Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ADENILATO CINASA DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*

Por:

Cristian Hernán Rodríguez Escalante

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Febrero, 2020

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Cristian Hernán Rodríguez Escalante, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
Director de tesis

Dr. Alonso Alexis López Zavala
Co-director de tesis

Dra. Karina Dalila García Orozco
Integrante del comité de tesis

Dra. Adriana Muhlia Almazán
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Caracterización Bioquímica de la Adenilato Cinasa de Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Cristian Hernán Rodríguez Escalante, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por haber patrocinado la beca de maestría que me permitió centrarme en el proyecto de investigación de tesis.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por aceptarme como parte del selecto grupo de estudiantes capacitados en esta institución y por permitirme usar sus instalaciones y equipos para el desarrollo de la presente tesis.

Agradezco al Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo por aceptarme como parte de su grupo de investigación, por darme su confianza, sus consejos y ayudarme a cambiar para ser un mejor investigador y una mejor persona.

Agradezco a los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Alonso Alexis López Zavala, la Dra. Adriana Muhlia Almazán y a la Dra. Karina Dalila García Orozco, por sus acertadas observaciones, por su paciencia y comprensión al mostrarme mis errores, por el tiempo que se tomaron para asesorarme y ayudarme a comprender muchos conceptos nuevos para mí. Me gustaría agradecer más que nada su apoyo y confianza en mi capacidad para salir adelante y superarme a mí mismo.

Agradezco a mis amigos que me apoyaron durante todo este tiempo, tanto a los nuevos que conocí y me ayudaron durante el desarrollo de mi maestría, como los viejos con los que he pasado tantos momentos y siempre me han mostrado su apoyo. Gracias a todos ustedes por su confianza, me han hecho creer en que soy capaz de superar cualquier problema y alcanzar todas mis metas.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a todos aquellos que creyeron en mí, pero en especial a mi familia, mi madre Francisca Escalante López y mi padre Guadalupe Rodríguez Aranda, por todos los sacrificios que han hecho por mí y por la familia, por siempre por siempre buscar lo mejor para nosotros y buscar la manera de sacarnos adelante. A mi hermano Julián Francisco Rodríguez Escalante, espero como hermano mayor servirte como ejemplo positivo, que logres superarte y alcances todas tus metas en la vida.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 5
CONTENIDO 6
LISTA DE FIGURAS 8
LISTA DE CUADROS 9
RESUMEN 10
ABSTRACT 11
1. INTRODUCCIÓN 12
2. ANTECEDENTES 14
2.1.AdenilatoCinasa (ADK) 14
2.2. Importancia de la Adenosina Monofosfato Como Señal Bioquímica 17
2.3.La Carga Energética Adenilada (CEA) 18
2.4. Isoformas de la Adenilato Cinasa 19
2.5. Otras Funciones Alternas de la ADK: *moonlighting protein* 22
2.6. Características de *Litopenaeus vannamei* 23
3. HIPOTESIS 26
4. OBJETIVOS 27
4.1. Objetivo General 27
4.2. Objetivos Específicos 27
5. MATERIALES Y MÉTODOS 28
5.1. Trasformación de la Cepa de *Escherichia coli* BL21 Rosetta con el Vector Plasmídico de la LvADK Recombinante 28
5.2. Cinética de Sobreexpresión de la LvADK Recombinante en *E. Coli* 29
5.3. Purificación de la Adenilato Cinasa de *Litopenaeus vannamei* Recombinante 30
5.4. Determinación del Estado Oligomérico de la Adenilato Cinasa Recombinante de *L. vannamei* 31
5.5. Determinación de la Actividad Enzimática tipo Adenilato Cinasa y Cálculo de Constantes Cinéticas 32
5.6. Determinación de la Actividad Tipo Nucleótido Monofosfato Cinasa (NMPK) y Nucleótido Difosfato Cinasa (NDPK) de la LvADK Recombinante 34
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 35
6.1. Obtención de la Adenilato Cinasa Recombinante de Camarón Blanco *L. vannamei* 35
6.2. Determinación del Estado Oligomérico de La LvADK Recombinante 38

CONTENIDO (continuación)

6.3. Actividad Enzimática Tipo ADK y Comportamiento Cinético de la LvADK Recombinante 39
6.4. Actividad Enzimática Nucleótido Monofosfato Cinasa y Nucleótido Difosfato Cinasa en la Adenilato Cinasa Recombinante de *Litopenaeus vannamei* 42
6.5. La Adenilato Cinasa de *Litopenaeus vannamei* como Probable LvADK 6 44
7. CONCLUSIONES 48
8. RECOMENDACIONES 49
9. REFERENCIAS 50

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reacción clásica de las adenilato cinasas.……	14
2	Sistema de fosfotransferencia de la adenilato cinasa…….	17
3	Ciclo vital de un peneido típico…….	24
4	Esquema de reacciones involucradas en el ensayo enzimático acoplado para medir actividad específica de adenilato cinasa…….	32
5	Esquema de las reacciones involucradas en el ensayo enzimático de actividad tipo NMPK y NDPK, donde NXP puede ser un nucleótido monofosfato o un nucleótido difosfato……..……	34
6	Cinética de sobreexpresión de la LvADK en la cepa BL21-Rosetta…….	36
7	Cromatograma de purificación de la adenilato cinasa recombinante de camarón blanco *L. vannamei* (LvADK)……	37
8	Análisis electroforético de las fracciones de cromatografía IMAC…….	38
9	Cromatograma de filtración en gel de la LvADK y curva de calibración de la columna Superdex75…….……..……..	39
10	Actividad específica de la Adenilato cinasa recombinante de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* a diferentes concentraciones de la enzima……	40
11	Efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática de la LvADK recombinante……...……	41
12	Actividad tipo nucleótido monofosfato cinasa (NMPK) de la adenilato cinasa recombinante de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (LvADK)……	43
13	Actividad tipo nucleótido difosfato cinasa (NDPK) de la adenilato cinasa recombinante de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (LvADK)……	44
14	Alineamiento de secuencias de la adenilato cinasa de *L. Vannamei* (LvADK) con algunas adenilato cinasas nucleares utilizando el programa Clustal Omega…….....	45
15	Relaciones filogenéticas de las distintas adenilato cinasa de *Homo sapiens*, y la LvADK realizada por alineamiento múltiple de secuencias en el programa Clustal Omega……...……	46
16	Comportamiento electroforético de distintas adenilato cinasa 6……..	46

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Donador de fosfato y sustrato específico de las diferentes isoformas de ADK en humanos……	20
2	Parámetros cinéticos determinados para la enzima adenilato cinasa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei)* y de otras adenilato cinasas con el sustrato ATP……..……..	41
3	Parámetros cinéticos determinados para la enzima adenilato cinasa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei)* y de otras adenilato cinasa respecto al sustrato AMP……...…….	42

RESUMEN

La adenilato cinasa es una enzima fosfotransferasa, ubicua de gran importancia en la trasferencia de energía, el balance energético celular, la transferencia de señales metabólicas y el desarrollo celular. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en vertebrados, específicamente en humanos se han reportado 9 isoformas distintas; cada una de ellas presenta una distribución celular, capacidad enzimática y expresión tejido-específica que las caracteriza. Se conoce que algunas adenilato cinasas pueden tener actividades alternas como nucleótido monofosfato cinasa y nucleótido difosfato cinasa, demostrando que la capacidad enzimática de este grupo de enzimas es más amplia de lo que generalmente se considera. Los estudios en las adenilato cinasas de invertebrados son escasos, especialmenteen crustáceos, haciendo evidente la ausencia de información de esta enzima en tales organismos. El objetivo de este trabajo fue caracterizarla adenilato cinasa del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), obtenida por sobreexpresión recombinante en bacterias de *Escherichia coli*. Para la sobreexpresión se uso el vector pJexpress404, este mismo que se usó para la transformación de bacteria de *E. coli* BL21 DE3 Rosetta, la proteína se purifico por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados y en un segundo paso por cromatografía de exclusión molecular. Se determinó que la enzima es un monómero de 21 kDa, presenta actividad como adenilato cinasa, con una Km_{ap} de 152μM y una $kcat_{ap}$ de 3.59 s^{-1} respecto el ATP y Km_{ap} de 94 μM y $kcat_{ap}$ de 1.46 s^{-1} para el AMP. La adenilato cinasa de *Litopenaeus vannamei* mostró actividad de nucleótido monofosfato cinasa sobre AMP, dCMP y dGMP, y actuó como nucleótido difosfato cinasa con los sustratos CDP y TDP.

Palabras clave: Adenilato cinasa, Camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, función alterna, nucleótido difosfato cinasa

ABSTRACT

Adenylate kinase is an ubiquitous phosphotransferase, of high importance in energy transfer, cellular energy balance, metabolic signal transfer and cell development. This enzyme has been widely studied in vertebrates, in humans nine different isoforms have been reported; each one presents an specific cellular distribution, enzymatic capacity and tissue-specific expression that characterizes them. It is known that some adenylate kinases may have alternate activities such as nucleotide monophosphate kinase and nucleotide diphosphate kinase, demonstrating that the enzymatic capacity of this group of enzymes is broader than is generally considered. Studies on invertebrate adenylate kinases are scarce, especially in crustaceans, making evident the lack of information on this enzyme in such organisms. The objective of this work was to characterize the adenylate kinase from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), obtained by recombinant overexpression in *Escherichia coli*. The pJexpress404 vector was used for overexpression, this vector was used for the transformation of *E. coli* BL21 DE3 Rosetta bacteria, immobilized metal affinity chromatography was performed for purification and molecular exclusion chromatography as a second step of purification. The enzyme was determined to be a 21 kDa monomer, it has activity as adenylate kinase, with a Km_{ap} of 152μM and a $kcat_{ap}$ of 3.59 s-1 with respect to ATP and Km_{ap} of 94 μM and $kcat_{ap}$ of 1.46 s^{-1} for AMP. The adenylate kinase *Litopenaeus vannamei* showed nucleotide monophosphate kinase activity on AMP, dCMP and dGMP, and acted as nucleotide diphosphate kinase with the CDP and TDP substrates.

Keywords: Adenylate kinase, Whiteleg shrimp Litopenaeus *vannamei*, alternating function, nucleotide diphosphate kinase

1. INTRODUCCIÓN

El control de la energía dentro de los sistemas biológicos es de especial importancia, ya que de manera directa o indirecta la energía es esencial para llevar a cabo procesos como el movimiento, regulación de la temperatura, la síntesis de compuestos entre otros procesos más, que son los que mantienen a un ser vivo en un estado óptimo. Dentro de la célula existen sistemas enzimáticos que ayudan tanto en el balance energético, la trasferencia de energía y en la producción continua de energía, la adenilato cinasa es una de las enzimas clave de estos sistemas energéticos (Panayiotou *et al*., 2014). La adenilato cinasa es una fosfotransferasa, que generalmente se encuentra en la célula en forma de monómeros, se caracteriza por catalizar la transferencia de un grupo fosfato de la adenosina trifosfato (ATP) a la adenosina monofosfato (AMP) dando como resultado dos moléculas de adenosina difosfato (ADP), siendo esta reacción reversible (Wujak *et al*., 2015). Las moléculas ATP, ADP y AMP son de las moléculas centrales en el sistema energético dentro de la célula, el ATP es la principal fuente de energía química en la célula, mientras tanto el ADP y el AMP funcionan como señales de gasto energético (Gowans *et al*., 2013). Una de las principales funciones de la adenilato cinasa es el mantener el balance entre el ATP, el ADP y el AMP, sin embargo estudios recientes han demostrado que su función es aún más variada (Ionescu, 2019). La adenilato cinasa junto con otras enzimas forman "redes energéticas", las cuales consisten en agrupaciones de enzimas que producen flujos de fosfotransferencia, permitiendo llevar la energía producida en la mitocondria a distintos sitios de la célula como flagelos, citoesqueleto, núcleo, etcétera (Dzeja y Terzic, 2009).

La adenilato cinasa se encuentra en varios compartimentos celulares como el citoplasma, el espacio intermembranal de la mitocondria, la matriz mitocondrial y el núcleo celular, por cada uno de estos sitios celulares hayal menos una isoforma de esta enzima (Wujak *et al*., 2015). Actualmente se conocen 9 isoformas en los vertebrados, enumeradas del 1 al 9en orden en el que fueron descubiertas, las isoformas1, 5, 7,8 y 9 se ubican en citoplasma, la isoforma 2 se presenta solo en el espacio intermembrana de la mitocondria, las isoformas3 y 4en la matriz mitocondrial y la 6 en el núcleo (Panayiotou *et al*., 2014). Cada isoforma además de tener una distribución característica, presentan tamaños distintos, expresión tejido-específicas y presentan características enzimáticas

particulares como puede ser una actividad de cinasa diversificada (Amiri *et al*., 2013). Algunas adenilato cinasas muestran una actividad de nucleótido monofosfato cinasa, así como de nucleótido difosfato cinasa, demostrando que la adenilato cinasa es una enzima muy dinámica. Si bien la adenilato cinasa ha sido estudiada ampliamente por su importancia en el sistema energético, diversos estudios revelan que interviene en distintos procesos, como el movimiento celular, la transferencia de señales metabólicas y en la maduración de ciertos ácidos ribonucleicos (Schoff *et al*., 1989; Dzeja *et al*., 1998; Granneman *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2014). La gran mayoría de los estudios de la adenilato cinasa se han realizado en humanos, esto por la relación que tiene esta enzima con problemas de salud; en cambio para otros organismos, la in formación existente sobre esta enzima es mínima o inexistente, como es el caso de los crustáceos como el camarón (Ionescu, 2019).

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei)* es un crustáceo de la familia de los peneidos, vive en aguas tropicales y tiene una amplia distribución geográfica, desde México hasta Perú. Durante su desarrollo, el camarón blanco puede encontrarse en zonas costeras como manglares y estuarios en su estado larvario y en mar abierto en su forma adulta (FAO, 1988). Este organismo cuenta con mecanismos que lo hacen capaz de soportar bajas condiciones de oxígeno en su ambiente y "resistencia" a enfermedades por patógenos, lo que lo ha convertido en una especie de elección para la acuicultura (FAO, 2019). Debido a su valor económico, *L. vannamei* se ha convertido en un organismo objeto de distintos y variados estudios; sin embargo aún existen muchos de sus sistemas enzimáticos de los cuales no existe información, como es el caso de la adenilato cinasa. No existe hasta el momento reporte de ninguna de las isoformas de la adenilato cinasa para *L. vannamei*, por lo que es de gran interés generar información de una de las principales enzimas del sistema energético para este organismo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Adenilato Cinasa (ADK)

La enzima adenilato cinasa (E.C. 2.7.4.3) es una enzima fosfotransferasa, cuyo estado es generalmente es monomérico. La ADK es una enzima ubicua, presente en todos organismos vivos, se destaca por que la reacción que cataliza involucra a tres de las principales moléculas del sistema energético celular (Wang y Makowski, 2018).

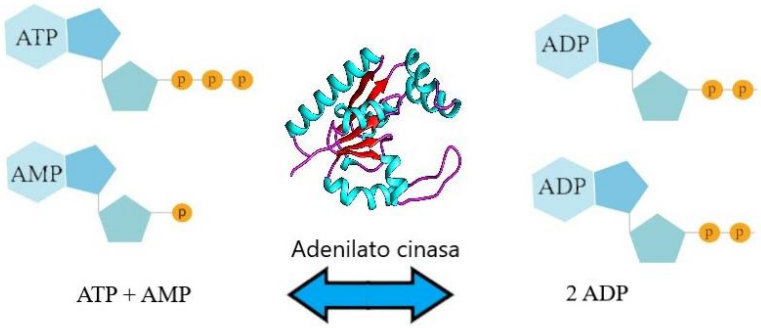

Figura 1. Reacción clásica de las adenilato cinasas.

La reacción de la adenilato cinasa (Figura 1) involucra tres moléculas de gran importancia, ya que el ATP es la principal fuente de energía química dentro de la célula, mientras que el ADP y el AMP, además de ser precursores del ATP son importantes moléculas de señalización del estado energético celular (Bessman y Carpenter, 1985; Dzeja y Terzic, 2003; Panayiotou *et al*., 2014). La capacidad de la adenilato cinasa de formar ATP usando 2 moléculas de ADP duplica el potencial energético de la molécula de ATP, ya que al trasferir el grupo fosfato de un ADP a otro permite "recuperar" el ATP usado, haciendo más eficiente el gasto del ATP (Dzeja y Terzic, 2003). La ADK participa tanto en la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de purinas, como en la ruta de rescate de nucleótidos de purinas, por lo que es importante para mantener la reserva de estos componentes dentro de la célula (Panayiotou *et al*., 2014). Esta enzima es considerada una

fosfotransferasa modelo, estudiada ampliamente por los cambios estructurales relativamente drásticos que presenta durante su catálisis, dichos estudios han permitido comprender mejor el dinamismo de las enzimas durante sus procesos catalíticos (Zeleznikar *et al*., 1995; Bae y Phillips, 2006; Whitford *et al.*, 2007; Tan *et al*., 2009; Jana *et al*., 2011; Ping *et al*., 2013; Kovermann *et al*., 2017).Con el paso de tiempo se ha identificado nueve diferentes isoformas de la ADK, la distribución intracelular de éstas y la función que cumplen en tales compartimentos celulares (Bandlow*et al*., 1988; Van Rompay *et al*., 1999; Ren *et al*., 2005; Cao *et al*., 2006; Amiri *et al*., 2013; Ionescu, 2019). Los genes asociados a la ADK han sido estudiados para conocer la regulación de esta enzima, se ha reportado como en ciertas alteraciones metabólicas se ve alterada la expresión de la ADK y demostrado que algunas enfermedades hereditarias están directamente relacionadas a cambios o la ausencia de la expresión de alguna de las isoformas de la ADK (Van Rompay *et al*., 1999; Santama *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2010; Six *et al*., 2015; Bai *et al*., 2016).Varios estudios han demostrado que la ADK cumple un rol de gran importancia en la difusión energética dentro de la célula y se ha reportado que algunas adenilato cinasas presentan una actividad catalítica más variada (Ren *et al*., 2005; Amiri *et al*., 2013; Wujak *et al*., 2015).

Las ADK presentan tres dominios funcionales en su estructura: el dominio central, que presenta una región rica en glicinas donde se da la interacción con el donador de fosfato conocida como "lazo p", el dominio tapadera y el sitio de unión del sustrato (Wang y Makowski, 2018). Generalmente se considera que la enzima presenta dos conformaciones, abierta y cerrada, pero estudios recientes sugieren que en realidad la enzima está presente en varias conformaciones metaestables (Schulz *et al*., 1990; Bae y Phillips, 2006; Jana *et al*., 2011; Ådén *et al*., 2012; Zeller y Zacharias, 2015; Kovermann *et al*., 2017; Wang y Makowski, 2018). Cuando se da la unión con el donador de fosfato, el dominio tapadera se cierra, cambiando la conformación de la enzima y facilitando la unión al sustrato aceptor del fosfato, durante esta conformación cerrada se da la catálisis, resultando en dos ADP. El ADP unido al sitio de unión del donante de fosfato se libera, posteriormente se da la apertura del dominio tapadera, este cambio permite al dominio de enlace del sustrato abrirse y liberar el segundo ADP (Ping *et al*., 2013; Zeller y Zacharias, 2015; Wang y Makowski, 2018).

La adenilato cinasa es una enzima eficiente en la transferencia de grupos fosfato pero la dirección

de la reacción se dicta por las concentración de los sustratos, esta propiedad de la ADK permite que los cambios en estos sustratos no sean tan abruptos (Panayiotou *et al*., 2014). Esta enzima es sensible a los cambios de temperatura, dependiendo del organismo y su ambiente, la ADK presenta diferentes temperaturas óptimas adaptadas a las condiciones ambientales del organismo enfrenta (Davlieva y Shamoo, 2009; Moon *et al*., 2017). No se conoce ningún tipo de regulador alostérico para la ADK, pero al igual que la mayoría de las enzimas fosfotransferasas, requiere de la presencia de magnesio como cofactor para su actividad (Scheffzek *et al*., 1996; Tan *et al*., 2009). La adenilato cinasa pertenece a la familia de las nucleótido monofosfato cinasas, por su capacidad de trasferir el grupo fosfato del ATP al AMP, pero además se ha reportado que pueden presentar la capacidad de actuar como una nucleótido difosfato cinasas (Amiri *et al*., 2013; Wujak *et al*., 2015).

La adenilato cinasa junto con otras enzimas fosfotransferasas forman las llamadas "redes energéticas" que permiten que la energía química sea trasmitida de forma eficiente, esta función en la ADK ha sido respaldada por distintos estudios bioquímicos, fisiológicos, de intercambio de fosforilos con marcaje molecular y hasta silenciamiento de genes específicos(Figura 2) (Zeleznikar *et al*., 1995; Roberts *et al*., 1997; Dzeja *et al*., 1998; Dzeja y Terzic, 2003; 2009). Estudios han mostrado la importancia del flujo energético que genera esta enzima desde la mitocondria a estructuras flagelares como en los espermatozoides y células pulmonares, mostrando que las alteraciones en la función correcta de las ADKs se ve reflejado en disfunciones en el movimiento flagelar (Schoff *et al*., 1989; Cao *et al*., 2006).

La adenilato cinasa tiene una función importante en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa, ya que evita que la concentración de ATP dentro de la matriz mitocondrial llegue a niveles capaces de bloquear el translocador de nucleótidos de adenina (Mannella *et al*., 2001).Adicionalmente, para evitar esta saturación de ATP, la célula cuenta con sistemas enzimáticos de fosfotransferencia que permite aumentar la velocidad de exportación de ATP e importación de ADP; la ADK es parte importante de este sistema junto con otras enzimas y transportadores de membrana (Roberts *et al*., 1997; Saks *et al*., 2001; Dzeja y Terzic, 2003). Bandlow y colaboradores (1988) reportaron que con el silenciamiento de los genes que codifican a la ADK en levaduras, se impide la exportación de ATP de las mitocondrias, causando falla total en el sistema de producción de energía por la vía aerobia, destacando la importancia de la ADK en

el funcionamiento correcto de este organelo. La acción coordinada de las isoformas mitocondrial (ADK2) y citosólica (ADK1) permite la transferencia de los fosforilos energéticos β y γ entre el ATP que se está formando dentro de la mitocondria y el ADP generado durante el gasto energético a una muy alta velocidad (Zeleznikar *et al.*, 1995; Dzeja y Terzic, 2003).

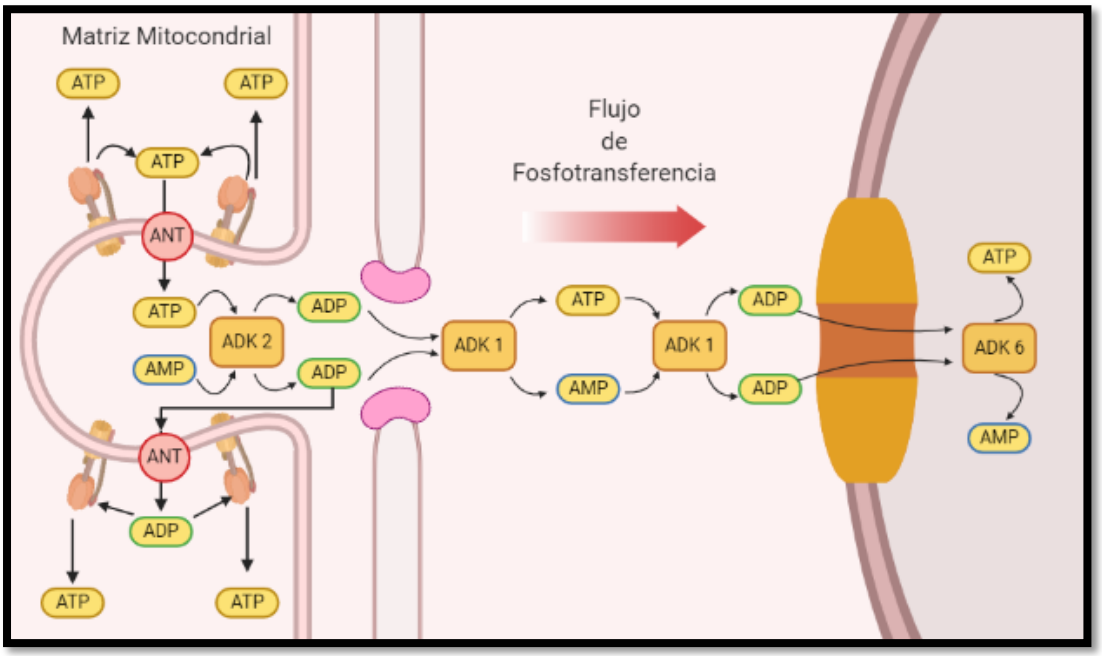

Figura 2. Sistema de fosfotransferencia de la adenilato cinasa (Modificado de Dzeja *et al*., 2003).

La actividad catalítica inherente de la adenilato cinasa permite que los cambios en el balance entre ATP y ADP se reflejen en un gran cambio en la concentración de AMP, haciendo que tanto enzimas como sensores metabólicos dependientes de la presencia de AMP muestren una "mayor sensibilidad" ante estas señales de estrés metabólico (Dzeja *et al*., 1998; Dzeja y Terzic, 2009).

2.2. Importancia de la Adenosina Monofosfato como Señal Bioquímica

La adenosina monofosfato (AMP) regula una serie de componentes sensibles: factores de las vías

glucolítica, sensores y efectores metabólicos como los canales K^+-ATP y la proteína cinasa activada por AMP (abreviado AMPK del inglés AMP-*activated protein kinase*), la AMPK a su vez puede regular el equilibrio energético celular mediante la administración de afluencia de calcio y fosforilando proteínas específicas (Dzeja y Terzic, 2009; Panayiotou *et al*., 2014). La fosfofructocinasa (PFK) es una de las proteínas clave de la glucólisis, sobre todo en músculo, donde se encarga de la fosforilación de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato. La PFK es inhibida alostéricamente por la presencia de ATP, lo cual permite detener la glucólisis cuando la célula cuenta con una alta cantidad de energía. Pero la inhibición de la PFK puede ser remediada por la presencia de AMP, pues esta molécula se une más fuertemente a la conformación relajada (activa) de la proteína. En una prueba sencilla de PFK en presencia de 1 mM de ATP y 0.6 mM de fructosa-6-fosfato al agregar 0.1mM de AMP la velocidad de reacción pasa de un 15% a un 50% de su actividad máxima. Por estos mecanismos el AMP funciona como una señal para continuar con la síntesis de ATP, puesto que la presencia del AMP es señal de gasto energético por parte del metabolismo celular (Voet, bioquímica, 1990).

El AMP también actúa sobre otro sensor energético importante que es la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), este es un regulador central del metabolismo celular y la homeostasis (Faubert *et al*., 2015). La AMPK es parte de la vía de detección de energía que se caracteriza por su regulación por los niveles de adenilato en la célula (es decir, ATP, ADP y AMP), el AMP actúa como inhibidor directo de las funciones de AMPK. Desde un punto de vista metabólico general, la AMPK promueve la conservación neta de ATP, activando vías del metabolismo catabólico e inhibe las reacciones anabólicas que consumen ATP. Las concentraciones de AMP-ADP-ATP dentro de la célula son un indicativo directo de las condiciones energéticas de la célula, la relación entre estos tres metabolitos es muy usada en bioenergética y se le conoce como la carga energética adenilada.

2.3. La Carga Energética Adenilada (CEA)

La carga energética adenilada (CEA) es un concepto que se centra alrededor de los nucleótidos fosforilados ATP, ADP y AMP. Al modificarse la concentración de cualquiera de estos 3

componentes el balance entre estos se ve alterado. El concepto de carga energética adenilada fue descrita por primera vez por Atkinson (1997) y es considerada por muchos como un indicativo directo del estado energético de la célula (Thébault *et al*., 2000). Este sistema energético permite a la célula detectar el aumento en uno de estos componentes y mantener un censo de su cantidad de "carga" (similar a una pila eléctrica) y activar mecanismos para volver al equilibrio. Una alta concentración de ATP respecto al ADP y AMP indica que la célula ha suplido sus necesidades y se encuentra "cargada" de energía, causando que los procesos de generación de energía disminuyan; en cambiosi existe un aumento en el ADP y AMP, estos funcionan como una alarma de insuficiencia energética.

Los cambios en el balance de la carga energética adenilada se han relacionado con la exposición de los organismos a contaminantes ambientales, el estrés biótico o abiótico puede promover el aumento en el consumo de ATP o disminuir su producción, comprometiendo el balance energético y generando cascadas de activación mediadas por la AMPK (Thébault *et al*., 2000; Gowans *et al*., 2013). Existe evidencia de como los cambios en la CEA y el incorrecto funcionamiento de la AMPK es están directamente relacionados con el desarrollo de las células cancerígenas (Steel *et al*., 2011; Faubert *et al*., 2015; Ionescu, 2019). Debido a lo anterior, todas las enzimas encargadas de mantener el balance de las moléculas de adenilato son de gran interés para comprender la fisiología durante distintos procesos, como lo son la exposición a xenobioticos o el desarrollo de enfermedades. La adenilato cinasa es una de las principales enzimas encargadas de censar y contribuir en el balance de la CEA, debido principalmente a su capacidad de convertir dos moléculas de ADP a una de ATP y una de AMP o viceversa. De esta forma la adenilato cinasa puede actuar como un amortiguador energético dentro de la célula, además de aumentar la "señal" que generan estos componentes en la célula (Nicholls, 2016).

2.4. Isoformas de la Adenilato Cinasa

La adenilato cinasa cuenta con nueve isoformas descritas, cada isoforma cuenta con distribución intracelular y características cinéticas únicas que ayudan a mantener el balance energético y la

CEA. Si bien todas las isoformas comparten una estructura tridimensional similar, su tamaño y secuencia puede variar muy significativamente entre ellas, generalmente existe mayor similitud de secuencia entre la misma isoforma de dos distintas especies que entre isoformas distintas de la misma especie. A pesar de que es bien conocido que algunas de las ADK pueden presentar una amplia capacidad de utilizar otros nucleótidos como sustratos, la implicación fisiológica aún no está del todo clara, en la cuadro 1 se muestran los diferentes aceptores y donadores de grupo fosfato que se ha reportado que pueden utilizar las ADK (Amiri *et al*., 2013; Panayiotou *et al*., 2014).

Cuadro 1. Donador de fosfato y sustrato específico de las diferentes isoformas de ADK en humanos. La letra "d" indica que es deoxiribonucleótido (Panayiotou *et al*., 2014).

Adenilato cinasa	Donador de fosfato	Sustrato
ADK1	Todos los NTP	AMP y dAMP
ADK2	Todos los NTP	AMP
ADK3	GTP y ITP	AMP
ADK4	ATP y GTP	AMP, dAMP, CMP, dCMP
ADK5	ATP y GTP	AMP, dAMP, CMP, dCMP
ADK6	Todos los NTP y dNTP	AMP, dAMP, CMP, dCMP
ADK7	ATP - GTP-	-AMP, dAMP, CMP, dCMP -AMP, CMP, dCMP
ADK8	ATP - GTP-	-AMP, dAMP, CMP, dCMP -AMP, CMP, dCMP
ADK9	ATP y GTP	AMP, dAMP, CMP, dCMP

En el citoplasma existen varias isoformas de la adenilato cinasa, pero la ADK1 es la más abundante. En humanos esta enzima se expresa en todos los tejidos, pero se encuentra en mayores niveles en

músculo esquelético, cerebro y eritrocitos (Khoo y Russell, 1972). La isoformas5, 7, 8 y 9 se encuentran presentes en el citoplasma pero su presencia por lo general es tejido-específica y algunas pueden estar presentes en más de un compartimiento celular. La ADK5 puede estar presente tanto en citoplasma como en núcleo, y parece estar expresada casi exclusivamente en tejido cerebral (Van Rompay *et al*., 1999).La ADK7 se ha encontrado mayormente en tejidos con alta cantidad de flagelos como pulmón, glándulas mamarias, tráquea, testículos y musculo esquelético, y se ha demostrado que la presencia de la enzima es esencial para mantener la funcionalidad de estos tejidos (Panayiotou *et al*., 2011). La ADK8 se expresa principalmente en páncreas, hígado, pulmón, tráquea y testículos; y el gen que la codifica está regulado de manera negativa durante la migración de células epiteliales (Panayiotou *et al*., 2011). Por último, la ADK9 presenta libre difusión entre el citoplasma y el núcleo, sus niveles de expresión son mayores en glándula pituitaria, tráquea, timo, testículos y glándulas mamarias, además puede encontrarse en cerebro faringe, útero, bazo y nódulos linfáticos (Amiri *et al*., 2013).

En la mitocondria se conocen tres isoformas de la adenilato cinasa, la 2,3 y 4. La primera se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria, mientras que las otras dos se localizan en la matriz mitocondrial. La ADK2 es la isoforma mitocondrial más abundante, si bien se expresa en todos los tejidos, parece tener una mayor expresión en hígado, corazón, músculo esquelético y páncreas (Khoo y Russell, 1972; Noma *et al*., 1998). La ADK3 muestra su mayor expresión en hígado, cerebro, corazón, músculo esquelético y riñón; pero a diferencia de las demás adenilato cinasas, la ADK3 sólo puede usar GTP e ITP como donadores de fosfato (Wilson*et al*., 1976; Noma *et al*., 2001). La ADK 4 se encuentra en mayor concentración en tejidos con gran cantidad de mitocondrias como cerebro, corazón, riñón e hígado; a pesar de presentar una alto valor de identidad (60%) con la ADK3 ésta si puede utilizar el ATP como donador de fosfatos (Panayiotou *et al*., 2010; Fujisawa *et al*., 2016).

En el núcleo se han reportado 2 isoformas, la ADK6 y la 9; la primera es la principal isoforma encontrada dentro del núcleo, no presenta expresión tejido-especifica, por lo que se atribuye que es la principal isoforma que mantiene el balance energético en el núcleo (Drakou *et al*., 2012). Santama y colaboradores (2005) reportaron la ADK 6 como hCINAP por sus siglas en inglés *Human Coilin Interacting Nuclear ATPase*, esto debido a la capacidad de la enzima de interactuar

y unirse con la coilina, una proteína constitutiva de los llamados cuerpos de Cajal, estructuras que se observan en el núcleo de células con alta actividad metabólica. Los cuerpos de Cajal son sitios dentro del núcleo donde se da la maduración de diferentes mini-ARNs y complejos de proteína-ARN, trabajos experimentales han mostrado que la sobreexpresión de la ADK 6 disminuye la cantidad de los cuerpos de Cajal presentes en el núcleo. La ADK 6 además de la función enzimática, aparentemente también tiene una función regulatoria indirecta al unirse con la coilina, evitando la formación de los cuerpos de Cajal y de esta manera se genera un control sobre la maduración de ARN y complejos proteína-ARN.

2.5. Otras Funciones Alternas de la ADK: *moonlighting protein*

Se conoce como *moonlighting protein* a un sola cadena polipeptídica que realiza más de una función, puede ser bioquímica y/o biofísica, siempre y cuando no se deba a la fusión de genes, variantes de la secuencia polipeptídica por splicing del ARN o efectos pleiotrópicos (Jeffery, 1999). Ya que las proteínas *moonlighting* son capaces de presentar más de una función estas pueden estar presentes en más de una ruta metabólica, ya sea participando como una enzima catalítica o actuando como regulador metabólico. Algunas de estas proteínas destacan su importancia en problemas de salud, puesto que ciertos organismos patógenos presentan enzimas que además de su actividad catalítica actúan como factores que permiten la infección o la facilitan, convirtiendo estas proteínas en objetivo para entender los mecanismos de invasión y/o moléculas diana de nuevos tratamientos (Perez-Riverol *et al*., 2015).Si bien la función alterna complica la capacidad de predicción de la función de las proteínas con base a su secuencia de aminoácidos, también puede ayudar a comprender la evolución de estas fascinantes moléculas e incluso el desarrollo de proteínas sintéticas con múltiples funciones.

Las ADKs 1,4,5,7,8 y 9 en humanos presentan una actividad enzimática más amplia, ya que además de su actividad clásica y la actividad como nucleótido monofosfato cinasa actúan como nucleótido difosfato cinasa o NDPK por sus siglas en inglés (Amiri *et al.*, 2013). Por su parte, la ADK 6 humana, además de su función enzimática tiene la capacidad de asociación a la coilina y de esta

manera es un regulador del ARN y del desarrollo celular (Santama *et al*., 2005). Si esta función diversificada de las ADKs se ha esclarecido bastante para el ser humano, aún falta consolidar que esta función es compartida por varios miembros de esta familia enzimática, debido a lo anterior, es importante el estudio del fenómeno de *moonlighting* en las enzimas adenilato cinasa de otros organismos.

2.6. Características de *Litopenaeus vannamei*

El camarón patiblanco del Pacífico (*L. vannamei*) es una especie de crustáceo endémica de la costa oeste del continente americano, que habita aguas de clima cálido tropical. Se encuentra distribuido desde Sonora, México al Norte, hasta Centro y Sudamérica llegando a Tumbes en Perú en su latitud más al sur (Fenucci, 1988). *L. vannamei* es un crustáceo perteneciente al orden de los decápodos, específicamente la familia de los peneidos. Morfológicamente en el camarón patiblanco se distinguen 3 segmentos: el cefalotórax, el abdomen y el telson. Durante su desarrollo *L. vannamei* migra de mar abierto a zonas costeras e intermediasen estado natural, la forma adulta del camarón vive y se reproduce en mar abierto, las postlarvas son llevadas por las corrientes a las costas. La postlarva de *L. vannamei* generalmente se desarrolla en estuarios, lagunas costeras o manglares hasta llegar a su etapa adulta y migrar de nuevo a mar abierto, la duración de maduración hasta llegar a la etapa adulta dura alrededor de 6 a 7 meses (Figura 3).

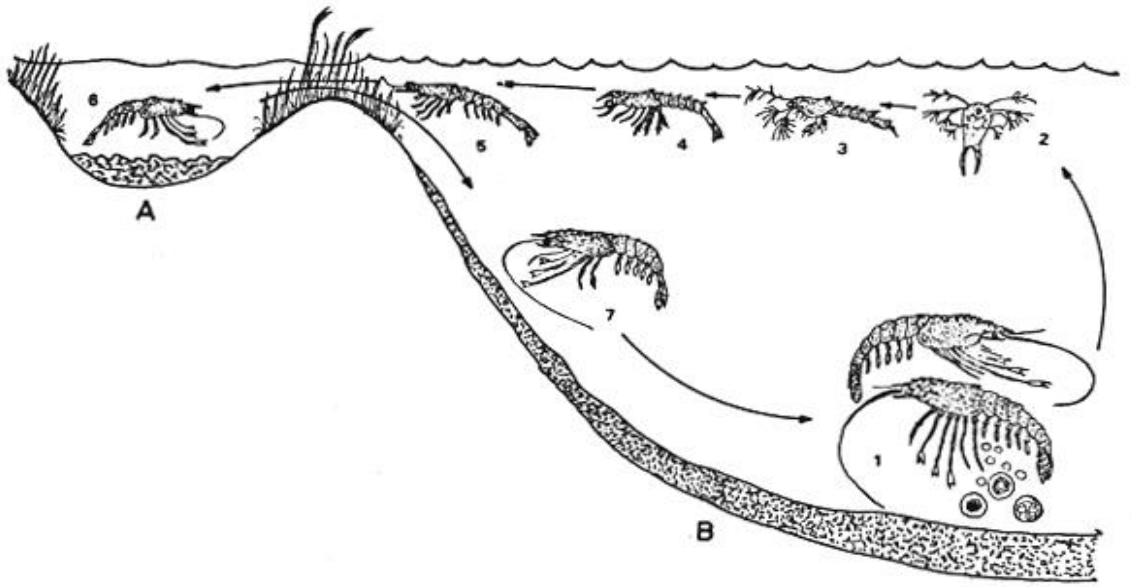

Figura 3. Ciclo vital de un peneido típico. 1: maduración y reproducción; 2: nauplio; 3: protozoea; 4: mysis; 5: postlarvas; 6: juveniles; 7: adultos (FAO, 2005-Modificado de Boschi, 1977).

Debido a la gran diversidad de zonas en las que se desarrollan los camarones, estos presentan gran variedad de mecanismos para enfrentar los diversos cambios en su entorno como la salinidad, la concentración de oxígeno disuelto en el agua y hasta la presencia de contaminantes y patógenos (Hagerman y Uglow, 1981; Setiarto *et al.*, 2004). *L. vannamei* es un organismo capaz de resistir bajas condiciones de oxígeno en el ambiente, para esto utiliza distintas estrategias como la hiperventilación, el cambio de pH en la hemolinfa que aumenta la afinidad de la hemocianina hacia el oxígeno y la reducción de su actividad metabólica. Estudios toxicológicos con camarón (*Palaemon serratus*) mostraron como la regulación del sistema energético es clave durante la exposición a xenobióticos en este tipo de organismos; en específico la carga energética adenilada se ve alterada por este tipo de alteraciones en el organismo (Thébault *et al*., 2000). Para todo proceso regulatorio es necesario el uso de la energía química, y la adenilato cinasa se destaca por su papel en la regulación energética y la transferencia de energía como se mencionó anteriormente.

Hasta el momento es escaso lo que se conoce de las adenilato cinasas en camarón, específicamente para *L. vannamei* este conocimiento es aún más escaso. Actualmente no se conoce si las adenilato cinasas del camarón patiblanco comparten las características bioquímicas de sus contrapartes de

vertebrados, como varias de ADK del humano que son proteínas *moonlighting*. Debido a la características únicas de este grupo enzimático de las adenilato cinasas, es de interés estudiar las características bioquímicas que presentan las ADKs en *L. vannamei*.

3. HIPOTESIS

La adenilato cinasa de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* presenta la actividad clásica de una adenilato cinasa, su estado oligomérico es como un monómero similar a la mayoría de las adenilato cinasas, pero además de realizar su función canónica, tiene la capacidad de actuar sobre diferentes nucleótidos monofosfato y difosfato.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar las características bioquímicas y el estado oligomérico de la adenilato cinasa recombinante de *Litopenaeus vannamei* y determinar si esta enzima presenta la capacidad de utilizar nucleótidos mono y difosfatos diferentes a sus sustratos canónicos.

4.2. Objetivos Específicos

- Obtener y purificar la adenilato cinasa recombinante de *Litopenaeus vannamei*.
- Determinar el estado oligomérico de la proteína mediante cromatografía de exclusión molecular.
- Determinar los valores de k_{cat} y K_m obtenidos a partir de los cálculos de las curvas Michaelis-Menten para la enzima recombinante en su actividad canónica.
- Analizar la capacidad de la adenilato cinasa recombinante de *Litopenaeus vannamei* de funcionar como nucleótido monofosfato cinasa y nucleótido difosfato cinasa con distintos nucleótidos di- y monofosfato.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Trasformación de la Cepa de *Escherichiacoli*BL21Rosetta con el Vector Plasmídico de la LvADK Recombinante

La expresión recombinante de la proteína se realizó mediante un vector plasmídico sintético, formado por el vector pJexpress404 (DNA2.0, U.S.A.) y la secuencia nucleotidíca codificante de la adenilato cinasa de *L. vannamei* (LvADK) optimizada para expresarse en *E. coli*. El vector utilizado cuenta con el sistema de expresión basado en el promotor T5, con un sitio del operón *Lac* para reprimir la expresión de la proteína hasta su inducción con lactosa o el análogo β-D-tiogalactopiranósido (IPTG). El vector también contiene un gen de resistencia a ampicilina como factor de selección para la transformación bacteriana. En la misma secuencia nucleotidíca codificante de la enzima se incluyó una región de poli-histidina (región N-terminal de la proteína), con el objetivo de facilitar la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad a metales; y un sitio susceptible a corte por proteasas para la eliminación de la etiqueta de poli-histidina, utilizando la PreScissionProtease.

La cepa de *E. coli*BL21 Rosetta (NOVAGEN, USA) se transformó con el constructo antes mencionado mediante la metodología de choque térmico. Una alícuota de la cepa bacteriana competente se descongeló en una cama de hielo, una vez descongelada, se transfirió a un tubo Falcon® estéril de 15 mL y se mezcló cuidadosamente con 1 µL del constructo de la LvADK, llegando a una concentración final de 20 µg/mL. La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, después los tubos se incubaron a 42°C por 45 segundos y posteriormente se regresaron a la cama de hielo y se dejaron reposar por 5 minutos. Se agregaron 250 µL de medio SOC (triptona 20 g/L, glucosa 3.6 g/L, KCl 0.186 g/L, $MgCl_2$ 0.96 g/L NaCl 0.5 g/L, extracto de levadura 5 g/L) sin antibiótico y se mezcló cuidadosamente. El cultivo se incubó a 37 °C durante 1 h con agitación a 220 rpm. Se tomaron alícuotas de 50 µL, 100 µL y 150 µL de este cultivo bacteriano para ser extendido en placas con agar LB (agar 15 g/L, triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5g/L), suplementadas con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL). Las placas se

incubaron a 37 °C durante toda la noche, al día siguiente se seleccionaron colonias aisladas y se inocularon 5 mL de medio LB con ampicilina 100 μg/mL, el cual se mantuvo en agitación constante de 250 rpm y a 37ºC por toda la noche. Estos fueron usados para inocular medios de cultivo durante la cinética de sobreexpresión.

5.2. Cinética de Sobreexpresión de la LvADK Recombinante en *E. Coli*

Con el fin de determinar el tiempo de expresión óptima de LvADK, la cinética de sobreexpresión se realizó en matraces Erlenmayer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, inoculados con los cultivos mencionados anteriormente. El crecimiento bacteriano se estimó mediante mediciones de la turbidez o densidad óptica a 600 nm, la densidad óptica se midió cada 30 min, hasta llegar a las 0.6 unidades de absorbancia a la longitud de onda antes mencionada. En ese punto se añadió 40 uL de IPTG 1 M, para dar una concentración final de 0.4 mM, se tomó una muestra de 2 mL antes de inducir, y posterior a la inducción, se tomaron 2 mL de muestra del cultivo a las 2, 4, 6 y 24 h. A partir de la adición de IPTG, se induce la expresión del gen de LvADK y la producción de la proteína recombinante.

La pastilla bacteriana se recuperó por centrifugación, a 5,000 rpm por 15 minutos a 4ºC y esta se mantuvo en congelación a -20ºC hasta su análisis electroforético, cada pastilla se resuspendió en100μl de buffer lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 250 mM, PMSF 5mM, benzamidina 5 mM, 1,4-dithiothreitol 1 mM). Las bacterias se lisaron por sonicación en un equipo Branson Sonifier 450, con 4 pulsaciones de 12 segundos cada una, con 20 s de separación entre cada pulso, durante la sonicación la muestra se mantuvo en baño de hielo. Las muestras de lisado bacteriano se clarificaron mediante centrifugación a 12,000 rpm por 20 min a 4ºC obteniéndose el sobrenadante y la pastilla de proteína insoluble y otros componentes bacterianos. Las muestras de la cinética de sobreexpresión se analizaron mediante SDS-PAGE (del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) utilizando geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Las muestras se mezclaron con buffer muestra 2X y 5X (SDS 4-10% para 2X y 5X respectivamente, glicerol 20%, DTT 200mM, azul de bromofenol

0.01%. Tris HCl0.1 M pH 6.8).

Se usaron 40 µL de sobrenadante de las muestras del lisado bacteriano y se les agregaron 10 µL de buffer muestra 5X, a las muestras de la pastilla se les agregó 50 µL de buffer muestra 2X y se homogeneizó con la pastilla completa, las muestras se incubaron a 96ºC por 5 min. Los geles se tiñeron por al menos una hora en una solución de Coomassie 250-G al 2%, 50% de metanol y 10% de ácido acético. Posteriormente se destiñeron con una solución de 50% metanol, 10% ácido acético, los geles se digitalizaron en un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (BIO RAD).

5.3. Purificación de la Adenilato Cinasa de *Litopenaeus vannamei* Recombinante

La LvADK recombinante se obtuvo a partir de la biomasa bacteriana proveniente de un cultivo de 500 mL de medio LB suplementado con antibióticos, el cual fue inoculado con 100 mL de un cultivo de la cepa recombinante conteniendo la secuencia codificante de la proteína, se monitoreo su densidad óptica hasta un valor de 0.6 unidades y se realizó la inducción con 200 uL IPTG de IPTG 1 M, llegando a la misma concentración que la de la cinética de sobreexpresión. Se mantuvo en incubación a 37 ºC con agitación constante 250 rpm por 24 h, después de esta incubación se recolectó la biomasa mediante centrifugación a 5,000 rpm por 15 min a 4ºC. La biomasa fue resuspendida en buffer lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 250 mM, PMSF 5mM, benzamidina 5 mM, 1,4-dithiothreitol 1 mM, lisozima de clara de huevo 0.1mg/mL) en una relación 1:6 peso/volumen. La suspensión bacteriana se lisó mediante sonicación en un equipo Branson Sonifier 450 mediante 4 pulsaciones de aproximadamente 12 segundos, con 20 segundos de separación entre cada pulso, manteniendo en baño de hielo. El lisado se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min a 4 ºC y se recuperó el sobrenadante, el pellet obtenido se resuspendió nuevamente en buffer lisis y se realizó una segunda extracción en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló con el previamente obtenido, este sobrenadante se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 15 min a 4ºC para la clarificación de la muestra, por último el clarificado se filtró utilizando un filtro Millipore® de 0.45 µm.

La proteína recombinante se purificó por el método de cromatografía por afinidad a metales

inmovilizados (IMAC por sus siglas en inglés Immobilized Metal Affinity Chromatography), utilizando una columna HisTrap FF (GE Healthcare) de 5 mL y un equipo AKTA prime plus (GE Healthcare). La columna fue previamente equilibrada con el buffer de corrida (Tris-HCl 25 mM, NaCl 500 mM pH 7.6) en un equipo AKTA prime plus (GE Healthcare). La muestra se cargó a la columna a un flujo de 2.5 mL/min. La proteína no unida fue eliminada y se realizó un gradiente escalonado de 2, 70 y 100% de buffer de elución (Tris-HCl 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, pH 7.6),se colectaron fracciones de 5 mL, de las muestras en las que se detectó la presencia de proteína (absorbancia a 280 nm) fueron analizadas por SDS-PAGE

Como segundo paso de purificación se realizó una cromatografía de exclusión molecular con una columna Superdex75 (GE Healthcare, USA). Las muestras fueron concentradas usando un filtro Amicon Ultra con una membrana punto de corte de 10 kDa hasta aproximadamente 4 mL. Durante la cromatografía se usó como buffer de corrida una solución de Tris-HCl 100 mM y NaCl 500mM a pH 7.6, se utilizó un flujo de 0.5 mL/min y se recolectaron fracciones de 1 mL.

5.4. Determinación del Estado Oligomérico de la Adenilato Cinasa Recombinante de *L. vannamei*

El estado oligomérico estructura cuaternaria de la LvADK se determinó por cromatografía de exclusión molecular mencionada anteriormente. Esta columna fue previamente calibrada con proteínas de distintos pesos moleculares: aprotinina (6.5 kDa), ribonucleasa A (13.70 kDa), anhidrasa carbónica (kDa), ovoalbúmina (44 kDa) y conalbúmina (75 kDa). Se realizó un análisis de regresión lineal de los estándares de peso molecular graficando el logaritmo del peso molecular contra la constante de elución (K_{av}) de cada estándar, esta constante se calculó con la formula mostrada en la fórmula 1.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

Fórmula 1. Fórmula para cálculo de la Constante de elusión. Donde V_e es el volumen de elución, V_0es el volumen vacío y V_c es el volumen geométrico de la columna.

Para el pico de elución de la ADK se calculó la constante (K_{av}) y mediante el análisis de regresión lineal se calculó el peso molecular obtenido.Para determinar el estado oligomérico de la LvADK, se dividió el valor estimado de peso molecular obtenido por la cromatografía de exclusión molecular, entre el valor de peso molecular calculado por el programa Protparam (Gasteiger *et al*., 2005).

5.5. Determinación de la Actividad Enzimática tipo Adenilato Cinasa y Cálculo de Constantes Cinéticas

Para determinar si la LvADK recombinante presentaba la actividad enzimática de adenilato cinasa, se realizó un ensayo acoplado modificado del reportado por Huss y Glaser (1983). Este ensayo permite evaluar la conversión del ATP y AMP en ADP. El método está basado en que el ADP producido por la LvADK es usado por la enzima piruvato cinasa (PK), que en presencia del fosfoenolpiruvato (PEP) forma ATP y piruvato. Este último, en presencia de β-NADH, es utilizado por la lactato deshidrogenasa (LDH) para la formación de lactato y β-NAD^+ (Figura 4), este último paso es monitoreado a 340 nm.

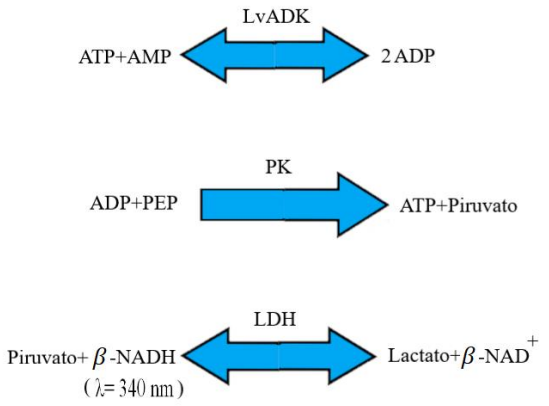

Figura 4. Esquema de reacciones involucradas en el ensayo enzimático acoplado para medir actividad específica de adenilato cinasa (Huss y Glaser, 1983).

Para evaluar la actividad de la LvADK se prepararon reacciones con un volumen de 1.5 mL conteniendo: Tris-HCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 100 mM, fosfoenolpiruvato 1 mM, β-NADH 0.1 mM, piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa de músculo de conejo 3 U/mL, ATP 1 mM, AMP 1 mM y 0.05 a 0.1 mg/mL de LvADK recombinante pura. El ensayo se realizó a una temperatura de 25ºC, se preparó una mezcla de reacción que contenía todos los componentes necesarios a excepción del ATP y la LvADK, se realizaron los cálculos pertinentes para que al mezclar las alícuotas de las soluciones concentradas de los componentes se llegara a las concentraciones finales deseadas. Durante los ensayos, primeramente se agregó la solución de reacción y después la solución de ATP, se dejó estabilizar la solución por 1 min, para posteriormente agregar la LvADK para iniciar la reacción, la cual fue monitoreada durante 5 min. Se registraron los valores de absorbancia de la reacción cada 5 segundos, el registro de la actividad se realizó usando un espectrofotómetro CARY 50 Bio con agitador magnético y acoplado a una unidad Peltier de control de temperatura. El ensayo se llevó a cabo a 3 diferentes concentraciones de enzima y por triplicado, con los correspondientes controles. Debido a que la actividad enzimática de una adenilato cinasa es igual a la capacidad de trasferir un grupo fosfato del ATP al AMP, y por cada ATP consumido se producen dos moléculas de ADP que entran al sistema enzimático acoplado PK/LDH, por tanto la disminución en la absorbancia a 340 nm es proporcional a la mitad de la actividad de la LvADK. El valor de unidades de actividad enzimática para la LvADK será igual a la cantidad de enzima necesaria para catalizar la transferencia del grupo fosfato a 1 μM de AMP en 1 minuto.

Para el cálculo de las constantes cinéticas K_m y k_{cat} de la LvADK, se realizaron ensayos de actividad a diferentes concentraciones de sustrato (desde 50 μM hasta 2 mM de ATP, y de 50 μMhasta2 mM de AMP). En estos ensayos las condiciones fueron iguales para la determinación de actividad tipo adenilato cinasa, la concentración de AMP se mantuvo constante a 1 mM y el ATP a2 mM respectivamente. Las velocidades iníciales de cada ensayo se graficaron y se ajustaron al modelo de regresión no lineal en el programa GraphPad Prism 5®.

5.6. Determinación de la Actividad Tipo Nucleótido Monofosfato Cinasa (NMPK) y Nucleótido Difosfato Cinasa (NDPK) de la LvADK Recombinante

Tanto para el ensayo de la actividad tipo nucleótido monofosfato cinasa (NMPK) y nucleótido difosfato cinasa (NDPK), se utilizó el mismo sistema acoplado solo que el AMP fue cambiado por los sustratos a evaluar (Figura 5). Para determinar la actividad tipo NMPK en la mezcla de reacción, los nucleótidos monofosfato dAMP, GMP, dGMP, TMP y dCMP sustituyeron el AMP, manteniéndose a la misma concentración que este último. Mientras que para el ensayo de actividad NDPK el AMP fue sustituido por los nucleótidos difosfato dADP, GDP, dGMP, TDP y dCDP manteniendo la misma concentración equivalente. Durante estos ensayos se mantuvieron las mismas condiciones de agitación, temperatura, tiempo de reacción.

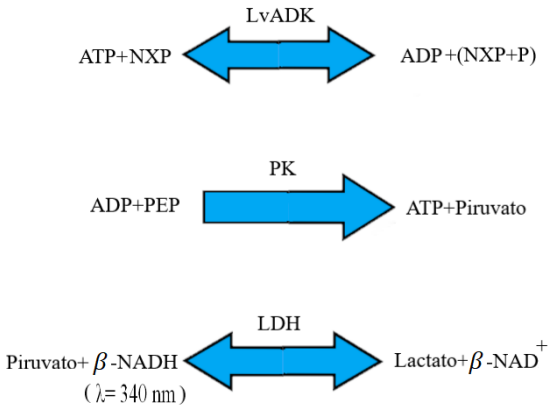

Figura 5. Esquema de las reacciones involucradas en el ensayo enzimático de actividad tipo NMPK y NDPK, donde NXP puede ser un nucleótido monofosfato o un nucleótido difosfato.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención de la Adenilato Cinasa Recombinante de Camarón Blanco *L. vannamei*

Después de realizar la trasformación de la cepa de *E. coli* BL21 DE3 Rosetta con el plásmido de expresión pJExpress404-LvADK conteniendo la secuencia de la adenilato cinasa de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (LvADK), la cinética de sobreexpresión mostró que a las 24 h de inducción se presentaba la mayor sobreexpresión de la proteína de manera soluble. Al ingresar la secuencia de aminoácidos de la LvADK al programa Protparam, se predice un tamaño de 22836.49 Da. Sin embargo esta presenta una movilidad electroforética anómala en la técnica de SDS PAGE, ya que se observa cercana al marcador de los 31 kDa (Figura 6). Este tipo de comportamiento se ha reportado para proteínas de membrana y proteínas con alta electronegatividad (Rath *et al*, 2009; Klenoba *et al*, 1997).Tomando en cuenta que la LvADK cuenta con 37 residuos de carga negativa y 17 de carga positiva, es decir una relación poco mayor de 2 a 1, esto puede explicarlas diferencias entre lo observado en los geles de poliacrilamida y el algoritmo de predicción. Santama y colaboradores (2005) reportaron este mismo comportamiento anómalo para la adenilatocinasa6 humana. En la figura 6 se puede observar en los carriles correspondientes a la fracción soluble, una banda cercana a los 31 kDa en los carriles respectivos a las muestra de 6 y 24 horas, esta banda corresponde a la LvADK recombinante.

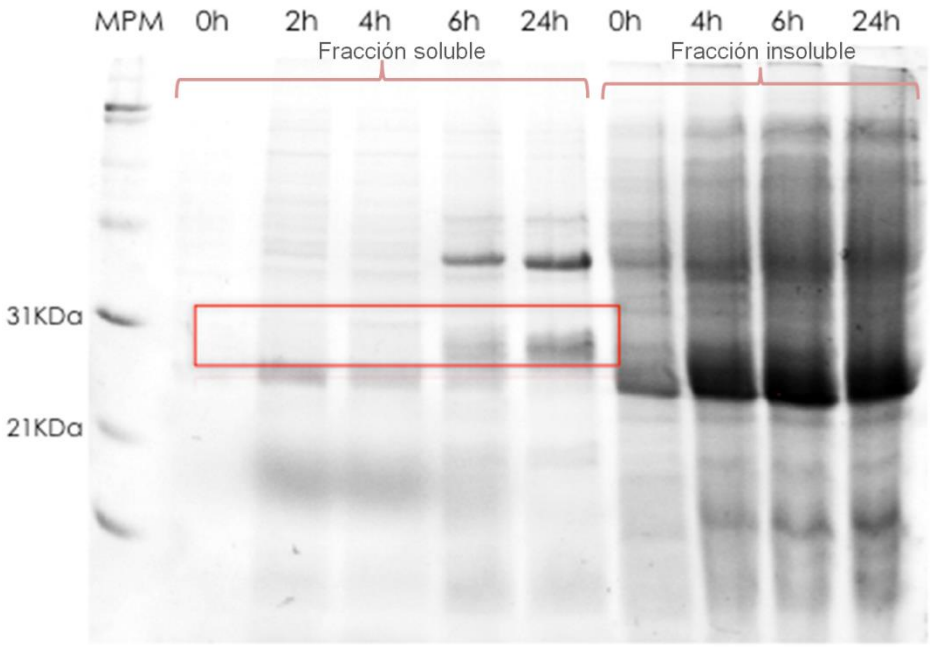

Figura 6. Cinética de sobreexpresión de la LvADK en la cepa BL21-Rosetta. MPM: marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad); 0, 2, 4,6 y 24, horas post inducción. En el recuadro se encuentra la banda correspondiente a la LvADK cercana a los 28 kDa.

En *E. coli*, esta reportado que una baja concentración de oxígeno disuelto lleva a una mayor acumulación de acetato dentro de la célula y esta acumulación compromete la capacidad de la bacteria para producir proteína recombinante (Wang *et al*, 2014, Akerson *et al*, 2001).Durante la acumulación de acetato la bacteria cambia sus procesos metabólicos de un metabolismo aerobio a uno anaerobio, esto cambia el ambiente celular dentro de la bacteria, haciendo que el plegamiento de las proteínas se vea afectado. Se encontró que para obtener la LvADK recombinante, fue necesario realizar cultivos de 500 mL de medio LB en matraces Fernbach de 2800 mL, debido a que al incrementar el volumen del medio de cultivo a 1 L, se encontró que se formaban cuerpos de inclusión. Por tanto las condiciones óptimas para la sobreexpresión en el experimento fueron en cultivos de 500 mL de medio LB, usando una concentración final de 0.4 mM de IPTG para la inducción, a 37 ºC, agitación constante a 250 rpm y recuperando la biomasa a las 24 h post inducción.

Después de diferentes corridas de purificación por cromatografía IMAC, se estandarizó la purificación de la LvADK usando una columna de afinidad a níquel tipo HisTrap FF de 5 mL (GE

Healthcare). Fue usado un gradiente por pasos o escalones, con diferentes concentraciones del buffer de elución al 5, 30 y 100% de buffer de elución (Figura 7).En la figura 7 en color azul se muestra el aumento en la absorbancia, mientras que en rojo los porcentajes de eluyente usados durante la cromatografía, "A" corresponde al aumento de la absorbancia debido a la proteína que no logra unirse a la columna, "B" corresponde al pico de elusión de la proteína que se une de manera inespecífica a la columna y "C" es el pico de elusión que contiene a la LvADK. La proteína obtenida por la cromatografía IMAC presentó contaminación como se observa en la parte superior del carril 6 de la figura 8, por lo cual fue necesario realizar un segundo pasó de purificación para eliminar las proteínas contaminantes. Debido a que en los geles se muestra que la proteína contaminante es de un mayor tamaño que la LvADK recombinante, se uso la filtración en gel como segundo paso de purificación.

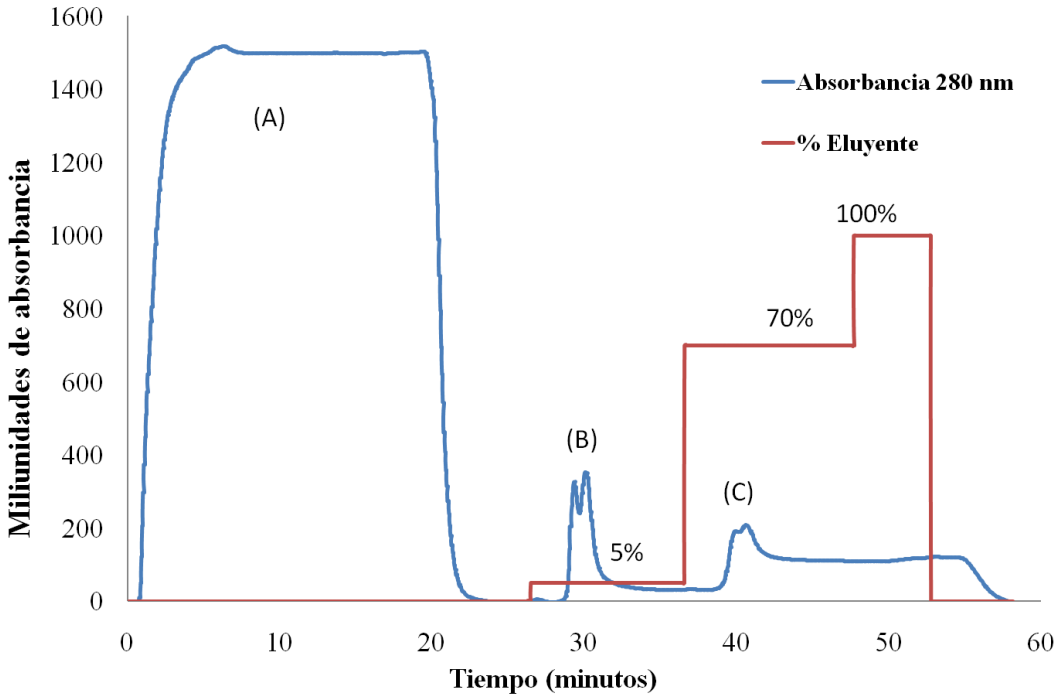

Figura 7. Cromatograma de purificación de la adenilato cinasa recombinante de camarón blanco *L. vannamei* (LvADK). A: proteína no unida a la columna; B: proteína unida inespecíficamente; C: LvADK.

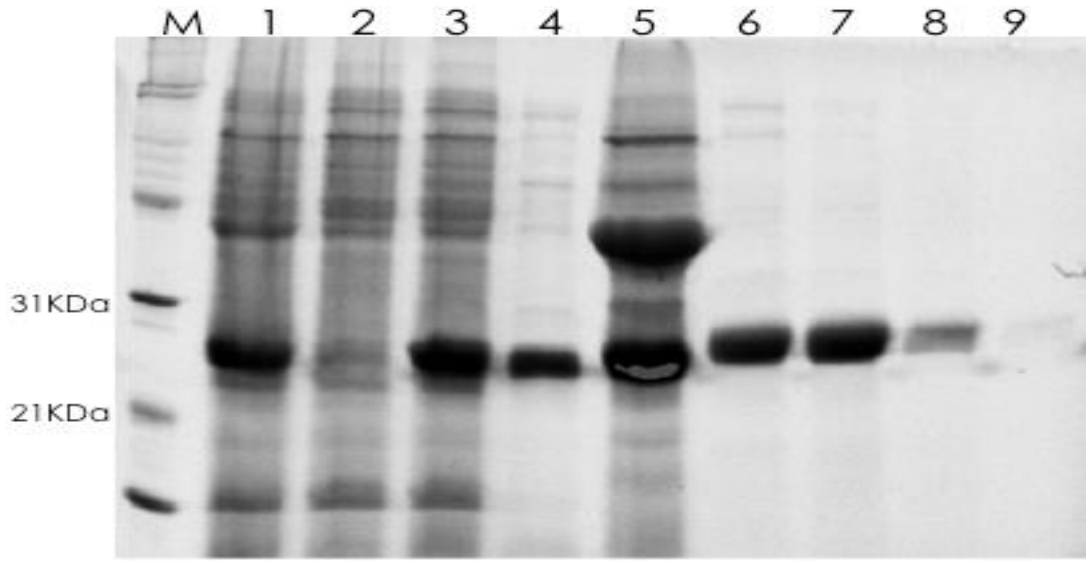

Figura 8. Análisis electroforético de las fracciones de cromatografía IMAC. M: marcador de peso molecular; 1, extracto que se obtiene de la lisis bacteriana; 2, 3 y 4, proteína no unida; 5 proteína unida inespecíficamente; 6, 7 y 8 LvADK purificada.

6.2. Determinación del Estado Oligomérico de La LvADK Recombinante

La LvADK obtenida de la cromatografía IMAC fue sometida a una cromatografía de filtración en gel con una columna Superdex75 (GE Healthcare, USA), obteniéndose una fracción mayoritaria a los 12 mL de corrida, volumen de elusión que corresponde a un peso de 26 kDa (Figura 9). En la parte derecha de la figura 9 se muestra la gráfica de regresión lineal con la cual se realizaron los cálculos para determinar el tamaño de la enzima y con esto se determinó el estalo oligomérico de la LvADK.Al dividir el tamaño de 26 kDa calculado entre el valor estimado de 21 kDa por el programa ProtParam, se demuestra que la LvADK recombinante se encuentra en forma de monómero, resultado concuerda con lo ya reportado para la mayoría de las adenilato cinasas (Roberts *et al*., 1997; Panayiotou *et al*., 2014; Ionescu, 2019).

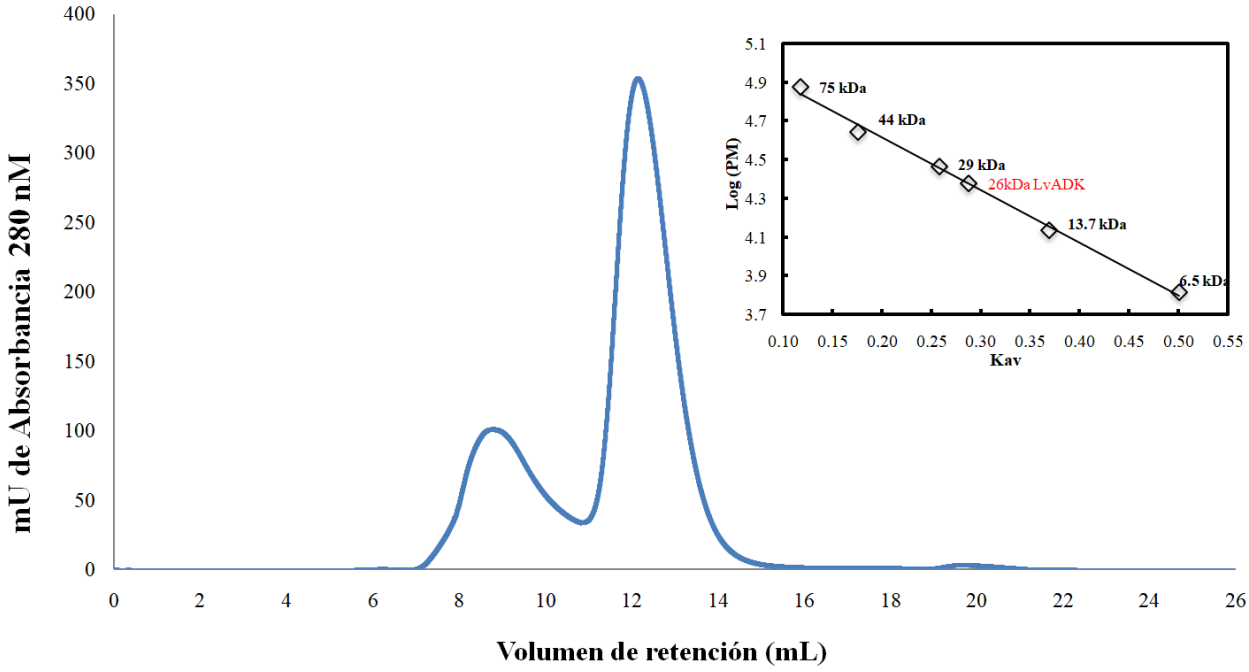

Figura 9. Cromatograma de filtración en gel de la LvADK y curva de calibración de la columna Superdex75.

6.3. Actividad Enzimática Tipo ADK y Comportamiento Cinético de la LvADK Recombinante

El ensayo de actividad de la proteína recombinante purificada confirmo que esta es una adenilato cinasa de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, ya que el incremento la concentración de proteína en el ensayo tuvo como resultado un aumento de la velocidad de reacción de la actividad específica tipo adenilato cinasa (Figura 10). Se calculó una actividad específica de 12.5µM/min por mg de proteína, valor mucho mayor a la ADK 6 humana que tiene una actividad específica 18 µM/min por mg de proteína (Drakou *et al*., 2012).

En la figura 11 se presentan las curvas resultantes de los cálculos de los experimentos cinéticos, mostrando que la LvADK presenta un comportamiento típico Michaelis-Menten, como lo reportado en la literatura para enzimas de este tipo (Kovermann *et al*., 2017). Respecto al sustrato ATP, los cálculos cinéticos realizados dieron como resultado una K_m aparente de 152.5 ±9 µM, y un valor de V_{max} de 12.5 ± 0.5 µM/min por mg de proteína (Cuadro 2).Los experimentos cinéticos

para el sustrato AMP mostraron una K_m aparente de 93.8± 5μM, y una V_{max} de 8.8± 0.5 μM/min por mg de proteína (Cuadro 3).Al comparar los parámetros cinéticos obtenidos para la LvADK contra su homólogo en humanos, la LvADK presenta una menor afinidad a su sustrato, pero en cambio presenta una mayor capacidad catalítica, con una actividad específica (Cuadro 2). La eficiencia catalítica (k_{cat}/ K_m) calculada, mostró que la LvADK es más eficiente que la ADK6 humana, pero menor al compararla con la ADK1 de *Schistosoma mansoni*, la ADK6 de humano tiene una función reguladora dentro del núcleo y la ADK1 de *S. mansoni* es la isoforma más activa en el citoplasma, por tanto la función de la LvADK sea estabilizadora de la CEA y no reguladora.

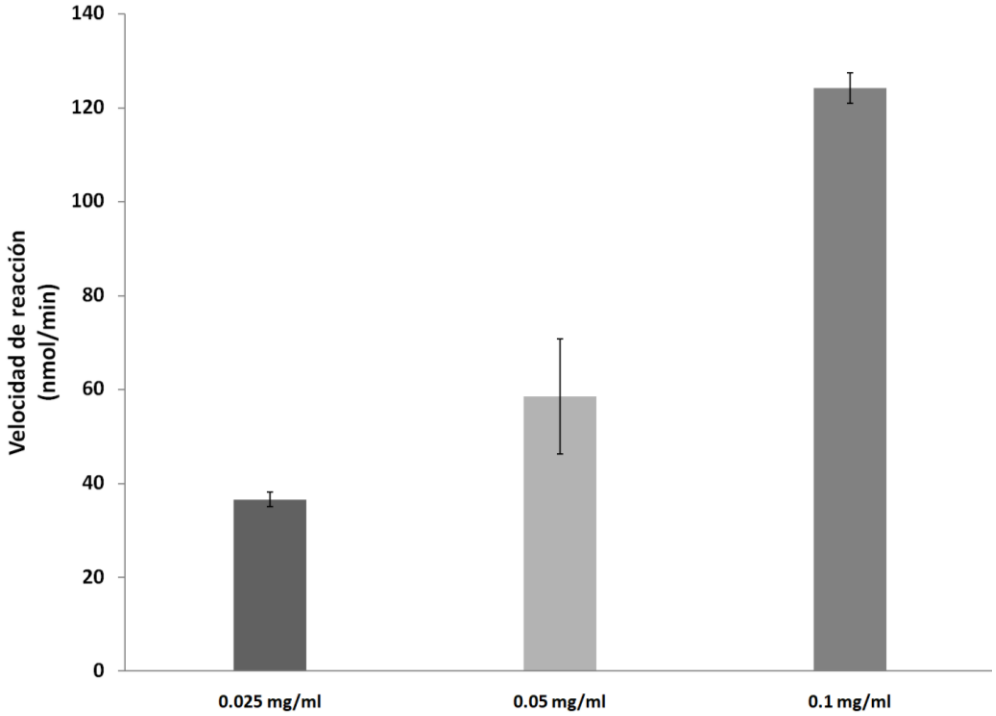

Figura 10. Actividad específica de la Adenilato cinasa recombinante de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* a diferentes concentraciones de la enzima.

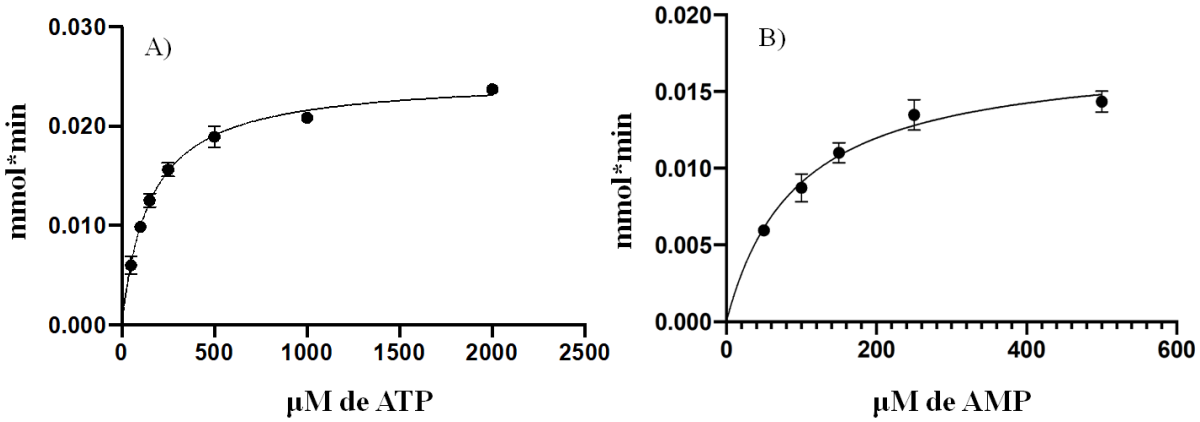

Figura 11. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática de la LvADK recombinante. A) Variación en la concentración de ATP (50 µM a 2 mM) y AMP a 1mM. B) Variaciones en la concentración de AMP (50 µM a 500 µM) ATP constante a 2 mM

Cuadro 2. Parámetros cinéticos determinados para la enzima adenilato cinasa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei)* y de otras adenilato cinasas con el sustrato ATP.

Enzima	**Actividad específica (nmol/min/mg)**	**k_{cat} (s^{-1})**	**K_m (µM ATP)**	**k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)**	**Referencia**
ADK *Litopenaeus vannamei*	12,418 ±500	3.59±0.11	152±9	23,618	Presente estudio
ADK6 *Homo sapiens*	18±0.9	$6.3x10^{-3}$	45±5	140	Drakou *et al.*, 2012
ADK1 *Schistosoma mansoni*	NR	25 ±1	272±16	91,911	Marques *et al.*, 2012
ADK2 *Schistosoma mansoni*	NR	5 ±0.1	13±1	$1x10^{6}$	Marques *et al.*, 2012
ADK *Marinibacillus marinus*	240 ±10	NR	2±0.3	NR	Davlieva y Shamoo, 2009

*3 de repeticiones por experimento ±DS
NR: Parámetro no reportado.

Cuadro 3. Parámetros cinéticos determinados para la enzima adenilato cinasa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y de otras adenilato cinasas respecto al sustrato AMP

Enzima	Actividad específica (µmol/min/mg)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (µM ATP)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\ s^{-1}$)	Referencia
ADK *Litopenaeus vannamei*	14.34±0.69	1.46±	94±10	15.53	Presente estudio
ADK1 *Schistosoma mansoni*	NR	50±1	244±14	204.92	Marques *et al*., 2012
ADK2 *Schistosoma mansoni*	NR	8.3±0.2	37±2	224.32	Marques *et al*., 2012
ADK *Marinibacillus marinus*	2.2 ±0.2	NR	21.4±6.7	NR	Davlieva y Shamoo, 2009

*3 de repeticiones por experimento ±DS
NR: Parámetro no reportado.

6.4. Actividad Enzimática Nucleótido Monofosfato Cinasa y Nucleótido Difosfato Cinasaen la Adenilato Cinasa Recombinante de *Litopenaeus vannamei*

El ensayo enzimático acoplado permitió registrar la trasferencia de grupos fosfatos a diferentes nucleótidos monofosfato, el ensayo enzimático usado para determinar la actividad específica de la LvADK se adaptó con cambios menores para evaluarla actividad nucleótido monofosfato cinasa. Fue necesario en este caso cambiar los nucleótidos monofosfato (dAMP, dCMP y dGMP) a la misma concentración en la que el AMP, los resultados mostraron que la LvADK es capaz de utilizar como sustratos al dAMP, dGMP y dCMP (Figura 12).

La LvADK presentó una actividad específica indistinta entre el AMP, el dAMP y el dCMP, mientras que para la dGMP presentó una menor actividad respecto a los demás sustratos. Se anticipaba que la LvADK no presentará diferencias importantes en la actividad catalítica entre AMP y dAMP al ser estructuralmente muy similares. Sin embargo que la actividad de la LvADK respecto al dCMP fuese mayor que para el dGMP, es un resultado contrastante ya que tanto el nucleótido adenina como guanina presentan mayor similitud estructural. Sin embargo, estos

resultados concuerdan con lo reportado por Ren y colaboradores (2005), en dicho estudio comprobaron que la adenilato cinasa 6 del ser humano presentaba una preferencia por AMP y dAMP, pero que de igual manera CMP y dCMP pueden ser catalizados por la enzima.

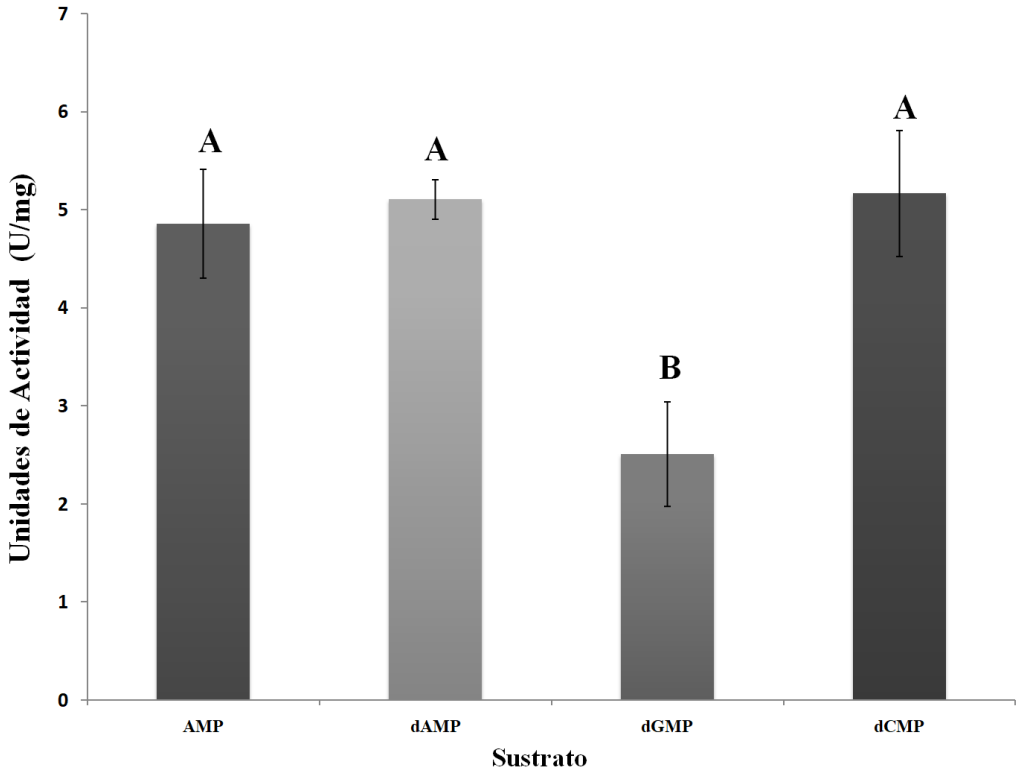

Figura 12. Actividad tipo nucleótido monofosfato cinasa (NMPK) de la adenilato cinasa recombinante de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (LvADK).

Por otro lado la actividad de nucleótido difosfato cinasa de la LvADK recombinante, fue llevada a cabo sustituyendo el AMP de la mezcla por los distintos nucleótidos difosfatos (dCDP y TDP). De los distintos nucleótidos difosfato analizados, se encontró que la LvADK cataliza la transferencia del grupo fosfato del ATP con los sustratos dCDP y TDP obteniéndose dCTP y TTP respectivamente. La LvADK presentó una mayor actividad con el sustrato TDP en comparación con el AMP, el cual es el sustrato cognado de la enzima (Figura 13).

No existen reportes previos acerca de la actividad de la adenilato cinasa isoforma 6 como NDPK, pero esta actividad ha sido reportada en otras adenilato cinasas. En el trabajo de Amiri y colaboradores (2013) evaluaron la capacidad de las adenilatocinasas1, 4, 5, 7, 8 y 9 de actuar como nucleótido difosfato cinasas, logrando evidenciar que esta capacidad catalítica está presente en varias de las isoformas de ADK de humano.

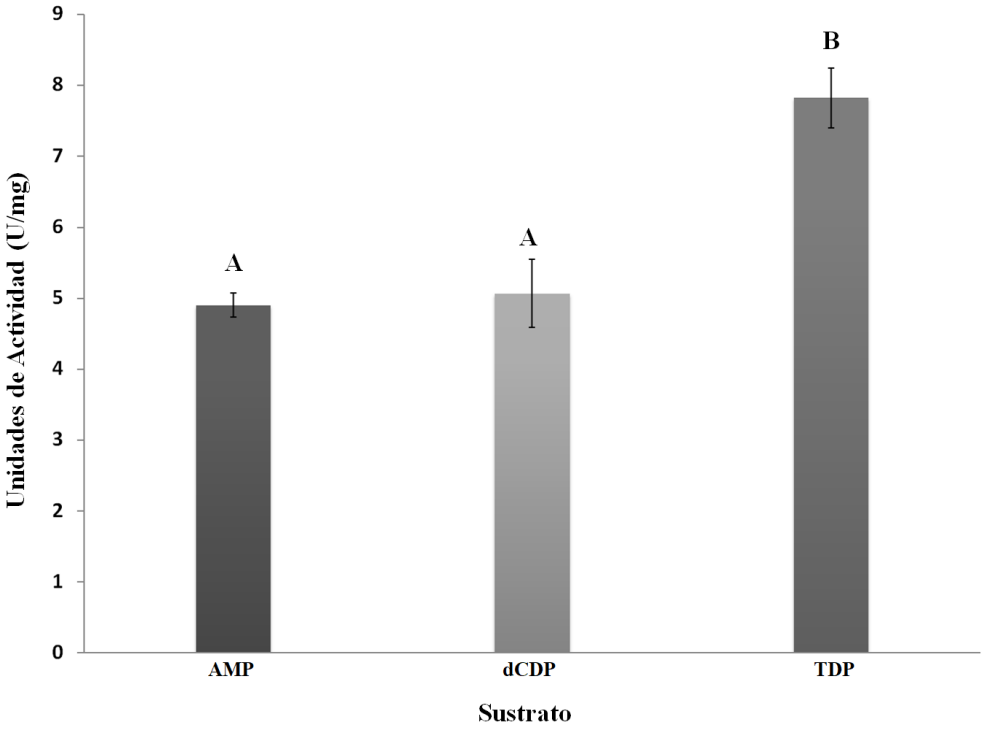

Figura 13. Actividad tipo nucleótido difosfato cinasa (NDPK) de la adenilato cinasa recombinante de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (LvADK).

6.5. La Adenilato Cinasa de *Litopenaeus vannamei* como Probable LvADK 6

Es bien conocido que las adenilato cinasas presentan localización específica dentro de la célula, por lo que la LvADK no debería ser la excepción, a pesar de que no se realizaron experimentos que permitieran determinar de forma exacta la localización celular de la adenilato cinasa de camarón blanco. Al comparar lo encontrado experimentalmente con lo reportado en la literatura

actual, sugiere que la localización de la LvADK sea nuclear. Se utilizo el programa BLAST® del NCBI (National Center for Biotecnology Information) para determinar con que grupo de adenilato cinasas se emparentaba mas la adenilato cinasa de camarón blanco de este estudio, el análisis de la base de datos arrojo que esta enzima la mayor similitud (60%) con las adenilato cinasas 6 de distintas especies. En la figura 14 se muestra el alineamiento múltiple de algunas ADK 6 con su localización en el núcleo validada con la secuencia de la LvADK. Además mediante la herramienta de predicción de localización subcelular BaCelLo, el cual predijo una probable localización nuclear para la LvADK (Pierleoni *et al.*, 2006).

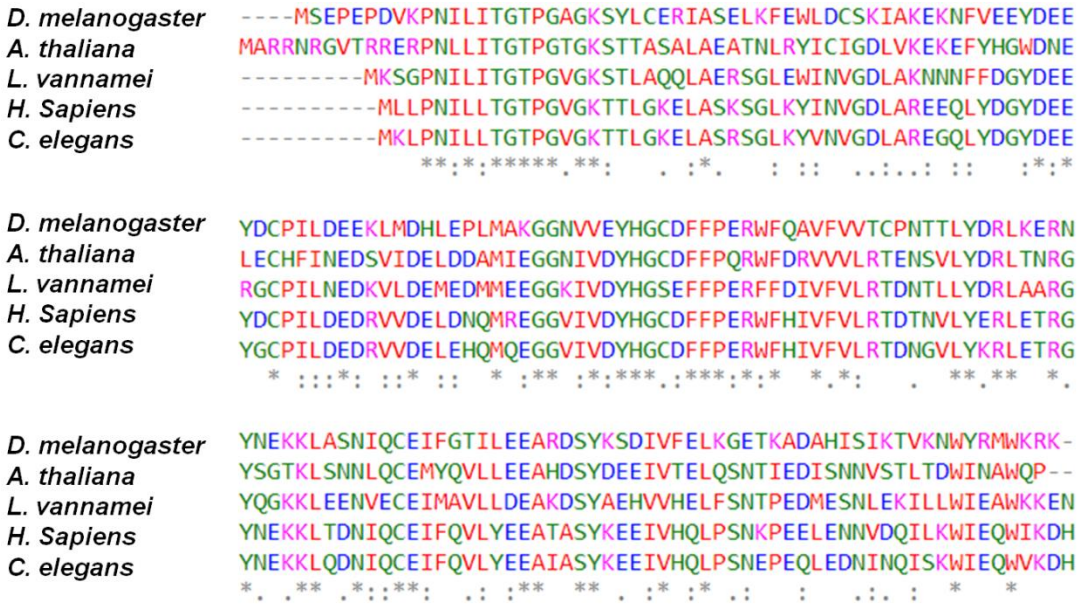

Figura 14. Alineamiento de secuencias de la adenilato cinasa de *L. Vannamei* (LvADK) con algunas adenilato cinasas nucleares utilizando el programa Clustal Omega (Santama *et al.*, 2005; Zhai *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2012; Madeira *et al.*, 2019).

Al realizar un árbol filogenético de las demás isoformas de la adenilato cinasa de humano e incluyendo la secuencia de la LvADK, la enzima de camarón se agrupó con la isoforma 6, de acuerdo con lo reportado por Meng y colaboradores (2008) para la adenilato cinasa 6 de *Drosophila melanogaster* (Figura 15). Algo interesante fue que varias de las adenilato cinasa 6 reportadas presentan comportamiento electroforético "anómalo" y la LvADK mostró este mismo comportamiento (Figura 16).

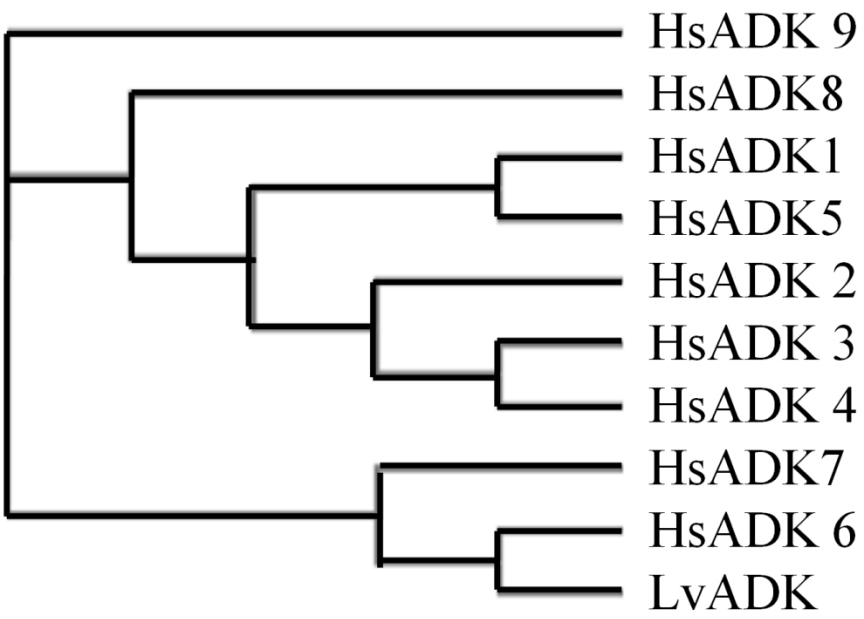

Figura 15. Relaciones filogenéticas de las distintas adenilato cinasas de humano (*Homo sapiens)*, y la LvADK realizada por alineamiento múltiple de secuencias en el programa Clustal Omega (Madeira *et al*., 2019). GenBank: HsADK1 (NP_000467), HsADK2 (NP_001616), HsADK3 (NP_057366), HsADK4 (P27144), HsADK5 (Q96EC9), HsADK6 (1RKB), HsADK7 (EAW81636), HsADK8 (Q96MA6), HsADK9 (Q5TCS8).

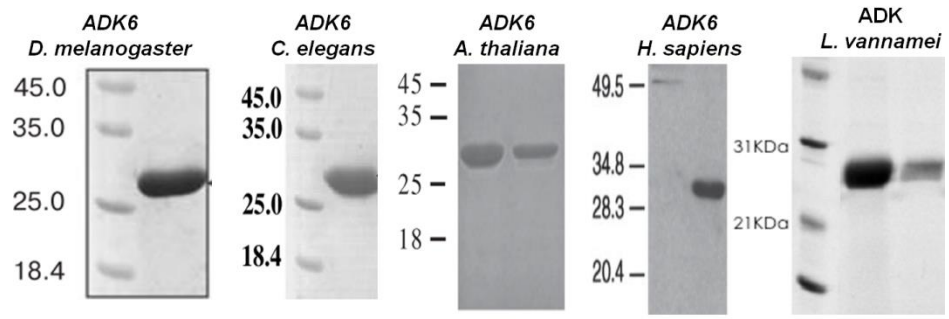

Figura 16. Comportamiento electroforético de distintas adenilato cinasas 6 (Santama *et al*., 2005; Zhai *et al*., 2006; Meng *et al*., 2008; Feng *et al*., 2012).

Si bien las constantes cinéticas fueron bastante diferentes entre la LvADK y su homóloga en humano, la capacidad como NMPK fue esencialmente la misma. Por los resultados experimentales obtenidos la LvADK es una proteína con capacidad *moonlighting*, característica que parece compartir con otras adenilato cinasas de humano. Es interesante observar esta capacidad *moonlighting* de la LvADK de transferencia de grupos fosfatos tanto a nucleótidos monofosfato

como difosfato, lo cual indicaría una posible participación en el mantenimiento de la poza de nucleótidos fosforilados, que son esenciales para distintos procesos que se llevan a cabo en su presunta localización celular, es decir el núcleo.

7. CONCLUSIONES

Los experimentos nos permiten confirmar que la adenilato cinasa de camarón blanco obtenida por tecnología recombinante es una proteína monomérica, que presenta la actividad clásica de una adenilato cinasa, y con un comportamiento cinético Michaeliano. La LvADK recombinante presenta la capacidad de actuar como una nucleótido monofosfato cinasa sobre los sustratos dAMP, dCMP y dGMP y cataliza la reacción propia de una nucleótido difosfato cinasa con los sustratos dCDP y TDP.

Estas evidencias sugieren que la enzima del presente estudio es una adenilato cinasa 6, tanto por la similitud en la secuencia, el comportamiento electroforético que comparte con otras ADK6 y similitudes en capacidad enzimática con la adenilato cinasa del ser humano.

Esta tesis presenta la caracterización bioquímica de una adenilato cinasa para *L. vannamei* hasta el momento, hay muchos aspectos que aún se desconocen, como el saber si al igual que en el ser humano, esta enzima es un factor importante en la maduración de diferentes ARN o está relacionada con las estructuras conocidas como cuerpos de Cajal (Zhang *et al*., 2010)

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere el uso de otro ensayo enzimático para evaluar la actividad como NDPK de la LvADK recombinante para los sustratos CDP y dCDP, esto debido a que se observó que la piruvato cinasa del mezcla PK/LDH actuó sobre el CDP y dCDP, por lo que no se pudo determinar si efectivamente la LvADK podía actuar con estos sustratos.

Evaluar la capacidad de la LvADK de usar distintos nucleótidos trifosfato como donadores de fosfato ya que para otras adenilato cinasas se ha encontrado que el ATP no es la única molécula que estas enzimas pueden usar como donador de fosfatos.

Determinar la estructura tridimensional de la LvADK para ampliar el conocimiento del mecanismo catalítico que permite a esta enzima una actividad catalítica tan amplia.

Evaluar otras adenilato cinasas 6 para determinar si la actividad NDPK es una característica general en este grupo de isoenzimas o si es una característica especial de la LvADK.

9. REFERENCIAS

Ådén, J., Verma, A., Schug, A. y Wolf-Watz, M. 2012. Modulation of a pre-existing conformational equilibrium tunes adenylate kinase activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(40):16562-16570.

Amiri, M., Conserva, F., Panayiotou, C., Karlsson, A. y Solaroli, N. 2013. The human adenylate kinase 9 is a nucleoside mono- and diphosphate kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 45(5):925-931.

Bae, E. y Phillips, G.N. 2006. Roles of static and dynamic domains in stability and catalysis of adenylate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(7):2132-2137.

Bai, D., Zhang, J., Li, T., Hang, R., Liu, Y., Tian, Y., Huang, D., Qu, L., Cao, X., Ji, J. y Zheng, X. 2016. The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth. *Nat. Commun.*, 7.

Bandlow, W., Strobel, G., Zoglowek, C., Oechsner, U. y Magdolen, V. 1988. Yeast adenylate kinase is active simultaneously in mitochondria and cytoplasm and is required for non-fermentative growth. *Eur. J. Biochem.*, 178(2):451-457.

Bessman, S.P. y Carpenter, C.L. 1985. The Creatine-Creatine Phosphate Energy Shuttle. *Annu. Rev. Biochem.*, 54(1):831-862.

Cao, W., Haig-Ladewig, L., Gerton, G.L. y Moss, S.B. 2006. Adenylate Kinases 1 and 2 Are Part of the Accessory Structures in the Mouse Sperm Flagellum1. *Biol. Reprod.*, 75(4):492-500.

Davlieva, M. y Shamoo, Y. 2009. Structure and biochemical characterization of an adenylate kinase originating from the psychrophilic organism Marinibacillus marinus. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 65(8):751-756.

Drakou, C.E., Malekkou, A., Hayes, J.M., Lederer, C.W., Leonidas, D.D., Oikonomakos, N.G., Lamond, A.I., Santama, N. y Zographos, S.E. 2012. hCINAP is an atypical mammalian nuclear adenylate kinase with an ATPase motif: Structural and functional studies. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, 80(1):206-220.

Dzeja, P. y Terzic, A. 2009. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int. J. Mol. Sci.*, 10(4):1729-1772.

Dzeja, P.P. y Terzic, A. 2003. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J. Exp. Biol.*,

Dzeja, P.P., Zeleznikar, R.J. y Goldberg, N.D. 1998. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol. Cell. Biochem.*, 184(1-2):169-182.

FAO. (2009-2019).Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO.Roma.Recuperado de: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es

Faubert, B., Vincent, E.E., Poffenberger, M.C. y Jones, R.G. 2015. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett.*, 356(2):165-170.

Feng, X., Yang, R., Zheng, X. y Zhang, F. 2012. Identification of a novel nuclear-localized adenylate kinase 6 from Arabidopsis thaliana as an essential stem growth factor. *Plant Physiol. Biochem.*, 61:180-186.

Fenucci J. L. 1998. Manual para la cría de camarones peneidos. FAO. Recuperado de: http://www.fao.org/docrep/field/003/AB466S/AB466S00.htm#TOC

Fujisawa, K., Terai, S., Takami, T., Yamamoto, N., Yamasaki, T., Matsumoto, T., Yamaguchi, K., Owada, Y., Nishina, H., Noma, T. y Sakaida, I. 2016. Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 35(1):48.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. y Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.* S.l.: s.n., 571-607pp.

Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A. y Hardie, D.G. 2013. AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. *Cell Metab.*, 18(4):556-566.

Granneman, S., Nandineni, M.R. y Baserga, S.J. 2005. The Putative NTPase Fap7 Mediates Cytoplasmic 20S Pre-rRNA Processing through a Direct Interaction with Rps14. *Mol. Cell. Biol.*, 25(23):10352-10364.

Hagerman, L. y Uglow, R.F. 1981. Ventilatory behaviour and chloride regulation in relation to oxygen tension in the shrimp palaemon adspersus rathke maintained in hypotonic medium. *Ophelia*, 20(2):193-200.

Huss, R.J. y Glaser, M. 1983. Identification and purification of an adenylate kinase-associated protein that influences the thermolability of adenylate kinase from a temperature-sensitive adk mutant of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, 258(21):13370-6.

Ionescu, M.I. 2019. Adenylate Kinase: A Ubiquitous Enzyme Correlated with Medical Conditions. *Protein J.* 21 enero 2019. 1-14pp.

Jana, B., Adkar, B. V., Biswas, R. y Bagchi, B. 2011. Dynamic coupling between the LID and NMP domain motions in the catalytic conversion of ATP and AMP to ADP by adenylate kinase. *J. Chem. Phys.*, 134(3).

Jeffery, C.J. 1999. *Moonlighting proteins*. 1 enero 1999. S.l.: Elsevier Ltd.

Khoo, J.C. y Russell, P.J. 1972. Isoenzymes of adenylate kinase in human tissue. *BBA - Enzymol.*, 268(1):98-101.

Kovermann, M., Grundström, C., Sauer-Eriksson, A.E., Sauer, U.H. y Wolf-Watz, M. 2017. Structural basis for ligand binding to an enzyme by a conformational selection pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114(24):6298-6303.

Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D. y Lopez, R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.*, 47(W1):W636-W641.

Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, P.C., Moraru, I.I., Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsie, C.E., Buttle, K. y Marko, M. 2001. Topology of the mitochondrial inner membrane: Dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*, 52(3-5):93-100.

Marques, I.D.A., Romanello, L., Demarco, R. y Pereira, H.D.M. 2012. Structural and kinetic studies of Schistosoma mansoni adenylate kinases. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 185(2):157-160.

Meng, G., Zhai, R., Liu, B. y Zheng, X. 2008. Identification of a Novel NuclearrLocalized Adenylate Kinase from Drosophila melanogaster. *Ltd*, 73(1):47753.

Moon, S., Kim, J. y Bae, E. 2017. Structural analyses of adenylate kinases from Antarctic and tropical fishes for understanding cold adaptation of enzymes. *Sci. Rep.*, 16027(7).

Nicholls, D.G. 2016. The Pancreatic β-Cell: A Bioenergetic Perspective. *Physiol. Rev.*, 96(4):1385-1447.

Noma, T., Fujisawa, K., Yamashiro, Y., Shinohara, M., Nakazawa, A., Gondo, T., Ishihara, T. y Yoshinobu, K. 2001. Structure and expression of human mitochondrial adenylate kinase targeted to the mitochondrial matrix. *Biochem. J.*, 358(1):225-232.

Noma, T., Song, S., Yoon, Y.S., Tanaka, S. y Nakazawa, A. 1998. cDNA cloning and tissue-specific expression of the gene encoding human adenylate kinase isozyme 2. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, 1395(1):34-39.

Panayiotou, C., Solaroli, N., Johansson, M. y Karlsson, A. 2010. Evidence of an intact N-terminal translocation sequence of human mitochondrial adenylate kinase 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42(1):62-69.

Panayiotou, C., Solaroli, N. y Karlsson, A. 2014. The many isoforms of human adenylate kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 49:75-83.

Panayiotou, C., Solaroli, N., XU, Y., Johansson, M. y Karlsson, A. 2011. The characterization of human adenylate kinases 7 and 8 demonstrates differences in kinetic parameters and structural organization among the family of adenylate kinase isoenzymes. *Biochem. J.*, 433(3):527-534.

Perez-Riverol, Y., Da, F., Leprevost, V., Pazos, F. y Jeffery, C.J. 2015. Why study moonlighting proteins? *Front. Genet.*, 6(211).

Pierleoni, A., Martelli, P.L., FAriselli, P. y Casadio, R. 2006. BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, 22(14):e408-e416.

Ping, J., Hao, P., Li, Y.-X. y Wang, J.-F. 2013. Molecular dynamics studies on the conformational transitions of adenylate kinase: a computational evidence for the conformational selection mechanism. *Biomed Res. Int.*, 2013:628536.

Ren, H., Wang, L., Bennett, M., Liang, Y., Zheng, X., Lu, F., Li, L., Nan, J., Luo, M., Eriksson, S., Zhang, C. y Su, X.-D. 2005. The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(2):303-308.

Roberts, J., Aubert, S., Gout, E., Bligny, R. y Douce, R. 1997. Cooperation and Competition between Adenylate Kinase, Nucleoside Diphosphokinase, Electron Transport, and ATP Synthase in Plant Mitochondria Studied by 31P-Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol.*, 113(1):191-199.

Saks, V. A, Kaambre, T., Sikk, P., Eimre, M., Orlova, E., Paju, K., Piirsoo, A, Appaix, F., Kay, L., Regitz-Zagrosek, V., Fleck, E. y Seppet, E. 2001. Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem. J.*, 356(Pt 2):643-657.

Santama, N., Ogg, S.C., Malekkou, A., Zographos, S.E., Weis, K. y Lamond, A.I. 2005. Characterization of hCINAP, a novel coilin-interacting protein encoded by a transcript from the transcription factor TAFIID32 locus. *J. Biol. Chem.*, 280(43):36429-41.

Scheffzek, K., Kliche, W., Wiesmüller, L. y Reinstein, J. 1996. Crystal structure of the complex of UMP/CMP kinase from Dictyostelium discoideum and the bisubstrate inhibitor P1-(5'-adenosyl) P5-(5'-uridyl) pentaphosphate (UP5A) and Mg2+ at 2.2 Å: Implications for water-mediated specificity. *Biochemistry*, 35(30):9716-9727.

Schoff, P.K., Cheetham, J. y Lardy, H.A. 1989. Adenylate kinase activity in ejaculated bovine sperm flagella. *J. Biol. Chem.*, 264(11):6086-91.

Schulz, G.E., Müller, C.W. y Diederichs, K. 1990. Induced-fit movements in adenylate kinases. *J. Mol. Biol.*, 213(4):627-630.

Setiarto, A., Augusto Strussmann, C., Takashima, F., Watanabe, S. y Yokota, M. 2004. Short-term responses of adult kuruma shrimp Marsupenaeus japonicus (Bate) to environmental salinity: osmotic regulation, oxygen consumption and ammonia excretion. *Aquac. Res.*, 35(7):669-677.

Six, E., Lagresle-Peyrou, C., Susini, S., De Chappedelaine, C., Sigrist, N., Sadek, H., Chouteau, M., Cagnard, N., Fontenay, M., Hermine, O., Chomienne, C., Reynier, P., Fischer, A., André-Schmutz, I., Ueguen, N. y Cavazzana, M. 2015. AK2 deficiency compromises the mitochondrial energy metabolism required for differentiation of human neutrophil and lymphoid lineages. *Cell Death Dis.*, 6(8).

Steel, R., Kemp, B.E., Ling, N., Oakhill, J.S., Chen, Z.-P., Scott, J.W. y Tam, S. 2011. AMPK Is a Direct Adenylate Charge-Regulated Protein Kinase. *Science (80-.).*, 332(6036):1433-1435.

Tan, Y.W., Hanson, J.A. y Yang, H. 2009. Direct Mg2+ binding activates adenylate kinase from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, 284(5):3306-3313.

Thébault, M.T., Raffin, J.P., Picado, A.M., Mendonça, E., Skorkowski, E.F. y Le Gal, Y. 2000. Coordinated changes of adenylate energy charge and ATP/ADP: Use in ecotoxicological studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46(1):23-28.

Van Rompay, A.R., Johansson, M. y Karlsson, A. 1999. Identification of a novel human adenylate kinase cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein. *Eur. J. Biochem.*, 261(2):509-516.

Wang, Y. y Makowski, L. 2018. Fine structure of conformational ensembles in adenylate kinase. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, 86(3):332-343.

Whitford, P.C., Miyashita, O., Levy, Y. y Onuchic, J.N. 2007. Conformational Transitions of Adenylate Kinase: Switching by Cracking. *J. Mol. Biol.*, 366(5):1661-1671.

Wilson, D.E., Povey, S. y Harris, H. 1976. Adenylate kinases in man: evidence for a third locus. *Ann. Hum. Genet.*, 39(3):305-313.

Wujak, M., Czarnecka, J., Gorczycka, M. y Hetmann, A. 2015. Human adenylate kinases – classification, structure, physiological and pathological importance. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 69:933-945.

Zeleznikar, R.J., Dzeja, P.P. y Goldberg, N.D. 1995. Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J. Biol.*

Chem., 270(13):7311-9.

Zeller, F. y Zacharias, M. 2015. Substrate Binding Specifically Modulates Domain Arrangements in Adenylate Kinase. *Biophys. J.*,

Zhai, R., Meng, G., Zhao, Y., Liu, B., Zhang, G. y Zheng, X. 2006. A novel nuclear-localized protein with special adenylate kinase properties from Caenorhabditis elegans. *FEBS Lett.*, 580(16):3811-3817.

Zhang, J., Bai, D., Ma, X., Guan, J. y Zheng, X. 2014. HCINAP is a novel regulator of ribosomal protein-HDM2-p53 pathway by controlling NEDDylation of ribosomal protein S14. *Oncogene*, 33(2):246-254.

Zhang, J., Zhang, F. y Zheng, X. 2010. Depletion of hCINAP by RNA interference causes defects in Cajal body formation, histone transcription, and cell viability. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(11):1907-1918.