

**Fosforilcolina Fosfatasa de
P. aeruginosa: Búsqueda del sitio de
Interacción de Amonio Cuaternario
y de los Residuos Involucrados en la
Especificidad de Sustrato**

**Trabajo Final
Cristhian Boetsch**

**Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Dpto. de Biología Molecular**

2010

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

El mismo se presenta como requisito para optar al título de Microbiólogo.

Director:

Dra. Paola R. Beassoni

Jurado:

Dra. Paola R. Beassoni

Dr. Edgardo Jofré

Dra. Ana Luz Serra

Río Cuarto, 17 de febrero de 2010

*“Después de escalar una montaña muy alta,
descubrimos que hay muchas otras montañas por escalar”*

(Nelson R. Mandela, 1918)

Agradecimientos

- ∞ A la Dra. Beassoni, Pao, por haberme marcado estos últimos años el camino que me trajo al día de hoy, y acompañado en él por supuesto. Por enseñarme todo o la gran mayoría de lo que aprendí en el Laboratorio 13, y ser la mejor compañera de mates;
- ∞ Al Dr. Domenech, “Dome”, por su predisposición y por buscar siempre una vuelta en cada resultado o algún problema circunstancial;
- ∞ A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por brindar el espacio físico, por brindar los profesores de estos últimos años de mi vida; al Dpto. de Biol. Cel. y Molec.;
- ∞ Al grupo, algunos en nuevos rumbos, Mili, Vir, Juli, en mis primeros pasos en el lab. me ayudaron mucho; y quienes aún quedan en el Dpto., Lifu, Loli, Tere, Diego, Marina, Lucas, Julio, Mónica, Agus; algunos más por la compañía, otros más por lo académico, cada uno aportando su granito de arena. A Ana Luz, por ser una gran compañera, de “lab” y de charlas; y a Lisandro, “enano”, por esas tardes filosóficas, y obviamente, ayudarme en mucho y hasta a veces discutiendo a los gritos hasta llegar a un acuerdo, jhe jhe. Y claro, a los están comenzando a recorrer este camino, Fede, Christopher y Mauri;
- ∞ Al Dr. Gonzales, Danilo, y a la Universidad de Talca (Chile) por su predisposición y el aporte tanto en recursos como en conocimiento. Al resto del grupo de Talca por su buena onda, principalmente Horacio y Cristian, quienes sin conocerme me brindaron alojamiento, Ariela, Daniel y Julio, me ayudaron tanto;
- ∞ Mamá y Papá, de más está decir que sin ellos no sería lo que soy, y no podría haber llegado hasta hoy. Por brindarme todo su apoyo, y en especial el cariño;
- ∞ Al resto de la familia, hermanos, mis primeros compañeros, mis primeros amigos, por hacerme llegar todo su cariño y apoyo. Y a los parientes más lejanos, siempre compartiendo momentos felices;
- ∞ A mis segundos compañeros, desde el jardín hasta la secundaria, a todos ellos, pero más especialmente a Nico y Fede, por mantener tan fuerte esta gran amistad. A mis amigos de “NadaHaremos”, por disfrutar juntos esos veranos y algún que otro invierno, que también formaron parte de mi vida con y sin pileta; todos ellos en una forma u otra hicieron que hoy llegue adonde estoy;

- ∞ A todos ellos de las OAB que alguna vez se involucraron conmigo, aportaron mucho a la causa;
- ∞ Juli y Guille, compañeros de esas mañanas, esas tardes, esas noches estudiando, por suerte no tanto esas madrugadas. Y también compañeros de esas mañanas, esas tardes, esas noches, esas madrugadas, ya no estudiando, sino riendo, charlando, haciendo ritmos, cocinando (bue... eso sólo Guille), saliendo a algún lado;
- ∞ A las 4 fantásticas, Vani -una amiga muy especial-, Tana –especialmente por su casa, jhe jhe-, Orne y Ana, y al 5^{to} elemento, Romi; a Maribringas –su entera predisposición-, a la Vasca, Juli, Betty, Cheleste –por esas noches con el machete cruzando la selva-; a todas ellas hicieron muy especial mis días como universitario, Nati –por sebarme mates hasta tarde tratando de armar el sistema (Apéndice I, 6.2.1);
- ∞ A “la hermana de Juli”, como así la llamé una vez, Lucía, sin duda mi cuñada preferida;
- ∞ A Juli, por siempre servirme como apoyo y estar cuando la necesito, por quererme y dejarse querer, por eso y muchísimo más;

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.2. <i>Pseudomonas</i> y colina	4
1.2.1. Metabolismo de colina en <i>P. aeruginosa</i>	5
1.2.2. Transporte de colina	5
1.2.3. Osmoprotección.....	6
1.3. Mecanismo de infección.....	6
1.4. PchP	8
1.4.1. Gen <i>PchP</i>	9
1.4.2. Familia HAD.....	9
1.4.3. Estructura de PchP: mecanismo catalítico.....	10
1.4.4. Inhibición de PchP por compuestos de amonio cuaternario.....	12
1.5. Sitios de Interacción con amonio cuaternario.....	14
1.5.1. <i>h</i> PHOSPHO1 y <i>h</i> PHOSPHO2.....	14
1.5.2. CBPs de bacterias Gram positivas.....	15
Objetivo General.....	18
Objetivos Específicos.....	18
2. Materiales y Métodos	20
2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo	20
2.2. Construcción de pET15b- <i>pchP</i>	20
2.3. Transformación en <i>E. coli</i>	21
2.4. Extracción de DNA plasmídico.....	21
2.5. Mutación sitio-específica.....	22
2.6. Sobreexpresión y purificación de proteínas.....	23
2.7. Cuantificación de enzima.....	24
2.8. Determinación de actividad enzimática de PchP.....	24
2.9. Estudios Cinéticos.....	25
2.10. Estudios bioinformáticos.....	25
2.10.1. Modelado molecular	25
2.10.2. Relajación de PchP.....	25
2.10.3. Docking Molecular.....	26
3. Resultados y Discusión.....	28
3.1. Búsqueda de candidatos para mutagénesis sitio-específica.....	28
3.2. Caracterización cinética de PchP y variantes.....	30
3.2.1. <i>p</i> -NPP como sustrato.....	30
3.2.2. Pch como sustrato.	31
3.2.3. Pch como inhibidor.....	34

3.2.4. Inhibición por T4MA de PchP y variantes mutadas.....	35
3.2.5. Inhibición por BHDC.....	37
3.3. Modelado de PchP.....	39
3.4. Relajación del modelo	42
3.5. Docking	44
3.5.1. Pch y <i>p</i> -NPP.....	45
3.5.2. T4MA.....	47
3.5.3. BHDC.....	47
3.5.4. Colina y Betaína.....	48
3.5.5. Hexametonio y Decametonio.....	50
3.6. Consideraciones finales	52
4. Conclusiones.....	55
5. Bibliografía	57
6. Apéndice I	62
6.1. Scripts de modelado.....	62
6.1.1. Construcción del modelo con satisfacción de restricciones espaciales (model-addrsr.py)	62
6.1.2. Refinamiento de Loops (loop.py)	64
6.2. Scripts de relajación del modelo.....	65
6.2.1. Armado del Sistema.....	65
6.2.2. Relajación (NAMD)	67

Resumen

Fosforilcolina fosfatasa (PchP) de *P. aeruginosa* es una enzima involucrada en la infección que produce esta bacteria a nivel pulmonar y de otros órganos o tejidos. PchP pertenece a la superfamilia Haloácido Dehalogenasa (HAD) y cataliza la hidrólisis de fosforilcolina (Pch) con producción de colina y fosfato inorgánico. Aunque se conocen los residuos aminoacídicos del sitio catalítico de PchP involucrados en la unión de cationes divalentes y la porción fosfato del sustrato, los residuos implicados en la unión del amonio cuaternario (NR_4^+) aún son desconocidos. Con el objetivo de localizar y caracterizar posibles sitios de interacción entre PchP y el grupo NR_4^+ , se realizaron las mutaciones sitio-específicas E42A, E43A y $^{82}\text{YYY}^{84}$ por $^{82}\text{AAA}^{84}$ (3YA). Las enzimas mutadas presentaron importantes cambios en la afinidad por el sustrato y en la inhibición por Pch y otros compuestos de NR_4^+ , lo que permitió sugerir por primera vez la identidad y localización de los residuos aminoacídicos involucrados específicamente en la interacción entre PchP y el grupo amonio cuaternario. Al mismo tiempo, la construcción y el análisis del un nuevo modelo molecular de PchP posibilitó una mejor caracterización del sitio de unión de amonio cuaternario y mediante docking molecular, fue posible predecir nuevos residuos involucrados en la entrada y unión del sustrato y/o ligandos inhibidores: F⁸⁰, D⁹⁰, D⁹¹, V⁹³, C⁹⁴, Y⁹⁵, W⁹⁷ y A¹⁶⁷.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción:

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, ligeramente curvado, no esporulado y con flagelos polares. Se caracteriza por ser un microorganismo quimioorganótrofo oxidando la glucosa por la vía de Entner-Doudoroff. Es aerobio estricto, aunque puede crecer en anaerobiosis mediante la reducción del nitrato.

Al igual que los otros miembros de la familia *Pseudomonadaceae*, dentro del grupo de las γ -Proteobacterias, *P. aeruginosa* es un microorganismo ampliamente distribuido en el medio ambiente, y posee una gran versatilidad nutricional. Estas características son codificadas por genes que se encuentran en un único cromosoma circular, y el intercambio genético, crucial para la adaptación bacteriana, puede ser llevada a cabo por conjugación, transformación o transducción.

Si bien cuatro especies son consideradas patógenas para el humano, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *P. mallei* y *P. pseudomallei* (Fick, 1993), la primera presenta principal interés ya que es un patógeno oportunista que provoca graves infecciones en pacientes cuyo sistema inmune está comprometido o sus barreras primarias están afectadas, tales como víctimas con quemaduras o daño en el epitelio corneal. Una situación de especial importancia es que *P. aeruginosa* afecta a pacientes con fibrosis quística, constituyendo la principal causa de morbi-mortalidad en los mismos (Bodey *et ál.*, 1983).

Algunas características epidemiológicas a considerar son: i. más de dos tercios de los pacientes hospitalizados son colonizados por esta bacteria; ii. es el principal organismo Gram negativo productor de bacteriemia en centros médicos alcanzando un 60% de mortalidad; iii. aproximadamente dos tercios de las neumonías adquiridas en hospitales son debidas a *P. aeruginosa* (Fick, 1993).

La fibrosis quística (CF) es una enfermedad genética, de mayor incidencia en caucásicos. Las infecciones crónicas por *P. aeruginosa* están involucradas en el 90% de las muertes por CF por el desarrollo de falla respiratoria (Fick, 1993). El origen de esta enfermedad reside en un gen recesivo cuyo producto es un canal involucrado en el transporte de cloro: el “regulador de conductancia de transmembrana de CF” (CFTR). Este canal es regulado por adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y proteín quinasa A o

proteín quinasa C (PKA y PKC, respectivamente) (Lyczak *et ál.*, 2002). La mutación en este gen resulta en una falla en la función de las glándulas secretorias, las cuales liberan fluidos isotónicos al suero en lugar de hipotónicos como ocurre en glándulas secretorias normales.

Esto provoca una disminución en la respuesta inmune innata en las vías respiratorias bajas, lo cual sumado a la acumulación de fluido y mucus, predispone a los pacientes con CF a contraer infecciones pulmonares crónicas (Lyczak, *et ál.*, 2002), donde *P. aeruginosa* toma el primer lugar como patógeno.

P. aeruginosa produce además severas infecciones en pacientes que han sufrido algún daño en la piel a causa de quemaduras. La ruptura de esta barrera de defensa primaria, sumado a la presencia del microorganismo en diversos ambientes y más aún la aparición de cepas de *P. aeruginosa* multi-resistentes a antibióticos en los centros de atención médica, hace que los pacientes se enfrenten al patógeno antes que las heridas lleguen a ser sanadas (Lyczak, *et ál.*, 2000).

P. aeruginosa también es conocida por desarrollar queratitis ulcerosa en córnea, resultado de la inflamación en respuesta al patógeno (Lyczak, *et ál.*, 2000). Si bien esta infección está relacionada con heridas o traumas previos, se han reportado casos en pacientes que utilizan lentes de contacto blandos y que no presenten daño ocular (Lyczak, *et ál.*, 2000) asociando la infección a algún tipo de corrosión por el uso de lentes, que éstos alberguen a la bacteria, o bien faciliten la adherencia de la misma. Sumado a esto, *P. aeruginosa* posee múltiples factores de virulencia, tales como glicocálix, endo- y exotoxina, proteasa, flagelos y pili (Lyczak, *et ál.*, 2000) y la fosfolipasa C Hemolítica (Lisa *et ál.*, 2007).

1.2. *Pseudomonas* y colina

Colina es un compuesto de amonio cuaternario, de gran importancia en mamíferos por mantener la integridad de membranas celulares, ya que forma parte de la fosfatidilcolina, uno de los principales fosfolípidos de membrana. Además es necesaria en la transmisión nerviosa colinérgica, estando involucrada en la síntesis de acetilcolina. Por otro lado, colina es la principal fuente de metilos en la síntesis de S-adenosilmetionina. Colina puede encontrarse a su vez como dipalmitoil fosfatidilcolina en la sustancia surfactante de pulmón, como acetilcolina en el epitelio corneal, o como tal

en el tracto urinario (Berka y Vasil, 1982. Pesin y Candia, 1982. Kunin *et ál.*, 1992).

1.2.1. Metabolismo de colina en *P. aeruginosa*

Luego de la publicación del genoma completo de *P. aeruginosa* PAO1 (<http://v2.pseudomonas.com>; Winsor 2005) y tras trabajos de proteómica, se pudo confirmar que la bacteria metaboliza colina por medio de una serie de oxidaciones y desmetilaciones sucesivas (Figura 1) (Diab *et ál.*, 2006; Lisa *et ál.*, 2007). Los genes que codifican las enzimas involucradas en el segundo paso de desmetilación no han sido identificados aún, sin embargo el gen de la sarcosina oxidasa, último paso de desmetilación, ya ha sido descrito (Diab *et ál.*, 2006; Lisa *et ál.*, 2007).

Cuando *P. aeruginosa* crece en medio mínimo con acetilcolina, colina o betaína como fuente de carbono, se inducen 3 actividades enzimáticas: una actividad colinesterasa (ChE), una actividad de fosfatasa ácida (AcPase), ambas de localización periplásmica, y una actividad fosfolipasa C (PlcH) de localización extracelular, las cuales están ausentes en medios suplementados con fuentes preferenciales de carbono como glucosa, glicerol, lactato, acetato o succinato, fuentes preferenciales de carbono (Lucchesi *et ál.*, 1998, Lisa *et ál.*, 2007).

1.2.2. Transporte de colina

Cuando es utilizada como fuente de carbono y/o nitrógeno, colina es transportada a través de la membrana plasmática de *P. aeruginosa*, por un sistema de transporte activo, el cual es reprimido por succinato por un mecanismo independiente de cAMP y por fuente preferencial de nitrógeno (Salvano, *et ál.*, 1989). Colina también puede ingresar a la célula mediante un sistema constitutivo que funciona tanto en medios iso- como hiperosmolares (Lisa *et ál.*, 2007). Esta variedad en los sistemas de transporte podría explicarse por la presencia de tres posibles transportadores, BeT1 (Kappes *et ál.*, 1996), BeT2 y BeT3 (Andersen *et ál.*, 1988; Lamark *et ál.*, 1999); (Lisa *et ál.*, 2007).

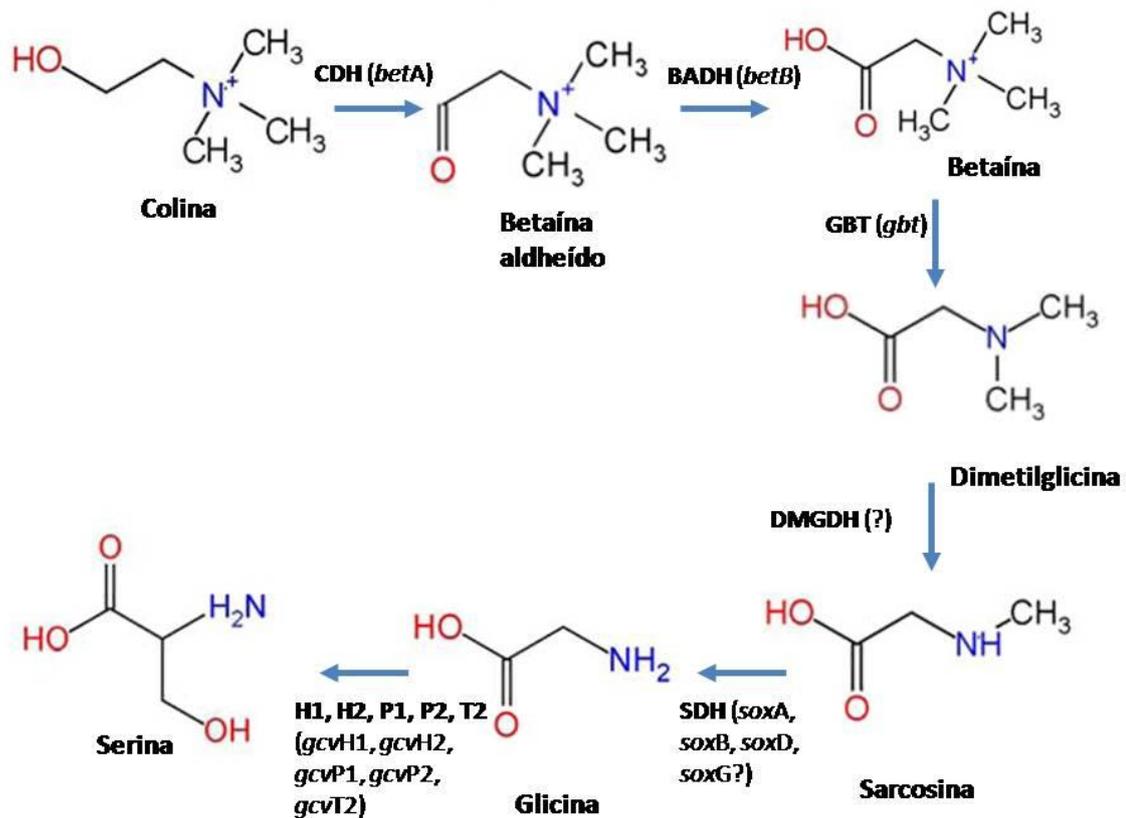


Figura 1: Metabolismo de colina. Se muestran los sucesivos pasos de oxidación y desmetilación hasta formar serina. Se detallan las enzimas correspondientes a cada paso y el gen que las codifica. Adaptado de Lisa *et. al.* 2007

1.2.3. Osmoprotección

Otro hecho de importancia es la alta tolerancia de *P. aeruginosa* a la hiperosmolaridad. Estudios sobre el crecimiento del microorganismo en dichas condiciones, han puesto de manifiesto el papel de colina como osmoprotector. En medios hiperosmolares la bacteria puede incorporar colina por vía constitutiva y a través de la oxidación a betaína (Figura 1); esta última podría acumularse en el interior de la célula cumpliendo la función de soluto compatible (Lisa *et ál.*, 1994a; Lisa *et ál.*, 1994b; Lisa *et ál.*, 2007).

1.3. Mecanismo de infección

Dado que colina es un compuesto abundante en mamíferos como el hombre, y que *Pseudomonas* puede tomar a colina mediante los sistemas de transporte mencionados e inducir la síntesis de diversas enzimas, entre ellas

PlcH, un importante factor de virulencia, en nuestro laboratorio desde hace varios años se viene estudiando la respuesta de *Pseudomonas* frente a colina.

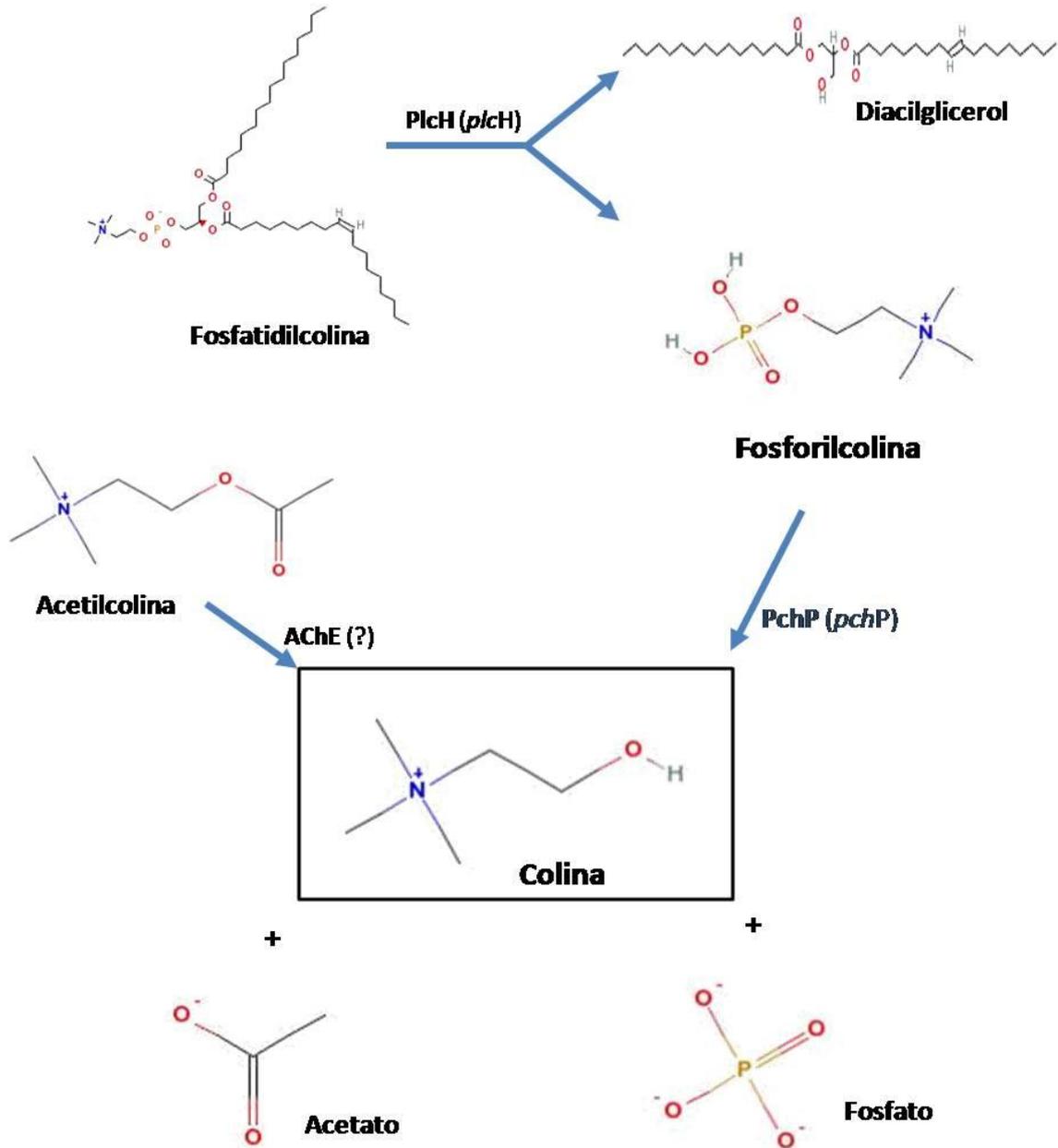


Figura 2: Mecanismo de infección propuesto para PlcH. Se muestran las enzimas correspondientes a cada paso y el gen que las codifica. Adaptado de Lisa *et ál.*, 2007

Fosfolipasa C Hemolítica (PlcH) fue descrita inicialmente como una enzima que se co-expresaba con una fosfatasa alcalina (AlkPase) cuando *P. aeruginosa* crecía en condiciones limitantes de fosfato (Liu 1979; Berka 1982). Estudios posteriores han indicado además que al igual que PchP, PlcH

es inducida por colina independientemente de la concentración de Pi, y puede hidrolizar a su vez fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (l-PC) o esfingomielina (Lisa *et ál.*, 2007). Dado que PC es un lípido mayoritario de membrana en mamíferos y que es el principal componente del surfactante pulmonar, se propuso un mecanismo de patogenicidad para *P. aeruginosa* en el cual PlcH actúa conjuntamente con PchP. PlcH hidroliza los fosfolípidos de membrana, dejando disponible Pch, que es hidrolizada por PchP liberando fosfato inorgánico y colina. De esta manera la bacteria se provee de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato necesarias para el crecimiento (Lisa *et ál.*, 2007). Dado que PchP es una enzima periplásmica (Garrido *et ál.*, 1990; Lisa *et ál.*, 2007, Beassoni, 2006a), una vez llevada a cabo la acción por PchP, colina sería incorporada inmediatamente por la bacteria, dándole una ventaja sobre las células del hospedador (Lisa *et ál.*, 2007).

1.4. PchP

Originalmente PchP fue descrita como una fosfatasa ácida (AcPase) capaz de hidrolizar *p*-NPP a pH 5,0 y en presencia de Mg²⁺. Además presenta una característica particular que la diferencia de otras fosfatasas: es inhibida por la presencia de colina, betaína o acetilcolina (Lisa *et ál.*, 2007). Se ha descrito actividad fosfatasa de estas características en otras *Pseudomonas* y en especies del género *Burkholderia* (Beassoni, 2006a), no así en otros microorganismos como *E. coli*, *Shigella flexneri* o *Salmonella typhimurum* (Lisa *et ál.*, 1984; Lisa *et ál.*, 2007). AcPase es también inhibida por Al³⁺ frente a ambos sustratos a pH 5,0 (Lisa *et ál.*, 2007). En presencia del sustrato *p*-NPP, el Al³⁺ parece interactuar en cuatro sitios (Beassoni, 2006a; Lisa *et ál.*, 2007) mientras que frente al sustrato Pch solo se detectó un sitio de interacción (Beassoni, 2006a; Lisa *et ál.*, 2007).

Cuando se realizaron curvas de saturación por sustrato, utilizando fosforilcolina (Pch) o fosforiletanolamina (Pet) a pH 5,0 y en presencia de Mg²⁺ 2mM, se observó un menor Km para Pch indicando que éste es mejor sustrato que Pet, por lo que AcPase se llamó fosforilcolina fosfatasa (PchP) (Garrido *et ál.*, 1990). Además, utilizando Pch como sustrato, la enzima es activa en un rango de pH entre 5,0 y 8,0 y presenta una típica inhibición por altas concentraciones de sustrato (Garrido *et ál.*, 1990; Lisa *et ál.*, 2007). Esto no ocurre con *p*-NPP, lo cual sugiere que la porción colina del sustrato fisiológico, es la involucrada en esta inhibición (Lisa *et ál.*, 2007).

1.4.1. Gen *pchP*

Teniendo en cuenta que PchP sería un factor de virulencia por inducir, mediante la producción de colina, la síntesis de PlcH, se prosiguió con el estudio intensivo de PchP y su gen codificante. Por un lado se llevaron a cabo mutaciones por inserción del transposón Tn5-751 y tras analizar más de 5000 tranconjugantes, se encontró un clon PchP⁻ incapaz de hidrolizar *p*-NPP o Pch a pH 5,0 en presencia de Mg²⁺, denominado JUF8-00 (Massimelli *et ál.*, 2005). Mediante el secuenciamiento de los 65 pb adyacentes al transposón, se encontró 100% de identidad con 65 pb del genoma publicado de *P. aeruginosa* PAO1, estando éste ubicado 341 pb corriente abajo del codón de iniciación ATG de PA5292 (gi9951606), revelando así la localización del gen que codifica para la síntesis de PchP (*pchP*). Esto fue confirmado con éxito mediante la clonación del gen completo *pchP* insertado en el plásmido pTYB12 expresándose en *E. coli* ER2566 como huésped heterólogo y por ensayos de complementación en la cepa JUF8-00 (Massimelli *et ál.*, 2005).

1.4.2. Familia HAD

Empleando herramientas de bioinformática, se localizaron en PchP tres motivos estructurales conservados en todos los miembros de la superfamilia haloácidodehalogenasas (HAD): Motivo I DXDX[T/V] en el extremo N-terminal, Motivo II [S/T]XX, y motivo III, K-[G/S]DXXX[D/N] (Koonin and Tatusov, 1994).

El primer aspártico del motivo I está involucrado en el ataque nucleofílico, y la lisina del motivo III interacciona directamente con la carga negativa del intermediario fosfo-aspartil del sustrato, permitiendo la estabilización del intermediario (Koonin and Tatusov, 1994). Por otra parte, el segundo aspártico del motivo I, y los aspárticos o la asparragina del motivo III, están involucrados en la formación del bolsillo de unión del magnesio, esencial para la catálisis. La serina o treonina del motivo II establece un puente hidrógeno con el fosfato del sustrato, permitiendo orientar el sustrato adecuadamente para el ataque nucleofílico y estaría involucrada en la desprotonación de una molécula de agua para hidrolizar el intermediario fosfo-aspartil (Selengut, 2001).

Tres grupos han sido diferenciados dentro de la superfamilia HAD según las distancias entre el motivo I y II, y entre el motivo II y III. El primero

consiste en un espaciamiento grande entre los motivos I y II, como es el caso de fosfonatasa, una haloácido halogenasa, una fosfoserina fosfatasa y una ATPasa tipo P (Selengut, 2001). El análisis de la estructura cristalográfica de estas enzimas, muestra este segmento dispuesto a manera de “cap” próximo al sitio activo, donde se cree que está involucrado en la unión y posicionamiento del sustrato. El segundo grupo consiste en un segmento largo entre el motivo II y III, el cual tendría una función análoga a la descrita para el grupo 1. En cambio, el tercer grupo no tiene segmentos largos entre ninguno de los motivos.

1.4.3. Estructura de PchP: mecanismo catalítico

Mediante el modelado molecular por threading utilizando el servidor 3D-PSSM (Kelley *et ál.*, 2000) con la enzima fosfoserina fosfatasa de *Methanococcus jannaschii* (*mjPSP*) como molde, se construyó un modelo de PchP y se identificaron los residuos críticos para la actividad, más específicamente aquellos que interaccionan con el grupo fosfato y el co-factor Mg^{+2} (Figura 3) (Beassoni *et ál.*, 2006b). *mjPSP* es una proteína dimérica (con subunidades A y B); cada monómero consiste en un dominio central α/β y un subdominio de 4 α -hélices (Wang *et ál.*, 2001). El primero, corresponde a 6 láminas- β dispuestas en paralelo, similar al plegamiento tipo Rossmann (1974) al igual que otros miembros de la superfamilia HAD (Wang *et ál.*, 2001). Del modelo molecular de PchP se desprende que el motivo I está constituido por $^{31}DMDNT^{35}$; $^{166}SAA^{168}$ forma el motivo II; y $K^{242}-^{261}GDTPDSD^{267}$ para el Motivo III (Beassoni *et ál.*, 2006b).

La relevancia de estos residuos fue demostrada por mutagénesis sitio-específica. Las mutaciones individuales de los aspárticos del motivo I (D31E y D33E) resultaron en mutantes totalmente inactivas, lo cual revela la importancia de estos residuos en la catálisis del sustrato, ya sea éste *p*-NPP o Pch, por lo que se propuso que D^{31} , está directamente involucrado en el ataque nucleofílico sobre el fosfato del sustrato, y que D^{33} participa en la reacción ácido base de la catálisis y en la fosforilación del D^{31} . De manera similar la mutación T35S presentó una fuerte disminución de la actividad. Mutaciones en K^{242} demuestran la importancia de la carga positiva de este residuo: cuando fue reemplazado por una arginina (K242R) la proteína mutada presentó actividad fosfatasa, pero cuando el residuo fue sustituido por glutamina (K242Q), ésta no presentó actividad alguna. La importancia

de la carga positiva de este residuo concuerda con lo propuesto por Koonin y Tatusov (1994)

Está determinado que los aspárticos del motivo III, D²⁶² y D²⁶⁷ tienen gran importancia en la actividad de PchP, ya que mutaciones en D262E y D267E resultan en una pérdida de actividad del 97% respecto de la proteína salvaje (WT); no así la mutación D265E que retiene un 70% de la actividad. Estos resultados concuerdan con el modelo ya que D²⁶⁵ está más alejado del bolsillo catalítico formado por los tres motivos, mientras que D²⁶² estaría coordinando el Mg²⁺ y D²⁶⁷ lo estabilizaría (Beassoni *et ál.*, 2006b).

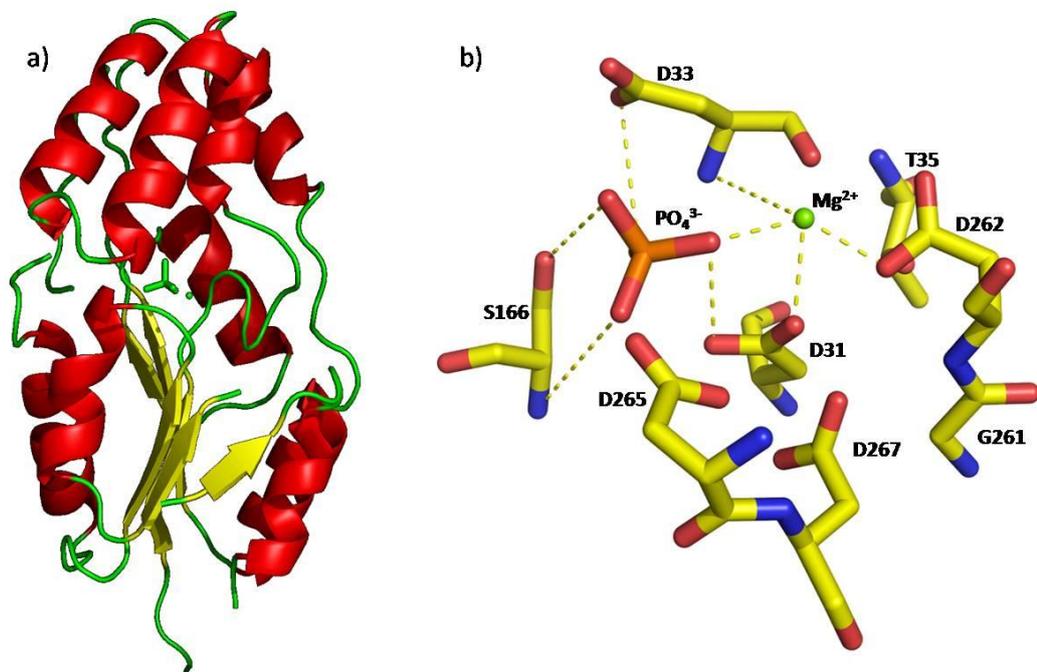


Figura 3: Modelo molecular de la proteína PchP obtenido a partir del cristal de *M. janaschii*: a) estructura secundaria de PchP y b) sitio catalítico y de unión al metal de PchP. Tomado de Lisa *et ál.*, 2007

En experimentos posteriores se demostró que la actividad de D262E y D267E fue incrementada 3 veces aproximadamente con el agregado de 20 mM de Mg²⁺, hecho que no ocurrió con la WT, lo que confirmaría su participación en el bolsillo de unión al cofactor Mg²⁺ (Beassoni *et ál.*, 2008a, Otero *et ál.*, 2010)

Sin embargo, al ser PchP de mayor tamaño que el molde, varios fragmentos no pudieron ser alineados, por lo que el modelo no cuenta con

ciertas zonas de la proteína. Por esta razón, dicho modelo presenta limitaciones en su aplicación más allá de la zona de catálisis.

1.4.4. Inhibición de PchP por compuestos de amonio cuaternario

La búsqueda del sitio de unión a colina en PchP, y por extensión en otras enzimas relacionadas en *P. aeruginosa*, es un tema que viene captando la atención del grupo desde hace un tiempo.

Inicialmente se conoció que PchP es inhibida por altas concentraciones del sustrato fisiológico Pch (Garrido *et ál.*, 1988, Lisa *et ál.*, 1984). En vista de esto se estudiaron otros compuestos de amonio cuaternario en PchP presente en extractos periplásmicos y se conoció que el grado de metilación del compuesto y la complejidad del mismo son aspectos importantes en la capacidad de inhibición (Garrido *et ál.*, 1988, Lisa *et ál.*, 1984).

Más recientemente, al comenzar a trabajar en la relación estructura/función de PchP recombinante, como parte del trabajo doctoral del Mic. Lisandro Otero, se llevo a cabo un estudio más profundo sobre la inhibición causada por diversos compuestos de amonio cuaternario frente a la actividad con el sustrato artificial *p*-NPP, empleando el método de Dixon (1979).

Se ensayaron compuestos de diferente complejidad y grado de metilación y se estableció el comportamiento de la inhibición en PchP-WT. Lo más relevante de este estudio es que todos los compuestos analizados producen inhibiciones parciales mixtas, preferentemente incompetitivas, indicando que el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo ES pero tiene más afinidad por este segundo. Sólo BHDC presento una inhibición mixta preferentemente competitiva, indicando que se uniría con mayor afinidad a la enzima libre compitiendo por el sitio con el sustrato (Beassoni *et ál.*, 2008b; Otero *et ál.*, 2008)

El mejor inhibidor es T4MA, probablemente por la simplicidad del compuesto y por la similitud estructural con la cabeza de amonio del propio sustrato.

Como parte de este estudio, también se conoció que los residuos involucrados en el sitio de unión a PO_4^{3-} o Mg^{+2} (D^{31} , D^{33} , T^{35} , D^{262} , D^{267}), no participan en la interacción con el NR_4^+ , debido a que sustituciones en estos residuos no afectan el perfil de inhibición por T4MA.

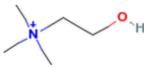
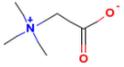
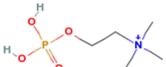
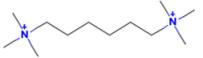
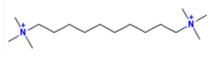
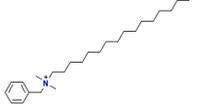
Se conoce que el grupo oxhidrilo de colina no es relevante en la inhibición ya que cuando es reemplazado por cloro (clorocolina) la inhibición

causada es idéntica. Sin embargo, sí parece ser importante la presencia de una carga negativa en ese grupo, ya que la inhibición por betaína es menos eficiente (Beassoni *et ál.*, 2008b; Otero *et ál.*, 2008).

Tomando todos estos antecedentes en conjunto, se emplearon en este trabajo los mejores inhibidores para el estudio cinético de las variantes mutantes de PchP y para llevar a cabo estudios de docking en PchP-WT.

En la Tabla 1 se resume el tipo de inhibición y las K_i de los compuestos empleados en este trabajo (Beassoni *et ál.*, 2008b; Otero *et ál.*, 2008).

Tabla 1: Inhibición de la actividad de PchP utilizando *p*-NPP por compuestos de amonio cuaternario

Inhibidor	Fórmula	Constantes de inhibición		Inhibición
		K_{iu} (mM)	K_{ic} (mM)	
Tetrametilamonio		0,035	0,17	Parcial Mixto prf Acomp.
Colina		0,10	0,89	Parcial Mixto prf Acomp.
Betaína		7,75	1,44	Mixto
Fosforilcolina		0,054 ($K_{0,5}$)		Sigmoidea; * n Hill \cong 2
Hexametonio		0,082	0,37	Parcial Mixto prf Acomp.
Decametonio		0,081	0,21	Parcial Mixto prf Acomp.
BHDC		0,97	0,17	Parcial Mixto prf Comp.

1.5. Sitios de Interacción con amonio cuaternario

A pesar de conocer en detalle los residuos involucrados en la interacción con el grupo fosfato del sustrato y el metal divalente, dada la escasa homología entre PchP y *mjPSP* (11% identidad), los reiterados intentos de encontrar los aminoácidos que interaccionen con compuestos de amonio cuaternario o con la porción colina de Pch, no han sido exitosos. Si bien las mutaciones descritas anteriormente presentan modificaciones a nivel de las constantes catalíticas, no se han observado cambios importantes en las afinidades respecto a compuestos de amonio cuaternario.

1.5.1. *hPHOSPHO1* y *hPHOSPHO2*

hPHOSPHO1 y *hPHOSPHO2* son dos enzimas humanas clasificadas también dentro de la superfamilia HAD, las cuales han sido implicadas en la generación de fosfato inorgánico para la mineralización del tejido óseo. *hPHOSPHO1* es capaz de hidrolizar Pet y Pch, teniendo mayor afinidad por la primera, mientras que *hPHOSPHO2* hidroliza una gran variedad de fosfoésteres, entre ellos piridoxal 5-fosfato, pero no hidroliza Pch ni Ps (Roberts *et ál.*, 2004, 2005). Al igual que PchP, estas enzimas fueron modeladas en base a la estructura de *mjPSP* con un 19,4% para *hPHOSPHO1* y 18,0% para *hPHOSPHO2*. Mediante el análisis de docking molecular con sus respectivos sustratos, D⁴³, D¹²³, E³⁵, D⁴⁴, Y⁷¹ y A¹²⁴ para *hPHOSPHO1* y los equivalentes D¹⁹, D⁹⁹, N¹¹, T²⁰, F⁴⁷ y S¹⁰⁰ para *hPHOSPHO2* han sido propuestos como residuos que interactúan directamente con el sustrato, además de aquellos que conforman los tres motivos de la Superfamilia HAD. Mutaciones en D⁴³ y D¹²³ de *hPHOSPHO1* demostraron la importancia de los mismos ya que ambas mutantes presentaron una disminución drástica en la actividad específica para Pet y Pch, más aun en la mutante sobre D43, no se observó actividad frente a Pch. Teniendo en cuenta estos resultados, ambos residuos fueron implicados en la interacción directa con Pch y Pet. Un hecho a destacar, son las cargas de los residuos localizados en la posible entrada del sustrato, siendo negativa en el caso de *hPHOSPHO1* conteniendo un glutámico (E⁶⁵) y positiva para *hPHOSPHO2* presentando una lisina (K⁴¹), por lo que estos residuos podrían estar involucrados también en la especificidad del sustrato.

1.5.2. CBPs de bacterias Gram positivas

En *Streptococcus pneumoniae* se han identificado numerosas “proteínas unidoras de colina” (CBP). Inicialmente fueron descritas diversas enzimas líticas de la pared celular. La primera en ser descubierta fue la amidasa de pared celular, la cual requería la interacción de la enzima con los residuos de colina del ácido teicoico de la pared celular. Luego esta enzima se purificó y caracterizó, encontrando que era inhibida por ácido lipoteicoico, cumpliendo un rol fisiológico en la regulación *in vivo* de la autolisina. Además, se demostró que la presencia de colina o fosfocolina, bloqueaban la adsorción de la enzima a la pared celular de los pneumococos e inhibían de manera no competitiva, la actividad enzimática, mientras que otros aminoalcoholes como etanolamina o derivados no tuvieron efecto alguno (García 1998). También se postuló que la enzima presenta una porción con actividad catalítica y una porción involucrada en el reconocimiento de la colina.

Por delección del gen *lycA*, codificante para la amidasa de pared celular, se logró la identificación de otra peptidoglucano hidrolasa, la glucosaminidasa de pared celular, la cual también requería colina del ácido teicoico para su actividad. También se ha encontrado una lisina codificada por el fago de pneumococo Dp-1, involucrada en la liberación del fago progénico dependiente de colina; como lo son también lisozimas de los fagos Cp-1, Cp-7 y amidasas de los bacteriófagos temperados HB-3 y EJ-1. Otras proteínas unidoras de colina también han sido reportadas en *Streptococcus pneumoniae*, la mayoría descritas como factores de virulencia. Algunos ejemplos son: PcpA, implicada en la interacción proteína-proteína o proteína-lípido; PspA (proteína de superficie de pneumococo A) inhibe factores del complemento, donde los residuos de colina servirían en la fijación de la enzima a la superficie del pneumococo; CBPA, una adhesina de superficie celular que se une a ácido siálico, o interfiere con la respuesta inmune uniéndose al receptor polimérico de Ig, a C3 o Factor H del complemento; CBPD, CBPE y CBPG han sido involucradas en la adhesión al epitelio nasofaríngeo (Garau 2005).

El alineamiento entre *lycA* y *cplI* (que codifica para la lisozima del fago Cp-1), mostró homología en los C-terminales de ambas proteínas, sugiriendo esta región como la responsable en el reconocimiento de los residuos colina, conformando el Dominio de Unión a Colina (CBD).

La estructura primaria del CBD consta de un número variable repetido de un péptido de 20 a 22 aminoácidos. Ambos contienen 6 repeticiones de esta

secuencia en su C-terminal, y la formación de híbridos N-LycA-C-Cp11 y N-Cp11-C-LycA produjo enzimas totalmente activas, mientras que la expresión en *E. coli* de C-terminales mostraron alta afinidad por colina en ambos casos, confirmando la función del dominio. Estas enzimas junto a las otras CBPs mencionadas más arriba, constan de un dominio N-terminal el cual contiene el núcleo catalítico y dan la especificidad por el sustrato junto al dominio de unión a colina (CBD) C-terminal (Garau, 2005) con repeticiones de la secuencia consenso (GWX₆WYYX₄GXX₂).

Se han encontrado también CBPs en otros organismos Gram (+), tal como la “Proteína Secretada por Clostridium” (CspA) de *Clostridium acetobutylicum*, las cuales poseen la misma secuencia consenso de *S. pneumoniae*. Incluso se ha demostrado que *C. saccharoperbutylacetonicum*, al igual que el pneumococo, presenta colina como componente del ácido teicoico (Sanchez-Beato 1994).

Si bien se han descrito proteínas que unen colina (CBPs) en bacterias Gram (-), como ChoX de *Sinorhizobium meliloti* (Dupont *et ál.*, 2004), no se ha caracterizado un dominio consenso de unión a colina.

OBJETIVOS

Objetivo General

Mediante herramientas bioquímicas, bioinformáticas y computacionales se pretende la caracterización funcional de fosforilcolina fosfatasa (PchP) de *Pseudomonas aeruginosa*. Esto permitirá realizar aportes en el conocimiento de su mecanismo catalítico en detalle. Este objetivo se encuentra enmarcado en un plan de mayor ambición donde se pretende establecer las bases estructurales, moleculares y bioquímicas para el desarrollo “in silico” de fármacos que permitan controlar este y otros factores de patogenicidad de *P. aeruginosa* estudiados en el laboratorio.

Objetivos Específicos

- ✓ Aprendizaje de técnicas básicas de biología molecular, bioquímica y sobreexpresión de proteínas en huésped heterólogo.
- ✓ Localización de la zona de interacción con el grupo amonio cuaternario mediante el uso de herramientas de bioinformática y mutagénesis sitio-específica.
- ✓ Detección de zonas críticas para la especificidad de sustrato.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y Métodos

2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Como cepas de expresión se emplearon *E. coli* BL21 codonPlus (Stratagene), huésped para los vectores de expresión de la serie pET. Los plásmidos utilizados fueron pTYB-*pchP*₃₂₇, construido anteriormente en nuestro laboratorio (Beassoni *et ál.*, 2006b) del cual se obtuvo el gen *pchP* y el plásmido de la serie pET15b. Las bacterias se cultivaron en medio LB para mantenimiento y la sobreexpresión se llevó a cabo en LB suplementado con IPTG o lactosa como se detalla posteriormente. En cada caso necesario se adicionaron los antibióticos correspondientes.

2.2 Construcción de pET15b-*pchP*

Una suspensión de plásmido pTY-*pchP*₃₂₇ fue digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Nde* I (según indicaciones del fabricante, Promega®) con el objeto de obtener el gen *pchP*. El producto de la digestión fue resuelto por electroforesis en gel de agarosa 0,8% y el fragmento correspondiente al gen *pchP* fue extraído del gel utilizando el kit GeneClean (Quiagen). Idéntico procedimiento se llevó con pET15b, purificándose el fragmento correspondiente al plásmido linealizado.

El plásmido pET15b y el fragmento correspondiente al gen *pchP* fueron incubados en presencia de T4 DNA ligasa (Promega) durante toda la noche a 4 °C. La mezcla de reacción fue introducida por transformación en *E. coli* XL10. El plásmido recombinante fue extraído de los clones transformantes (Figura 4) como se describe a continuación.

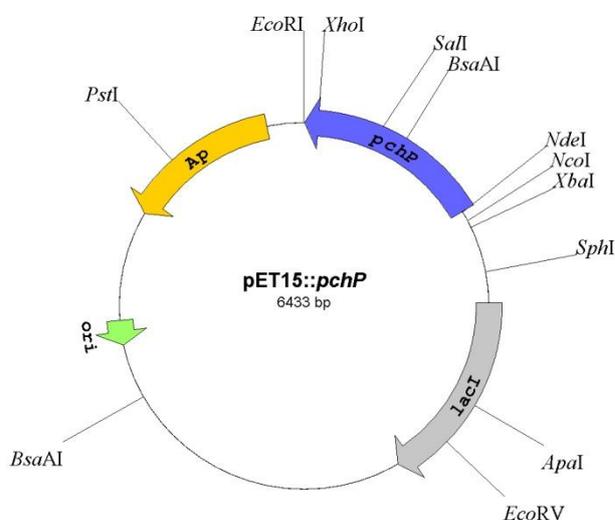


Figura 4: Plásmido pET15b-*pchP*. El mismo presenta un gen de resistencia a ampicilina (naranja), el gen represor *lacI* (gris) y un ori derivado de ColE1 (verde). El gen *pchP* fue clonado en los sitios *Nde* I y *EcoR* I (azul).

2.3 Transformación en *E. coli*

La transformación de *E. coli* con DNA plasmídico se llevó a cabo según los protocolos descritos en Sambrook y Russell (2001). Las células competentes fueron incubadas con el DNA a transformar durante 30 min en hielo. Posteriormente las células fueron sometidas a un shock térmico a 42 °C durante 90 segundos. Luego de una incubación en frío durante 2 min, las células se recuperaron durante 1 hora a 37 °C en un volumen final de 1 ml de medio LB para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina que se utilizó para seleccionar las colonias transformantes. Luego de la recuperación se sembraron diferentes alícuotas de la mezcla de transformación según correspondiera, en placas de LB agar suplementadas con ampicilina 150 µg/ml y se incubaron toda la noche a 37 °C.

2.4 Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción de DNA plasmídico libre de fenol y con calidad para secuenciamiento se utilizó el kit de Promega[®] o la técnica de extracción alcalina como se describe a continuación. Alícuotas de 1,5 – 3 ml de cultivo crecido hasta fase estacionaria fueron cosechadas durante 3 min a 8.000 rpm. El precipitado celular se resuspendió en 200 µL de solución P-1 (Buffer Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM) y se agregó 6 µL de 10 mg.mL⁻¹ de RNAsa. A la mezcla se le adicionó 200 µL de solución de lisis P-2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y se homogeneizó por inversión hasta clarificación. Posteriormente se neutralizó la mezcla mediante el agregado de 200 µL de solución P-3 (AcK 3 M pH 4,8) mezclando por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Luego de centrifugar la mezcla a velocidad máxima durante 3 minutos, el sobrenadante fue tratado con 300 µL de cloroformo y agitación vigorosa para eliminar restos de proteínas. La mezcla se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos y el DNA presente en el sobrenadante fue precipitado mediante el agregado de 500 µL de isopropanol seguido de una incubación de 10 minutos a -20 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos. El precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 32 µL de agua bidestilada estéril. El DNA fue reprecipitado mediante el agregado de 8 µL de 4 M NaCl y 40 µL de 13% PEG e incubación en hielo durante 1 hora. Luego se centrifugó durante 30 minutos a velocidad máxima y el precipitado obtenido (translúcido) se lavó con etanol 70% y luego de secar el precipitado final se resuspendió en 20-30 µL

de agua bidestilada estéril. Se obtuvieron preparaciones de aproximadamente 200 ng. μL^{-1} de plásmido libre de proteínas y RNA.

2.5 Mutación sitio-específica

Las mutaciones sitio-específicas se llevaron a cabo utilizando el kit "QuickChange XL-Site-Directed Mutagenesis Kit" de Stratagene. Este kit permite la introducción de una mutación puntual por sustitución, inserción o delección de uno o varios aminoácidos utilizando como DNA molde cualquier tipo de plásmido de hasta 10 Kb y un par de oligonucleótidos mutagénicos los cuales se muestran en la Tabla 2. Para cada reacción se utilizó como DNA molde el plásmido pET15b::*pchP-wt*.

Para la introducción de las mutaciones se utilizó la mezcla de reacción:

pET15b- <i>pchP</i> :	3 μl (30 ng)
Primer a y b:	1 μl c/uno (125 ng)
dNTP mix 50X:	1 μl
Buffer de reacción 10X:	5 μl
QuickSolution™:	3 μl
H ₂ O _{bd} :	34 μl
PfuTurbo® DNA pol:	1 μl

Se emplearon las condiciones de ciclado:

1. 1 ciclo de 95°C durante un minuto.
2. 18 ciclos de 50 seg a 95°C, 50 seg a 60°C y 13,5 min (2 min x 6,7, donde 6,7 Kb es el tamaño del plásmido y se requieren 2 minutos por Kb).
3. 1 ciclo de 7 min a 68°C.

La cadena parental (wt) fue digerida mediante el agregado de 1 μl de *Dpn* I a 37°C durante 2 hs. El producto de esta reacción fue transformado en *E. coli* XL10-Gold.

Al menos 3 clones de cada mutante fueron secuenciados parcialmente (Macrogen Inc, Korea) para corroborar la existencia de la mutación deseada y analizados mediante Codon Code Aligner

Tabla 2: Primers utilizados en la mutación sitio-específica para la obtención de mutantes

Enzima	Secuencia de oligonucleótidos mutagénicos*
3YA	5'-GGAGAGCCTGTTTCAGC <u>GCCGCCGCC</u> CGGCTTTGCGAGATCG-3'
E42A	5'-CGCTACGACCTGG <u>CA</u> GAAATCGCTGCTGC-3'
E43A	5'-CTACGACCTGGA <u>AGCA</u> TCGCTGCTGCCC-3'

*Se utilizaron un par de primers complementarios para cada mutante, mostrándose solo la secuencia codificante. El cambio en la secuencia se muestra subrayado y resaltado en negritas.

2.6 Sobreexpresión y purificación de proteínas

La sobreexpresión de las diferentes variantes proteicas N-terminal a colas de histidinas fue llevada a cabo en *E. coli* BL21 codonPlus. Inicialmente de las colonias obtenidas de la transformación en *E. coli* BL21, se seleccionaron 10 colonias de cada mutante y WT, y se verificó la expresión de la proteína de interés a pequeña escala (5 ml de medio de cultivo LB Amp¹⁵⁰). Las muestras inducidas con IPTG y sin inducir fueron procesadas con SDS, sonicadas y analizadas por electroforesis, donde se seleccionó aquella colonia con mayor expresión de la proteína correspondiente.

Las colonias seleccionadas fueron crecidas en 2 litros de LB suplementado con Amp¹⁵⁰ y glucosa 0,5% a 37°C e inducidas luego con IPTG 0,4 mM manteniendo temperatura de 18°C y agitación suave durante toda la noche.

Los cultivos sobreexpresados como se describe anteriormente, fueron cosechados por centrifugación a 5000 rpm 10 min. El precipitado celular fue resuspendido en solución Tris-HCl 33 mM pH 8,0, en un volumen tal que resulte concentrado 30 veces respecto del cultivo inicial. Se realizó una segunda centrifugación a 5000 rpm 10 min, con el fin de eliminar sustancias no deseadas del medio. El pellet fue resuspendido nuevamente en igual volumen de Tris-HCl 33 mM pH 8,0, y se le agregó suavemente igual volumen de solución de Shock Osmótico y lisozima, y se incubó durante 15 min en agitación suave. Tras una nueva etapa de centrifugación se recuperó el sobrenadante y al pellet se le adicionó de manera rápida 6 ml de solución fría de Cl₂Mg 1 mM y fue resuspendido, dejándolo incubar 10 min en hielo. Seguido a esto, se procedió a realizar una ruptura mecánica de las células sensibilizadas por sonocado en tres series de 2 min a intervalos de 5 seg y potencia de 30-40 Watts cada una, en hielo para prevenir la

desnaturalización de proteínas por calor. Luego se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 20 min. El sobrenadante fue recuperado como extracto celular (EC) y el pellet conteniendo proteínas insolubles y restos de membrana fue resuspendido para analizar luego por SDS-PAGE. Se observó la presencia de la proteína de interés en las distintas fracciones y se prosiguió la purificación con la o las fracciones que contengan la proteína de interés.

La fracción se incubó durante toda la noche a 4 °C con la resina de Ni²⁺-NTA, permitiendo la unión de la proteína de interés a la resina. Posteriormente la resina fue empaquetada en una columna vacía, para realizar la elución, se recogió la primera fracción como FT, y se continuó con un lavado con 20 volúmenes (de resina) de solución L-1 (Tris-HCl 10 mM ClNa 300 mM, Imidazol 20 mM). Una vez realizado, se prosiguió a la elución de la proteína de interés con el agregado de BE (buffer de elución) el cual contiene 200 mM de Imidazol. El eluido se separó entre 5 y 10 fracciones y todas ellas junto a EC, FT y L-1 además de la resina se analizaron por SDS-PAGE, para analizar la presencia de proteína de interés utilizando marcadores de peso molecular como referencia.

2.7 Cuantificación de enzima

Las muestras fueron analizadas por espectrofotometría a 280 nm respetando la ley de Lambert-Beer utilizando un $\epsilon^{280}=1.775 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ obtenida por la herramienta ProtParam, (www.expasy.ch/tools/protparam.html).

2.8 Determinación de actividad enzimática de PchP

La actividad PchP se midió con *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) como sustrato artificial o fosfocolina (Pch) como sustrato natural a pH 5,0, Mg⁺² 2 mM y 37 °C como se describe en Salvano and Domenech (1999). La mezcla de reacción contuvo 100 mM de buffer HAc/NaAc pH 5,0; 2mM MgCl₂ y cantidades variables de sustrato según correspondiera. Cuando el sustrato utilizado fue *p*-NPP, la reacción se detuvo mediante el agregado de 500 µL de 2 N NaOH y el producto *p*-nitrofenol (*p*-NP) fue cuantificado mediante absorción a 410 nm. Cuando el sustrato fue Pch, la reacción se detuvo mediante el agregado de 150 µl de reactivo Verde de Malaquita según Baykov *et ál.* (1987) y se midió en espectrofotómetro a 630 nm.

2.9 Estudios Cinéticos

La actividad fue medida con *p*-NPP y Pch como sustratos, tal como se describe en Garrido *et ál.* (1988) y Domenech *et. ál.* (1991). El análisis de los datos cinéticos se realizó como en trabajos previos (Garrido *et ál.*, 1988, Domenech *et ál.*, 1992, Salvano y Domenech, 1999) y según lo indicado en Dixon (1979); Cornish-Bowden (1995) o Antunes (2003), y posteriormente analizados mediante el software DynaFit (Kuzmic 1996) tal como se describe en Otero *et. ál.* (2010). Los parámetros analizados fueron K_m , velocidad máxima (V_{max}), K_{cat} , y parámetros de inhibición (K_i y $K_{s,i}$).

2.10 Estudios bioinformáticos

2.10.1 Modelado molecular

El modelado se realizó mediante una combinación de métodos de threading combinado con modelado comparativo satisfaciendo restricciones espaciales con Modeller (Sali y Blundell, 1993). Se aplicaron restricciones según la estructura secundaria predicha por threading. Tres zonas fueron descartadas para el modelado: regiones ⁵⁷R-L⁶⁶; ¹²¹G-A¹³⁵; ²⁰⁵G-R²²³.

Se realizaron con Modeller 1000 modelos que fueron analizados mediante los criterios GA341 y DOPE “score” (medidas energéticas) y visualmente teniendo en cuenta el cumplimiento de las restricciones asignadas. Posteriormente se refinaron cada uno de los loops individualmente, obteniéndose 200 conformaciones de cada uno y seleccionando según GA341 y DOPE “score”.

En el apéndice 1 se muestran los diferentes “scripts” empleados para el modelado comparativo con Modeller.

2.10.2 Relajación de PchP

La relajación de PchP se realizó por dinámica molecular mediante el empleo del software NAMD (Philips *et ál.*, 2005). Las condiciones de esta dinámica fueron creadas utilizando VMD (Humphrey *et ál.*, 1996) como soporte, en donde la proteína se encuentra en una caja de agua de 90 Å aproximadamente, y una concentración de NaCl simulando la fuerza osmótica del periplasma (170 mM ó 340 mOsm). Inicialmente se realizó un paso de minimización de la energía libre, seguido de la dinámica molecular de 1 ns a 37°C. Además se le agregó una restricción de 0,5 Kcal/mol.Å a la cadena principal (C, O, C α y N), y una restricción de 1,0 Kcal/mol.Å a los aminoácidos ya descriptos que forman el sitio catalítico (D³¹ D³³ T³⁵ S¹⁶⁶ K²⁴²

G²⁶¹ D²⁶² D²⁶⁷) y de unión a magnesio. En esta dinámica también fueron incluidos el metal Mg⁺² y el sustrato Pch.

En el apéndice 1 se muestran los “scripts” empleados para los cálculos de dinámica molecular con NAMD.

2.10.3 Docking Molecular

Los ensayos de docking rígido fueron realizados utilizando el software Molsoft ICM (Pro v3.4-8), utilizando como macromolécula al modelo de PchP obtenido en este trabajo. Las estructuras de los diferentes ligandos empleados se obtuvieron de la biblioteca PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Las imágenes de modelos moleculares se llevaron a cabo con PyMol (DeLano, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Resultados y Discusión

3.1 Búsqueda de candidatos para mutagénesis sitio-específica

Inicialmente, para buscar posibles candidatos de residuos que interactúen con el amonio cuaternario de Pch, se tuvieron en cuenta 2 aspectos: a) la comparación de PchP con dos proteínas humanas, *hPHOSPHO1* y *hPHOSPHO2*; y b) los CBDs de bacterias Gram positivas.

Para el primer enfoque se debe recordar que *hPHOSPHO1* y *hPHOSPHO2* son 2 enzimas pertenecientes a la superfamilia HAD y tienen diferente especificidad de sustrato. *hPHOSPHO1* al igual que PchP hidroliza Pch y Pet, no así la *hPHOSPHO2*. Se realizó un alineamiento entre las 3 secuencias proteicas para encontrar características similares entre PchP y *hPHOSPHO1* que no estén presentes en *hPHOSPHO2*, en un intento por detectar residuos involucrados específicamente en la interacción con el amonio cuaternario del sustrato.

Roberts *et ál.* (2005) describieron a los residuos D43 y D123 de *hPHOSHO1* como responsables de interaccionar con Pch y Pet específicamente, ya que la sustitución de estos residuos por asparragina causa la pérdida de actividad. En busca de residuos conservados a éstos en PchP, se llevó a cabo el alineamiento entre las 3 enzimas empleando ClustalX (Larkin *et ál.*, 2007) que se muestra en la Figura 5. Allí puede verse que PchP posee un residuo ácido en posición equivalente a D43 de *hPHOSPHO1* (E⁴²), pero también este residuo se encuentra presente en *hPHOSPHO2* (D¹⁹), por lo que resulta razonable pensar que no es este residuo el responsable de la diferente especificidad entre *hPHOSPHO 1* y 2.

Respecto al residuo D¹²³ de *hPHOPSHO1*, PchP no posee un residuo ácido en esa posición, (A¹⁶⁷). En adición, *hPHOSPHO2* presenta un aspártico (D⁹⁹), por lo cual tampoco pareciera ser un residuo que defina la especificidad de sustrato.

A pesar de que Roberts *et ál* (2005) observan pérdida de la actividad de *hPHOSPHO1* al mutar los residuos D⁴³ y D¹²³, pareciera ser un efecto global, que afecta al sitio catalítico y no un efecto específico que afecta la interacción directa con el amonio cuaternario de Pch o Pet. Por lo tanto el residuo equivalente en esta posición en PchP (A¹⁶⁷) se descartó inicialmente para estudios de mutagénesis.

Una observación muy interesante que se desprende del alineamiento múltiple (Figura 5) es el residuo aspártico D⁴⁴ de *hPHOSPHO1*, uno de los

residuos que Roberts *et ál.* (2005), mediante ensayos de docking, definen como parte del bolsillo de unión al sustrato. PchP tiene como equivalente a E⁴³, mientras que hPHOSPHO2 en dicha posición no es ocupada por un residuo ácido (T²⁰), por lo cual es razonable suponer que ese residuo ácido pueda estar involucrado en la especificidad por Pch y Pet. De este modo, E⁴³ fue el principal candidato seleccionado para ser sometido a mutagénesis.

Ambos residuos seleccionados, E⁴² y E⁴³, fueron sometidos a mutagénesis no conservada siendo sustituidos por residuos de alanina para obtener las variantes mutadas E42A y E43A, como un primer acercamiento para definir su relevancia en la función de PchP.

Motivo I		.**:**	: : :		
	hPHOSPHO1	-GAPRFLLTDFDFDETIVDENS	DD	SIVR--	48
	hPHOSPHO2	---MKILLVDFDFNTIIDDNS	DT	WIVQCA	26
	PchP	NANKGAYAVFDMNTSYRYDL	EE	SLLPYL	49
Motivo II		:	:: ** :	:	
	hPHOSPHO1	FVAKQGACFEVILISDANTFGV	ESS	LRAA	137
	hPHOSPHO2	FIRKNKDKFDCIIISDSNSVF	ID	WVLEAA	113
	PchP	YNKLMENGIEVYVISAAHEEL	VR	MVAADP	180
Motivo III		.	:: ** :	*	
	hPHOSPHO1	DGVHFERLFYVGDGAN-DF	CP	MGLLAGG	217
	hPHOSPHO2	QGVNYTQIVYIGDGGN-DV	CP	VTFLKND	193
	PchP	IDRWKRPILVAGDTPDS	SD	GYMLFNGTAE	278

Figura 5: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de hPHOSPHO1, hPHOSPHO 2 y PchP. Se observa positividad entre D⁴³ de hPHOSPHO1, D¹⁹ de hPHOSPHO 2 y E⁴² de PchP. Es necesario destacar el glutámico E⁴³ adyacente a E⁴² de PchP, el cual es similar a D⁴⁴ de hPHOSPHO1 pero difiere del T²⁰ de hPHOSPHO2.

En un segundo enfoque para detectar residuos de aminoácidos involucrados en la interacción con NR₄⁺, se comparó la secuencia de aminoácidos de PchP con las proteínas unidoras de colina de las bacterias Gram (+). Como se mencionó en la introducción estas proteínas se caracterizan por tener un CBD (dominio de unión a colina) constituido por una repetición de una secuencia consenso, en la cual 3 residuos aromáticos interactúan directamente con colina (Figura 6). El alineamiento mediante el algoritmo ClustalX del CBD completo o sólo un motivo aislado con PchP no permitió evidenciar tales residuos. Sin embargo se observó una región

formada por tres residuos aromáticos contiguos de tirosina, ⁸²YYY⁸⁴, y un alineamiento parcial con la secuencia consenso del motivo del CBD, por lo cual, estas tirosinas fueron sustituidas por alaninas simultáneamente, resultando en la proteína mutada denominada 3YA.



Figura 6: Alineamiento entre la secuencia consenso del dominio de unión a colina (CBD) en bacterias Gram (+). El triplete WYY es el que interacciona directamente con colina. Si bien PchP no contiene esta secuencia, posee tres tirosinas consecutivas análogas al triplete WYY (arriba).

3.2 Caracterización cinética de PchP y variantes

3.2.1 *p*-NPP como sustrato

Cuando se ensayó la actividad de PchP frente a *p*-NPP, se observó un modelo catalítico típico michaeliano (Figura 7a), presentando un $K_m=1.52$ mM y una $K_{cat}=87.1$ s⁻¹ (Tabla 3).

De manera comparativa con las actividades observadas en PchP-WT, se observó que tanto las sustituciones 3YA y E43A muestran una disminución significativa en el K_m de casi tres veces respecto a la proteína silvestre (WT) (Tabla 3), indicando un aumento de la afinidad por *p*-NPP, y más aún, en el caso de E43A se ve aumentada la eficiencia catalítica para este sustrato. Esto puede deberse a que en WT, estos residuos se encuentran en el bolsillo de unión del sustrato, y su presencia podría afectar estéricamente la entrada del mismo. Esto no ocurriría en las mutantes que en dicha posición tienen un residuo de alanina, cuya cadena lateral significativamente menor facilitaría el acomodamiento del anillo fenólico de *p*-NPP. Con respecto a E42A se observó un ligero aumento en K_m y la disminución de K_{cat} a más de la mitad comparada con PchP-WT (Tabla 3).

Además, Pch podría unirse nuevamente al complejo ES, esta vez formando un complejo inactivo SES, con una constante de inhibición $K_{si}=385,05 \mu\text{M}$. Esto sugiere dos sitios de unión para Pch, uno funcionando como sustrato y otro produciendo inhibición a altas concentraciones. Si bien se observa una constante catalítica mayor para *p*-NPP, la gran diferencia en la afinidad por este sustrato en más de 200 veces, permite que PchP sea más eficiente con su sustrato natural, como se muestra en la Tabla 3.

La actividad enzimática de cada variante fue también ensayada frente a sustrato natural, Pch. Curvas de saturación con este sustrato (Figura 10), mostraron que las tres variantes mutadas presentaron cambios significativos con respecto a PchP-WT en el sitio de unión al sustrato. Esto fue evidenciado por el aumento en el K_m para las tres mutantes, siendo más importante para E43A y 3YA. Es importante destacar que tanto 3YA como E42A presentaron un fuerte aumento en el K_{si} , y más llamativo aún no pudo observarse inhibición por altas concentraciones de sustrato para E43A, presentando una curva típica michaeliana (Tabla 3 y Figura 10c).

Tabla 3 Caracterización cinética de PchP y variantes mutadas con *p*-NPP y Pch

Constantes cinéticas	WT	3YA	E42A	E43A
<i>p</i> -NPP				
K_m (mM)	1,52 ± 0,06	0,51 ± 0,10	1,90 ± 0,45	0,56 ± 0,05
K_{cat} (s ⁻¹)	87,1 ± 4,6	6,70 ± 0,69	38,8 ± 6,0	79,6 ± 7,6
Ef (s ⁻¹ ·μM ⁻¹)	0,0572 ± 0,0051	0,0133 ± 0,0013	0,0214 ± 0,0082	0,1410 ± 0,0019
Pch				
K_m (μM)	6,89 ± 0,44	36,25 ± 5,33	23,78 ± 3,65	35,66 ± 2,46
K_{cat} (s ⁻¹)	46,31 ± 1,82	6,50 ± 0,95	79,38 ± 7,03	20,08 ± 1,47
Ef (s ⁻¹ ·μM ⁻¹)	6,7	0,17	3,34	0,56
K_{si} (μM)	385,05 ± 60,88	7525,33 ± 1458,85	4500,50 ± 1041,66	n.d.

La actividad fue medida en presencia de 2 mM de MgCl₂ con concentraciones de *p*-NPP que van desde 0,25 a 8 mM de *p*-NPP como sustrato artificial; o concentraciones de Pch desde 6 a 1600 μM. n.d.: no detectado.

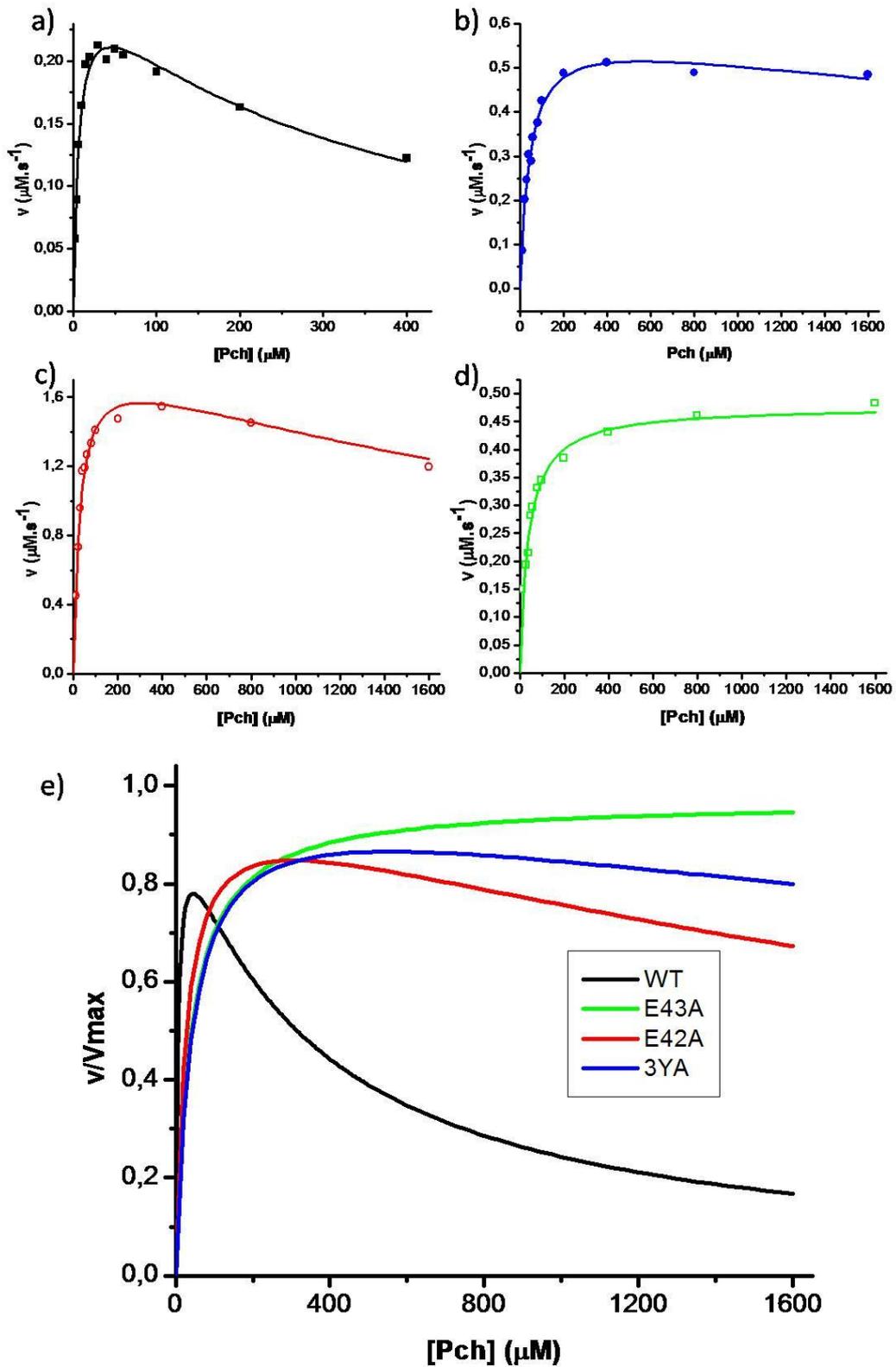


Figura 8: Curva de saturación por sustrato Pch de a) WT, b) 3YA, c) E42A, d) E43A, y e) actividad relativa de PchP-WT y variantes mutadas

Por otra parte, las tres mutaciones si bien afectaron el K_m , también comprometieron el K_{si} , no sólo mostrando la importancia de los residuos sustituidos en la inhibición por altas concentraciones de sustrato, sino también marcando una estrecha relación con el sitio de unión del sustrato como tal, y el sitio de inhibición por altas concentraciones de sustrato.

3.2.3 Pch como inhibidor

Dada la característica típica de PchP de ser inhibida por altas concentraciones de Pch, se llevaron a cabo estudios utilizando al propio sustrato natural como inhibidor frente a la actividad con *p*-NPP. PchP-WT muestra una inhibición del tipo sigmoidea con un $K_{0,5} = 0,054$ mM (Tabla1) y un coeficiente de Hill = 2, lo cual sugiere la presencia de dos sitios de interacción para este inhibidor.

Las tres variantes mutadas mostraron menor inhibición por Pch, respecto de PchP (Figura 9, Tabla 4).

La variante E43A fue la más afectada, presentando un aumento en el $K_{0,5}$ hasta 0,266 mM y sólo se observó un sitio de interacción, puesto de manifiesto por el valor de “n” de Hill $n=1$, sugiriendo la pérdida de un sitio de interacción para este compuesto en esta proteína. Este hecho concuerda con lo observado en curvas de saturación por Pch, donde se evidencia la pérdida de la inhibición por altas concentraciones del mismo (Figura 10).

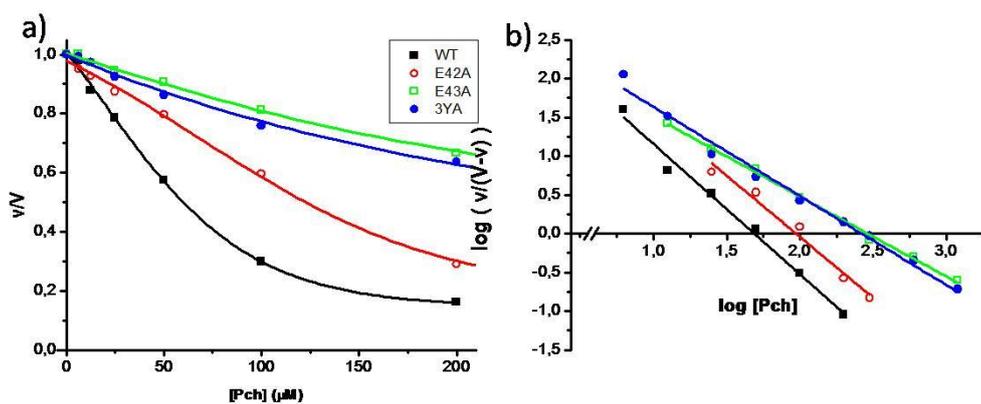


Figura 9: Inhibición de la actividad PchP y variantes por Pch a concentraciones saturantes (10mM) de *p*-NPP. a) curvas de inhibición directas, y b) gráfica de Hill. La actividad fue ensayada con 2 mM de Mg^{2+} e incubada durante 20 min a 37 °C

Tabla 4: Inhibición por Pch de la actividad de PchP y variantes mutadas

Enzima	$K_{0,5}$ (μM)	N Hill
WT	$54,23 \pm 7,57$	$1,70 \pm 0,03$
3YA	$206,48 \pm 17,81$	$1,29 \pm 0,06$
E42A	$125,78 \pm 43,91$	$1,93 \pm 0,50$
E43A	$266,32 \pm 31,15$	$0,93 \pm 0,11$

La actividad fue medida en presencia de 2 mM de MgCl_2 con 10 mM de *p*-NPP; y cantidades desde 0 a 300 μM de Pch

3.2.4 Inhibición por T4MA de PchP y variantes mutadas

T4MA produce en PchP-WT, una inhibición del tipo parcial mixta preferentemente incompetitivo, lo cual muestra que este inhibidor se une con mayor afinidad al complejo ES ya formado ($K_{iu} = 0,035$ mM) y con menor afinidad a la enzima libre ($K_{ic} = 0,17$ mM) (Tabla 1, Figura 10a).

Al analizar la inhibición por este compuesto en las variantes mutadas se observó que la afinidad por el inhibidor disminuyó drásticamente en las tres variantes, E42A, E43A y 3YA. Las dos mutantes de los residuos glutámicos, E42A y E43A (Figura 11b), conservaron el mismo modelo de inhibición que WT (Figura 10a, Tabla 5), y presentaron un mayor aumento del K_{iu} , junto a un aumento del K_{ic} aunque menos importante. Por otro lado 3YA presentó gran aumento del K_{iu} , es decir, el componente incompetitivo, aún mayor que para E42A y E43A, pero también desapareció el componente competitivo, cambiando el tipo de inhibición a parcial incompetitivo (Figura 10b, Tabla 5).

Estos resultados concuerdan con lo mencionado anteriormente, respecto a que ninguna de las mutantes sobre los residuos del sitio catalítico presentó cambios significativos en la afinidad por el sustrato (D^{31} , D^{33} , T^{35} , D^{262} , D^{267}), mientras que los resultados obtenidos con estas tres nuevas mutantes confirman su importancia en el reconocimiento del sustrato, interactuando con el amonio cuaternario de Pch.

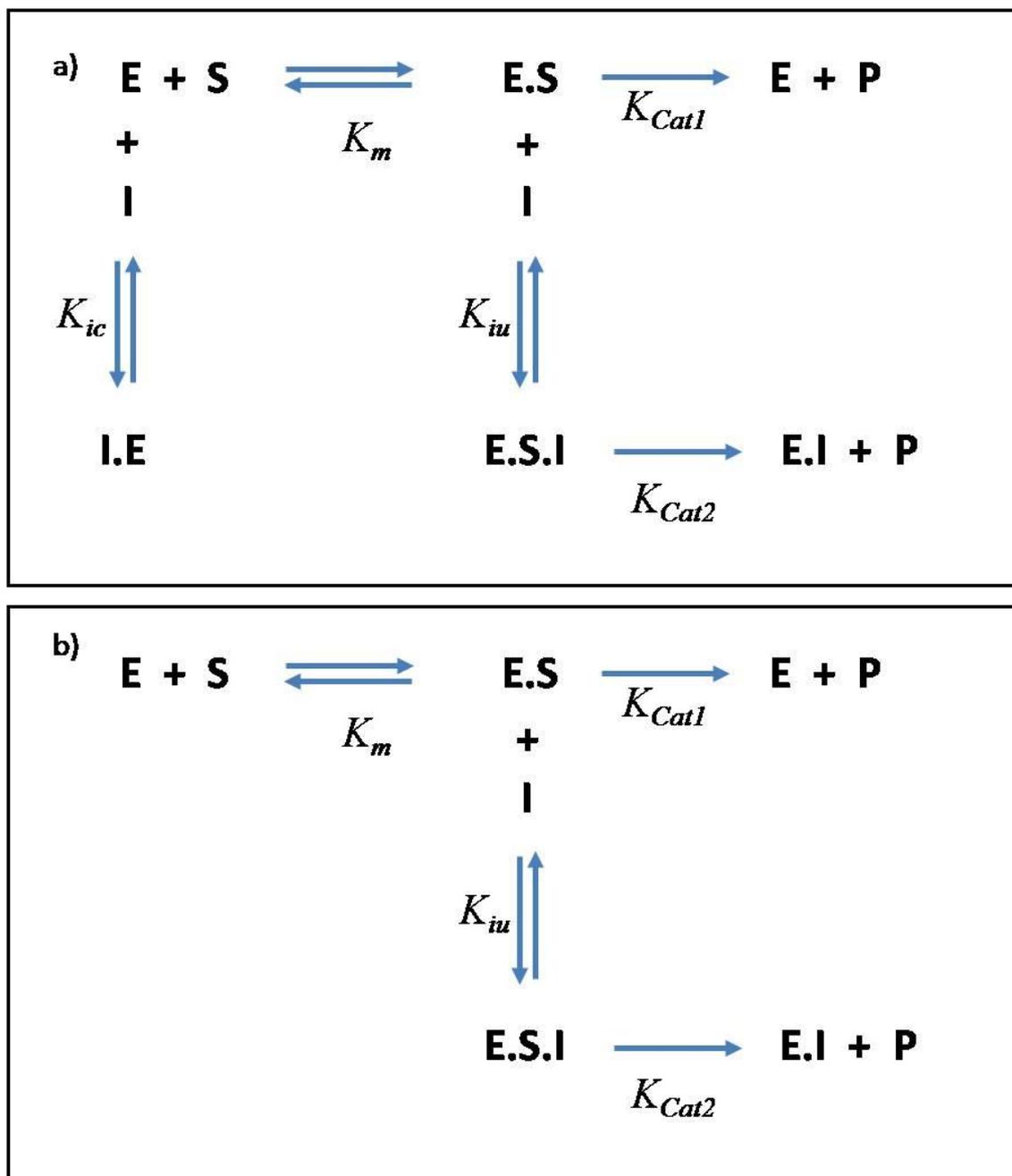


Figura 10: Modelo catalítico a) parcial mixto propuesto para compuestos de amonio cuaternario. Según $K_{iu} < K_{ic}$ o $K_{iu} > K_{ic}$ será preferentemente acompetitivo o competitivo respectivamente. $K_{cat1} > K_{cat2}$. b) parcial acompetitivo

Tabla 5: Inhibición por T4MA de la actividad de PchP y variantes

Enzima	Constantes de inhibición		Inhibición
	K_{iu} (mM)	K_{ic} (mM)	
WT	0,035	0,17	Parcial Mixto prf ¹ Acomp. ²
E42A	0,48	0,62	Parcial Mixto prf Acomp.
E43A	0,97	2,1	Parcial Mixto prf Acomp.
3YA	1,31	n.d.	Parcial Acomp.

La actividad fue medida en presencia de 2 mM de $MgCl_2$ con 0,5; 1; 3; 6 y 10 mM de *p*-NPP; y cantidades desde 0 a 1 mM de T4MA. n.d.: no detectado. ¹Prf: preferente, ²Acomp.: acompetitivo,

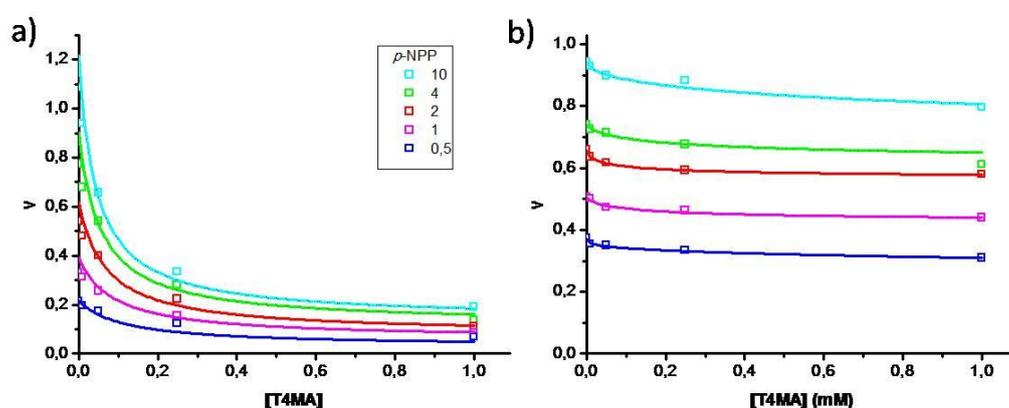


Figura 11: Inhibición por T4MA de la actividad de a) WT, y b) E43A; las gráficas correspondientes a E42A y 3YA son similares a b). La actividad fue medida con 2 mM Mg^{+2} , pH 5,0, a 37 °C durante 20 min. (□) simboliza la actividad medida, (-) corresponde a los valores de actividad optimizados por DynaFit.

3.2.5 Inhibición por BHDC

Si bien la mayoría de los compuestos de amonio cuaternario probados en este trabajo presentan inhibición de tipo mixta preferentemente acompetitiva en PchP-WT, fue de interés estudiar en nuestro laboratorio, el efecto de las mutaciones en estudio cuando BHDC es utilizado como inhibidor, dado que a

diferencia de los otros inhibidores, éste presenta un modelo de naturaleza mixto preferentemente competitivo. Es decir que BHDC se une con mayor afinidad a la enzima libre ($K_{ic} = 0,17$ mM) y es capaz de unirse además al complejo ES pero con menor afinidad ($K_{iu} = 0,97$ mM) (Tabla 1, Figura 10).

En este caso, los resultados fueron muy llamativos (Tabla 6), donde E43A presentó ligero aumento de la afinidad por BHDC, y más aún 3YA presentó un aumento de entre 200 y 300 veces la afinidad por BHDC, en ambos casos conservando el mismo modelo cinético. Esto puede deberse a la presencia de un anillo aromático en BHDC y de manera consistente, al aumentar la afinidad hacia *p*-NPP en ambas mutantes, resulta lógico esperar un incremento en la afinidad por BHDC.

Por otra parte, la variante E42A (Figura 12c) presentó un aumento en las constantes de inhibición en comparación a la WT de manera tal que el mecanismo de inhibición cambia de preferentemente competitivo a indistinto, siendo así no competitivo.

Tabla 6: Inhibición por BHDC de la actividad de PchP y variantes

Enzima	Constantes de inhibición		Inhibición
	K_{iu} (mM)	K_{ic} (mM)	
WT	0,97	0,17	Parcial Mixto ¹ prf Comp.
E42A	0,25	0,25	Parcial No Comp.
E43A	0,66	0,12	Parcial Mixto prf ² Comp.
3YA	0,0035	0,00087	Parcial Mixto prf Comp.

La actividad fue medida en presencia de 2 mM de MgCl₂ con 0,5; 1; 3; 6 y 10 mM de *p*-NPP; y cantidades desde 0 a 1 mM de BHDC. ¹prf.: preferente, ²Comp.: Competitivo

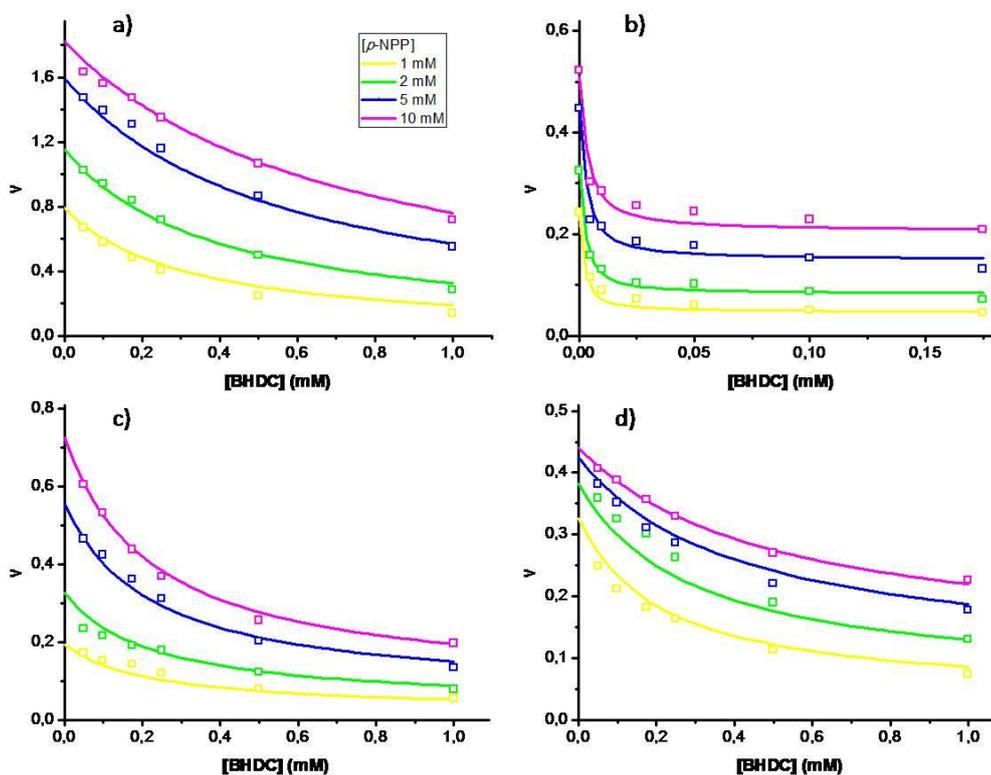


Figura 12: Curvas de inhibición por BHDC de a) PchP, b) 3YA, c) E42A y d) E43A. La actividad fue medida con 2 mM Mg^{+2} , pH 5,0 durante 20 min a 37 °C, con 1,0; 2,0; 4,0 y 10,0 mM de *p*-NPP.

3.3 Modelado de PchP

Las enzimas que pertenecen a la superfamilia HAD, tienen un alto grado de homología estructural en el “core” central, pero escasa homología en el resto de la secuencia (alrededor del 10-15%); es por esta razón que no es posible realizar un modelado comparativo convencional.

Como fue mencionado anteriormente en nuestro laboratorio se cuenta con un modelo molecular realizado por Beassoni *et ál.* (2006b) por técnicas de threading, empleando el servidor 3d-PSSM (Kelley *et ál.*, 2000) que se basan en la comparación de secuencia y estructura secundaria simultáneamente. En este sentido, se obtiene un alineamiento inicial que pondera ambos factores: secuencia y estructura y el servidor construye un modelo molecular de la proteína bajo análisis. Debido a la baja identidad de PchP con la proteína molde (fosfoserina fosfatasa de *M. janaschii*, código pdb 1F5S), este modelo carece de algunas zonas con lo cual el modelo que construyó el servidor

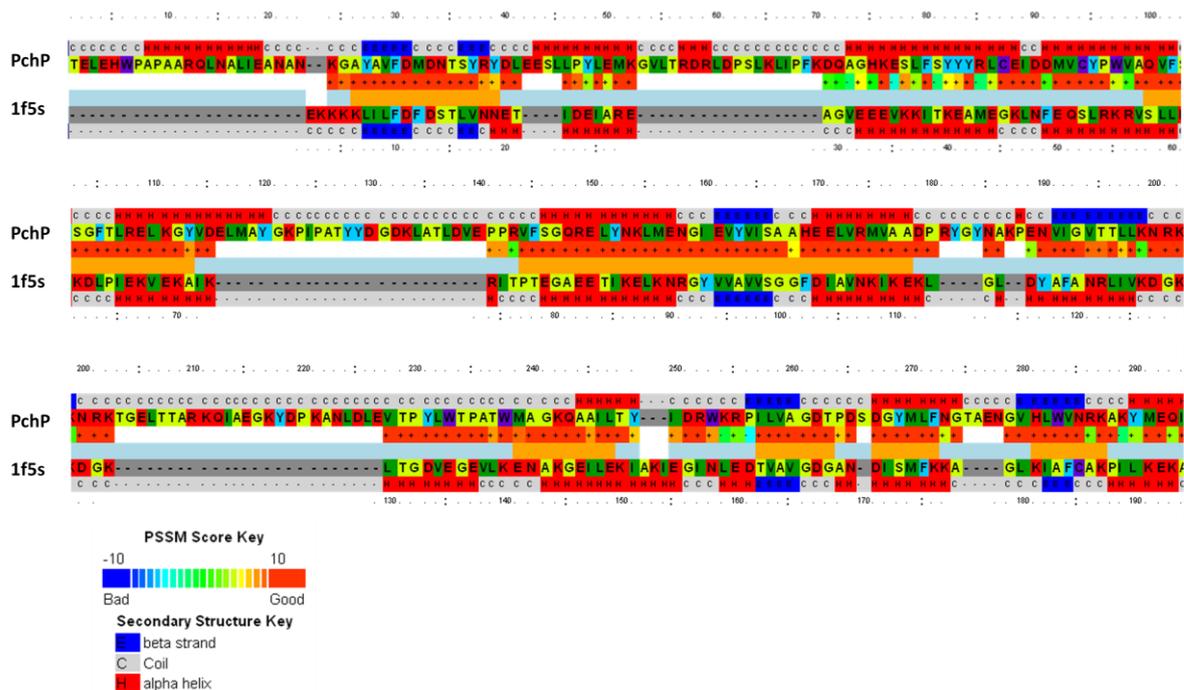


Figura 13: Alineamiento de secuencia/estructura de PchP y *mjPSP* (1F5S). El alineamiento se realizó mediante software servidor Phyre (Kelley *et ál.*, 2009)

presenta cortes, ya que no une las partes modeladas. De este modo, si bien ha resultado muy útil para explicar el funcionamiento del sitio activo en cuanto a la interacción con fosfato y Mg^{2+} , no ha sido de igual utilidad para la porción colina del sustrato debido a la presencia de zonas no modeladas, más aún la presencia de estos “huecos” impedía el empleo de técnicas de docking.

Es por esto que uno de los objetivos más importantes planeados para este trabajo final fue el mejoramiento del modelo molecular de PchP.

Para ello se combinó la técnica de threading para realizar el alineamiento inicial con técnicas de modelado comparativo por satisfacción de restricciones espaciales. Además de introducir mejoras por el hecho de emplear ambas técnicas, el algoritmo de threading fue mejorado considerablemente. En este caso, se empleó el servidor Phyre de la universidad de Cambridge (Kelley *et ál.*, 2009) que derivó de 3d-PSSM.

El alineamiento por secuencia y estructura secundaria se muestra en la Figura 13, donde se puede observar, a pesar de la escasa homología en la secuencia de aminoácidos, una alta similitud en la estructura secundaria de ambas enzimas. Además, dado el mayor tamaño de PchP frente a *mjPSP*, se observa la presencia de 3 loops en PchP no alineados.

En este alineamiento, se eliminaron esos 3 “mega-loops” ya que al carecer de estructura secundaria ordenada y al no tener molde, el modelado

de los mismos sería azaroso. Este alineamiento editado fue el archivo de entrada para el software modeller. El script de modelado además incluyó restricciones espaciales de estructura secundaria según lo predicho por Phyre.

Se construyeron 1000 modelos los cuales fueron evaluados según 2 criterios: a) GA341 y DOPE “*puntuación*” las cuales son medidas energéticas propias de Modeller y b) visualmente según en qué medida cumplieron las restricciones de estructuras secundarias asignadas. Una vez elegido el modelo, se comenzó a refinar cada uno de los loops sin templado, modelándose entre 100 y 200 conformaciones de cada loop y se eligió el de menor energía en cada caso según el DOPE “*puntuación*”.

En la Figura 14 se muestra el resultado del modelado, en el cual, al igual que el modelo realizado en el 2006, presenta un plegamiento tipo Rossman. En esta figura se encuentran resaltados en color azul la zona donde los 3 mega-loops fueron deletados. La localización del sitio de unión a fosfato se muestra en la Figura 14b, y comparando con la Figura 3b se puede observar que no hay diferencias con el sitio activo del modelo anterior.

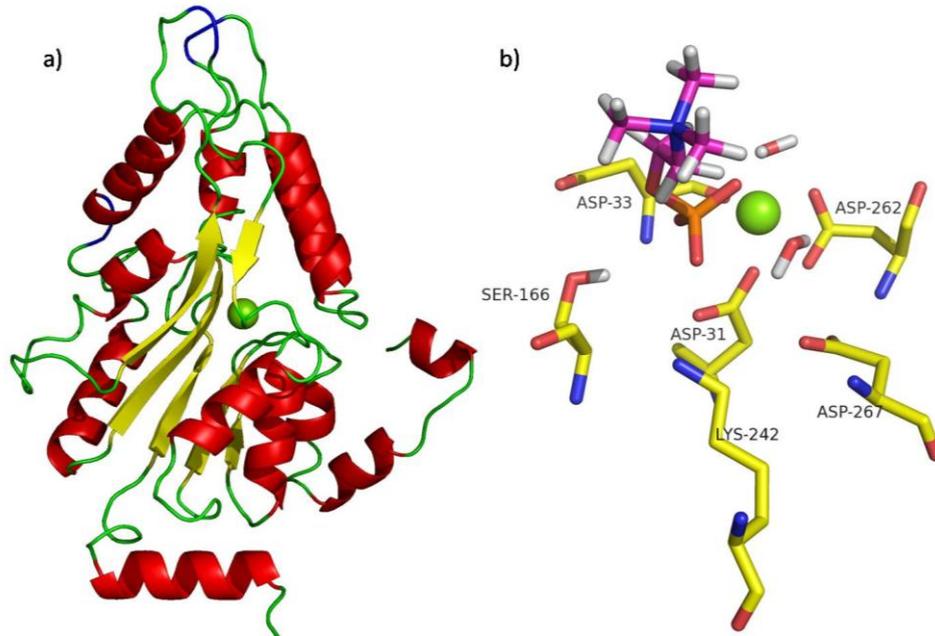


Figura 14: Modelo molecular de PchP obtenido a partir del cristal de *M. janaschii* mediante Modeller (Sali *et al.*, 1993) a) estructura general en representación “cartoon” de PchP y b) representación en “bastones” del sitio catalítico y de unión al metal de PchP.

3.4 Relajación del modelo

Las técnicas de modelado comparativo básicamente superponen el esqueleto carbonado de la proteína bajo estudio con la proteína molde. Cuando un aminoácido a modelar es idéntico al molde, la posición de la cadena lateral será la misma. Pero en caso de no haber identidad, la cadena lateral se ubica en una posición “probable” pero no necesariamente la más estable energéticamente, sobre todo porque no tiene en cuenta la ubicación de las cadenas laterales vecinas.

Este aspecto puede ser mejorado notablemente empleando técnicas de dinámica molecular para la relajación del modelo construido. De este modo, se busca un mínimo global de energía y se reducen los problemas estéricos que puedan existir luego de modelar.

Previo a la relajación con el software NAMD, se realizó docking del sustrato natural en la región cercana al sitio activo de PchP, en presencia de Mg^{+2} y dos moléculas de agua, de manera tal que se asemeje a las condiciones reales de la enzima en presencia del sustrato fisiológico. El objeto de esto es evitar que el sitio activo adopte una conformación cerrada, ya que en ausencia de sustrato, puede que el mínimo de energía modifique el estado del sitio activo. Dada la alta identidad entre el sitio activo de PchP y *mjPSP* y dado que *mjPSP* está cristalizada en presencia de PO_4^{3-} y Mg^{2+} , la conformación del sitio activo modelado en PchP se acercaría al real y se encontraría en una conformación abierta permitiendo la entrada del sustrato.

Como resultado de este docking previo a la relajación se obtuvo una unión pobre del sustrato a la enzima (energía de unión positiva), (Tabla 7), pero a pesar de esto, se logró un correcto posicionamiento del grupo fosfato de Pch, según lo predicho a partir del cristal de *mjPSP*. Esto no es extraño si se considera que este docking se desarrolló sobre un modelo sin relajar, donde el bolsillo de unión puede no ser suficiente para la ubicación del ligando o quizás haya impedimento estérico para el acceso al sitio activo.

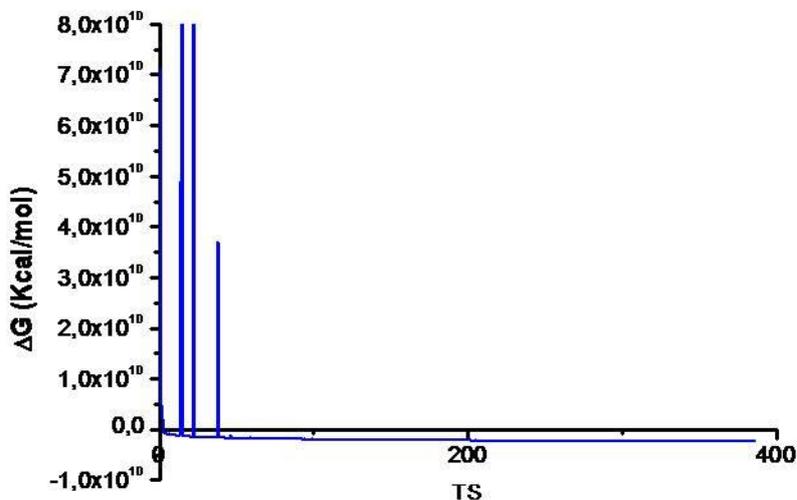


Figura 15: Cambio de Energía Libre (ΔG) del sistema en los primeros pasos (TS= “time step”) de minimización. Se observa una caída brusca en los primeros 10 pasos, con saltos posteriores de energía, hasta adoptar una conformación estable mantenida en el tiempo.

La relajación del complejo PchP-Pch se llevó a cabo como se indica en materiales y métodos. En la Figura 15 se muestra la energía libre (ΔG) del sistema correspondiente al paso de minimización donde se observa una marcada y rápida disminución del ΔG total del sistema. A lo largo de la simulación se observa que la estructura general de la molécula se mantiene, al igual que las ubicaciones tanto del sustrato como del metal se conservan estables, indicando el buen posicionamiento de los mismos. En la Figura 16 se observa el modelo obtenido por Modeller antes de relajar, y se compara con el modelo final, una vez relajado, con el sustrato y el metal unidos.

En esta figura también se puede observar las diferencias existentes los residuos del sitio activo y un corrimiento de aproximadamente 1 Å del Mg^{+2} .

Además, en resultados preliminares obtenidos mediante una relajación en ausencia de sustrato y Mg^{+2} , en el análisis de la presencia de posibles bolsillos de unión al sustrato, no se encontraron regiones factibles para el docking de Pch. Esto mejoró con PchP relajada con sustrato, donde el bolsillo de unión del sustrato se vio aumentado enormemente en su tamaño, lo que lograría un mejor posicionamiento del ligando.

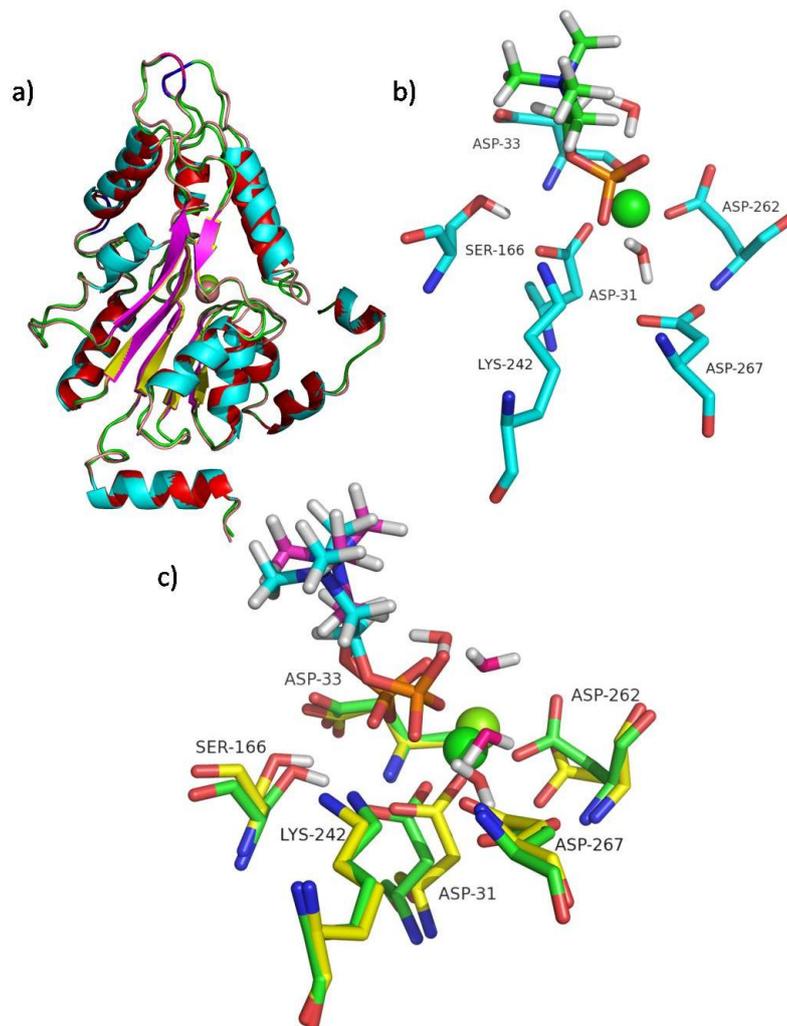


Figura 16: Modelo estructural de PchP. a) superposición del modelo antes (hélices- α celestes, láminas- β magenta y loops marrones) y después (hélices- α rojas, laminas- β amarillas y loops verdes) de ser relajado por dinámica molecular, representación en “cartoon” superpuestas; b) residuos del sitio activo en presencia de Mg^{2+} , dos moléculas de agua y Pch del modelo relajado; y c) superposición de los residuos del sitio activo del modelo relajado y no relajado (cadenas laterales amarillas, H_2O fucsia, Mg^{+2} verde claro y Pch magenta)

3.5 Docking

Con el objetivo de detectar posibles residuos involucrados en la interacción con el sustrato (tanto Pch, como *p*-NPP) y diversos compuestos de amonio cuaternario, se llevaron a cabo ensayos de docking utilizando el modelo relajado

Tabla 7: Energías de unión predichas para las conformaciones de ligandos posibles obtenidas por docking en PchP.

Ligando	Figura	Energía de unión (Kcal/mol)
Pch (NR)*	13b	2,43
Pch	16a – 16b	-73,21
<i>p</i>-NPP	16c – 16d	-59,99
T4MA	17	-31,07
BHDC	18a	-67,15
	18b	-48,26
Colina	19a	-34,05
	19b	-31,25
	19c	-27,68
Betaína	19d	-37,98
Decametonio	20a	-42,25
	20b	-23,41
Hexametonio	20c	-40,67
	20d	-20,26

Se detalla además la figura correspondiente a cada ligando y conformación. *NR: docking realizado sobre proteína no relajada

3.5.1 Pch y *p*-NPP

El docking de Pch montado sobre el modelo relajado (Figura 17), mostró una energía de unión negativa de -70 kcal/mol, por un lado, demostrando la importancia de realizar la relajación por dinámica molecular, la cual permitió un mejor posicionamiento de las cadenas laterales de los aminoácidos de PchP, y permitiendo así una mejor interacción con el ligando. Asimismo, se observó que E⁴³, E⁴² y Y⁸⁴ (de ⁸²YYY⁸⁴) interaccionan directamente con Pch, mientras que E⁴³ y Y⁸⁴ interaccionan directamente con la cabeza de amonio cuaternario. Se observan también que los residuos D⁹¹ C⁹⁴ Y⁹⁵ A¹⁶⁷ y D²⁶⁵ están en cercanías de la porción colina, sugiriendo algún tipo de interacción.

Además, cuando se realizó el docking utilizando *p*-NPP como ligando (Figura 17 c-d), se observó que el grupo fosfato se posicionó en una región muy cercana a la posición que adoptó el fosfato de Pch, e incluso se observa que probablemente la tirosina Y⁸⁴ interacciona con el anillo fenólico de *p*-NPP.

Se puede observar que el grupo nitrato de *p*-NPP se encuentra en una orientación ligeramente desplazada respecto de la adoptada por el grupo NR_4^+ de Pch. Esta conformación es razonable si se considera que la longitud de Pch es menor a la de *p*-NPP, y teniendo en cuenta la rigidez de la molécula debida a la presencia del grupo fenólico en esta molécula lo cual impide una rotación libre. Resulta interesante la concordancia de este resultado con el hecho de que mutaciones en el E⁴³ o en las tirosinas (E43A y 3YA respectivamente),

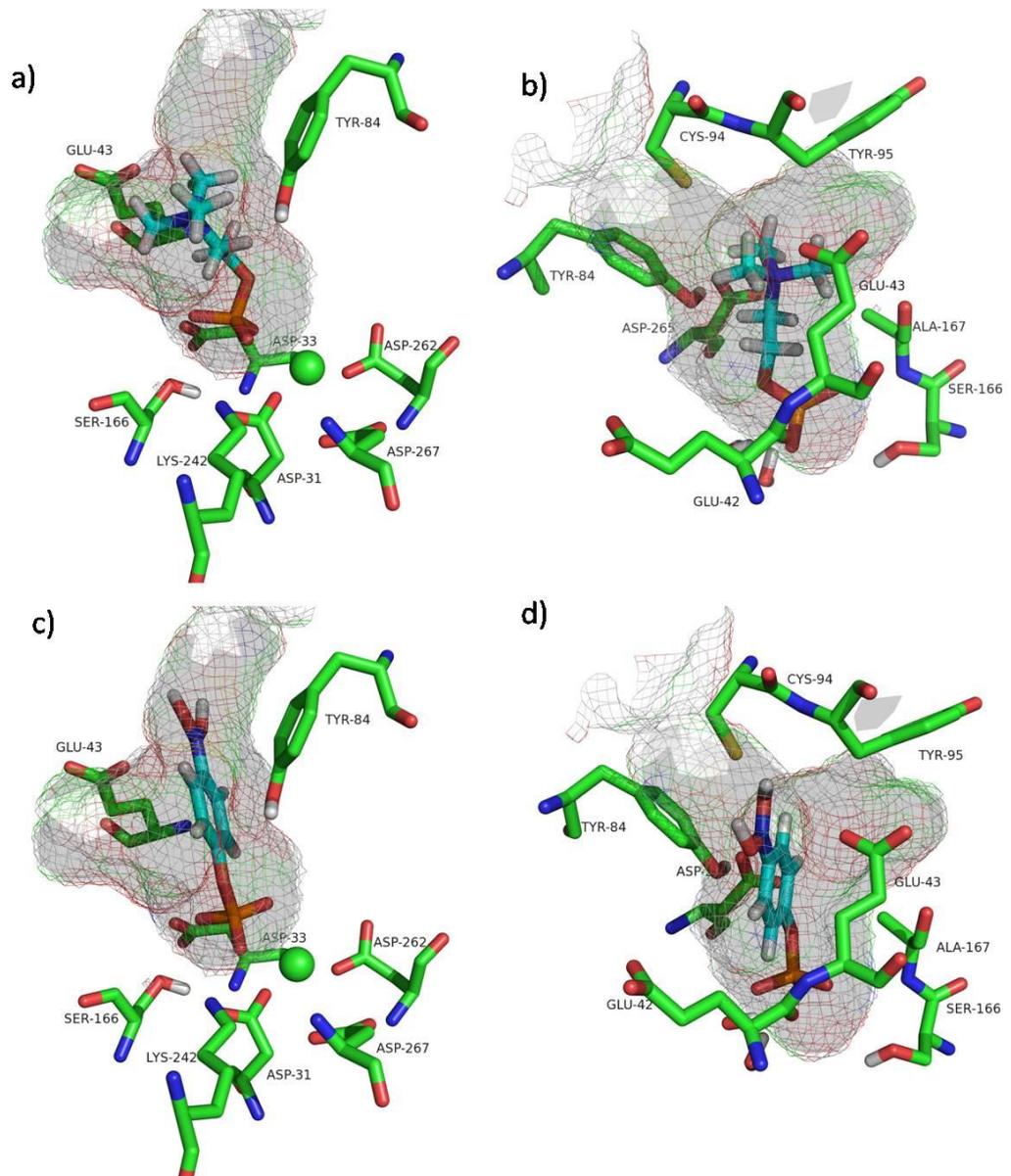


Figura 17: Conformaciones obtenidas por docking de: Pch (a y b); y *p*-NPP (c y d). Las vistas b y d son una rotación en 180 ° respecto de las vistas a y c.

producen un aumento en la afinidad por *p*-NPP probablemente porque la ausencia de una cadena lateral voluminosa permite un mejor posicionamiento de *p*-NPP sobre PchP en estas variantes.

3.5.2 T4MA

T4MA mostró un posicionamiento similar al correspondiente al amonio cuaternario de Pch. En la Figura 18 se observa que se encontraría interaccionando con los mismos residuos que Pch. Sin embargo, no se observa en las cercanías del ligando el residuo glutámico E⁴², como era de esperarse según lo observado experimentalmente. Probablemente este residuo esté involucrado en la interacción sobre regiones cercanas al fosfato y/o en mantener la estructura del bolsillo de unión.

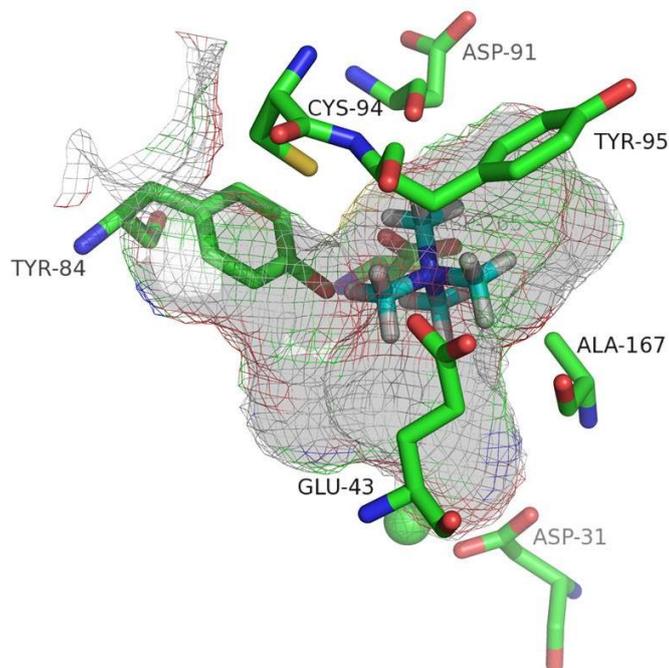


Figura 18: Conformación T4MA obtenida por docking.

3.5.3 BHDC

La unión de este ligando mostró principalmente dos conformaciones favorables (Tabla 7). En la primera (Figura 19a) se observa que el grupo fenilo se ubica cercano a la posición equivalente al fosfato de Pch; el amonio, al igual que en Pch, se encuentra interaccionado con E⁴³, Y⁸⁴, D⁹¹, C⁹⁴, Y⁹⁵ y A¹⁶⁷, mientras que la cadena carbonada se encuentra saliendo de la proteína por un canal flanqueado por los residuos F⁸⁰, S⁸¹, V⁹³, C⁹⁴ y V⁹⁸.

En la segunda conformación, con mayor energía de unión, se observa que el grupo amonio se localiza desplazado hacia la tirosina Y⁹⁵, interactuando directamente con la misma

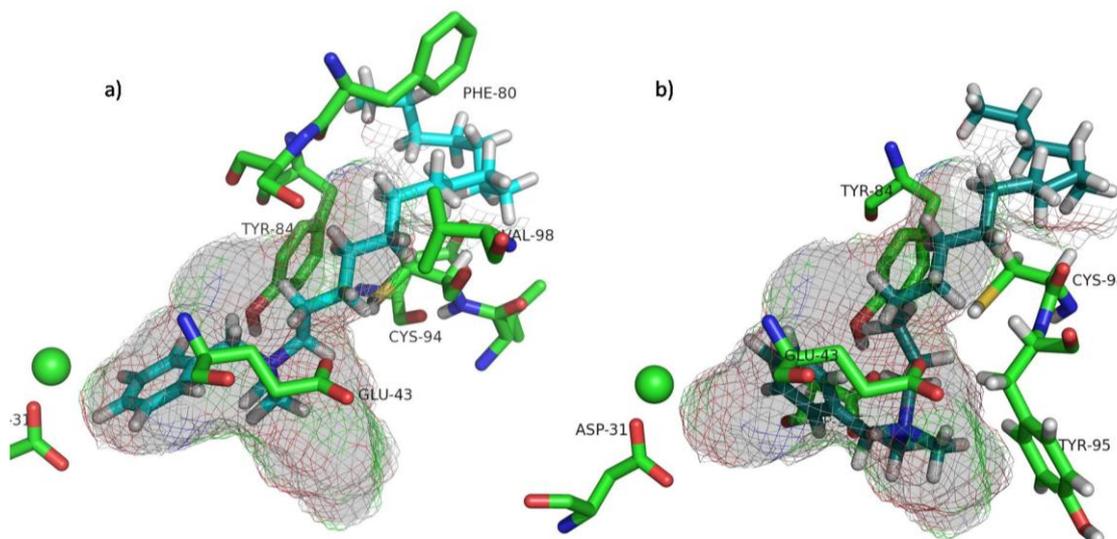


Figura 19: conformaciones de BHDC obtenidas por docking. a

3.5.4 Colina y Betaína

El docking con colina mostró 3 conformaciones favorables energéticamente (Tabla 7). De manera general las 3 se ubican en el mismo bolsillo pero se ve modificada la orientación de los grupos NR_4^+ y $-\text{OH}$. Los residuos que probablemente interactúan con colina de manera constante en las 3 conformaciones son: Y84, E43, A167 y D265.

En las conformaciones a y c, parecen tener interacción además los residuos Y95, C94 y D91.

Esto estaría indicando que el bolsillo para la unión del amonio cuaternario sería amplio y el ligando podría adoptar estas diferentes conformaciones con una energía similar. Alguna de estas conformaciones podría resultar no catalítica y esto podría explicar la inhibición por altas concentraciones de sustrato o las inhibiciones de tipo mixtas que son frecuentemente observadas con los compuestos de amonio cuaternario ensayados.

Los resultados de este docking sugieren experimentos futuros de mutagénesis en los residuos Y95, C94 y D91.

En el docking de betaína se observa que el carboxilo se ubica en el bolsillo correspondiente al fosfato lo cual arrastra al grupo amonio cuaternario hacia el interior del sitio catalítico, probablemente afectando así la unión de este ligando. Esto resulta concordante con lo deducido a partir de la comparación de la inhibición de PchP por colina y por betaína, en la cual se postuló que el grupo carboxilo podría estar afectando la unión de betaína por repulsión electrostática.

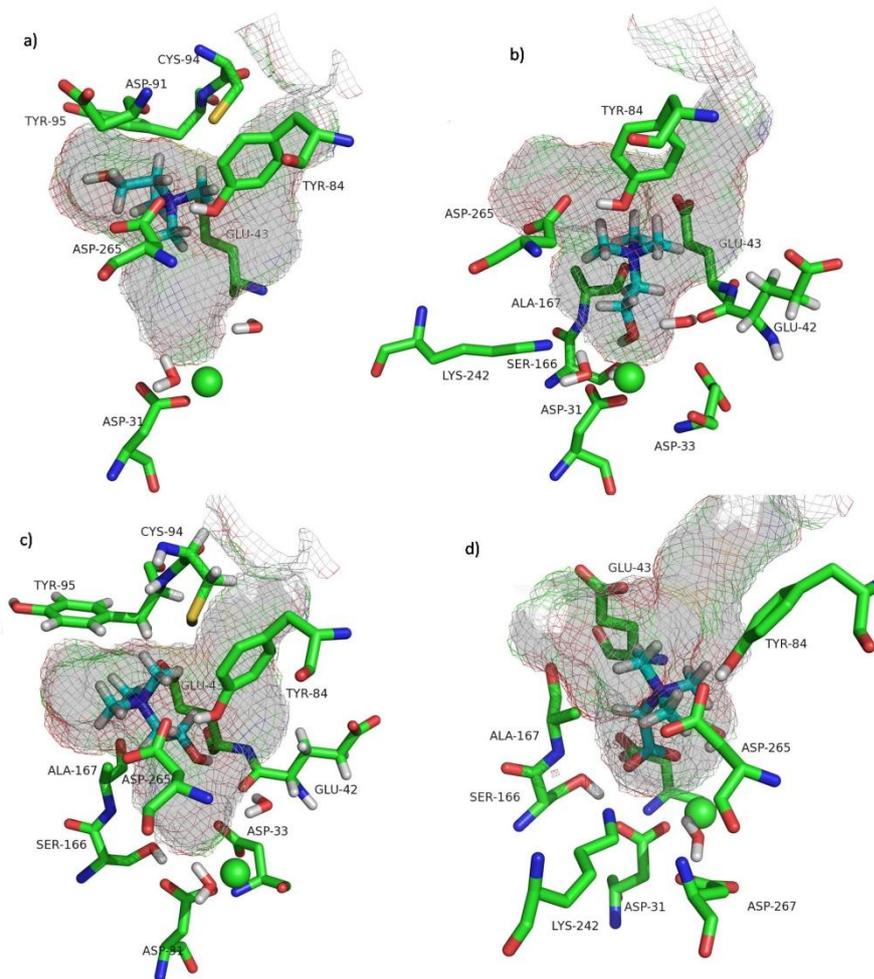


Figura 20: Conformaciones obtenidas por docking de: a), b) y c) 3 conformaciones de colina; d) betaína

3.5.5 Hexametonio y Decametonio

En los ensayos de docking con decametonio se observaron 2 conformaciones favorables (Tabla 6) pero con una diferencia energética entre ellas considerable. La más favorable (Figura 21a), muestra una de las cabezas de amonio cuaternario posicionado en el mismo lugar donde se posiciona este grupo en el docking con Pch, mientras que el resto de la cadena sale por el canal formado por los residuos F⁸⁰, S⁸¹, V⁹³, C⁹⁴, W⁹⁷ y V⁹⁸. En la segunda conformación posible (Figura 21b), ambas cabezas de amonio cuaternario se encuentran dentro del bolsillo, pero ninguno de estos grupos se acomoda como el grupo equivalente en Pch.

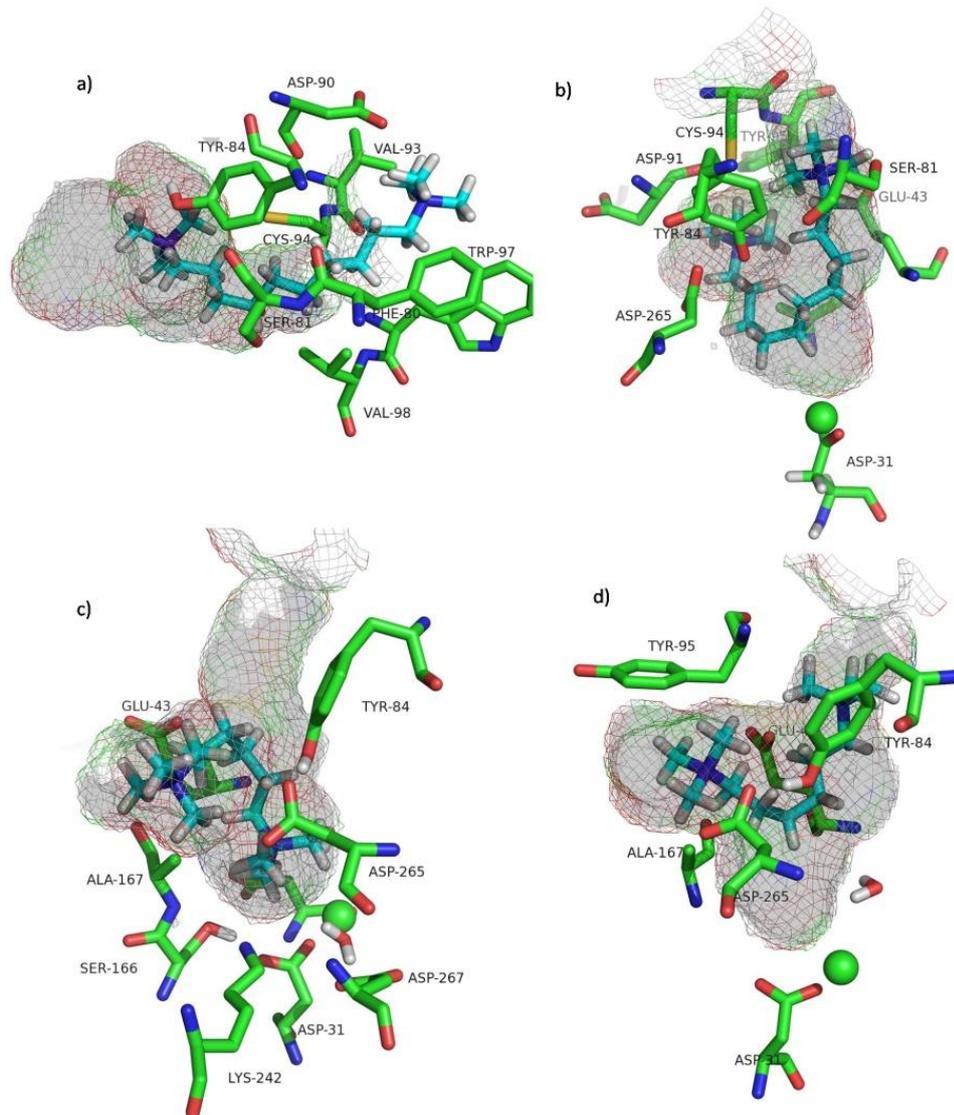


Figura 21: Conformaciones obtenidas por docking de: decametonio (a y b); hexametonio (c y d)

De manera similar, el docking con hexametonio mostró 2 conformaciones posibles con energías de unión considerablemente diferentes. La más favorable energéticamente (Figura 21c) llamativamente tiene posicionada una de las cabezas de amonio cuaternario en el bolsillo de unión del fosfato. La otra cabeza se encuentra orientada hacia la Y⁹⁵ volviendo a sugerir este residuo aromático como candidato para interactuar con estos grupos.

En la segunda conformación, se observó ambas cabezas de amonio cuaternario orientadas de manera similar a la segunda ubicación favorable de decametonio, respaldando la existencia de dicha conformación.

La existencia de 2 conformaciones posibles tanto para hexametonio como para decametonio está en concordancia con las inhibiciones del tipo mixta observadas experimentalmente. En adición los valores de energías de unión en ambos se correlacionan con las K_i similares presentadas por estos 2 compuestos.

3.6 Consideraciones finales.

De estos resultados, es interesante destacar que los dos fosfoésteres probados (Pch y *p*-NPP) se unen con menor energía (Tabla 7) que aquellos sin el fosfato (T4MA, colina y betaína), demostrando la importancia del grupo fosfato en la unión del ligando, más allá de su relevancia en la catálisis del mismo sustrato.

La unión de los compuestos simples de amonio cuaternario, principalmente T4MA, presenta una única orientación como ocurre con Pch. En contraste, los compuestos de amonio más complejos, de mayor tamaño y con mayor número de rotámeros posibles, mostraron diferentes tipos de conformaciones. Por un lado, a partir de lo observado con BHDC y decametonio (Figuras 19a y 21a respectivamente), se puede proponer un sitio o canal de entrada de los ligandos en los que estarían involucrados los residuos V⁹³, D⁹⁰, F⁸⁰ y W⁹⁷. Este canal también podría ser la vía de entrada para el propio sustrato.

Por otro lado, con los resultados obtenidos con hexametonio además de decametonio, se observa que cuando coexisten dos amonios cuaternarios dentro del mismo bolsillo, éstos toman una orientación a ambos lados de la posición central observada en Pch, que sería la ubicación catalítica. Si se tiene en cuenta que experimentalmente se detectan 2 sitios de interacción para Pch, esto sugiere que probablemente una primer molécula de sustrato inicialmente se une a la enzima, con el amonio cuaternario en la posición catalítica, y que la segunda molécula de Pch no se une directamente en un sitio diferente sino que produciría un desplazamiento de la orientación del NR₄⁺ de la primer molécula de sustrato, impidiendo así la catálisis.

Las tres variantes mutadas de PchP mostraron alteraciones en la interacción con el amonio cuaternario. E42A y 3YA presentan una muy baja inhibición por altas concentraciones de Pch, mientras que E43A pierde por completo esta característica. Tomando en consideración este aspecto experimental con los resultados de docking, el residuo E⁴² estaría estabilizando el complejo enzima-sustrato aunque no interaccionando directamente con el NR₄⁺. La sucesión de tirosinas ⁸²YYY⁸⁴, más específicamente la tirosina Y⁸⁴, estaría involucrada en la coordinación de los metilos probablemente mediante interacciones catión- π , aunque en este caso habría que descartar efectos estructurales. Este resultado sugiere analizar el efecto de mutaciones individuales en estos residuos. Finalmente, el residuo E⁴³ estaría neutralizando la carga positiva sobre el átomo de nitrógeno, y a su

vez delimitando las 2 orientaciones posibles que puede tomar el NR_4^+ , definiéndose entre una posición catalítica y una no catalítica. En resumen, lo observado en este trabajo, muestra la relevancia de los residuos mutados, tanto en la interacción del sustrato como en la inhibición por altas concentraciones de Pch.

De los estudios de docking, se sugieren nuevos residuos para ser estudiados mediante mutaciones sitio-específicas: D^{91} , C^{94} , Y^{95} y A^{167} . A su vez, se debe hacer énfasis sobre los aminoácidos F^{80} , D^{90} , V^{93} y W^{97} que se encontrarían fuera del sitio activo, los cuales podrían encontrarse en la vía de entrada del sustrato y/o inhibidores al sitio activo.

CONCLUSIONES

4. Conclusiones

- E⁴³ y ⁸²YYY⁸⁴, más precisamente Y⁸⁴ están involucrados en la interacción con el amonio cuaternario de Pch y otros ligandos. Esto se puede observar por un lado tanto en la inhibición por T4MA y por Pch, como en las variaciones de K_m y K_{si} . Los resultados del docking apoyan esta afirmación;
- El E⁴² si bien es importante en la unión del sustrato, no ejerce una unión directa al amonio cuaternario, aunque sin duda su remplazo por alanina generaría un cambio en la conformación del bolsillo de unión al NR₄⁺ o reduciría el entorno electronegativo;
- Se logró mejorar el modelo tridimensional de PchP, lo cual permitió aplicar técnicas de docking para sugerir interacciones con el amonio cuaternario de los ligandos estudiados;
- El modelo tridimensional de PchP apoya lo predicho por las mutaciones sitio-específicas, mostrando que E⁴³ E⁴² y Y⁸⁴ interactúan con el sustrato Pch. Según este modelo, además de estos residuos, están interactuando los residuos D⁹¹, C⁹⁴, Y⁹⁵ y A¹⁶⁷;

BIBLIOGRAFÍA

5. Bibliografía

1. Abagyan R, Totrov M, Kuznetsov D. (1994). "Icm – a new method for protein modeling and design – applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation". *J. Comp. Chem.* 15: 488–506.
2. Andersen PA, Kaasen I, Styrvold OB, Boulnois G, Strom AR. (1988). "Molecular cloning, physical mapping and expression of the bet genes governing the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*". *J Gen Microbiol.* 134(6):1737-46.
3. Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM. (1987) "A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay". *Anal. Biochem.* 171 (2): 266-270.
4. Beassoni PR, Otero LH, Lisa AT, Domenech CE. (2008a). "Using a molecular model and kinetic experiments in the presence of divalent cations to study the active site and catalysis of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase. *Biochem. Biophys Acta.* 1784(12), 2038-44.
5. Beassoni PR, Otero LH, Massimelli MJ, Lisa AT, Domenech CE. (2006b). "Critical Active-Site Residues Identified by Site-Directed Mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa* Phosphorylcholine Phosphatase, A New Member of the Haloacid Dehalogenases Hydrolase Superfamily". *Curr. Microbiology.* 53 (6): 534-539
6. Beassoni PR. (2006a). "Relación entre estructura y función de la fosforilcolina fosfatasa de *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias del genero *Pseudomonas*. Tesis Doctoral.
7. Beassoni PR; Otero LH; Boetsch C and Domenech CE. (2008b). "Interaction of alkylammonium ions with the active site of *P. aeruginosa* phosphocholine phosphatase". XLIV Reunión Anual de la SAIB. Noviembre 2008. BIOCELL vol 32 (suppl): 53.
8. Berka R and Vasil M. (1982). Phospholipase C (heat-labile-hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa* purification and preliminary characterization. *J. Bacteriol.* 152: 239-245.
9. Bodey GP, Bolivar R, Faistein V, Jadeja L. (1983). "Infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*". Review, *Infect. Dis.* 5: 279–313
10. DeLano WL. (2002). "The PyMOL Molecular Graphics System". DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
11. Diab F, Bernard T, Bazire A, Haras D, Blanco C, Jebbar M. (2006). "Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities" *Microb.* 152, 1395-1406
12. Dixon M, Webb EC. (1979). "Enzymes". Academic Press, NY, USA. ISBN 0-12-218358-4.
13. Dupont L, Garcia I, Poggi MC, Alloing G, Mandon K, Le Rudulier D. (2004). "The *Sinorhizobium meliloti* ABC Transporter Cho Is Highly Specific for Choline and Expressed in Bacteroids from *Medicago sativa* Nodules. *J Bacteriol.* 186 (18): 5988–5996

14. Fick RB. (1993). "*Pseudomonas aeruginosa*, the opportunist: pathogenesis and disease". CRC Press. 1-5 Series ISBN: 0-8493-4811-0
15. Garau G, Lemaire D, Vernet T, Dideberg O, Di Guilmi AM. (2005). "Crystal Structure of Phosphorylcholine Esterase Domain of the Virulence Factor Choline-binding Protein E from *Streptococcus pneumoniae*. J. Biol. Chem. 280(31): 28591-600.
16. García JL, Sanchez-Beato AR, Medrano FJ, Lopez E. (1998). "Versatility of choline binding domain". Microb. Drug Resist, 4: 25-36.
17. Garrido MN, Lisa AT, Albelo S, Lucchesi GI, Domenech CE. (1990). "Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase as a phosphorylcholine phosphatase activity". Mol. Cel. Biochem. 94, 89-95.
18. Garrido M, Lisa AT, Domenech CE. (1988). *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase contains an anionic site with a trimethyl subsite. Mol. Cel. Biochem. 84:41-49.
19. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. (1996). "VMD – Visual Molecular Dynamics". J. Molec. Graphics. 14(1): 33-38.
20. Kappes RM, Kempf B and Bremer E. (1996). *Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine* operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. J Bacteriol. 178(17): 5071-5079.
21. Kelley LA, MacCallum RM and Sternberg MJE. (2000). "Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM". J. Mol. Biol. 299(2): 499-520.
22. Kelley LA and Sternberg MJE. (2009). "Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server". Nature Protocols 4, 363 - 371
23. Koonin EV, Tatusov RL. (1994). "Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search". J. Mol. Biol. 244: 125-132
24. Kuzmic P. (1996). "Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase" Anal. Biochem, 237: 260-273.
25. Lamark T, Kaasen I, Eshoo MW, Falkenberg P, McDougall J, Strom AR. (1991). "DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*". Mol Microbiol. 5(5):1049-64
26. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23, 2947-2948.
27. Lisa AT, Beassoni PR, Massimelli MJ, Otero LH, Doménech CE (2007). "A Glance on *Pseudomonas aeruginosa* Phosphorylcholine Phosphatase, an Enzyme whose Synthesis Depends on the Presence of Choline in its Environment". Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology-Editorial: A. Méndez-Vilas (Ed.). Vol 1: 255-262. Series: ISBN-13: 978-84-611-9421
28. Lisa AT, Casale C, Lucchesi GI, Domenech CE. (1994b). "Cholinesterase, acid phosphatase and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hiperosmotic conditions in a high-phosphate medium". Curr. Microbiol. 28: 71-76

29. Lisa AT, Garrido MN and Domenech, CE. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase and cholinesterase induced by choline and its metabolic derivatives may contain a similar anionic peripheral site. *Mol. Cell. Biochem.* 63:113-118.
30. Lisa AT, Lucchesi GI, Domenech CE. (1994a). "Pathogenicity of *P. aeruginosa* and its relationship to the choline metabolism through the action of cholinesterase and phosphatase, phospholipase C". *Curr Microbiol.* 29: 193-199
31. Liu P. (1974). Exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa* factors that influence the production of exotoxin A. *J. Infect. Dis.* 130: 594-599.
32. Lucchesi GI, Pallotti C, Lisa AT, Domenech CE. (1998). "Constitutive choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*" *FEMS Microb. Letters.*
33. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist". *Mic. And Infect.* 2: 1051-1060.
34. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. (2002). Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin. Microb. Review.* 15 (2): 194-222.
35. Massimelli MJ, Beassoni P, Forrellad MA, Barra JL, Garrido MN, Domenech CE, Lisa AT. (2005). "Identification, cloning and expression of *P. aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase gene". *Curr.Microbiol.* 50 (5) 251-256
36. Otero LH; Beassoni PR; Boetsch C, Domenech CE. 2009. "*Pseudomonas aeruginosa* phosphocholine phosphatase contains two sites for quaternary ammonium". *XLV Reunión Anual de la SAIB. Noviembre 2009. BIOCELL vol 33 (suppl): 47*
37. Otero LH, Beassoni PR, Lisa AT, Domenech CE. (2010). "Transition from octahedral to tetrahedral geometry causes the activation or inhibition by Zn²⁺ of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase". *BioMetals.* DOI 10.1007/s10534-010-9289-1.
38. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L, Schulten K. (2005). "Scalable Molecular Dynamics with NAMD". *J. Comp. Chem.* 26:1781-1802
39. Roberts SJ, Stewart AJ, Sadler PJ, Farquharson. (2004). "Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities". *Biochem.* 382: 59-65
40. Roberts SJ, Stewart AJ, Schmid R, Blindauer CA, Bond SR, Sadler PJ, Farquharson C. (2005). "Probing the substrates specificities of human PHOSPHO 1 and PHOSPHO2". *Biochem. Biophys. Acta.* 1752: 73-78.
41. Sali A, Blundell TL. (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints". *J. Mol. Biol.* 234: 779-815.
42. Salvano MA, Lisa AT, Domenech CE. (1989). "Choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*". *Mol. Cell. Biochem.* 85: 81-89.
43. Salvano MA, Domenech CE. (1999). "Kinetic properties of purified *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase indicated that this enzyme may be utilized by the bacteria to colonize in different environments". *Curr. Microbiol.* 39:1-8.
44. Sambrook J, Russell DW. (2001). "Molecular Cloning". *CSHLP.* 3rd Edition.
45. Sanchez-Beato AR, Ronda C, Garcia JL. (1995). "Tracking the Evolution of the Bacterial Choline-Binding Domain: Molecular Characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* Gene". *J Bacteriol.* 177(4): 1098-1103.

46. Selengut JD. (2001). "MDP-1 Is a New and Distinct Member of the Haloacid Dehalogenase Family of Aspartate-Dependent Phosphohydrolases". *Biochem.* 40: 12704-711.
47. Wang W, Kim R, Jancarik J, Yokota H, Kim SH. (2001). "Crystal Structure of Phosphoserine Phosphatase from *Methanococcus jannaschii*, a Hyperthermophile, at 1.8 Å Resolution". *Structure.* 9: 65-71.
48. Winsor GL, Lo R, Ho Sui SJ, Ung KSE, Huang S, Cheng D, Ho Ching WK, Hancock REW, Brinkman FSL. (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation". *Nucleic. Acids Research*, 33, D338-43

APÉNDICE I

6. Apéndice I

6.1 Scripts de modelado

6.1.1 Construcción del modelo con satisfacción de restricciones espaciales (model-addrsr.py)

```
# Addition of restraints to the default ones
from modeller import *
from modeller.automodel import *      # Load the automodel class
from modeller.optimizers import conjugate_gradients, molecular_dynamics,
actions
from modeller.scripts import complete_pdb

log.verbose()
env = environ()
env.libs.topology.read(file='${LIB}/top_heav.lib') # read topology
env.libs.parameters.read(file='${LIB}/par.lib') # read parameters

# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.']
env.io.hetatm = True

class MyModel(loopmodel):
    def special_restraints(self, aln):
        rsr = self.restraints
        at = self.atoms
#       Add some restraints from a file:
#       rsr.append(file='my_rsrsl.rsr')

#       Residues should be an alpha helix
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('8:',
'19:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('43:',
'52:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('63:',
'78:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('81:',
'92:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('97:',
'110:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('121:',
'132:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('145:',
'153:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('202:',
'207:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('225:',
'232:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('248:',
'254:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('257:',
'264:')))
        rsr.add(secondary_structure.alpha(self.residue_range('269:',
'273:')))

#       Residues should be beta-strands
```

```

        rsr.add(secondary_structure.strand(self.residue_range('26:',
'31:')))
        rsr.add(secondary_structure.strand(self.residue_range('36:',
'38:')))
        rsr.add(secondary_structure.strand(self.residue_range('136:',
'141:')))
        rsr.add(secondary_structure.strand(self.residue_range('166:',
'174:')))
        rsr.add(secondary_structure.strand(self.residue_range('214:',
'218:')))
        rsr.add(secondary_structure.strand(self.residue_range('238:',
'243:')))
        rsr.add(secondary_structure.strand(self.residue_range('277:',
'279:')))

a = MyModel(env,
            alnfile = 'PchP-1F5S_sinloop.pir',
            knowns = '1F5SA', sequence = 'PchP',
            assess_methods=(assess.DOPE, assess.GA341),
            loop_assess_methods=assess.DOPE) # code of the
target
a.starting_model= 1 # index of the first model
a.ending_model = 1000 # index of the last model
# (determines how many models to
calculate)
a.make() # do homology modeling

# Get a list of all successfully built models from a.outputs
ok_models = filter(lambda x: x['failure'] is None, a.outputs)

# Rank the models by DOPE score
key = 'DOPE score'
ok_models.sort(lambda a,b: cmp(a[key], b[key]))

# Get top model
m = ok_models[0]
print "Top model: %s (DOPE score %.3f)" % (m['name'], m[key])

```

6.1.2 Refinamiento de Loops (loop.py)

```
# Loop refinement of an existing model
from modeller import *
from modeller.automodel import *

log.verbose()
env = environ()

# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_file']
# Create a new class based on 'loopmodel' so that we can redefine
# select_loop_atoms (necessary)

class MyLoop(loopmodel):
    # This routine picks the residues to be refined by loop modeling
    def select_loop_atoms(self):
        # three loop from residue 19 to 28 inclusive
        return selection(self.residue range('21:', '25:'))

a = MyLoop(env,
            inimodel='PchP.L1_L2_L3_L4_L5_L6.pdb', # initial model of the
target
            sequence='PchP', # code of the target
            loop_assess_methods=assess.DOPE)

a.loop.starting_model= 1 # index of the first loop model
a.loop.ending_model = 100 # index of the last loop model
a.loop.md_level = refine.very_fast # loop refinement method
a.make()
```

Todos los loops se refinaron empleando un script similar a este, modificando la región que comprende el loop en la línea subrayada y resaltada en letras negritas.

6.2 Script de relajación del modelo

6.2.1 Armado del Sistema

```

>>% mol new PchPUnrelax.pdb
>>% set all [atomselect top all]
>>% $all moveby [vecinvert [measure center $all]]
>>% $all writepdb PchP_centro.pdb
>>% mol delete all
>>% mol load pdb PchP_centro.pdb
>>% play 01BuildPsf.tcl
#####Open#07Restrain_CA.tcl#####
## CONSTRUIR EL PSF (conectividad) ##
#####
#Archivo de Topologia
package require psfgen
topology ./top_all27_prot_lipid_pch.rtf
#Renombra atomos que NO son reconocidos
pdbalias atom SER HG HG1
pdbalias atom ILE CD1 CD
pdbalias atom CYS HG HG1
pdbalias atom ILE 1HD1 HD1
pdbalias atom ILE 2HD1 HD2
pdbalias atom ILE 3HD1 HD3
#Selecciona cada una de las cadenas (A,B,C,D,E)
set pchp [atomselect top protein]
$pchp writepdb E.pdb
set mg [atomselect top ion]
$mg writepdb A.pdb
set pch [atomselect top "resid 319"]
$pch writepdb S.pdb
set ho [atomselect top "water"]
$ho writepdb H.pdb
segment A {first none; last none; pdb A.pdb }
coordpdb A.pdb A
segment S {first none; last none; pdb S.pdb }
coordpdb S.pdb S
segment H {first none; last none; pdb H.pdb }
coordpdb H.pdb H
segment E {first NTER; last CTER; pdb E.pdb }
coordpdb E.pdb E
#Se escriben los nuevos archivos PDB y PSF
guesscoord
writepdb PchPcentro.pdb
writepsf PchPcentro.psf
#Se eliminan todos los archivos creados temporalmente
file delete A.pdb
file delete S.pdb
file delete E.pdb
file delete H.pdb
#Se elimina todo y se cargan los archivos generados
mol delete all
mol load psf PchPcentro.psf pdb PchPcentro.pdb
#####Close#07Restrain_CA.tcl#####
>>% solvate PchPcentro.psf PchPcentro.pdb -t 15 -o PchP_centro_solv
>>% set prot [atomselect top protein]
atomselect17
>>% eval vecadd [$prot get charge]
-4.999996796250343

```

```

>>% set all [atomselect top all]
atomselect18
>>% eval vecadd [$all get charge]
-3.9999967142939568
>>%
>>% set prot [atomselect top protein]
atomselect17
>>% eval vecadd [$prot get charge]
-4.999996796250343
>>% set all [atomselect top all]
atomselect18
>>% eval vecadd [$all get charge]
-3.9999967142939568
>>% reading topology file C:/Program Files/University of
Illinois/VMD/plugins/noarch/tcl/autoionize1.2/ions.top
>>% mol delete all
>>% mol load psf PchP_equil.psf
9
>>% mol load pdb PchP_equil.pdb
10
>>% set all [atomselect top all]
atomselect153
>>% measure minmax $all
{-42.16899871826172 -33.39699935913086 -50.60599899291992}
{47.9370002746582 38.4640007019043 45.83700180053711}
>
>% measure center $all
2.8330488204956055 2.6980807781219482 -2.3832719326019287
>>% eval vecadd [$all get charge]
0.0
>>% eval vecadd [$prot get charge]
atomsel: get: was molecule 5 deleted?
>>% set prot [atomselect top protein]
atomselect154
>>% eval vecadd [$prot get charge]
0.0
>>%play 07Restraining_CA.tcl
#####Open#07Restraining_CA.tcl#####

#####
## Hacer los respectivos Restraining (CA) ##
#####
# Put harmonic restraints on the CA atoms for heating and unit cell
# equilibration. Use the coordinates from the last simulation frame.
set all [atomselect top all]
$all set beta 0
set sel [atomselect top "protein and backbone"]
$sel set beta 0.5
set sel2 [atomselect top "(protein and resid 31 33 35 166 242 261 262
267)"]
$sel2 set beta 1.0
$all writepdb Restraining_CA_PchP.pdb
#####Close#07Restraining_CA.tcl#####

```

6.2.2 Relajación (NAMD)

```
#####
## JOB DESCRIPTION                                     ##
#####

# RELAJACION PchPOO EN AGUA
# Ensamble NPT

#####
## ADJUSTABLE PARAMETERS                             ##
#####

structure          PchP_equil.psf
coordinates         PchP_equil.pdb
outputName         min_eq_pchp
set temperature    310

#####
## SIMULATION PARAMETERS                             ##
#####

if {0} {
set inputname      min_eq_open_p475d
binCoordinates     $inputname.restart.coor
binVelocities      $inputname.restart.vel  ;# remove the
"temperature" entry if you use this!
extendedSystem     $inputname.restart.xsc
}

# Input
paraTypeCharmm     on
parameters         par_all27_prot_lipid.prm
#parameters       par-extratrms.inp
temperature        $temperature

# Force-Field Parameters
exclude            scaled1-4
l-4scaling         1.0
cutoff             12.0
switching          on
switchdist        10.0
pairlistdist      13.5

# Integrator Parameters
timestep           1.0  ;# 1fs/step (2)
rigidBonds         water ;# needed for 1fs steps (2)
nonbondedFreq     1
fullElectFrequency 2
stepspercycle     20

# Constant Temperature Control
langevin           on    ;# do langevin dynamics
langevinDamping    1    ;# damping coefficient (gamma) of 10/ps (5)
langevinTemp       $temperature
langevinHydrogen  yes   ;# don't couple langevin bath to
hydrogens

# use lighter damping now that system is equilibrated
```

```

langevinPiston          on
langevinPistonTarget    1.01325
langevinPistonPeriod    100
langevinPistonDecay     300
langevinPistonTemp      300

useGroupPressure        yes      # smaller fluctuations
useFlexibleCell         yes      # allow dimensions to fluctuate
independently
useConstantRatio        no      # fix shape in x-y plane

# Periodic Boundary Conditions
cellBasisVector1        90.0     0.0     0.0
cellBasisVector2        0.0     72.0     0.0
cellBasisVector3        0.0     0.0     96.0
cellOrigin               3.17    2.33   -2.32
# the z dimension is going to shrink so pad sufficiently
# the margin could be reduced once the cell is equilibrated
margin 5

wrapAll                  on

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME                      yes
PMEGridSizeX             92
PMEGridSizeY             74
PMEGridSizeZ             98

# Output
binaryoutput             no
outputEnergies           1000
outputTiming             1000
xstFreq                  5000
dcdFreq                  2500
restartfreq              1000

#####

if {0} {
fixedAtoms               on
fixedAtomsForces         yes
fixedAtomsFile           Fix_Atoms_OPEN_P475D.pdb
fixedAtomsCol            B
}

#####

if {1} {
constraints              on
consRef                  Restraint_CA_PchP.pdb
consKFile                Restraint_CA_PchP.pdb
consKCol                 B
}

# IMD Settings (can view sim in VMD)
if {0} {
IMDon                    on
IMDport                  3000      ;# port number (enter it in VMD)
IMDfreq                  1         ;# send every 1 frame

```

```
IMDwait          no          ;# wait for VMD to connect before running?
}

#####

# run one step to get into scripting mode
minimize 0

# turn off until later
langevinPiston  off

# minimize nonbackbone atoms
minimize 5000
output min_fix

# min all atoms
#fixedAtoms     off
minimize 5000
output min_all

# heat with CAs restrained
# langevin      on
run 500000
output heat

# equilibrate volume with CAs restrained
langevinPiston  on
run 500000
output equil_ca
```