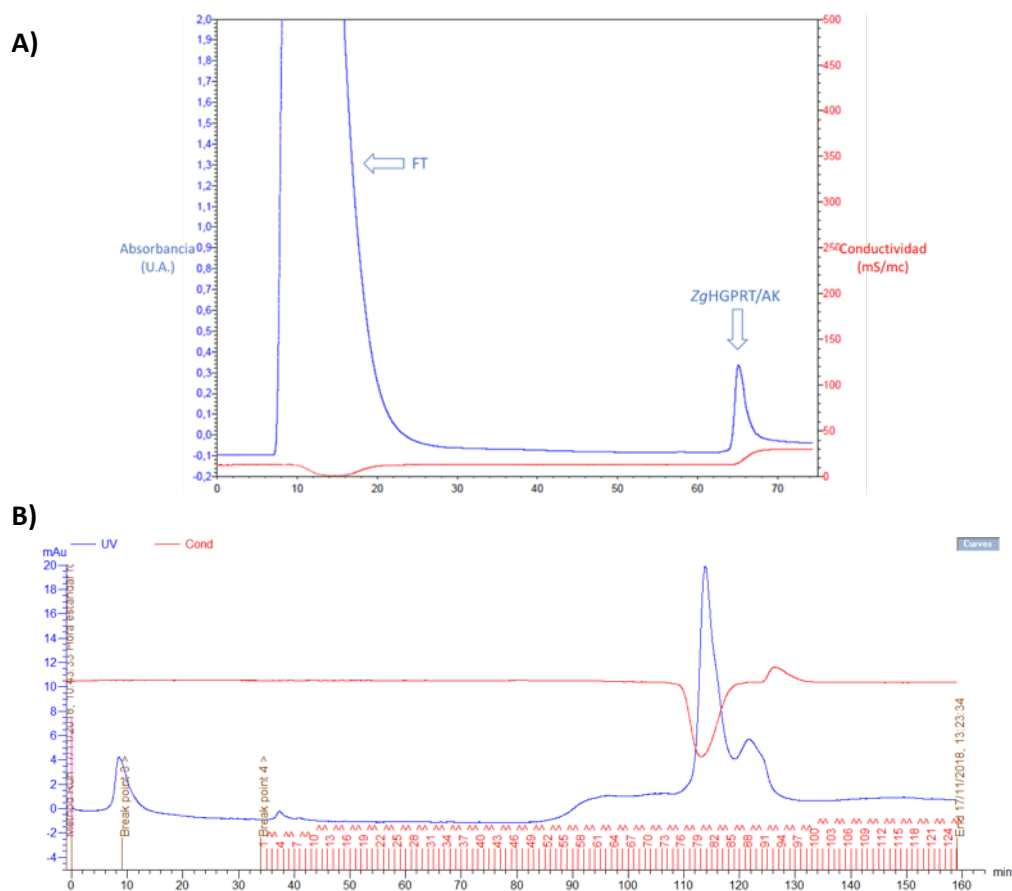


Figura 11: Perfil cromatografico **A)** de afinidad y **B)** de exclusión molecular por la que se purificó ZgHGPRT/AMPK.

Tras la purificación y concentración de la proteína *ZgHGPRT/AMPK*, se calculó la cantidad de 1,33 mg/mL de enzima según los datos espectrofotométricos. Sin embargo dada la ausencia de residuos Trp junto con la presencia de 22 His y 15 Tyr, en la Figura suplementaria 4 se observa el máximo de absorbancia desplazado desde 280 nm hacia 260-270 nm ya que la absorptividad máxima de estos residuos se produce a 257 y 274 nm respectivamente¹¹⁴.

La eficacia de la purificación se analizó mediante un SDS-PAGE (Figura 12). En el extracto soluble se observan múltiples bandas correspondientes a las proteínas intracelulares del huésped que no se unen a la columna de afinidad (FT) y un banda de mayor intensidad compatible con la proteína *ZgHGPRT/AMPK*. En el carril 3 se muestran todas las proteínas que se expresan como cuerpos de inclusión y otros restos celulares, y se comprueba que la proteína de interés no se encuentra. Por último, en el carril 4 se observa una única proteína con un peso molecular de 44 KDa que coincide con el peso molecular calculado de la proteína de interés.

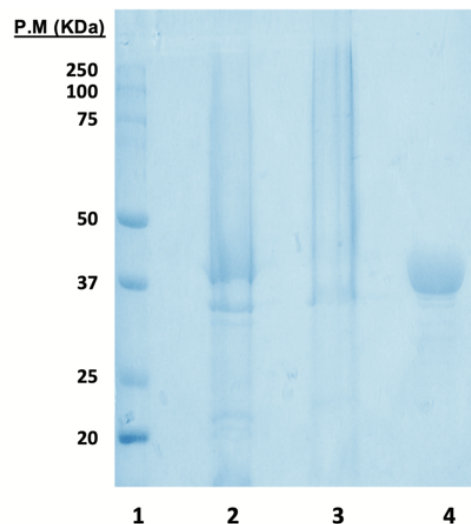


Figura 12: Gel SDS-PAGE del proceso de purificación. Carril 1: marcador “Dual Color Standards” de BioRad. Carril 2: extracto soluble previo a la purificación. El carril 3: extracto no soluble tras el lisado celular. El carril 4: proteína de interés tras el proceso de purificación.

4.4. Ultracentrifugación analítica

Los experimentos de velocidad de sedimentación de la proteína *ZgHGPRT/AMPK* en disolución mostraron un grupo de dos especies con un coeficiente de sedimentación experimental de 4,51 S ($s_{20,w} = 4,55$ S) (97%) y 7,10 S ($s_{20,w} = 7,23$ S) (3%) (Figura 13). Teniendo en cuenta que el peso molecular calculado a partir de la secuencia de aminoácidos es de 43,77 kDa que coincide con la banda de sobreexpresión del gel (Figura 12), se puede afirmar que la especie principal encontrada en disolución corresponde a un dímero ($M_w =$

83,33 kDa), compatible con una subunidad monomérica de 41,67 kDa. Por otro lado, la especie minoritaria corresponde a un trímero con un peso molecular experimental de 137,58 kDa compatible con una subunidad monomérica de 45,86 kDa.

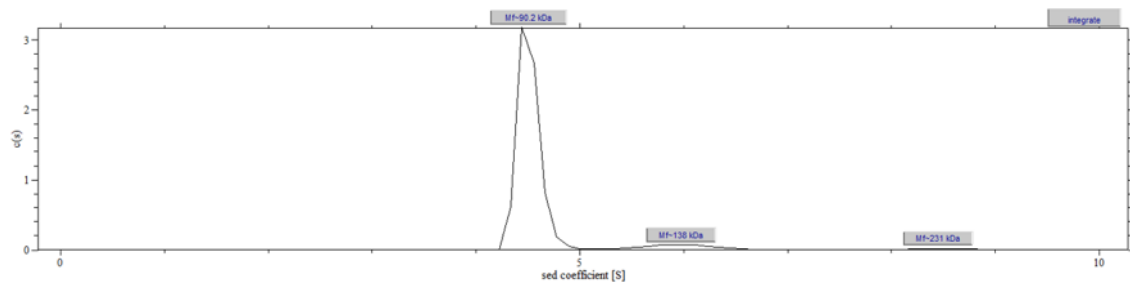


Figura 13: Análisis por ultracentrifugación analítica de ZgHGPRT/AMPK.

Dado que ZgHGPRT/AMPK es la primera proteína de dominio catalítico doble PRT/NMPK, no hay ejemplos previos para compararla. Sin embargo, se han descrito diferentes estados oligoméricos para las 6-oxopurina PRT de varios organismos, tales como estados diméricos de *Sulfolobus solfataricus* (SsHGXPRT) y de *Giardia lamblia* (GIGPRT), estados tetraméricos de *Thermus thermophilus* (TtHGXPRT y TtXPRT), *Toxoplasma gondii* (TgHGPRT) y *E. coli* (EcXGPRT y EcHPRT), y estados hexaméricos de *Pyrococcus horikoshii* (PfhHGXPRT) ²⁵. En este sentido, el estado de oligomerización de ZgHGPRT/AMPK encaja con las 6-oxopurina PRT diméricas. Por otro lado, las AMPKs generalmente se encuentran en dos estados oligoméricos distintos, la clase trimérica comúnmente presente en *Archaea* y la clase monomérica más común en *Eubacteriae* ¹¹⁵. En algunos casos se han descrito formas diméricas coexistentes con el estado monomérico como en la AMPK de *Paracoccus denitrificans* ¹¹⁶. A este respecto, *Zobellia galactanivorans* pertenece al dominio de las *Eubacteriae* y como tal, la proteína ZgHGPRT/AMPK presenta un estado de oligomerización inusual.

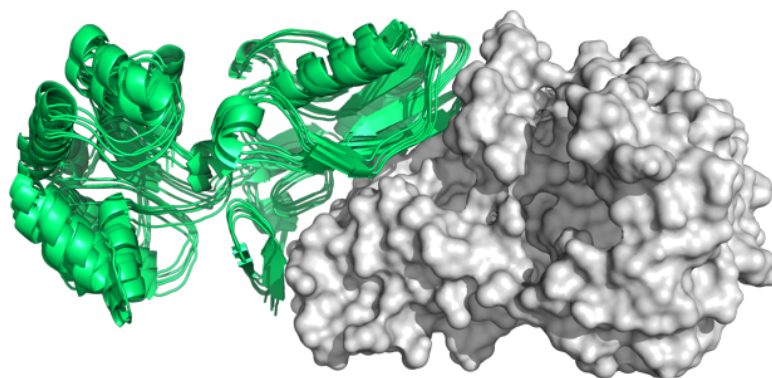


Figura 14. Resultado del acoplamiento proteína-proteína del dímero de ZgHGPRT/AMPK. En *surface* blanco se muestra el receptor y en *cartoon* verde se muestran las mejores poses del *docking*.

Para justificar el estado de oligomerización de *ZgHGPRT/AMPK* se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular entre las dos subunidades. Los resultados bioinformáticos muestran un único sitio de dimerización posible a través del dominio HGPRT con una probabilidad superior al 90 % (Figura 14). Estos datos están en consonancia con los resultados obtenidos experimentalmente. En este sentido, la necesidad de que sea un dímero elongado por el dominio quinasa justifica que el dominio HGPRT constituya un dímero mientras que el dominio AMPK constituya un monómero.

4.5. Caracterización bioquímica de *ZgHGPRT/AMPK*

4.5.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se muestra en la Figura 15. *ZgHGPRT/AMPK* muestra una alta actividad (> 70 %) en un amplio rango de temperatura (de 30 a 80 °C), con un máximo a 50-60 °C. Sin embargo, por debajo de los 30 °C se observa un efecto significativo de la temperatura en la actividad.

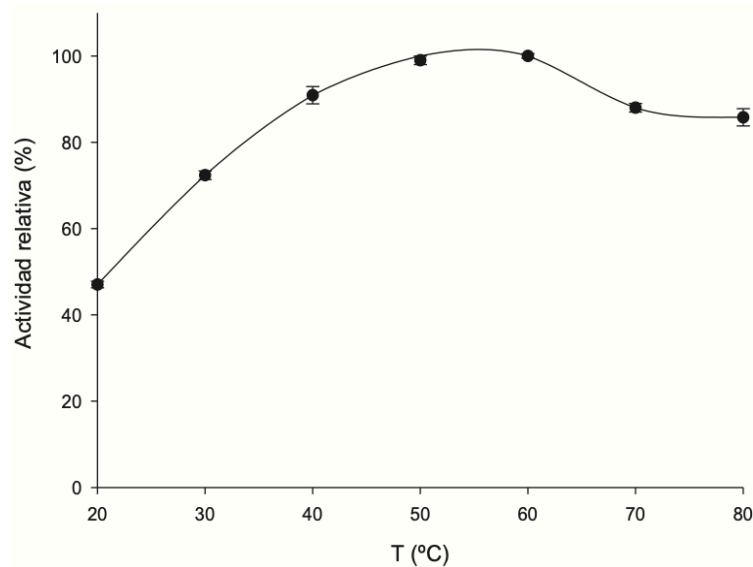


Figura 15: Efecto de la temperatura sobre la actividad de *ZgHGPRT/AMPK*.

Estos resultados son bastante sorprendentes ya que los organismos mesófilos como *Z. galactanivorans* sobreviven en entornos de entre 20 °C-40 °C. Sin embargo, tal y como se demuestra en el alineamiento de secuencia (Tabla suplementaria 2), la proteína *ZgHGPRT/AMPK* comparte una elevada identidad con sus homólogas en organismos psicrófilos, mesófilos y termófilos lo que justifica su elevada actividad en un amplio rango de temperaturas.

4.5.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Los resultados de la Figura 16 muestran el efecto del pH sobre la actividad enzimática de ZgHPGRT/AMPK. El perfil de pH pone de manifiesto una alta actividad en un rango de pH estrecho (pH 6-7), con un pico máximo cuando se incubaba en 50 mM de tampón fosfato sódico a pH 7. Estos resultados están en concordancia con otras HGPRT como la de *Plasmodium falciparum* ¹¹⁷.

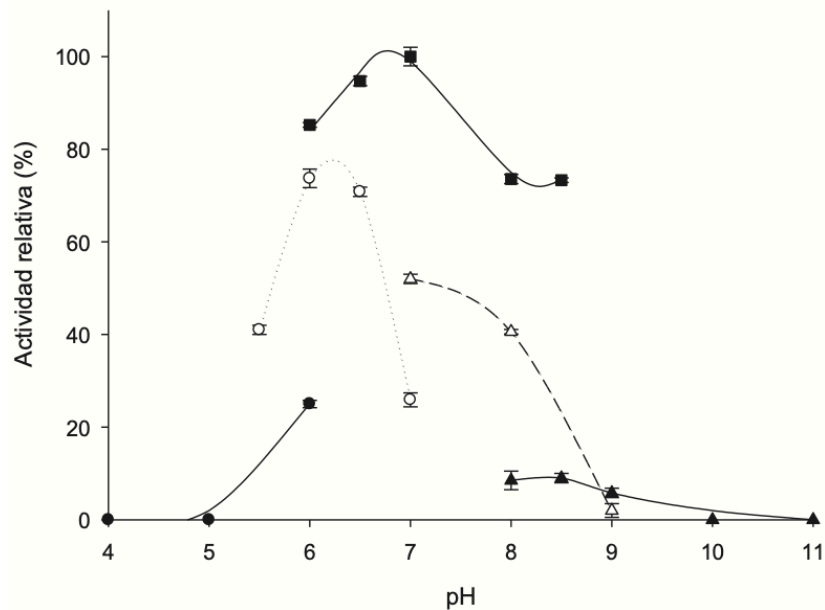


Figura 16: Efecto del pH sobre la actividad de la enzima ZgHPGRT/AMPK en la síntesis de IMP a partir de hipoxantina y PRPP. (●) 50 mM de citrato sódico (pH 4-6), (○) 50 mM de MES (pH 5.5-7), (■) 50 mM de fosfato sódico (pH 6-8.5), (Δ) 50 mM de Tris-HCl (pH 7-9), (▲) 50 mM de borato sódico (pH 8-11).

Por otro lado, los datos experimentales sugieren una fuerte dependencia de la naturaleza de la solución tampón con variaciones de hasta un 50 % sobre la actividad de ZgHPGRT/AMPK. Este efecto ya se ha descrito para otras proteínas de *Z. galactanivorans* como la manonato oxidoreductasa con variaciones de hasta el 40 % ¹¹⁸.

4.5.3. Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de pH (7) y temperatura (50 °C), se analizó el efecto de los cationes divalentes sobre la actividad enzimática (Figura 17). Como se describe para las enzimas HGPRT, la presencia de dos iones metálicos divalentes en el sitio activo de estas enzimas es crucial para la reacción catalítica. De hecho, están asociados tanto con el PP_i de PRPP como con los residuos del sitio activo (directamente o mediante

moléculas de agua). Uno de estos cationes también interacciona con la base de purina a través de una molécula de agua, colocando el sustrato de purina para la catálisis ¹¹⁹.

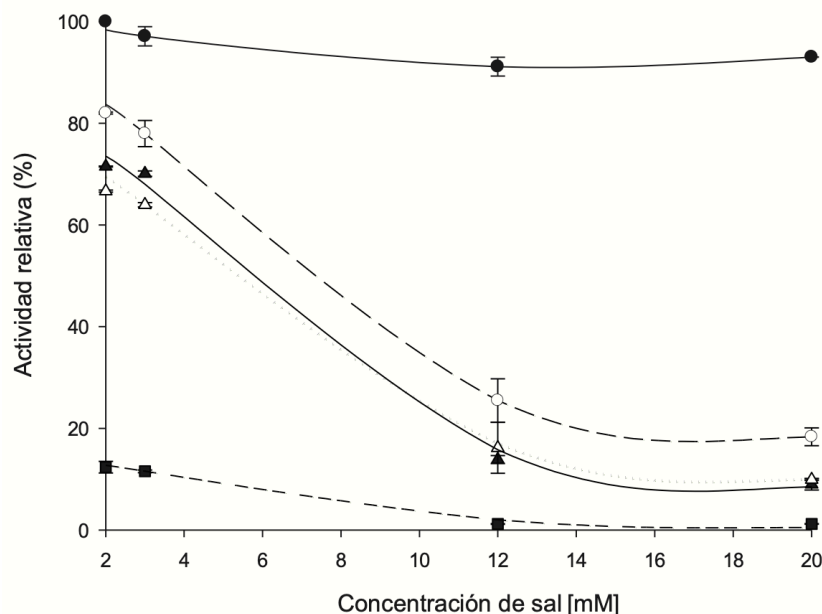


Figura 17. Influencia de sales de cationes divalentes sobre la actividad de ZgHPGRT/AMPK. (●) MgSO₄, (○) CoSO₄, (Δ) MnSO₄, (▲) ZnSO₄ and (■) CaCl₂.

Como se esperaba, la presencia de cationes divalentes es esencial para la actividad de la enzima. En este sentido, la concentración óptima de cationes se estableció en un rango de 2-3 mM, obteniendo los mejores valores de actividad con Mg²⁺ 2 mM. Dado que también se observaron altos valores de actividad al usar Mn²⁺, podría emplearse como un sustituto efectivo de Mg²⁺, como también se describe para otras HGPRT como las de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* ¹²⁰, *Artemia sp.* ¹²¹ y levaduras ¹²². Al igual que en *Artemia sp.* ¹²¹ y en levaduras ¹²², el catión Zn²⁺ también puede producir la actividad fosfotransferasa en ZgHGPRT/AMPK, aunque en menor medida que el catión Mg²⁺. Como se muestra en la Figura 17, también se obtuvieron altos valores de actividad con Co²⁺, como ocurre también con la HGPRT de la levadura reportada por Ali *et al.* ¹²² Finalmente, se obtuvieron valores significativamente bajos de actividad cuando se usó Ca²⁺, lo cual parece indicar que no se puede reemplazar por el Mg²⁺ como se observó para la HGPRT de *Plasmodium falciparum* ¹²³. Este hallazgo también sugiere que el Ca²⁺ podría actuar como un inhibidor, como se describe para APRT de *Artemia sp.* ¹²¹.

4.5.4. Efecto de disolventes orgánicos sobre la actividad enzimática

Para investigar el efecto de los disolventes orgánicos en la actividad enzimática, se analizó la actividad fosforribosiltransferasa en presencia de disolventes polares próticos al 20 % (v/v)

(metanol, etanol, isopropanol, glicerol, etilenglicol y propilenglicol) y disolventes apróticos (acetonitrilo, acetona, cloroformo, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido y acetato de etilo). Como se muestra en la Figura 18, hay una pérdida insignificante de actividad (menos del 5%) en presencia de glicerol, etilenglicol, cloroformo y acetato de etilo. Se observó una pérdida moderada de actividad (menos del 40 %) en presencia de acetonitrilo, dimetilsulfóxido, metanol, etanol y propilenglicol. Finalmente, se observa una pérdida significativa de actividad cuando se agrega acetona, N,N-dimetilformamida o isopropanol a la mezcla de reacción.

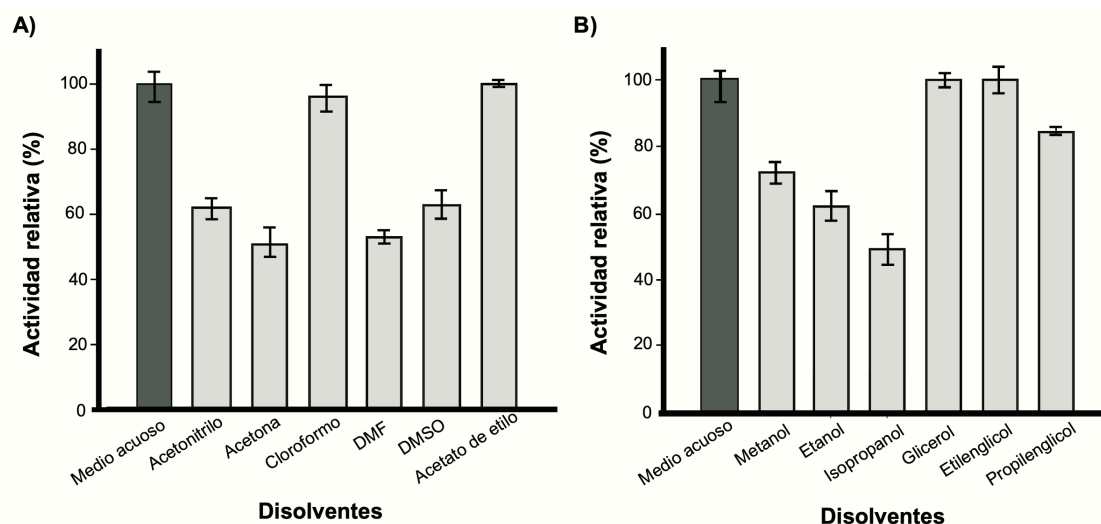


Figura 18. Efecto de disolventes orgánicos (20 % v/v) en la actividad de ZgHPGRT/AMPK. **A)** Disolventes polares apróticos. **B)** Alcoholes y polioles. DMSO = dimetilsulfóxido, DMF = N,N-dimetilformamida.

El análisis de la gráfica anterior demuestra una correlación entre la hidrofobicidad y la actividad (Figura 18A) al usar disolventes apróticos. A este respecto, los valores de actividad más altos se muestran en presencia de disolventes hidrófobos ($\log P > 0$) al 20 %, como acetato de etilo (100 % de actividad relativa, $\log P = 0,73$) o cloroformo (disolvente no miscible, 96 % de actividad relativa, $\log P = 1,83$), mientras que se observa una disminución significativa de la actividad para disolventes hidrofílicos (valor de $\log P < 0$), como acetona (51 % de actividad relativa, $\log P = -0,21$), acetonitrilo (62 % de actividad relativa, $\log P = -0,3$), DMF (53 % de actividad relativa, $\log P = -1,0$), DMSO (63 % de actividad relativa, $\log P = -1,3$). Además, también se observa un aumento de la actividad enzimática cuando la constante dieléctrica (ϵ) disminuye, mostrando los valores de actividad más altos para acetato de etilo ($\epsilon = 6,0$) y cloroformo ($\epsilon = 4,8$), y los valores más bajos para DMF ($\epsilon = 38$) y acetona ($\epsilon = 21$).

El aumento de la actividad enzimática en presencia de disolventes apróticos al 20 % (monoalcoholes y polioles, Figura 18B) parece estar relacionado con el aumento de la constante dieléctrica (ϵ), en el siguiente orden: glicerol ($\epsilon = 47$) > etilenglicol ($\epsilon = 37$) >

propilenglicol ($\epsilon = 32$) \approx metanol ($\epsilon = 32,7$) $>$ etanol ($\epsilon = 25$) $>$ isopropanol ($\epsilon = 20$) (Figura 18B). Sin embargo, se obtuvieron actividades relativas más altas para los polioles (100-85 %), en lugar de las obtenidas para los monoalcoholes (72-49 %), lo que indica que el tamaño y/o la conformación de los polioles también influyen en la actividad enzimática.

4.5.5. Estabilidad térmica

La proteína ZgHGPRT/AMPK no perdió actividad cuando se almacenó a 4 °C en 20 mM de tampón fosfato sodico, pH 7 durante 365 días. Sin embargo, se observó una pérdida significativa de actividad ($\approx 30\%$) cuando se almacenó a -80 °C. Además, el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima se evaluó incubando la enzima ZgHGPRT/AMPK durante 4 horas en 20 mM de fosfato sódico a pH 7, en el rango de temperatura 40-60 °C (Figura 19A). Como se esperaba para una enzima mesófila, ZgHGPRT/AMPK sufrió una elevada pérdida de actividad cuando se incubó a 50 °C y 60 °C en un breve período de tiempo (actividad relativa $< 70\%$ para períodos de incubación de más de 10 min). En contraste, la proteína ZgHGPRT/AMPK mostró una alta actividad relativa (alrededor del 80%) cuando se almacenó a 40 °C durante 240 min.

Estos resultados concuerdan con las curvas de desnaturalización térmica, lo que permitió estimar una temperatura de fusión moderada (T_m) de 45,25 °C (Figura 19B). Como se muestra en la literatura, el estado de oligomerización de las enzimas PRT específicas de 6-oxopurinas puede contribuir a la estabilidad general de la proteína y, además, los estados de alta agregación favorecen el aumento de la estabilidad térmica en este tipo de enzimas ²⁵. Por tanto, considerando la naturaleza dimérica de ZgHGPRT/AMPK, no se esperaba una alta estabilidad térmica en este caso.

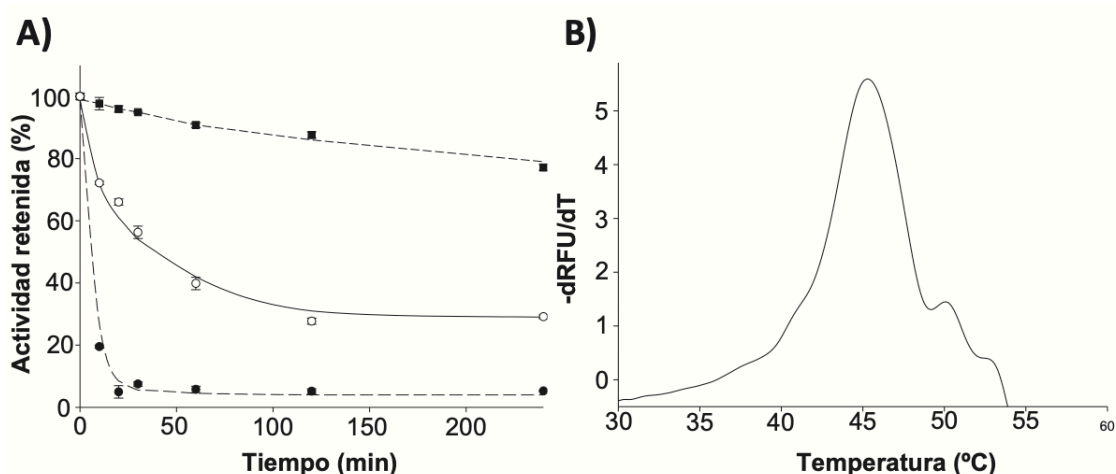


Figura 19. A) Inactivación térmica de ZgHGPRT/AMPK a (■) 40 °C, (○) 50 °C y (●) 60 °C. **B)** Temperatura de fusión de ZgHGPRT/AMPK.

4.5.6. Especificidad de sustrato

La Tabla 2 resume las actividades específicas de ZgHGPRT/AMPK para las reacciones fosforribosiltransferasa y adenilato quinasa. Estos datos, en concordancia con el análisis *in silico* previo, indican que la enzima ZgHGPRT/AMPK puede realizar la reacción fosforribosiltransferasa sobre bases 6-oxopurinicas (Hyp y Gua), mientras que ni las bases 6-aminopurinicas ni las pirimidinicas pueden emplearse como sustratos para ZgHGPRT/AMPK. Además, no se observó reacción de transferasa cuando se usó xantina como aceptor. Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía descrita para las PRT que son específicas de purina ya que, en la ruta de salvamento de estas bases, los organismos generalmente poseen diferentes PRT en función de la especificidad de sustrato, uno específico para adenina y uno o más responsables del rescate de bases 6-oxopurinicas ²⁵.

Tabla 2. Estudio de la especificidad de sustrato de ZgHGPRT/AMPK empleando diferentes nucleótidos y nucleobases como sustratos. n.d. no se detecta.

| Donador | Aceptor | Producto 1 | Actividad específica (U/mg) | Producto 2 | Actividad específica (U/mg) |
|-------------------------|--------------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|
| Actividad PRTasa | | | | | |
| PRPP | Ade | AMP | n.d. | - | - |
| | Cyt | CMP | n.d. | - | - |
| | Gua | GMP | 0,47 ± 0,03 | - | - |
| | Hyp | IMP | 0,53 ± 0,05 | - | - |
| | Ura | UMP | n.d. | - | - |
| | Thy | TMP | n.d. | - | - |
| | Xan | XMP | n.d. | - | - |
| | Actividad quinasa | | | | |
| ADP | ADP | AMP | 0,03 ± 0,004 | ATP | 0,03 ± 0,004 |
| ATP | AMP | ADP | 0,09 ± 0,01 | - | - |

Para explicar estos resultados, se analizaron las posibles interacciones de la base en el centro activo ^{25 103}. Como se muestra en la Figura 20, la unión de la hipoxantina se estabiliza mediante

una red de enlaces de hidrógeno entre Asp 104, Lys 132 e Ile 154, y N1, O6 exocíclico y N7 del anillo de purina. Debido a la ausencia de residuos adecuados para el reconocimiento del NH₂ exocíclico, las 6-aminopurinas no se acomodan adecuadamente en el sitio de unión e impide la catálisis.

Además, ZgHGPRT/AMPK también catalizó la reacción de fosfotransferencia entre nucleótidos de adenina. Como se muestra en la Tabla 2, ZgHGPRT/AMPK es más activa (hasta 3 veces) cuando se transfiere el grupo γ -fosfato desde el ATP hasta el α -fosfato del AMP, que en la reacción inversa. En este sentido, el equilibrio de la reacción parece estar desplazado hacia la síntesis de ADP. Además, la relación de actividad PRTasa/quinasa es de alrededor de 5-6/1, lo que indica una fuerte preferencia por Hyp y PRPP en lugar de nucleótidos de adenina como sustratos. Estos resultados pueden sugerir que ZgHGPRT/AMPK juega un papel clave en la ruta de salvamento, mientras que no es esencial para mantener la homeostasis celular de los nucleótidos de adenina. La presencia de otras enzimas putativas, que estarían involucradas en el metabolismo de los nucleótidos de adenina, en el genoma de *Zobellia galactanivorans*, como una APRT (GenBank: CAZ96936.1), una ribonucleótido reductasa (GenBank: CAZ95963.1), una nucleósido difosfato quinasa (GenBank: CAZ97836.1) y adenilato ciclasa (GenBank: CAZ95571.1) refuerzan esta hipótesis.

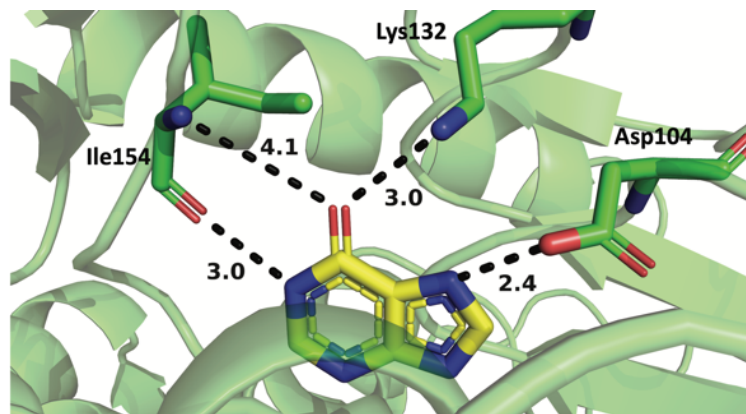


Figura 20. Análisis de las interacciones del centro activo con la base nitrogenada tras 30 ns de simulación *in silico*. Los enlaces de hidrógeno formados entre los residuos de la proteína ZgHGPRT/AMPK y la hipoxantina se muestran con líneas discontinuas negras.

4.5.7. Análisis cinético

Se realizaron estudios cinéticos mediante la aproximación del estado estacionario a concentraciones variables de Hyp o PRPP para determinar los parámetros cinéticos (K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M). Los resultados se resumen en la Tabla 3. En este sentido, ZgHGPRT/AMPK

muestra un valor de K_M más bajo para la Hyp que para el PRPP, lo que concuerda con los datos cinéticos descritos para otras PRT de tipo I^{40 103 124}. Además, se observa un valor de k_{cat} más bajo para Hyp, que se relaciona con la inhibición aparente por sustrato a una alta concentración de Hyp (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros cinéticos con la aproximación del estado estacionario para la síntesis de IMP y ADP catalizada por ZgHGPRT/AMPK.

| Parámetros | Valores con sustratos variables | | | |
|------------------------------|---------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| | Hyp | PRPP | ATP | AMP |
| K_M (mM) | 1,01 ± 0,05 | 6,77 ± 0,41 | 0,77 ± 0,04 | 8,02 ± 0,40 |
| k_{cat} (s ⁻¹) | 1,11 ± 0,06 | 2,82 ± 0,21 | 0,07 ± 0,003 | 0,16 ± 0,008 |
| k_{cat}/K_M | 1,10 | 0,42 | 0,10 | 0,02 |
| K_i (mM) | 11,12 ± 1,02 | - | - | - |

En cuanto a la síntesis de ADP, la K_M para AMP es 10 veces mayor que la K_M para ATP. Esta diferencia significativa en la afinidad entre AMP y ATP se debe probablemente a una unión más inestable del AMP al sitio de unión del nucleósido monofosfato, mientras que la unión de ATP al dominio LID parece estar favorecida¹²⁵. Además, los números de recambio cumplen con la forma de liberación de los productos, donde la escisión del ADP proveniente del AMP ocurre a través del sitio de unión del AMP, y la liberación del ADP procedente del ATP ocurre a través del dominio CORE¹²⁵. Finalmente, la diferencia en la eficiencia catalítica entre AMP y ATP se ajusta al modelo descrito por Áden *et al.*¹²⁶ donde el AMP puede unirse al LID con una afinidad muy baja generando un complejo improductivo^{125 127}.

5. Conclusiones

Las principales conclusiones del trabajo son las siguientes:

1. Se describe por **primera vez la estructura y la actividad bifuncional HGPRT y AMPK** en una única proteína.
2. Los resultados experimentales revelaron que ZgHGPRT/AMPK:
 - a. Presenta un estado de **oligomerización complejo**: con una región dimérica en el dominio HGPRT y una monomérica en el dominio AMPK.
 - b. Es activo en el rango de **pH 6-7** y en el intervalo de temperaturas **30-80 °C**; y muestra una actividad máxima a **pH 7 y 50 °C**.
 - c. La enzima mantiene una actividad superior al 80 % tras la **incubación a 40 °C durante más de 200 minutos**. Sin embargo, la estabilidad de la misma se ve comprometida tras la incubación a 50 °C durante más de 50 minutos.
 - d. El efecto de los cationes divalentes muestra una clara **preferencia por el Mg²⁺** y una **inhibición a altas concentraciones de sal**.
 - e. Mantiene más de un **80 % de actividad en presencia de disolventes orgánicos** como el cloroformo, el acetato de etilo, el glicerol, el etilenglicol y el propilenglicol.
 - f. Los estudios de especificidad de sustrato revelan que **puede actuar como fosforribosiltransferasa o adenilato quinasa** dependiendo de la naturaleza de los sustratos.
 - g. La cinética enzimática demuestra una **mayor actividad catalítica para el dominio HGPRT que AMPK**, así como una inhibición por hipoxantina.

Por tanto, el presente trabajo demuestra que ZgHGPRT/AMPK es un catalizador apto para la síntesis de nucleósidos mon-, di-, y trifosfato. Asimismo, puede servir como referencia de ligación natural de dominios catalíticos para la fusión de enzimas *in vitro*.

6. Bibliografía

- (1) Tylecote, A. Biotechnology as a New Techno-Economic Paradigm That Will Help Drive the World Economy and Mitigate Climate Change. *Res. Policy*. **2019**, *48* (4), pp 858–868.
- (2) Villadsen, J. Innovative Technology to Meet the Demands of the White Biotechnology Revolution of Chemical Production. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62* (24), pp 6957–6968.
- (3) Verma, G.; Ravichandran, S. Evolution of Biotechnology as a Million Dollar Market: The Management and Commerce of a Biotech Start-Up. In *Biotechnology Business - Concept to Delivery. EcoProduction (Environmental Issues in Logistics and Manufacturing)*; Saxena, A., Ed.; Springer, Cham, 2020; pp 161–178.
- (4) Aguilar, A.; Twardowski, T.; Wohlgemuth, R. Bioeconomy for Sustainable Development. *Biotechnol. J. Wiley-VCH Verlag August 1*, **2019**, *14* (8), pp 1800638.
- (5) Lokko, Y.; Heijde, M.; Schebesta, K.; Scholtès, P.; Van Montagu, M.; Giacca, M. Biotechnology and the Bioeconomy—Towards Inclusive and Sustainable Industrial Development. *New Biotechnol.* Elsevier B.V. January 25, **2018**, *40* (3), pp 5–10.
- (6) Heux, S.; Meynial-Salles, I.; O'Donohue, M. J.; Dumon, C. White Biotechnology: State of the Art Strategies for the Development of Biocatalysts for Biorefining. *Biotechnol Adv.* Elsevier Inc. December **2015**, *33* (8) pp 1653–1670.
- (7) Zhang, Y. H. P.; Myung, S.; You, C.; Zhu, Z.; Rollin, J. A. Toward Low-Cost Biomanufacturing through in Vitro Synthetic Biology: Bottom-up Design. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (47), pp 18877–18886.
- (8) Acosta, J.; Del Arco, J.; Martínez-Pascual, S.; Clemente-Suárez, V. J.; Fernández-Lucas, J. One-Pot Multi-Enzymatic Production of Purine Derivatives with Application in Pharmaceutical and Food Industry. *Catalysts* **2018**, *8* (1), pp 9.
- (9) Dako, E.; Bernier, A.-M.; Dadie, A.T.; Jankowski, C.K. The Problems Associated with Enzyme Purification. In *Chemical Biology*; Ekinci, D., Ed.; IntechOpen, 2012.
- (10) Berg, J. M. (Jeremy M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; Stryer, L). *Biochemistry*; W.H. Freeman, 2002.
- (11) Cunha, E. S.; Hatem, C. L.; Barrick, D. Insertion of Endocellulase Catalytic Domains into Thermostable Consensus Ankyrin Scaffolds: Effects on Stability and Cellulolytic Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79* (21), pp 6684–6696.
- (12) Liu, Z. L.; Li, H. N.; Song, H. T.; Xiao, W. J.; Xia, W. C.; Liu, X. P.; Jiang, Z. B.; Liu, Z. L. Construction of a Trifunctional Cellulase and Expression in *Saccharomyces Cerevisiae* Using a Fusion Protein. *BMC Biotechnol.* **2018**, *18* (1).
- (13) Levary, D. A.; Parthasarathy, R.; Boder, E. T.; Ackerman, M. E. Protein-Protein Fusion Catalyzed by Sortase A. *PLoS One*. **2011**, *6* (4), pp e18342.
- (14) Alonso, S.; Santiago, G.; Cea-Rama, I.; Fernandez-Lopez, L.; Coscolín, C.; Modregger, J.; Ressmann, A. K.; Martínez-Martínez, M.; Marrero, H.; Bargiela, R.; Pita, M.; Gonzalez-Alfonso, J. L.; Briand, M. L.; Rojo, D.; Barbas, C.; Plou, F. J.; Golyshin, P. N.; Shahgaldian, P.; Sanz-Aparicio, J.; Guallar, V.; Ferrer, M. Genetically Engineered Proteins with Two Active Sites for Enhanced Biocatalysis and Synergistic Chemo- and Biocatalysis. *Nat. Catal.* **2020**, *3* (3), pp 319–328.
- (15) Barbeyron, T.; L'Haridon, S.; Corre, E.; Kloareg, B.; Potin, P. *Zobellia Galactanovorans* Gen. Nov., Sp. Nov., a Marine Species of Flavobacteriaceae Isolated from a Red Alga, and Classification of [Cytophaga] *Uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia Uliginosa* Gen. Nov., Comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51* (3), pp 985–997.
- (16) Bowater, R. P.; Gates, A. J. Nucleotides: Structure and Properties. In eLS; Wiley Online Library, 2015; pp 1–9.
- (17) Roy, B.; Depaix, A.; Périgaud, C.; Peyrottes, S. Recent Trends in Nucleotide Synthesis. *Chem. Rev. American Chemical Society July 27*, **2016**, *116* (14) pp 7854–7897.

- (18) Boswell-Casteel, R. C.; Hays, F. A. Equilibrative Nucleoside Transporters—A Review. *Nucleos., Nucleot. Nucl.* Taylor and Francis Inc. January 2, **2017**, 36 (1) pp 7–30.
- (19) Fresco-Taboada, A.; De La Mata, I.; Arroyo, M.; Fernández-Lucas, J. New Insights on Nucleoside 2'-Deoxyribosyltransferases: A Versatile Biocatalyst for One-Pot One-Step Synthesis of Nucleoside Analogs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer Verlag May 1, **2013**, 97 (9) pp 3773–3785.
- (20) Leningher, M. C.; Nelson, D. L. Principles of Biochemistry. 2017, 1 (7).
- (21) Crespo, N.; Sánchez-Murcia, P. A.; Gago, F.; Cejudo-Sanches, J.; Galmes, M. A.; Fernández-Lucas, J.; Mancheño, J. M. 2'-Deoxyribosyltransferase from *Leishmania Mexicana*, an Efficient Biocatalyst for One-Pot, One-Step Synthesis of Nucleosides from Poorly Soluble Purine Bases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 101 (19).
- (22) Fresco-Taboada, A.; Serra, I.; Arroyo, M.; Fernández-Lucas, J.; De La Mata, I.; Terreni, M. Development of an Immobilized Biocatalyst Based on *Bacillus Psychrosaccharolyticus* NDT for the Preparative Synthesis of Trifluridine and Decytabine. *Catal. Today* **2016**, 259 (5), pp 197-204.
- (23) Zhou, X.; Szeker, K.; Janocha, B.; Böhme, T.; Albrecht, D.; Mikhailopulo, I. A.; Neubauer, P. Recombinant Purine Nucleoside Phosphorylases from Thermophiles: Preparation, Properties and Activity towards Purine and Pyrimidine Nucleosides. *FEBS J.* **2013**, 280 (6), pp 1475-1490.
- (24) Iglesias, L. E.; Lewkowicz, E. S.; Medici, R.; Bianchi, P.; Iribarren, A. M. Biocatalytic Approaches Applied to the Synthesis of Nucleoside Prodrugs. *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33 (5), pp 412-434.
- (25) Arco, J. Del; Fernandez-Lucas, J. Purine and Pyrimidine Phosphoribosyltransferases: A Versatile Tool for Enzymatic Synthesis of Nucleoside-5'-Monophosphates. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, 23 (45), pp 6898–6912.
- (26) del Arco, J.; Acosta, J.; Pereira, H. M.; Perona, A.; Lokanath, N. K.; Kunishima, N.; Fernández-Lucas, J. Enzymatic Production of Non-Natural Nucleoside-5'-Monophosphates by a Thermostable Uracil Phosphoribosyltransferase. *ChemCatChem.* **2018**, 10 (2), pp 439-448.
- (27) Del Arco, J.; Cejudo-Sanches, J.; Esteban, I.; Clemente-Suárez, V. J.; Hormigo, D.; Perona, A.; Fernández-Lucas, J. Enzymatic Production of Dietary Nucleotides from Low-Soluble Purine Bases by an Efficient, Thermostable and Alkali-Tolerant Biocatalyst. *Food Chem.* **2017**, 237 (2), pp 605-611.
- (28) Marques, I. D. A.; Romanello, L.; DeMarco, R.; Pereira, H. D. M. Structural and Kinetic Studies of *Schistosoma Mansonii* Adenylate Kinases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2012**, 185 (2), pp 157-160.
- (29) Nyhan, W. L. Nucleotide Synthesis via Salvage Pathway. In *eLS*; **2006**.
- (30) Serra, I.; Conti, S.; Piškur, J.; Clausen, A. R.; Munch-Petersen, B.; Terreni, M.; Ubiali, D. Immobilized *Drosophila Melanogaster* Deoxyribonucleoside Kinase (DmdNK) as a High Performing Biocatalyst for the Synthesis of Purine Arabinonucleotides. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356 (2-3), pp 563-570.
- (31) Zou, Z.; Ding, Q.; Ou, L.; Yan, B. Efficient Production of Deoxynucleoside-5'-Monophosphates Using Deoxynucleoside Kinase Coupled with a GTP-Regeneration System. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97 (21), pp 9389-9395.
- (32) Mori, H.; Iida, A.; Fujio, T.; Teshiba, S. A Novel Process of Inosine 5'-Monophosphate Production Using Overexpressed Guanosine/Inosine Kinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 48 (6), pp 693-698.
- (33) Ducati, R. G.; Breda, A.; Basso, L. A.; Santos, D. S. Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Curr. Med. Chem.* **2011**, 18 (9), pp 1258-1275.
- (34) Zhang, Y.; Evans, G. B.; Clinch, K.; Crump, D. R.; Harris, L. D.; Fröhlich, R. F. G.; Tyler, P. C.; Hazleton, K. Z.; Cassera, M. B.; Schramm, V. L. Transition State Analogues of *Plasmodium Falciparum* and Human Orotate Phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288 (48), pp 34746-34754.

- (35) Leija, C.; Rijo-Ferreira, F.; Kinch, L. N.; Grishin, N. V.; Nischan, N.; Kohler, J. J.; Hu, Z.; Phillips, M. A. Pyrimidine Salvage Enzymes Are Essential for De Novo Biosynthesis of Deoxyuridine Nucleotides in *Trypanosoma Brucei*. *PLoS Pathog.* **2016**, *12* (11), pp e1006010.
- (36) El Kouni, M. H. Potential Chemotherapeutic Targets in the Purine Metabolism of Parasites. *Pharmacol. Therapeut.* **2003**, *99* (3), pp 283-309.
- (37) Kadziola, A.; Neuhard, J.; Larsen, S. Structure of Product-Bound *Bacillus Caldolyticus* Uracil Phosphoribosyltransferase Confirms Ordered Sequential Substrate Binding. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2002**, *58* (6), pp 936-945.
- (38) Villela, A. D.; Ducati, R. G.; Rosado, L. A.; Bloch, C. J.; Prates, M. V.; Gonçalves, D. C.; Ramos, C. H. I.; Basso, L. A.; Santos, D. S. Biochemical Characterization of Uracil Phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium Tuberculosis*. *PLoS One* **2013**, *8* (2), pp e56445.
- (39) Xu, Y.; Eads, J.; Sacchettini, J. C.; Grubmeyer, C. Kinetic Mechanism of Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase: Rapid Phosphoribosyl Transfer Chemistry. *Biochemistry* **1997**, *36* (12), pp 3700-3712.
- (40) Munagala, N. R.; Chin, M. S.; Wang, C. C. Steady-State Kinetics of the Hypoxanthine-Guanine-Xanthine Phosphoribosyltransferase from *Tritrichomonas Foetus*: The Role of Threonine-47 †. *Biochemistry* **1998**, *37* (12), pp 4045-4051.
- (41) Krungkrai, S. R.; Aoki, S.; Palacpac, N. M. Q.; Sato, D.; Mitamura, T.; Krungkrai, J.; Horii, T. Human Malaria Parasite Orotate Phosphoribosyltransferase: Functional Expression, Characterization of Kinetic Reaction Mechanism and Inhibition Profile. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *134* (2), pp 245-255.
- (42) Wang, G. P.; Lundegaard, C.; Jensen, K. F.; Grubmeyer, C. Kinetic Mechanism of OMP Synthase: A Slow Physical Step Following Group Transfer Limits Catalytic Rate. *Biochemistry* **1999**, *38* (1), pp 275-283.
- (43) Natalini, P.; Ruggieri, S.; Santarelli, I.; Vita, A.; Magni, G. Baker's Yeast UMP:Pyrophosphate Phosphoribosyltransferase. Purification, Enzymatic and Kinetic Properties. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (5), pp 1558-1563.
- (44) Linde, L.; Jensen, K. F. Uracil Phosphoribosyltransferase from the Extreme Thermoadicophilic *Archaebacterium Sulfolobus Shibatae* Is an Allosteric Enzyme, Activated by GTP and Inhibited by CTP. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1996**, *1296* (1), pp 16-22.
- (45) Jensen, K. F.; Mygind, B. Different Oligomeric States Are Involved in the Allosteric Behavior of Uracil Phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240* (3), pp 637-645.
- (46) Craig, S. P.; Eakin, A. E. Purine Phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (27), pp 20231-20234.
- (47) Esipov, R. S.; Abramchik, Y. A.; Fateev, I. V.; Konstantinova, I. D.; Kostromina, M. A.; Muravyova, T. I.; Artemova, K. G.; Miroshnikov, A. I. A Cascade of Thermophilic Enzymes As an Approach to the Synthesis of Modified Nucleotides. *Acta Naturae* **2016**, *8* (4), pp 82-90.
- (48) Seism, R. A.; Stec, D. F.; Bachmann, B. O. Synthesis of Nucleotide Analogues by a Promiscuous Phosphoribosyltransferase. *Org. Lett.* **2007**, *9* (21), pp 4179-4182.
- (49) Scism, R. A.; Bachmann, B. O. Five-Component Cascade Synthesis of Nucleotide Analogues in an Engineered Self-Immobilized Enzyme Aggregate. *ChemBioChem.* **2010**, *11* (1), pp 67-70.
- (50) Keough, D. T.; Ng, A. L.; Winzor, D. J.; Emmerson, B. T.; De Jersey, J. Purification and Characterization of *Plasmodium Falciparum* Hypoxanthine-Guanine-Xanthine Phosphoribosyltransferase and Comparison with the Human Enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, *98* (1), pp 29-41.
- (51) Terán, D.; Hocková, D.; Česnek, M.; Zíková, A.; Naesens, L.; Keough, D. T.; Guddat, L. W. Crystal Structures and Inhibition of *Trypanosoma Brucei* Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), pp 1-14.

- (52) Boitz, J. M.; Ullman, B. A Conditional Mutant Deficient in Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase and Xanthine Phosphoribosyltransferase Validates the Purine Salvage Pathway of *Leishmania Donovanii*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (23), pp 16084–16089.
- (53) Shivashankar, K.; Subbaya, I. N.; Balaram, H. Development of a Bacterial Screen for Novel Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Substrates. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *3* (4), 557–562.
- (54) Matte, A.; Tari, L. W.; Delbaere, L. T. J. How Do Kinases Transfer Phosphoryl Groups? *Structure.* **1998**, *6* (4), pp 413–419.
- (55) Bellinzoni, M.; Haouz, A.; Graña, M.; Munier-Lehmann, H.; Shepard, W.; Alzari, P. M. The Crystal Structure of Mycobacterium Tuberculosis Adenylate Kinase in Complex with Two Molecules of ADP and Mg²⁺ Supports an Associative Mechanism for Phosphoryl Transfer. *Protein Sci.* **2006**, *15* (6), pp 1489–1493.
- (56) Schlichting, I.; Reinstein, J. Structures of Active Conformations of UMP Kinase from *Dictyostelium Discoideum* Suggest Phosphoryl Transfer Is Associative. *Biochemistry* **1997**, *36* (31), pp 9290–9296.
- (57) Hamada, M., Takenaka, H., Sumida, M. Phosphotransferases-Structure and Mechanisms: Adenylate Kinase, A study of enzymes.; Kuby, S. A., Ed.; CRC Press, 1990, 2 (1).
- (58) Honggao, Y., Ming-Daw, T. *Nucleoside Monophosphate Kinases: Structure, Mechanism, and Substrate Specificity*; Purich, D. L., Ed.; Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **1999**, *73* (4), pp 103–134.
- (59) Aviram, H. Y.; Pirchi, M.; Mazal, H.; Barak, Y.; Riven, I.; Haran, G. Direct Observation of Ultrafast Large-Scale Dynamics of an Enzyme under Turnover Conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (13), pp 3243–3248.
- (60) Kovermann, M.; Grundström, C.; Sauer-Eriksson, A. E.; Sauer, U. H.; Wolf-Watz, M. Structural Basis for Ligand Binding to an Enzyme by a Conformational Selection Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (24), pp 6298–6303.
- (61) Sakamoto, H.; Landais, S.; Evrin, C.; Laurent-Winter, C.; Bâzsu, O.; Kelln, R. A. Structure-Function Relationships of UMP Kinases from PyrH Mutants of Gram-Negative Bacteria. *Microbiology* **2004**, *150* (7), pp 2153–2159.
- (62) Cui, Q.; Shin, W. S.; Luo, Y.; Tian, J.; Cui, H.; Yin, D. Thymidylate Kinase: An Old Topic Brings New Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (10), pp 1286–1305.
- (63) Liu, K.; Myers, A. R.; Pisithkul, T.; Claas, K. R.; Satyshur, K. A.; Amador-Nogues, D.; Keck, J. L.; Wang, J. D. Molecular Mechanism and Evolution of Guanylate Kinase Regulation by (p)PpGpp. *Mol. Cell.* **2015**, *57* (4), pp 735–749.
- (64) Gavel, O. Y.; Bursakov, S. A.; Pina, D. G.; Zhadan, G. G.; Moura, J. J. .; Moura, I.; Shnyrov, V. L. Structural Stability of Adenylate Kinase from the Sulfate-Reducing Bacteria *Desulfovibrio Gigas*. *Biophys. Chem.* **2004**, *110* (1–2), pp 83–92.
- (65) Ulschmid, J. K.; Rahlfs, S.; Schirmer, R. H.; Becker, K. Adenylate Kinase and GTP:AMP Phosphotransferase of the Malarial Parasite *Plasmodium Falciparum*. Central Players in Cellular Energy Metabolism. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *136* (2), pp 211–220.
- (66) Ren, H.; Wang, L.; Bennett, M.; Liang, Y.; Zheng, X.; Lu, F.; Li, L.; Nan, J.; Luo, M.; Eriksson, S.; Zhang, C.; Su, X.-D. The Crystal Structure of Human Adenylate Kinase 6: An Adenylate Kinase Localized to the Cell Nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (2), pp 303–308.
- (67) Schrank, T. P.; Wrabl, J. O.; Hilser, V. J.; Jenkins, T. C. Conformational Heterogeneity within the LID Domain Mediates Substrate Binding to *Escherichia Coli* Adenylate Kinase: Function Follows Fluctuations. *Top. Curr. Chem.* **2013**, *337*, pp 95–121.
- (68) Formoso, E.; Limongelli, V.; Parrinello, M. Energetics and Structural Characterization of the Large-Scale Functional Motion of Adenylate Kinase. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), pp 8425.

- (69) Rocha, R. A. R.; Ribeiro, M. N.; Silva, G. A.; Rocha, L. C. R.; Pinheiro, A. C. M.; Nunes, C. A.; Carneiro, J. de D. S. Temporal Profile of Flavor Enhancers MAG, MSG, GMP, and IMP, and Their Ability to Enhance Salty Taste, in Different Reductions of Sodium Chloride. *J. Food Sci.* **2020**, *85* (5), pp 1565-1575.
- (70) Hess, J. R.; Greenberg, N. A. The Role of Nucleotides in the Immune and Gastrointestinal Systems: Potential Clinical Applications. *Nut. Clin. Pract.* April 5, **2012**, *27* (2), pp 281–294.
- (71) Pu, F.; Ren, J.; Qu, X. Nucleobases, Nucleosides, and Nucleotides: Versatile Biomolecules for Generating Functional Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* Royal Society of Chemistry February 21, **2018**, *47* (4), pp 1285–1306.
- (72) Kumar, A.; Gupta, S. K. 5'-Guanosine Monophosphate Mediated Biocompatible Porous Hydrogel of β -FeOOH-Viscoelastic Behavior, Loading, and Release Capabilities of Freeze-Dried Gel. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (35), pp 10543–10551.
- (73) Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42* (12), pp 3505–3508.
- (74) IKEMOTO, T.; HAZE, A.; HATANO, H.; KITAMOTO, Y.; ISHIDA, M.; NARA, K. Phosphorylation of Nucleosides with Phosphorus Oxichloride in Trialkyl Phosphate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1995**, *43* (2), pp 210–215.
- (75) Fernández-Lucas, J. Multienzymatic Synthesis of Nucleic Acid Derivatives: A General Perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer Verlag June 18, **2015**, *99* (11), pp 4615–4627.
- (76) Zika, E.; Institute for Prospective Technological Studies. Consequences, Opportunities and Challenges of Modern Biotechnology for Europe; Joint Research Centre, 2007.
- (77) Serra, I.; Conti, S.; Piškur, J.; Clausen, A. R.; Munch-Petersen, B.; Terreni, M.; Ubiali, D. Immobilized *Drosophila Melanogaster* Deoxyribonucleoside Kinase (*Dm* DNK) as a High Performing Biocatalyst for the Synthesis of Purine Arabinonucleotides. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356* (2–3), pp 563–570.
- (78) Liu, Z.-Q.; Zhang, L.; Sun, L.-H.; Li, X.-J.; Wan, N.-W.; Zheng, Y.-G. Enzymatic Production of 5'-Inosinic Acid by a Newly Synthesised Acid Phosphatase/Phosphotransferase. *Food Chem.* **2012**, *134* (2), pp 948–956.
- (79) Zou, H.; Cai, G.; Cai, W.; Li, H.; Gu, Y.; Park, Y.; Meng, F. Extraction and DNA Digestion of 5'-Phosphodiesterase from Malt Root. *Tsinghua Sci. Technol.* **2008**, *13* (4), pp 480–484.
- (80) Hathaway, H. J.; Sutton, J. M.; Jenkins, A. T. A. Study into the Kinetic Properties and Surface Attachment of a Thermostable Adenylate Kinase. *Biochem. Biophys. Reports.* **2015**, *1* (1), pp 1–7.
- (81) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215* (3), pp 403–410.
- (82) Buchan, D. W. A.; Jones, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 Years On. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (W1), pp W402-W407.
- (83) Madeira, F.; Park, Y.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.; Potter, S.; Finn, R.; Lopez, R. The EMBL-EBI Search and Sequence Analysis Tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (W1), pp W636-W641.
- (84) Robert, X.; Gouet, P. Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (W1), pp W320–W324.
- (85) Drozdetskiy, A.; Cole, C.; Procter, J.; Barton, G. J. JPred4: A Protein Secondary Structure Prediction Server. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (W1), pp W389–W394.
- (86) Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (W1), pp W296–W303.

- (87) Zhou, X.; Hu, J.; Zhang, C.; Zhang, G.; Zhang, Y. Assembling Multidomain Protein Structures through Analogous Global Structural Alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116* (32), pp 15930–15938.
- (88) Vajda, S.; Yueh, C.; Beglov, D.; Bohnuud, T.; Mottarella, S. E.; Xia, B.; Hall, D. R.; Kozakov, D. New Additions to the ClusPro Server Motivated by CAPRI. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2017**, *85* (3), pp 435–444.
- (89) Delano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. De Lano Scientific, San Carlos. 2002.
- (90) Case, D. A.; Betz, R. M.; Cerutti, D. S.; Cheatham Iii, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Homeyer, N. Amber 16. *Univ. California, San Fr.* **2016**, *810*.
- (91) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from Ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (8), pp 3696–3713.
- (92) Jeong, H.; Barbe, V.; Lee, C. H.; Vallenet, D.; Yu, D. S.; Choi, S. H.; Couloux, A.; Lee, S. W.; Yoon, S. H.; Cattolico, L.; Hur, C. G.; Park, H. S.; Ségurens, B.; Kim, S. C.; Oh, T. K.; Lenski, R. E.; Studier, F. W.; Daegelen, P.; Kim, J. F. Genome Sequences of Escherichia Coli B Strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* **2009**, *394* (4), pp 644-652.
- (93) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor N.Y., 1989, *1* (4).
- (94) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **1970**, *227* (5259), pp 680-685.
- (95) Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In The Proteomics Protocols Handbook. Walker, J. M., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005; pp 571–607.
- (96) Brown, P. H.; Schuck, P. Macromolecular Size-and-Shape Distributions by Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation. *Biophys. J.* **2006**, *90* (12), pp 4651–4661.
- (97) Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., and Pelletier, S. L. Computer-Aided Interpretation of Analytical Sedimentation Data for Proteins. In Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science; Harding, S. E.; Horton, J. C.; Rowe, A. J., Eds.; Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K, 1992; pp 90–125.
- (98) Minton, A. P. Alternative Strategies for the Characterization of Associations in Multicomponent Solutions via Measurement of Sedimentation Equilibrium. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1997**, *107*, pp 11–19.
- (99) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (9), pp 2212–2221.
- (100) Motulsky, H.; Christopoulos, A. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting; 2003, *4* (2), pp 147-148.
- (101) NCBI Conserved Domain Search
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?SEQUENCE=339733250&FULL> (acceso 27 de abril, 2020).
- (102) Buchan, D. W. A. D. T.; Jones, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 Yearson. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (W1), pp W402-W407.
- (103) Kanagawa, M.; Baba, S.; Ebihara, A.; Shinkai, A.; Hirotsu, K.; Mega, R.; Kim, K.; Kuramitsu, S.; Sampei, G. I.; Kawai, G. Structures of Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (TTHA0220) from Thermus Thermophilus HB8. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, *66* (8), pp 893–898.
- (104) Mukhopadhyay, A.; Kladova, A. V.; Bursakov, S. A.; Gavel, O. Y.; Calvete, J. J.; Shnyrov, V. L.; Moura, I.; Moura, J. J. G.; Romão, M. J.; Trincão, J. Crystal Structure of the Zinc-, Cobalt-, and Iron-Containing Adenylate Kinase from Desulfovibrio Gigas: A Novel Metal-Containing Adenylate Kinase from Gram-Negative Bacteria. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16* (1), pp 51–61.

- (105) Moon, S.; Bannen, R. M.; Rutkoski, T. J.; Phillips, G. N.; Bae, E. Effectiveness and Limitations of Local Structural Entropy Optimization in the Thermal Stabilization of Mesophilic and Thermophilic Adenylate Kinases. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2014**, *82* (10), pp 2631–2642.
- (106) Héroux, A.; White, E. L.; Ross, L. J.; Kuzin, A. P.; Borhani, D. W. Substrate Deformation in a Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Ternary Complex: The Structural Basis for Catalysis. *Structure* **2000**, *8* (12), pp 1309–1318.
- (107) Monzani, P. S.; Trapani, S.; Thiemann, O. H.; Oliva, G. Crystal Structure of *Leishmania Tarentolae* Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase. *BMC Struct. Biol.* **2007**, *7* (1), pp 59.
- (108) Argos, P. An Investigation of Oligopeptides Linking Domains in Protein Tertiary Structures and Possible Candidates for General Gene Fusion. *J. Mol. Biol.* **1990**, *211* (4), pp 943–958.
- (109) George, R. A.; Heringa, J. An Analysis of Protein Domain Linkers: Their Classification and Role in Protein Folding. *Protein Eng.* **2002**, *15* (11), pp 871–879.
- (110) Chen, X.; Zaro, J. L.; Shen, W. C. Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier October 15, **2013**, *65* (10), pp 1357–1369.
- (111) Eisenberg, D.; Lüthy, R.; Bowie, J. U. VERIFY3D: Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles. *Methods Enzymol.* **1997**, *277*, pp 396–404.
- (112) Héroux, A.; White, E. L.; Ross, L. J.; Davis, R. L.; Borhani, D. W. Crystal Structure of *Toxoplasma Gondii* Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase with XMP, Pyrophosphate, and Two Mg²⁺ Ions Bound: Insights into the Catalytic Mechanism. *Biochemistry* **1999**, *38* (44), pp 14495–14506.
- (113) Karnawat, V.; Gogia, S.; Balaram, H.; Puranik, M. Differential Distortion of Purine Substrates by Human and *Plasmodium Falciparum* Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase to Catalyse the Formation of Mononucleotides. *ChemPhysChem.* **2015**, *16* (10), pp 2172–2181.
- (114) Fasman, G. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. In Handbook of biochemistry and molecular biology. 1976, *1*, pp 192–200.
- (115) Davlieva, M.; Shamoo, Y. Crystal Structure of a Trimeric Archaeal Adenylate Kinase from the Mesophile *Methanococcus Maripaludis* with an Unusually Broad Functional Range and Thermal Stability. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2010**, *78* (2), pp 357–364.
- (116) Perrier, V.; Burlacu-Miron, S.; Boussac, A.; Meier, A.; Gilles, A. M. Metal Chelating Properties of Adenylate Kinase from *Paracoccus Denitrificans*. *Protein Eng. Des. Sel.* **1998**, *11* (10), pp 917–923.
- (117) Sarkar, D.; Ghosh, I.; Datta, S. Biochemical Characterization of *Plasmodium Falciparum* Hypoxanthine-Guanine- Xanthine Phosphorybosyltransferase: Role of Histidine Residue in Substrate Selectivity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *137* (2), pp 267–276.
- (118) Groisillier, A.; Labourel, A.; Michel, G.; Tonon, T. The Mannitol Utilization System of the Marine Bacterium *Zobellia Galactanivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (5), pp 1799–1812.
- (119) Sinha, S. C.; Smith, J. L. The PRT Protein Family. *Curr. Opin. Struc. Biol.* December 1, **2001**, *11* (6), pp 733–739.
- (120) Hochstadt, J. Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase and Guanine Phosphoribosyltransferase from Enteric Bacteria. *Methods Enzymol.* **1978**, *51* (C), pp 549–558.
- (121) Montero, C.; Llorente, P. Artemia Purine Phosphoribosyltransferases. Purification and Characterization. *Biochem. J.* **1991**, *275* (2), pp 327–334.
- (122) Ali, L. Z.; Sloan, D. L. Activation of Hypoxanthine/Guanine Phosphoribosyltransferase from Yeast by Divalent Zinc and Nickel Ions. *J. Inorg. Biochem.* **1986**, *28* (4), pp 407–415.
- (123) Mbewe, B.; Chibale, K.; McIntosh, D. B. Purification of Human Malaria Parasite Hypoxanthine Guanine Xanthine Phosphoribosyltransferase (HGXPRT) Using Immobilized Reactive Red 120. *Protein Expr. Purif.* **2007**, *52* (1), pp 153–158.

- (124) Wenck, M. A.; Medrano, F. J.; Eakin, A. E.; Craig, S. P. Steady-State Kinetics of the Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma Cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2004**, *1700* (1), pp 11–18.
- (125) Zeller, F.; Zacharias, M. Substrate Binding Specifically Modulates Domain Arrangements in Adenylate Kinase. *Biophys. J.* **2015**, *109* (9), pp 1978–1985.
- (126) Ådén, J.; Weise, C. F.; Brännström, K.; Olofsson, A.; Wolf-Watz, M. Structural Topology and Activation of an Initial Adenylate Kinase-Substrate Complex. *Biochemistry* **2013**, *52* (6), pp 1055–1061.
- (127) Whitford, P. C.; Gosavi, S.; Onuchic, J. N. Conformational Transitions in Adenylate Kinase: Allosteric Communication Reduces Misligation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (4), pp 2042–2048.

7. Material suplementario

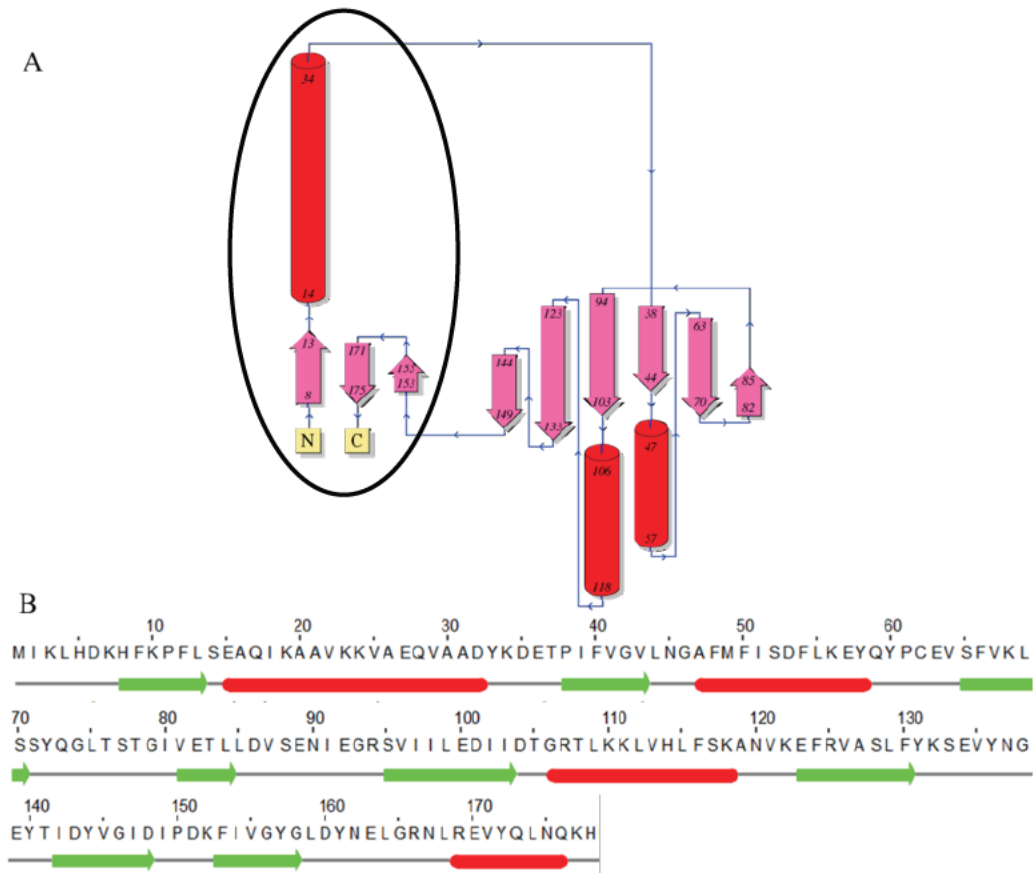


Figura suplementaria 1. Estructura secundaria del dominio HGPRT. La figura A muestra la distribución de la estructura secundaria de la proteína HGPRT de *Leptospira interrogans* (código PDB 4QRI). La figura B muestra la estructura secundaria predicha por JPred del dominio funcional HGPRT de la proteína ZgHGPRT/AMPK. Ambas estructuras tienen un BLAST E-value de $2 \cdot 10^{-29}$. Flechas verdes y rosas: β -lámina; segmentos rojos: α -hélice. El círculo negro representa una región posiblemente compartida con el dominio AK.

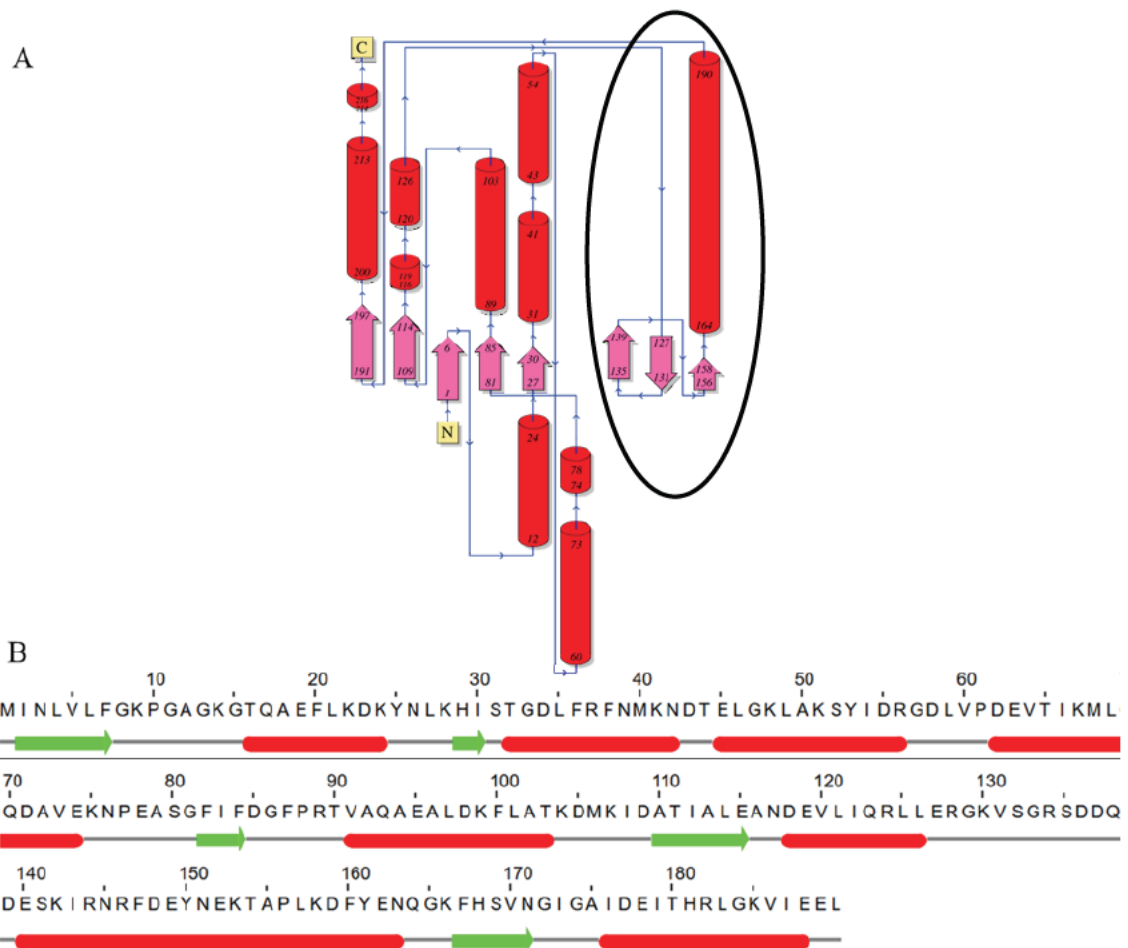
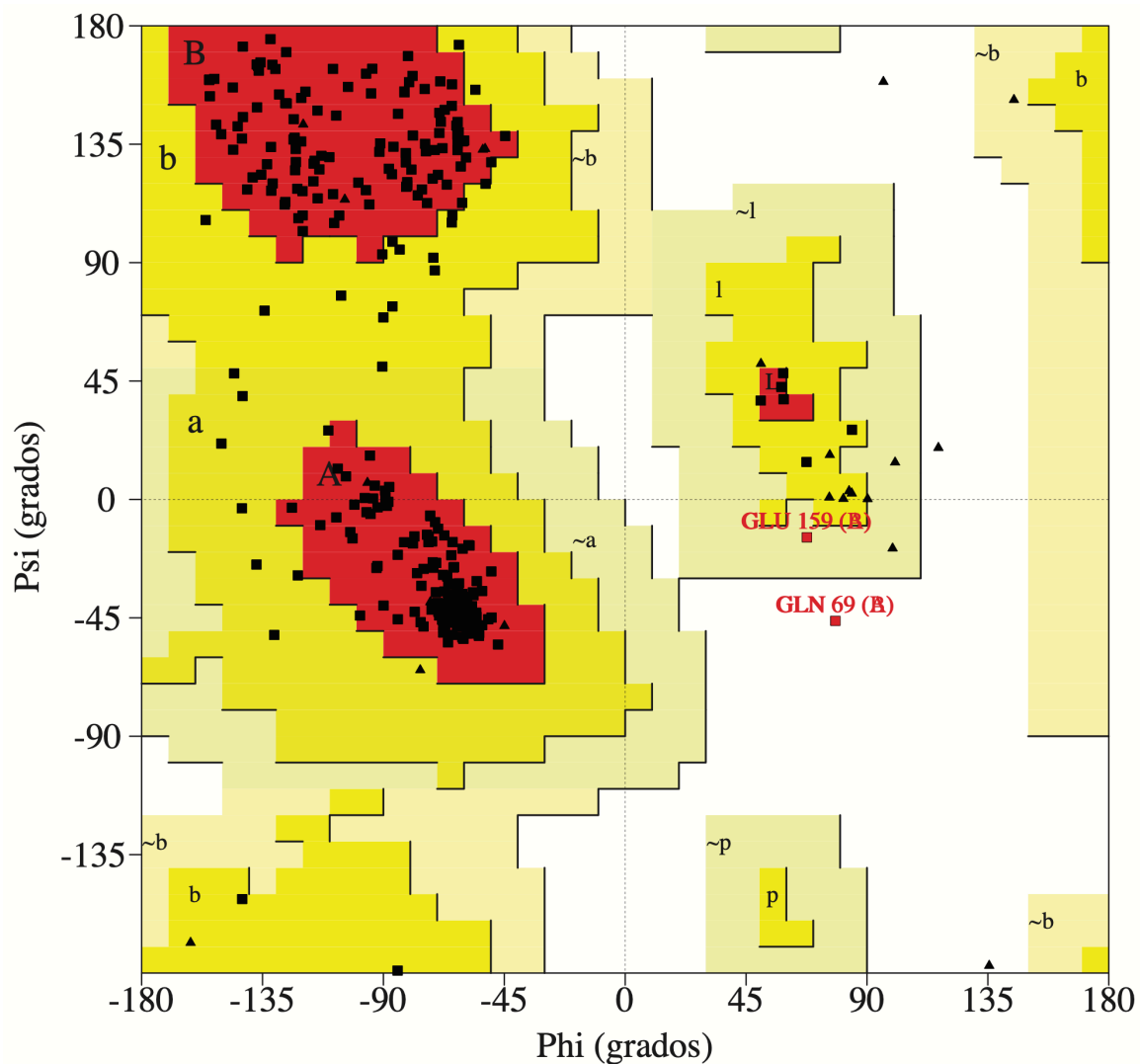


Figura suplementaria 2. Estructura secundaria del dominio AK. La figura A muestra la distribución de la estructura secundaria de la proteína AK de construcción sintética (código PDB 5G3Y). La figura B muestra la estructura secundaria predicha por JPred del dominio funcional AK de la proteína ZgHGPR/AMPK. Ambas estructuras tienen un BLAST E-value de $8 \cdot 10^{-41}$. Flechas verdes y rosas: β -lámina; segmentos rojos: α -hélice. El círculo negro representa una región posiblemente compartida con el dominio AK.



Estadística de la gráfica

| | | |
|---|-----|--------|
| Residuos en la región más favorecida [A,B,L] | 600 | 91.7% |
| Residuos en la región adicional permitida [a,b,l,p] | 50 | 7.6% |
| Residuos en la región generosamente permitida [~a,~b,~l,~p] | 2 | 0.3% |
| Residuos en la región no permitida | 2 | 0.3% |
| Total | 654 | 100.0% |

Basado en un análisis de 118 estructuras de resolución de al menos 2.0 Angstroms y factor R no mayor al 20%, se espera que un modelo de buena calidad tenga más del 90% en las regiones más favorecidas.

Figura suplementaria 3. Diagrama de Ramachandran aplicado al modelo de ZgHGPRT/AMPK. Los triángulos (▲) representan glicinas.

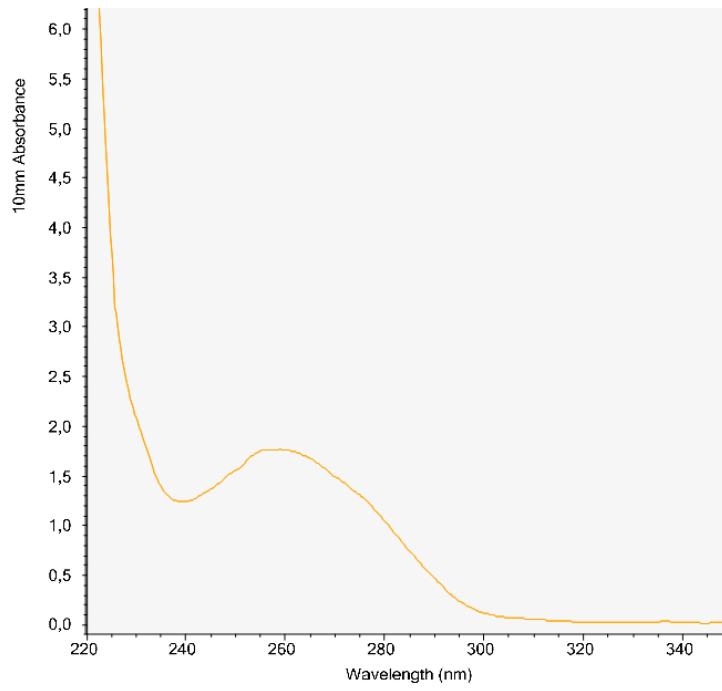
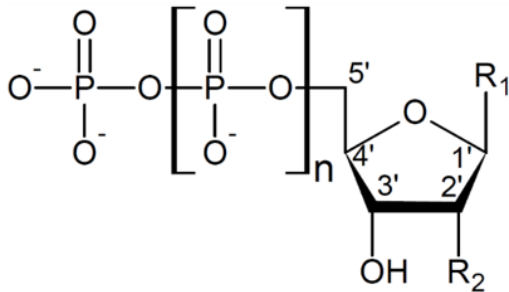


Figura suplementaria 4. Gráfica de la absorbancia de la muestra ZgHGPRT/AMPK en el NanoDrop® con el programa ProteinA280.

Tabla suplementaria 1: Estructura de los nucleótidos.

Nucleótido

R₁: Base púrica o pirimidínica



R₂: -OH → β-D-ribosfuranosa

-H → 2'-deoxi-β-D-ribofuranosa

n = 0: nucleósido 5'-monofosfato

1: nucleósido 5'-difosfato

2: nucleósido 5'-trifosfato

| Bases púricas | | Bases pirimidínicas | |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| <p>Adenina (Ade)</p> | <p>Guanina (Gua)</p> | <p>Citosina (Cyt)</p> | <p>Timina (Thd)</p> |
| <p>Hipoxantina (Hyp)</p> | <p>Xantina (Xan)</p> | <p>Uracilo (Ura)</p> | |

Tabla suplementaria 2: Resumen del resultado del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de ZgHGPRT/AMPK con una base de datos no redundante.

| Tipo de organismo | Nombre | Identidad de secuencia | Cobertura | E-Value |
|----------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------|---------|
| Psicrófilos (< 20 °C) | <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> | 89,40 % | 100 % | 0,0 |
| | <i>Pricia antarctica</i> | 86,41 % | 100 % | 0,0 |
| | <i>Maribacter antarcticus</i> | 85,87 % | 100 % | 0,0 |
| Mesófilos (20 °C-40 °C) | <i>Euzebyella marina</i> | 87,23 % | 100 % | 0,0 |
| | <i>Maribacter polysiphoniae</i> | 83,70 % | 100 % | 0,0 |
| | <i>Zobellia uliginosa</i> | 99,46 % | 100 % | 0,0 |
| Termófilos (> 40 °C) | <i>Pseudozobellia thermophila</i> | 87,50 % | 100 % | 0,0 |