



UNIVERSIDAD DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

EXOPOLIFOSFATASAS, ENZIMAS RELACIONADAS  
CON EL ESTRES Y LA SUPERVIVENCIA:  
ESTUDIO MOLECULAR Y COMPUTACIONAL PARA ENTENDER LA RELACION ENTRE  
ESTRUCTURA Y FUNCION, Y EL MODO DE INTERACCION CON LIGANDOS

*Mic. Cristhian Boetsch*

DIRECTOR: Dr. Paola Rita Beassoni  
CODIRECTOR: Dr. Ángela Teresita Lisa

26 de agosto de 2016



## COMISIÓN ACESORA y JURADO

Dr. Gustavo Parisi

Universidad Nacional de Quilmes

Dr. Osvaldo Charra

Universidad Nacional de La Plata

Dr. Edgardo Jofré

Universidad Nacional de Río Cuarto

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: *Universidad Nacional de Río Cuarto, 26 de agosto de 2016*

Calificación:





# Financiamiento

Los fondos que respaldaron la realización de esta tesis fueron:

- la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto (SECYT-UNRC), bajo el proyecto “Regulación Transcripcional y relación entre estructura y función de proteínas relacionadas con el metabolismo de colina en *Pseudomonas aeruginosa*”, Director: A.T. Lisa;
- el Consejo Nacional de Investigaciones en Ciencia y Tecnología (CONICET), bajo el proyecto “Regulación transcripcional y relación entre estructura y función de proteínas relacionadas con el metabolismo de colina y fosfato en *Pseudomonas aeruginosa*”, Director: A.T. Lisa;
- Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Chile);



*“Después de escalar una montaña muy alta,  
descubrimos que hay muchas otras montañas por escalar”*  
(Nelson Mandela, 1918)

*“No hay una meta, no hay un arco del triunfo, no hay un paraíso que nos recibe  
porque moriste en la guerra. Lo que hay es la hermosura de vivir al tope, de querer la  
vida en cualquier circunstancia y luchar por ella e intentar transmitirla.”*  
(José Mujica, 2015)

*a mi padre*



# Agradecimientos

Por todo el apoyo obtenido a lo largo de esta tesis, es que dedico unas palabras, cortas, por supuesto, pero es que no alcanzan para expresar el profundo agradecimiento que siento:

- A CONICET quién otorgó la beca para la realización del doctorado;
- a la Universidad Nacional de Río Cuarto que me ofreció su espacio, y buena parte de la financiación;
- a Pao, mi Directora, no solo por guiarme en este sendero, su apoyo sino también por haber demostrado ser una gran amiga;
- a Tere, la jefa suprema, te hicimos renegar entre los tres varoncitos pero ahí estuviste para nosotros cuando lo necesitamos;
- a Danilo y Daniél, de Chile que fueron de gran apoyo y me facilitaron el estudiar un mundo completamente nuevo que es la bioinformática. ¿cómo no mencionar también a Horacio, Ariela, Jans, Ingrid y otros cuantos muchos de aquellos pagos?;
- a la gente del lab., Emi, Tincho, Diego y Ceci, que no solo siempre estuvieron para resolver dudas o bancarme en alguna sino por compartir grandes y buenos momentos;
- durante todos aquellos alumnos de doctorado que me crucé durante los cursos, fue muy grato haberlos conocido, y a los profesores quienes han sido de gran ayuda dentro y fuera del curso;

- a todos los miembros de la banda, por esos buenos momentos, tiradas a la parilla, sumamente necesarias para nuestro crecimiento intelectual, Lopez, Rossi, Usorach, Christoph, Ferrari, Pablo, Sosa, Alexis, Primo y Vicario;
- a lo largo de estos años fueron sumandose personas a la vida del doctorado: a Maricel, Fiore, a Tammy por su buena onda y entregar toda su confianza, a Mica por su constante positivismo-optimismo;
- a los microbios, Guille, Juli, Vani, Mari, Tana, Chele, Julia, Anita, Vasca, Romi, Noe, Orne, Betty y Naty, que algunos desde primero, otros ya más entrando en segundo año de la facu, venimos remando, cada uno con sus proyectos personales, pero siempre haciendose un tiempito para preguntar como te va, contar una buena (o mala) nueva;
- a mi “*concuwino*” -no literal- que remamos estos últimos años juntos en la casucha y que junto a los mendos supimos encontrar un lado religioso a la vida cada “miercoles de cenizas”;
- a las alumnas, Cintia, Maru, Vero, que llegaron al laboratorio y tuvieron su participación en esta tesis;
- a los muchachos del barrio (porque Río Ceballos ya es un barrio más), Fede, Nico, Ricky y Franco, casi todos las veces que viaje a mis pagos, me hice un lugarcito para encontrarme con ellos y poder disfrutar esos pequeños placeres que te da la vida y que es solamente estar juntos;
- a la **familia**, a mis hermanos que si no fuera por el maltrato que sufrí toda mi vida no me hubiese enderezado y ser el chico “bueno” que soy ahora;
- a mis primos, tíos e incontables parientes, que son siempre una gran fuente de alegría;
- por último a mis viejos, que sin ellos no podría estar donde estoy hoy.

# Resumen

En esta tesis Doctoral se estudia la enzima polifosfato fosfatasa de *Escherichia coli* cuya función es hidrolizar largas cadenas de polifosfato, de manera procesiva, a *orto*-fosfato. Esta proteína pertenece a la superfamilia de proteínas ASHKA, donde ha sido bien caracterizado el sitio activo. El estudio de esta proteína en particular es de importancia ya que conjuntamente con PPK (polifosfato quinasa) y mediante ensayos genéticos se ha demostrado que están relacionadas con la sobrevivencia bacteriana.

En este trabajo se presentan diferentes enfoques computacionales para entender el modo de interacción del sustrato (polifosfato) con Ppx y con otros ligandos como ATP, GTP, ppGpp, pppGpp. Se realizan ensayos de Docking con estos ligandos y se evalúa la influencia del potencial electrostático en dichas interacciones. Este estudio a su vez, indaga las relaciones evolutivas con otras polifosfatasas, tal el caso de la proteína ortóloga de *Pseudomonas aeruginosa*, determinando la importancia, según el grado de conservación, de los residuos de unión al ligando,.

Con el fin de conocer las implicancias en el modo de unión del sustrato a Ppx, se realizaron ensayos de dinámica molecular dirigida y se obtuvieron perfiles de energía libre que permitieron entender la importancia del largo de la cadena del polifosfato y la procesividad de la enzima. Mediante estas simulaciones se propuso al residuo H<sup>378</sup> como fundamental para el reconocimiento del polifosfato de cadena larga, actuando como residuo portero o “gatekeeper”; que permite el pasaje por el acueducto (residuos E<sup>163</sup>, R<sup>165</sup>, E<sup>371</sup>, N<sup>377</sup>, H<sup>378</sup> y R<sup>449</sup>) formado en la interface de dimerización. La participación de este residuo crítico para la especificidad de sustrato de cadena larga fue corroborada por mutación sitio-dirigida y por ensayos cinéticos.

De esta manera, se realizaron aportes para avanzar en el conocimiento de la relación entre estructura y función de esta enzima, lo que permite por extensión conocer también algunas características de su ortólogo en *Pseudomonas aeruginosa* como así también de polifosfatasas de otros organismos. Considerando la participación de los polifosfato en la sobrevivencia bacteriana, crecimiento, respuesta estricta, movilidad, “quorum sensing”, etc, los avances realizados en este trabajo de tesis Doctoral, contribuyen a sentar las bases para el diseño racional de fármacos dirigidos a Ppx y así poder contrarrestar la acción patogénica de microorganismos dañinos para el hombre.





# Abstract

The exopolyphosphatase of *Escherichia coli* processively and completely hydrolyses long polyphosphate chains to ortho-phosphate. Genetic surveys, based on the analysis of single *ppx*<sup>-</sup> or *ppk*<sup>-</sup> mutants and on the double mutant, demonstrated a relationship between these genes and the survival capacity. The exopolyphosphatase belongs to the ASHKA protein superfamily, hence, its active site is well known; however, the knowledge of the way in which this enzyme binds polyP remains incomplete.

In this work we present different computational approaches, to understand the substrate (polyphosphate) interaction mode with the enzyme, and other ligands like ATP, GTP, ppGpp, pppGpp. In this sense, we performed docking assays with these ligands and we evaluated the influence of the electrostatic potential in such interactions. This study was also addressed digging into the evolutionary relationships with other exopolyphosphatases, as is the case of the ortholog enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*, and the importance of ligand binding residues according to the degree of conservation was determined. In order to understand the implications in the binding mode of the substrate to the exopolyphosphatase, steered molecular dynamics simulations were performed and free energy profiles were obtained that allowed us to understand the importance of long chain polyphosphate and processivity of the enzyme. This assays allowed to us to propose the residue H<sup>378</sup> as fundamental to long chain polyphosphate recognition, acting as a gatekeeper in the traversing of polyphosphate through the aqueduct, formed between the dimerization interface (residues E<sup>163</sup>, R<sup>165</sup>, E<sup>371</sup>, N<sup>377</sup>, H<sup>378</sup> y R<sup>449</sup>). The participation of this critical residue for long chain polyphosphate specificity was confirmed by site-directed mutation and kinetic assays.

Progress on the knowledge of this enzyme, allows us to know by extension some features of its ortholog in *Pseudomonas aeruginosa* as well as other exopolyphosphatase.

Considering the participation of polyphosphate in bacterial survival, growth, stress response, motility, quorum sensing, among others, the contributions of this thesis work, would aim to lay the foundation for the rational design of drugs aimed at exopolyphosphatase to counteract the pathogenicity of this important pathogen.



# Índice general

<b>Financiamiento</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>XI</b>
<b>Índice</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>XXI</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>XXIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>XXV</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Polifosfatos . . . . .	1
1.2. Funciones del polyP . . . . .	2
1.3. Enzimas relacionadas a polyP . . . . .	3
1.4. Exopolifosfatasa . . . . .	3
1.5. Introducción a Dinámica Molecular . . . . .	8
<b>2. Objetivos</b>	<b>11</b>
2.1. Objetivo General . . . . .	11
2.2. Objetivos específicos: . . . . .	11
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>13</b>
3.1. Potencial electrostático . . . . .	13

3.2. Búsqueda de cavidades . . . . .	13
3.3. Docking Molecular . . . . .	13
3.4. Análisis filogenético . . . . .	14
3.5. Modelado Sitio Activo . . . . .	14
3.6. Mecánica Cuántica . . . . .	15
3.7. Parametrización de polyP . . . . .	15
3.8. Espectrometría de infrarrojo . . . . .	16
3.9. Dinámica Molecular . . . . .	16
3.10. Determinación de la energía libre . . . . .	17
3.11. Cepas, condiciones de cultivo . . . . .	17
3.12. Metodología de ADN . . . . .	18
3.13. PCR . . . . .	18
3.14. Mutaciones sitio dirigidas . . . . .	18
3.15. Purificación de <i>ecPpx</i> . . . . .	19
3.16. Determinación de la concentración de proteínas . . . . .	20
3.17. Ensayos enzimáticos . . . . .	20
<b>Resultados</b>	<b>23</b>
<b>4. Sitios de unión favorables</b>	<b>23</b>
4.1. Potencial electrostático . . . . .	23
4.2. Docking . . . . .	28
4.2.1. Docking sobre la superficie completa de la proteína . . . . .	28
4.2.2. Docking y bolsillos de unión . . . . .	28
4.2.3. Docking sobre el sitio activo . . . . .	30
4.2.4. Docking sobre el canal electropositivo y el acueducto . . . . .	33
<b>5. Homólogos</b>	<b>37</b>
5.1. Árbol filogenético . . . . .	37
5.2. Modelados estructurales . . . . .	42
5.2.1. Sitio Activo . . . . .	42
5.2.2. Modelado Ppx de <i>Escherichia coli</i> ( <i>ecPpx</i> ) estructura abierta . . . . .	43
5.2.3. Modelado <i>paPpx</i> . . . . .	45

5.3. Ppx de <i>A. tumefaciens</i> . . . . .	48
5.4. Estructuras similares . . . . .	52
<b>6. Dinámicas moleculares</b>	<b>55</b>
6.1. Parametrización de polyP . . . . .	55
6.2. Espectro IR . . . . .	60
6.3. Dinámica molecular . . . . .	60
6.4. Cálculo de energía libre de disociación . . . . .	61
<b>7. Experimentos húmedos</b>	<b>65</b>
7.1. Clonado de <i>ecppx</i> . . . . .	65
7.2. Sobreexpresión de <i>ecppx</i> WT y mutante . . . . .	65
7.3. Caracterización cinética de <i>ecPpx</i> . . . . .	67
7.4. Cambios conformacionales . . . . .	68
7.5. Rol de H <sup>378</sup> en el reconocimiento del largo del sustrato . . . . .	69
<b>Conclusiones</b>	<b>73</b>
<b>8. Observaciones finales</b>	<b>73</b>
<b>Apéndice</b>	<b>81</b>
<b>A. Scripts utilizados</b>	<b>81</b>
A.1. Minimización y equilibrado de sistema . . . . .	81
A.2. SMD . . . . .	83
<b>B. Archivos de parámetros y topología</b>	<b>87</b>
B.1. Archivo de parámetros para polyP . . . . .	87
B.2. Archivo de topología para polyP . . . . .	90
<b>Bibliografía</b>	<b>93</b>



# Índice de figuras

1.1. a) Modelo de unión de polyP propuesto según la unión de iones $\text{SO}_4^{2-}$ en <i>ecPpx</i> , imagen tomada de (Alvarado <i>et al.</i> , 2006) y b) regiones de potencial electronegativo de <i>ecPpx</i> donde se uniría polyP, imagen tomada de (Rangarajan <i>et al.</i> , 2006) . . . . .	5
3.1. Representación de un tetra-polifosfato utilizado para los cálculos de energía de diedro. Se muestra en esferas grises los átomos que forman el diedro $\phi$ y en bastones azules $\psi$ . . . . .	16
4.1. Representación de la superficie de <i>ecPpx</i> con los $\text{SO}_4^{2-}$ presentes en la estructura PDB:1U6Z (esferas y bastones): a) vista de frente, se marca el canal electropositivo junto a la entrada al acueducto; b) vista de detrás, se muestra la salida del acueducto y el sitio 2 ( $\text{SO}_4^{2-}$ 4); y c) vista del sitio activo. . . . .	24
4.2. Potencial electrostático de Ppx. a), b) y c) pH=6 ( $\text{Ppx}^{+16}$ ), d) e) y f) pH=8 ( $\text{Ppx}^{-1}$ ). Se observa un potencial electrostático altamente positivo en la región del canal formado por ambos dímeros (A y D) y en el bolsillo del posible sitio activo (c y f) donde las regiones de mayor potencial se localizan cercana a $\text{Mg}^{+2}$ en el sitio activo y dentro del canal. Por otro lado a pH 8 Ppx muestra un potencial electrostático negativo del lado opuesto al canal. . . . .	25
4.3. Superposición de los residuos involucrados en la formación de los acueductos en <i>ecPpx</i> (1U6Z). En cian acueducto formado por el residuo $\text{H}^{378}$ de la cadena A y verde por el residuo $\text{H}^{378}$ de la cadena B. b) y c) corte transversal del acueducto (líneas punteadas) para el residuo $\text{H}^{378}$ de la cadena B y A respectivamente. . . . .	27

- 
- 4.4. Ensayos de docking con  $PP_5$  sobre *ecPpx*. a) vista de frente al canal electropositivo de todas las conformaciones con  $\Delta G$  negativos; b) c) y d) superficie accesible a solvente de *Ppx* coloreado según la menor energía de unión de los ligandos a 5 Å de distancia. Vistas del frente (b) y cara opuesta al canal electropositivo (c) y sitio activo (d), respectivamente. . . . . 29
- 4.5. Esquematización de los túneles calculados mediante MOLE en *ecPpx*. Se muestran sitio activo a) y el canal electropositivo junto al acueducto b). c) y d) representan los radios respectivamente; e) bolsillos calculados con *icmPocketFinder*, en celeste se observa el canal electropositivo y en verde el sitio activo. También se pueden observar pequeños bolsillos en la intersección entre dominio I y III (marrón). . . . . 31
- 4.6. Docking en el sitio activo de ATP (a y b); ADP (c); y GTP (d, e y f). a), c) y d) muestran todas las conformaciones obtenidas; b) y e) mejor conformación obtenida. . . . . 32
- 4.7. Docking mapeando una región que abarca el canal electropositivo y acueducto con: a)  $PP_3$ ; b)  $PP_6$ ; c)  $PP_9$  y d) una de las conformaciones de  $PP_9$  atravesando el acueducto. . . . . 34
- 5.1. Árbol filogenético simplificado y coloreado según el residuo presente en posición equivalente a R<sup>165</sup> (a); y E<sup>163</sup> y H<sup>378</sup> (b) . . . . . 38
- 5.2. Representación de la superficie: a) vista de frente; b) vista de atrás; c) vista desde arriba del sitio activo y d) vista del costado del dominio I; coloreada según la conservación de residuos obtenidos mediante *ConSurf* desde 1 (rojo) menos conservado a 9 (azul) más conservado. . . . . 40
- 5.3. Se representa a) canal electropositivo y acueducto; b) hendidura segmento N-terminal; c) región intermedia entre el sitio activo y el canal electropositivo; d) zona interdominio I y II; izquierda representación cintas y bastones, derecha superficie. . . . . 41



5.4. Sitio activo de: a) NTPDasa2 de <i>Rattus norvegicus</i> , se presenta el ion $\text{Ca}^{2+}$ interaccionando con 4 moléculas de agua y dos átomos de oxígeno del ANP; b) modelo para <i>ecPpx</i> ubicados por superposición con la NTPDasa2 (transparente) y optimizado por QM/MM; c) vista de perfil, se observa con línea punteada la orientación de la molécula de agua involucrada en el ataque nucleofílico, interaccionando directamente con el $\text{E}^{121}$ . . . . .	44
5.5. Representación de posibles orientaciones de la región N-terminal en <i>ecPpx</i> : a) resultado directo de modelar con <i>aaPpx</i> y <i>ecPpx</i> ; b y c) conformaciones obtenidas por docking proteína-proteína, b) conformación más favorable, el canal no se continua con la hendidura del sitio activo mientras que si ocurren mayor continuidad en c); izquierda representación NewCartoon, derecha Superficie coloreado con potencial electrostático. . . . .	46
5.6. Modelo de <i>ecPpx</i> en conformación abierta: a) representación en cintas de proteína completa en verde superpuesto PDB:1U6Z en cyan; b) en cintas y bastones sitio activo, en esfera verde $\text{Mg}^{2+}$ , nótese la molécula de agua que completa la esfera de coordinación tetraédrica del $\text{Mg}^{2+}$ . . . . .	47
5.7. Superposición de el modelo de <i>paPpx</i> (cyan) con la estructura de <i>ecPpx</i> (pdb 1U6Z; verde): a) dímero completo; b) puente salino entre $\text{E}^{371}$ y $\text{R}^{449}$ de <i>ecPpx</i> , se muestran los residuos equivalentes en <i>paPpx</i> formando puente salino; y el loop adyacente al ser más corto, presenta estructura diferente. . . . .	48
5.8. Potencial electrostático de <i>atPpx</i> (a y b) y <i>paPpx</i> (c y d). Vistas desde el frente y detrás (izquierda y derecha respectivamente. Cálculos realizados con APBS a pH=8. . . . .	49
5.9. Superposición entre <i>atPpx</i> y <i>ecPpx</i> : a) N-terminal (rmsd 1,89); b) C-terminal (rmsd 4,68) y c) dímero C-terminal (rmsd 6,59) Å. . . . .	50
5.10. Representación de las diferencias entre <i>atPpx</i> (azul) y <i>ecPpx</i> (rojo): a) superposición del segmento que une la región N-terminal con C-terminal; b) esquema representando la disposición de la región N-terminal (trapecio) con sitio activo (triángulo amarillo) respecto de las subunidades C-terminal (rectángulo). . . . .	51

5.11. Representación de la superficie: a) vista de frente; b) vista de atrás coloreada según la conservación de residuos obtenidos mediante. . . . .	52
6.1. Representación en bastones de una molécula de hexa-polifosfato luego de optimización por RHF/6-31+G*. . . . .	56
6.2. Representación de polyP. ON3 son los oxígenos aniónicos, ON2 los enlazantes. Los oxígenos enlazantes de los residuos extremos poseen cargas diferentes a los otros residuos de manera similar como ocurre con los oxígenos aniónicos y el fósforo (P2) estos últimos poseen una carga . . .	56
6.3. Superficie de energía potencial en la rotación de los diedros $\phi$ y $\psi$ calculados por mecánica cuántica a) (RHF/6-31+G*); y mecánica clásica: b) diedros incluidos, c) diedros + CMAP. d) diferencia en valores absolutos (—QM-MM—) entre a) y c) desde 0,25 kcal.mol <sup>-1</sup> con incremento de 0,5 kcal.mol <sup>-1</sup> . a b y c) incremento de 1 kcal.mol <sup>-1</sup> hasta 10 kcal.mol <sup>-1</sup> , se muestran además 12,5 15,0 17,5 y 20 kcal.mol <sup>-1</sup> . d) desde 0,25 y con incremento de 0,5 kcal.mol <sup>-1</sup> . . . . .	58
6.4. Espectro infrarrojo de tetrafosfato de amonio (negro) en comparación al espectro calculado por QM de tetrafosfato (rojo) y amonio (verde) . . .	59
6.5. Cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) para (a) PP <sub>6</sub> y (b) PP <sub>20</sub> iniciando unido al canal electropositivo en dirección hacia y opuesta al acueducto hasta soltarse de la proteína. Eje de coordenadas centradas en cadena lateral de H <sup>378</sup> . Ensamble NTP, k=100 kcal.mol <sup>-1</sup> .Å <sup>-2</sup> , tiempo de integración 1 fs, velocidad 10 Å.ns <sup>-1</sup> . . . . .	62
6.6. Superposición de un estado de la dinámica molecular dirigida, con los SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 6B 7A y 8B del cristal PDB:1U6Z. . . . .	63
7.1. Electroforesis SDS-PAGE: a) control de sobreexpresión, 1-6) las diferentes cepas, 1s 3s y 5s control sin inducir, M) marcador de peso molecular (82, 61, 45, 34, y 27 KDa); b) control de purificación en columna de Ni <sup>2+</sup> , FT fracción no retenida, W1 primer volumen de lavado, W2 último volumen de lavado, E1, E2, E3, E4, E5 y E6, eluidos 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mM de imidazol, R resina . . . . .	66

7.2.	Dependencia de la actividad enzimática en función de la temperatura. ● PP <sub>25</sub> , ■ PP <sub>65</sub> , Mg <sup>2+</sup> 1 mM. . . . .	68
8.1.	Representación del modo de unión de polyP. En cartoon la estructura secundaria de Ppx, en color naranja se representa la cadena de polyP; representados como esferas verdes los residuos 3, 14 y 50 de polyP y en esferas rojas y amarillas iones sulfato cristalográficos: a) polyP unido según Alvarado <i>et al.</i> (2006); b) posible recorrido según resultados del docking; c) y d) descripción según Rangarajan <i>et al.</i> (2006) con la región N-terminal en conformación cerrada o abierta, respectivamente. . . . .	74
8.2.	Mecanismo propuesto de unión para polyP (rojo) a <i>ecPpx</i> : a) cerca del canal electropositivo; b) formando un bucle; c) el polyP atraviesa el acueducto; y d) alcanza el sitio activo (el residuo 14 del polyP, contando desde el sitio activo, se resalta en esfera azul). Aniones SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> se muestran en representación de esferas ocre. . . . .	77



# Índice de tablas

3.1. <b>Oligonucleótidos utilizados en este trabajo:</b> 1 y 2- para el clonado del gen <i>ecppx</i> , subrayado se indican los sitios de corte insertos. 3- cebadores mutagénicos, se subrayan las bases mutadas (solo se muestra el oligonucleótido correspondiente a la cadena codificante . . . . .	19
4.1. <b>Valores de <math>pK_a</math> de residuos ionizables del acueducto</b> . . . . .	26
6.1. <b>Parámetros para polyP:</b> Parámetros optimizados para polyP. Nótese la presencia de una serie de Fourier para el diedro P2 ON2 P2 ON2. . . . .	57
7.1. <b>Parámetros enzimáticos</b> . . . . .	67



# Abreviaturas

**ASKHA** acetato y azúcar quinasa, Hsp70, actina

**ecPpx** Ppx de *Escherichia coli*

**aaPpx** Ppx/GPPA de *Aquifex aeolicus*

**paPpx** Ppx de *Pseudomonas aeruginosa*

**PPK** polifosfato quinasa

**Gpp** guanosina pentafofosfato fosfohidrolasa

**polyP** polifosfato inorgánico

**P<sub>i</sub>** orto-fosfato

**PP<sub>i</sub>** pirofosfato

**ATP** adenosin 5'trifosfato

**AMPNP** eter adenilato-ácido fosfoaminofosfónico

**GTP** guanosin 5'trifosfato

**ppGpp** guanosin 5'-3' bis-difosfato

**pppGpp** guanosin 5' trifosfato 3' difosfato

**ARN** ácido ribonucleico

**ADN** ácido desoxiribonucleico

**QM/MM** híbrido mecánica cuántica/mecánica molecular

**QM** mecánica cuántica

**MM** mecánica molecular

**PMF** potencial de fuerza media

**BLAST** Basic Local Alignment Search Tool

**PDB** Protein Data Banck

**APBS** Adaptive Poisson-Boltzmann Solver

**PCR** reacción en cadena de polimerasa

**PDB** base de datos de proteínas

**vdW** van der Waals

**msd** error cuadrado medio

**CMAP** “cross term map”; funciones de suavizado de la grilla de corrección

**FEP** free energy perturbation

**IR** infra rojo

**MD** dinámica molecular

**SMD** “steered molecular dynamics”; dinámica molecular dirigida

**ABF** “Adaptive Biasing Force”; fuerza de empuje adaptativa



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Polifosfatos

Los polifosfatos (polyP) son polímeros que comprenden desde unas pocas moléculas de ortofosfato hasta cientos de ellas unidas por uniones fosfoanhidro de alta energía. Estos polímeros están ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que se encuentran tanto en organismos eucariotas como en procariotas formando agregados celulares.

Los polyP tienen una fórmula general  $M_{(n+2)}P_nO_{(3n+1)}$ , donde M puede ser protón o catión, y  $n$  comprende desde 2 hasta  $10^6$ , indicando el grado de polimerización. La forma de obtener largas cadenas de polyP es conocida y consta de la fusión de la sal de orto-fosfato (orto-fosfato ( $P_i$ )). Por ejemplo, la sal de Graham se obtiene a partir de  $NaH_2PO_4$  entre 700 y 800°C lográndose cadenas de  $10^2$  monómeros, mientras que la sal de Kurrol ( $10^4$ ) por fusión de  $KH_2PO_4$  a 260°C. Esta última, si bien es insoluble en agua, puede disolverse fácilmente mediante intercambio iónico con mono-cationes como por ejemplo NaCl, mientras que las sales de di-cationes son de mayor insolubilidad (Kulaev *et al.*, 2004). Si bien la estructura cristalina de sales de polyP es bien conocida (Kulaev *et al.*, 2004; Jost y Schulze, 1969), no se recabaron datos de la estructura que estos polímeros adoptan en soluciones acuosas.

## 1.2. Funciones del polyP

Son un importante reservorio de  $P_i$ , pero además tienen un papel relevante en la sobrevivencia bacteriana en fase estacionaria; están íntimamente relacionados con la capacidad de responder a diferentes tipos de estrés y han sido involucrados en la virulencia de ciertos patógenos ya que están relacionados, entre otras cosas, con el “quórum sensing”, la motilidad y la esporulación (Rao *et al.*, 2009).

Diversas funciones han sido atribuidas a polyP, entre las que podemos mencionar:

- sustituye al ATP como fuente de energía. Esto se realiza directamente a través de la síntesis de ATP, o por medio de la transferencia del fosfato terminal del polyP al AMP, catalizado por la AMP-transferasa. Una vez formado el ADP y mediante la adenilato quinasa, se sintetiza ATP. A su vez, se ha observado que polyP puede reemplazar a ATP en la fosforilación de glucosa (Rao *et al.*, 2009);
- tiene capacidad buffer frente a bases, como en algas levaduriformes (Rao *et al.*, 2009);
- participa en la incorporación de ADN a la célula a través de la formación de canales de complejo de polihidroxitirato- $Ca^{2+}$ -polyP (Rao *et al.*, 2009; Reusch y Sadoff, 1988);
- es capaz de quelar iones metálicos, ya sea en la regulación de la concentración de calcio, o como detoxificación de otros metales (Rao *et al.*, 2009; Remonsellez *et al.*, 2006);
- está involucrado en la regulación de estrés y supervivencia, interaccionando con proteínas básicas (como histonas), o dominios básicos de proteínas tal como ocurre con polimerasas y proteínas nucleares no histónicas, pudiendo afectar tanto positiva como negativamente las funciones génicas; respuesta estricta, etc (Rao *et al.*, 2009; Crooke *et al.*, 1994);
- participa en la regulación ante cambios medioambientales: se ha propuesto que las concentraciones de polyP afectan la formación de cuerpos fructíferos aportando la energía necesaria como ha sido descrito en *Myxococcus xanthus*; o como componente de cápsula como se ha reportado en *Neisseria* spp. (Rao *et al.*, 2009);

- importante reservorio de  $P_i$ . polyP puede convertirse en  $P_i$  a través de la acción de exopolifosfatasa (Rao *et al.*, 2009; Keasling *et al.*, 1993). Tal como ocurre con otros polímeros, el polyP acomplejado con sus contra iones presenta menor potencial osmótico respecto al  $P_i$  libre (Rao *et al.*, 2009).

### 1.3. Enzimas relacionadas a polyP

La única vía de síntesis conocida de polyP en procariotas, es a través de la polimerización del fosfato  $\gamma$  del ATP, mediante la acción de la polifosfato quinasa (PPK) (Rao *et al.*, 2009). Esta enzima, en *Escherichia coli*, se encuentra en el mismo operón que la polifosfato fosfatasa (Ppx), enzima encargada de la degradación de polyP, aunque no se conoce la regulación del operón para estas dos enzimas de funciones contrapuestas (Rao *et al.*, 2009). PPK en *E. coli* sintetiza largas cadenas de 750 residuos, sin embargo, cuando se delecionaron de los genes *ppk* y *ppx*, se encontraron polyPs de alrededor de 60 residuos, indicando otras vías de síntesis ya sea a partir de ADP, acetil-P, 1,3-difosfoglicerato, dolicilpirofosfato, como por fijación de fosfato en  $PP_i$  o ATP por fuerza protón motriz (Rao *et al.*, 2009; Crooke *et al.*, 1994). Mutantes delecionales de *ppk1* en *Pseudomonas aeruginosa*, permite mantener hasta un 20 % el nivel de polyP respecto a la WT. Esto se debe en gran parte a la presencia de una segunda quinasa, la PPK2.

### 1.4. Exopolifosfatasa

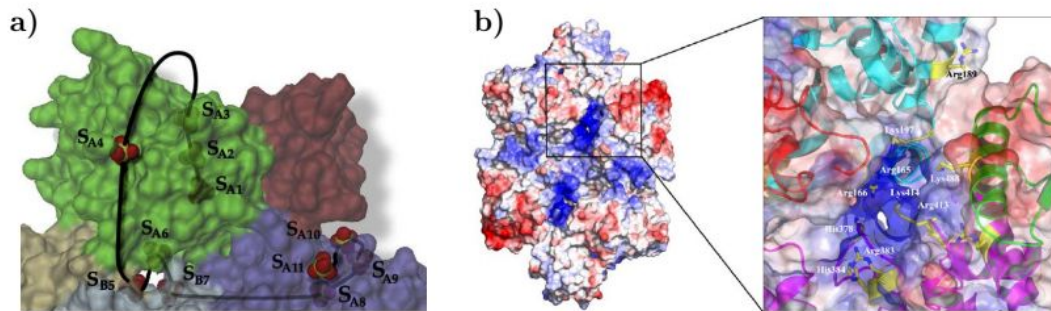
Varias Ppx han sido estudiadas en diferentes organismos: *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma* sp., *Aquifex aeolicus*, *Leishmania major*, *P. aeruginosa*, *Sulfolobus solfataricus* entre otras; o resuelta su estructura: PDB:3RF0 de *Yersinia pestis*; PDB:3CER de *Bifidobacterium longum* o PDB:3HI0 de *Agrobacterium tumefaciens*. De ellas, una de las mejor caracterizadas estructuralmente es la *ecPpx* cuyo modelo estructural ha sido resuelto por cristalografía de rayos X en 2006, por dos grupos de investigadores (PDB: 1U6Z (Alvarado *et al.*, 2006) y 2FLO (Rangarajan *et al.*, 2006)). Se trata de un dímero con los monómeros dispuestos en cabeza con cola. Cada monómero está constituido por 2 subunidades bien diferenciadas: la región N-terminal de 34 kDa, con los dominios I y II, la cual contiene el sitio activo; y la región C-terminal de 24 kDa, con los dominios III y IV. El dominio III es el que principalmente está

involucrado en la interface de dimerización (Alvarado *et al.*, 2006). *ecPpx* tiene un sitio sensible a proteólisis en el loop que une las subunidades N- y C-terminales (Bolesch y Keasling, 2000a). La región C-terminal ha sido propuesto como el encargado de la unión de polyP de cadena larga, mientras que la N-terminal contiene el sitio activo y uniría polyP de cadena corta (Bolesch y Keasling, 2000a).

La región N-terminal pertenece a la superfamilia de las ASKHA (acetato y azúcar quinasa, Hsp70, actina). La comparación de *ecPpx* con otros miembros de esta superfamilia, permitió postular los residuos involucrados en el sitio activo: E<sup>121</sup> es el residuo encargado de activar una molécula de agua para realizar el ataque nucleofílico sobre el fosfato terminal. Dos motivos (D/N)XG se encuentran en el sitio activo. En el dominio I, D<sup>17</sup> S<sup>20</sup> N<sup>21</sup> y S<sup>22</sup> se encuentran contenidos en un loop crítico para la unión a fosfato en otros miembros de la familia ASKHA. El otro motivo se ubica en un loop del dominio II, enfrentando al primer motivo, y se ha encontrado en otros miembros de las ASKHA quinasa. Se trata de los residuos D<sup>143</sup>, G<sup>146</sup>, G<sup>147</sup> y S<sup>148</sup> (Alvarado *et al.*, 2006). Los dos aspárticos, D<sup>17</sup> y D<sup>143</sup> han sido predichos en la interacción con el metal que es necesario para la catálisis (Alvarado *et al.*, 2006; Hurley, 1996). Mutaciones no conservadas en D<sup>143</sup> y E<sup>150</sup> produjeron variantes inactivas (Alvarado *et al.*, 2006) confirmando su participación en el sitio activo. A diferencia de otros miembros de la familia ASKHA, *ecPpx* tiene preferencia por sustratos de cadena larga y no hidroliza ATP (Alvarado *et al.*, 2006; Akiyama *et al.*, 1993).

El metabolismo de polyP está íntimamente relacionado con la respuesta estricta donde la proteína RelA sintetiza guanosin 5' trifosfato 3' difosfato (pppGpp) a partir de ATP y GTP, mientras que la guanosina pentafofosfato fosfohidrolasa (Gpp) produce guanosina 5' difosfato 3' difosfato (ppGpp) (Hara y Sy, 1983). Ambas moléculas regulan la transcripción interaccionando con la ARN polimerasa (Chatterji y Ojha, 2001). Se ha demostrado que pppGpp es un inhibidor competitivo de *ecPpx*, por lo cual en esas condiciones fisiológicas se estimula la acumulación de polyP por inhibición de esta enzima (Kuroda *et al.*, 1997; Miyake *et al.*, 1999).

Estudios realizados por Bolesch y Keasling (2000a) en *ecPpx*, basados en la pérdida de procesividad provocado por altas concentraciones de KCl, demostraron la liberación de pirofosfato (PP<sub>i</sub>), PP<sub>3</sub>, PP<sub>14</sub> y PP<sub>50</sub> a medida que la concentración de K<sup>+</sup> aumenta. Esto permitió sugerir la presencia de 3 sitios importantes de unión a polyP. El primero,



**Figura 1.1** a) Modelo de unión de polyP propuesto según la unión de iones  $\text{SO}_4^{2-}$  en ecPpx, imagen tomada de (Alvarado *et al.*, 2006) y b) regiones de potencial electro negativo de ecPpx donde se uniría polyP, imagen tomada de (Rangarajan *et al.*, 2006)

adyacente al sitio activo; el segundo en la región cercana al residuo 14 del polyP, y el tercero, en el residuo 50. La posición de estos sitios no ha sido definida hasta el momento debido a que la estructura de la enzima acomplejada con este polímero no ha sido reportada.

Sin embargo, los dos grupos de investigación que han reportado la estructura de ecPpx han sugerido posibles modos de unión de polyP mediante dos enfoques diferentes. Por un lado, Alvarado *et al.* (2006) han descrito una posible zona de unión en base a una serie de iones sulfato presentes en el cristal, asumiendo que los sulfatos podrían unirse en el mismo lugar donde lo hace el polyP y en el cual se sugiere que las distancias entre los sitios son consistentes con el largo de la cadena de polyP. En la Figura 1.1 a) se muestra el posible recorrido del polyP partiendo del sitio activo (sitio 1), pasa por una región en el N-terminal donde se encuentra un sulfato (sitio 2), atraviesa un acueducto para unirse en una región electro positiva (sitio 3) para luego terminar unido entre el dominio III y I del dímero (sitio 4). Un segundo enfoque fue propuesto por (Rangarajan *et al.*, 2006) quienes sugirieron la presencia de un “canal” de unión al polyP con un potencial electrostático altamente positivo presente en la interface de dimerización. Ambos enfoques son coincidentes en proponer las zonas de unión del polyP a la ecPpx. Estos residuos son: R<sup>165</sup>, R<sup>166</sup>, R<sup>189</sup>, R<sup>197</sup> correspondientes a un monómero, y H<sup>378</sup>, H<sup>384</sup>, R<sup>383</sup>, R<sup>413</sup>, K<sup>414</sup>, K<sup>488</sup>, para el otro monómero (Figura 1.1). De éstos, se observó que R<sup>166</sup>, R<sup>197</sup>, H<sup>378</sup>, R<sup>413</sup> están unidos a triadas de iones sulfatos en la estructura 1U6Z (Alvarado *et al.*, 2006).

En la bacteria *Aquifex aeolicus*, se ha reportado la estructura de una Ppx/GPPA (*aaPpx*) unida al producto de la reacción ppGpp (Kristensen *et al.*, 2004). Esta enzima es algo diferente a *ecPpx* ya que está formada sólo por la región N-terminal, y por ende carece de los dominios III y IV de la región C-terminal. Se trata también de un dímero pero la interface de dimerización es diferente debido a esta ausencia de la región C-terminal. Esta enzima cataliza la hidrólisis de pppGpp en ppGpp. Llamativamente, *A. aeolicus* carece de PPK, por lo cual el rol fisiológico de esta enzima parece ser diferente.

En la estructura cristalina, *aaPpx* fue co-cristalizada con  $\text{Ca}^{+2}$  o ppGpp, y ésta se encuentra en conformación abierta (Kristensen *et al.*, 2004). Kristensen *et al.* (2004) hacen especial énfasis en la necesidad de estar en esta conformación para permitir la unión del sustrato, cosa que no sería posible si un pequeño giro en un loop produce un cierre entre los dominio I y II. Ambas estructuras de *ecPpx* reportadas (PDB:1U6Z,2FLO) se encuentran en conformación cerrada, por lo que Rangarajan *et al.* (2006) discuten sobre esta diferencia, y proponen que *ecPpx* podría tener un cambio conformacional pasando de una estructura cerrada a abierta, lo cual dejaría una hendidura directamente conectada al canal electropositivo y proponiendo a este como el modo de unión de polyP.

Por otra parte, Alvarado *et al.* (2006) realizan una superposición de *ecPpx* con la proteína filamentosa sensible a temperatura A (FtsA) de *Thermotoga marítima* (PDB:1E4G) (van den Ent y Löwe, 2000). Observando la posición del ATP, argumentan que la baja afinidad por éste es debido a choques de la ribosa con la cadena lateral de la N<sup>21</sup>, y de la base nitrogenada con C<sup>169</sup> y R<sup>267</sup>. De ocurrir el cambio conformacional para pasar de una conformación cerrada a abierta, Rangarajan *et al.* (2006) proponen que habría suficiente espacio para que interaccione el nucleótido sin producirse los choques electrostáticos.

En *P. aeruginosa*, bacteria que se estudia en nuestro grupo de trabajo desde hace varios años, la síntesis de polyP es llevada a cabo por una PPK1 (PA5242) y su hidrólisis hasta P<sub>i</sub> por Ppx (PA5241) (Zago *et al.*, 1999; Miyake *et al.*, 1999). Por otro lado, colina ha sido propuesto como un factor que contribuye a la patogénesis de *P. aeruginosa* (Domenech *et al.*, 1991; Lisa *et al.*, 1994, 2007), ya que se observó que cuando este compuesto es utilizado por la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno, regula las cantidades de polyP almacenadas (Grumelli, 1998), hallazgo que centró la atención

de nuestro grupo en el estudio de la Ppx de *P. aeruginosa* (*paPpx*). Uno de los objetivos iniciales fue la caracterización de la relación estructura/función de *paPpx* que fue motivo del desarrollo de parte de la tesis doctoral de Gallarato (2012).

Además de la proteína completa, *paPPX* fue purificada, por separado, en sus variantes N- y C-terminal. Se caracterizó bioquímicamente la proteína completa y el fragmento N-terminal de *paPpx*, analizando su actividad con sustratos de 25, 45 y 65 residuos de fosfato de longitud. El análisis cinético con estos 3 sustratos mencionados, permitieron determinar que la ausencia del fragmento C-terminal resulta en una enzima sin preferencias por sustrato de cadena larga (Gallarato, 2012; Beassoni *et al.*, 2015).

*paPpx* posee un 41 % de identidad y un 59 % de positividad con *ecPpx* (Beassoni *et al.*, 2015). Este grado de similitud permitió hacer un modelado comparativo, el cual sugiere que el sitio activo se encuentra entre los dominios I y II de la región N-terminal y la cadena de polyP tendría 3 zonas de interacción, 2 en la región N-terminal y uno en la subunidad C terminal. Este último, sería el responsable de interaccionar con polyP de longitud mayor a 50 residuos (Beassoni *et al.*, 2007; Gallarato, 2012).

*paPpx* tiene totalmente conservados los residuos del sitio activo (E<sup>126</sup>, D<sup>149</sup>, G<sup>151</sup>, S<sup>154</sup> y E<sup>156</sup>) por lo que hay una concordancia total entre la estructura del sitio activo entre *ecPpx* y el modelo propuesto para *paPpx* (Gallarato, 2012). La sustitución de estos residuos aminoacídicos por alanina y la pérdida de actividad observada confirmó la participación de los mismos en el sitio activo (Gallarato, 2012).

La enzima de *P. aeruginosa* presenta el canal con un potencial electrostático menos positivo que *ecPpx*, a pesar del alto porcentaje de identidad que comparten. Se observan diferencias en la región N-terminal, ya que mientras que *ecPpx* presenta los residuos básicos R<sup>165</sup>, R<sup>166</sup> y K<sup>197</sup>; *paPpx* tiene en posición equivalente los residuos L<sup>171</sup>, Q<sup>172</sup> y E<sup>203</sup>. Por otro lado en la región C-terminal, formando parte del mismo canal, se encuentra muy conservado: en *ecPpx* con H<sup>378</sup>, R<sup>413</sup> y K<sup>414</sup>; y en *paPpx* H<sup>383</sup>, R<sup>418</sup> y R<sup>419</sup>. Esta diferencia sugiere que *paPpx* puede haber evolucionado perdiendo parte de esta función o bien que tiene algún rol adicional (Gallarato, 2012; Beassoni *et al.*, 2015). Entre las diferencias que se resaltan en la actividad de ambas enzimas, *paPpx* presenta su actividad óptima aproximadamente a la mitad de concentración de KCl (80mM *paPpx* y 175mM *ecPpx*). Por otro lado, NH<sub>4</sub>Cl es el mejor activador, mientras que

otros iones monovalentes, como NaCl o LiCl, no activaron la enzima, lo cual permite descartar la fuerza iónica en la activación de la enzima. Tampoco se pudo establecer una relación directa entre el radio iónico ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  y  $\text{NH}_4^+$  aunque sí se observa que aquellos iones de menor radio no son activadores y el mejor activador es aquel de mayor radio iónico ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{NH}_4^+$  ; orden ascendente de activación) (Gallarato, 2012).

Se ha demostrado que *paPpx*, no solo presenta actividad polifosfatasa, sino que también es capaz de transferir el grupo fosfato terminal a una molécula de ADP, permitiendo la formación de ATP a partir de polyP en presencia de metal divalente. Se ha propuesto que esta actividad esté relacionada con el metabolismo de colina, debido a que cuando colina es fuente de nitrógeno, se favorece la síntesis de *paPpx*, la cual podría funcionar como fosfotransferasa (Gallarato, 2012; Beassoni *et al.*, 2015).

## 1.5. Introducción a Dinámica Molecular

En los últimos años, se ha registrado un gran incremento en el número de archivos de coordenadas atómicas disponibles en la base de datos de proteínas (PDB) . Estos contienen importante información acerca de la estructura estática de una proteína, como así también de la dependencia de conformaciones según la unión o no de ligandos. Por su parte, las técnicas de RMN brindan también información estructural de proteínas con algunos indicios de movimientos en las moléculas, pero esta información es mucho más acotada fundamentalmente por la limitación de la técnica para ser empleada en sistemas proteicos de mediano a gran tamaño.

Mediante la aplicación de técnicas de dinámica molecular (MD) es posible simular la interacción entre átomos y moléculas durante un periodo de tiempo dado (generalmente corto, menor a la escala experimental), analizar los efectos de cambios en el sistema, e incluso proyectar cambios conformacionales. De esta manera, la MD, junto a otros estudios *in silico*, se ha convertido en un importante complemento de estudios experimentales.

Estos estudios de MD son llevados a cabo en base a campos de fuerza empíricos (Guvench y MacKerell, 2008). Las simulaciones de MD clásica utilizan funciones a través de coordenadas atómicas para representar la energía de un sistema, las cuales



a su vez son una aproximación de la función de onda de mecánica cuántica (QM). De esta manera, se han desarrollado diversos campos de fuerza para representarlo, entre los que se destacan AMBER, CHARMM, GROMOS y OPLS, entre otros. Estas funciones, representan las interacciones entre los distintos componentes de un sistema y pueden dividirse en dos grupos: de unión ( $V_u$ ) y no unión ( $V_{nu}$ ) (Ecuación 1.1). El primero, representa a las longitudes de enlace, ángulo de valencia y rotación de diedro (Ecuación 1.2. Mientras que el término de no unión, refiere a la dispersión electrostática y a la exclusión de Pauli (ecuación 1.3) (Guvench y MacKerell, 2008). Así, una función energética tiene la forma:

$$V_T = V_u + V_{nu} \quad (1.1)$$

$$V_u = \sum_{\text{enlace}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{ángulo}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} K_\chi[1 + \cos(n\chi - \sigma)] \quad (1.2)$$

$$V_{nu} = \sum_{ij} \left( \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \quad (1.3)$$

En la ecuación 1.2, el primer término describe la suma de todos los pares de átomos enlazados con la longitud de enlace  $b$ ,  $K_b$  la constante de fuerza y  $b_0$  la distancia de equilibrio. Éste tiene la misma función cuadrática de la ley de Hooke para un resorte. El segundo término, consiste en un triplete de átomos donde  $\theta$  es el ángulo entre los átomos  $a$ ,  $b$  y  $c$  ( $a$ - $b$ - $c$ ),  $K_\theta$  y  $\theta_0$  son la dureza y ángulo de equilibrio, respectivamente. Por último, el tercer término, describe al diedro formado entre los átomos  $a$ ,  $b$ ,  $c$  y  $d$ , secuencialmente enlazados, es decir el ángulo del plano formado por los átomos  $a$ ,  $b$  y  $c$ , con el plano de los átomos  $b$ ,  $c$  y  $d$ . Dada que la rotación del ángulo diedro es periódica, se usa una función coseno, donde  $\chi$  es el valor del diedro,  $K_\chi$  determina la altura de la barrera energética,  $n$  la multiplicidad y  $\sigma$  la fase. También para esta última se puede aplicar una función de Fourier, donde se aplican distintos valores de  $n$  (Guvench y MacKerell, 2008).

La ecuación 1.3 describe las interacciones de no unión. Estas interacciones son descritas entre átomos de distintas moléculas o de la misma molécula separados por tres o más enlaces interatómicos. La primera parte de la función descrita por la ecuación de Lennard-Jones, la atracción dispersiva y exclusión de Pauli, conocida como fuerza

de van der Waals (vdW). La segunda parte de la ecuación corresponde a la ley de Coulomb, la cual describe la interacción electrostática entre pares de átomos (Guvench y MacKerell, 2008).

Si bien, los distintos campos de fuerza han sido aplicados a variedad de sistemas proteicos con éxito, algunas limitaciones persisten en lo referido a la formación de estructura secundaria. Por ejemplo, la aparición de hélices  $\pi$ . En vista de mejorar la representación del enlace peptídico y asemejar el perfil energético del mismo a la realidad, Mackerell *et al.* (2004) desarrollaron una grilla de corrección de la superficie de energía potencial para las torsiones alrededor del carbono alfa. De esta manera, se logró mejorar el error cuadrado medio (rms) entre el cálculo empírico y el cálculo por QM de 2,47 con el campo de fuerza CHARMM22 reduciéndolo a 0,04 con el agregado de funciones de suavizado de la grilla de corrección (CMAP).

La revisión de la literatura y comparación de las estructuras descriptas (Alvarado *et al.*, 2006; Rangarajan *et al.*, 2006) muestran que es limitado el conocimiento de los sitios de unión específicos para polyP. Considerando rol del polyP en la patogénesis, tolerancia a estrés y sobrevida bacteriana, el estudio de *ecPpx* con un enfoque híbrido *in silico*/experimental es crucial para entender el modo de acción de esta enzima la cual puede constituir un blanco de acción farmacológica contra esta y otras bacterias relacionadas.

De esta manera, en este trabajo de tesis se estudió la interacción polyP-Ppx determinando posibles sitios de contacto y residuos aminoacídicos involucrados en el mecanismo de unión con un enfoque global que incluyó análisis evolutivo, docking, potencial electrostático, MD y determinación de energía libre. Finalmente, estos estudios fueron complementados con ensayos experimentales para evaluar las hipótesis surgidas de las simulaciones computacionales.

# Capítulo 2

## Objetivos

### 2.1. Objetivo General

Mediante herramientas computacionales, bioquímicas y moleculares se pretende conocer la caracterización funcional de la polifosfato fosfatasa de *E. coli* (*ecPpx*). Esto permitirá indagar el modo de interacción de la enzima con diferentes ligandos tales como polyP, ppGpp, pppGpp, GTP y ATP y así realizar avances con respecto al modo de unión con cada uno de ellos, con especial énfasis en polyP evaluando la importancia del potencial electrostático en la unión a la enzima. El avance sobre el conocimiento de *ecPpx* nos permitirá conocer por extensión algunas características de Ppx de *P. aeruginosa* (*paPpx*, en estudio en nuestro grupo) y otras Ppx, enzimas que han sido relacionadas con la patogénesis y supervivencia al estrés en diversos organismos.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Optimizar una cadena de polyP por métodos de mecánica molecular, para utilizarla posteriormente en ensayos de docking y dinámica molecular.
- Dilucidar los modos de unión de ATP, GTP, ppGpp y pppGpp en *ecPpx* y detectar los residuos aminoacídicos que interactúan con los mismos permitiendo encontrar las razones del comportamiento diferencial de los mencionados compuestos. Encontrar las regiones de unión a polyP y la influencia del largo de la misma en el modo de unión a *ecPpx*.

- Determinar la importancia de los nucleótidos en la inhibición de *ecPpx*.
- Evaluar el potencial electrostático sobre el modo de unión del polyP.
- Analizar los cambios de energía libre como así también cambios conformacionales que se producen, permitiendo describir la vía de unión (binding) y desunión (unbinding) mediante dinámica molecular dirigida “steered molecular dynamics” y/o simulaciones de “Adaptive Biasing Force” (ABF) para inducir la desunión de los ligandos “docados”.
- Analizar el la influencia del largo de la cadena de polyP en la unión a *ecPpx*, mediante la realización de estudios bioquímicos.
- Analizar la importancia de los residuos en la procesividad de la enzima y unión al ligando mediante la realización de mutaciones sitio-dirigidas para la correlación con las predicciones *in silico* surgidas del cumplimiento de los objetivos anteriores.

# Capítulo 3

## Materiales y Métodos

**3.1 Potencial electrostático** Se llevaron a cabo cálculos de potencial electrostático utilizando el software APBS (Baker *et al.*, 2001). La asignación de cargas y radio de VDW del sistema se hizo mediante el software pdb2pqr (Dolinsky *et al.*, 2004, 2007) utilizando el campo de fuerza CHARMM. El estado de protonación según el pH fue determinado con la herramienta propKa (Li *et al.*, 2005), midiéndose el potencial electrostático a pH 4, 6, 8 y 10.

**3.2 Búsqueda de cavidades** La búsqueda de bolsillos de unión, túneles y cavidades fue realizada mediante MOLE (Berka *et al.*, 2012) y visualizado por pymol; icmPocketFinder de Molsoft; o CASTp (Binkowski *et al.*, 2003) utilizando parámetros por default.

**3.3 Docking Molecular** Ensayos de Docking fueron llevados a cabo con AutoDock4 (Morris *et al.*, 1998, 2008). Para esto se diseñaron 165 grillas de 15x15x15 Å abarcando toda la superficie de la proteína con AutoGrid4 (Meng *et al.*, 1992). Utilizando una molécula de PP<sub>5</sub> como ligando, se realizaron 10 corridas por cada grilla con el algoritmo Lamarquiano. Las cargas del ligando fueron asignadas por el método de “Gasteiger” (Gasteiger y Marsili, 1980), suplementado por AutoDockTools. Otros ensayos de docking fueron realizados utilizando el software ICMpro: la región a mapear fue seleccionada a partir de bolsillos o cavidades encontradas con icmPocketFinder, se utilizaron como ligandos PP<sub>3</sub>, PP<sub>6</sub>, PP<sub>9</sub>, PP<sub>12</sub>, ATP, ADP y pppGpp.

**3.4 Análisis filogenético** Para el análisis filogenético, se buscaron secuencias similares mediante el servidor pHMMER (Finn *et al.*, 2011) contra la base de datos rp55 de UniProt. Cada secuencia obtenida fue considerada ortólogo, si al utilizarla como secuencia problema en una búsqueda con pHMMER contra la base de datos de ORF de *E. coli* O157:H7, devolvían como mejor alineamiento a *ecPpx*, tal como fue realizado por Wideman (2015). También se descartaron fragmentos que alineen menos del 77 %.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas usando el software MAFFT, empleando la matriz de sustitución BLOSUM62. La penalización por “GAP” fueron por defecto, 1,53 y 0,123 para apertura y extensión. La construcción del árbol filogenético fue realizada mediante la plataforma PHYLIP utilizando máximo de verosimilitud (“maximum likelihood”, proml).

Para el análisis de modelo evolutivo, se utilizó el servidor ConSurf (Glaser *et al.*, 2003), en el cual, la tasa de evolución se estima en base a la relación evolutiva entre la proteína y sus homólogos y considera la similitud entre los aminoácidos según el modelo de sustitución usado que fue JTT (Jones *et al.*, 1992) con método de cálculo bayesiano.

**3.5 Modelado Sitio Activo** Para el modelado del sitio activo en conformación cerrada, se tomó como referencia la ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 2 (NTPdasa), acomplejada con  $\text{Ca}^{2+}$  y eter adenilato-ácido fosfoaminofosfónico (AMPNP) de *Rattus norvegicus* (PDB:3CJA) y se superpuso con la estructura de *ecPpx* (PDB:1U6Z). De la misma se tomaron las coordenadas atómicas del  $\text{Ca}^{2+}$  y se las asignaron al  $\text{Mg}^{2+}$ , y además se agregaron 7 moléculas de agua explícitas (residuos HOH<sub>503–508</sub> y HOH<sub>537</sub>) que, según la estructura cristalográfica interaccionan directamente con el sustrato y/o el metal en PDB:3CJA. Un polyP de 3 residuos (PP<sub>3</sub>) fue docado como se describe anteriormente. Cálculos de minimización por QM/MM (hibrido mecánica cuántica / mecánica molecular) del complejo N-terminal/PP<sub>3</sub>/Mg<sup>2</sup> fueron realizados mediante la aplicación Qsite de maestro. Para ello, se consideró como región cuántica al metal Mg<sup>2+</sup>, al ligando PP<sub>3</sub>, la cadena lateral del E<sup>121</sup>. Se agregaron restricciones espaciales en la cadena principal de los residuos a 10 Å del PP<sub>3</sub>. Átomos a mayor distancia fueron fijados.

El modelado de *ecPpx* en conformación abierta fue realizado en la región N-terminal

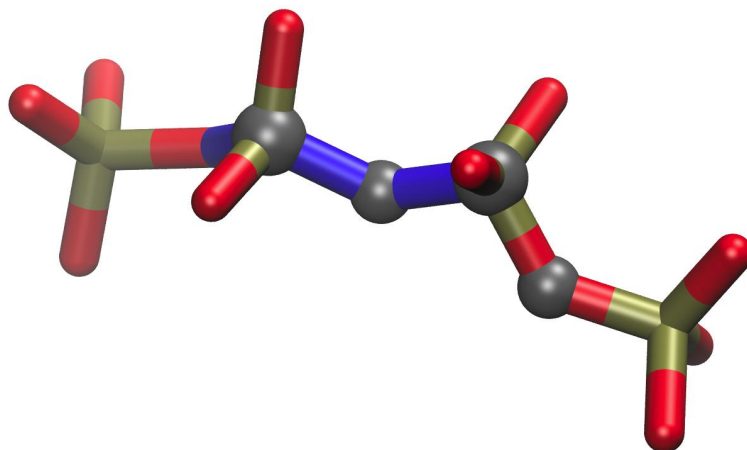
mediante MODELLER (Šali *et al.*, 1995). Se utilizó como molde PDB:1T6C de *A. aeolicus* (Kristensen *et al.*, 2004). El docking entre la región C-terminal y N-terminal fue realizado mediante Hex (Ritchie *et al.*, 2008) partiendo como posición original la resultante del modelo y permitiendo rotación de  $15^\circ$  y  $30^\circ$  para el C-terminal y N-terminal respectivamente y un giro de  $60^\circ$ . La búsqueda de conformeros fue realizada por criterio de forma y potencial electrostático.

El modelado de *paPpx*, se realizó mediante el software ICM (Molsoft). Las secuencias alineadas fueron obtenidas de alineamiento múltiple en el análisis de “evolutionary trace” (sección 3.4). Posteriormente se remodelaron los loops y se analizaron energética y visualmente para seleccionar la mejor conformación.

**3.6 Mecánica Cuántica** Los cálculos de minimización por mecánica cuántica de la cadena de polyP se realizaron con el software Gaussian 3, empleando el nivel de teoría (RHF/6-31+G\*). Asimismo, se realizaron cálculos de frecuencia de  $PP_6$  ya optimizado y de cargas parciales por el método CHELPG, el cual es un método basado en grilla que ajusta las cargas parciales de los átomos de manera de reproducir el potencial electrostático calculado (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010; Chipot *et al.*, 1993).

**3.7 Parametrización de polyP** La parametrización de polyP fue realizada utilizando el plugin Paratool de VMD y Gaussian 3. La fuerza de repulsión (Lennard-Jones) fueron tomadas del fosfato  $\gamma$  y  $\beta$  del ATP del campo de fuerzas CHARMM 22 Foloppe y MacKerell (2000); MacKerell y Banavali (2000) para los fosfatos terminales e intermedios, respectivamente. Las cargas fueron tomadas del ATP como en el caso de Lennard-Jones, o de CHELPG (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010) o se ajustaron según (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010; Chipot *et al.*, 1993; MacKerell *et al.*, 1998). Cálculos de frecuencia fueron llevados a cabo para la parametrización de los enlaces y ángulo de valencia (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010). Para la parametrización de los ángulos de torsión, se llevaron a cabo optimizaciones de tetra-polifosfato manteniendo restricción los ángulos diedro  $\phi$  (P2-ON2-P2-ON2) y  $\psi$  (ON2-P2-ON2-P2) (Figura 3.1) cada  $15^\circ$ ,  $-180 - 0$  para  $\phi$  y desde  $-180 - 165$  para  $\psi$ , como en (Mackerell *et al.*, 2004).

Los parámetros de enlace, ángulo de valencia y torsión fueron ajustados para obtener menor diferencia de energía potencial respecto a los cálculos cuánticos, para esto fue se utilizaron funciones de mínimos cuadrados para funciones no lineares con Solver el



**Figura 3.1** Representación de un tetra-polifosfato utilizado para los cálculos de energía de diedro. Se muestra en esferas grises los átomos que forman el diedro  $\phi$  y en bastones azules  $\psi$

cual emplea el método GRG2 (Lasdon y Waren, 1981). El uso de CMAP de CHARMM también fue testado (Mackerell *et al.*, 2004).

**3.8 Espectrometría de infrarrojo** Para determinar parámetros estructurales empíricos de polyP se realizaron estudios de infrarrojo (IR) de tetrafosfato de amonio ( $PP_4$ ) y utilizando los cálculos de frecuencia mencionados anteriormente se obtuvo el QM-IR teórico. 5 mg de tetra-polifosfato de amonio fue mezclado con 5 partes de KBr anhídrido previo al armado de la pastilla.

**3.9 Dinámica Molecular** Los ensayos de minimización y dinámica molecular fueron realizados mediante el software VMD para el ensamblado del sistema (Humphrey *et al.*, 1996) y la dinámica por NAMD Phillips *et al.* (2005). Los parámetros utilizados en dinámica molecular fueron: para minimización y equilibrado: tiempo de integración 1 fs, frecuencia de enlaces de no unión (`nonBondedFreq`) 2, cargas eléctricas totales (`fullElectFrequency`) 4, pasos por ciclo (`stepspercycle`) 20, con un cutoff de 12,0 Å para las interacciones de no unión, un apagado suave (`switchdist`) a partir de los 10,0 Å y una lista de pares `pairlistdist` hasta 13,5 Å ; para cálculos de SMD se cambiaron según las recomendaciones de (Wells *et al.*, 2012): `nonBondedFreq` 1, `fullElectFrequency` 3, `stepspercycle` 12, con un cutoff 8,0 Å `switchdist` 7,0 Å y `pairlistdist` 10,0 Å. Para el control de temperatura se utilizó el algoritmo



de Langevin y para presión el pistón de Langevin a 310 K y 1 atm, respectivamente.

Para la relajación de los sistemas, se procedió una minimización de 10000 pasos usando un algoritmo de gradiente conjugado, sumado a 100 ps de calentado del sistema hasta 310 K en un ensamble NVT a través de dinámica de Langevin. Para el equilibrado, se realizaron 5 ns de dinámica molecular en un ensamble isotérmico e isobárico a 1 atm de presión controlado por el método `LangevinPiston`. La cadena principal de mantuvo restringida a las posiciones iniciales utilizando un potencial armónico con constante de fuerza  $k = 10, 5, 2$  y  $1 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$  en etapas de 100 ps para finalmente mantenerlo con  $k = 0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ .

**3.10 Determinación de la energía libre** Los resultados de SMD fueron analizados mediante la igualdad de Jarzynski (Crooks, 1998; Park *et al.*, 2003) para cálculos de energía libre. En esta, el exponencial del cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) es igual al exponencial del promedio infinito del trabajo en un ensamble determinado.

$$e^{-\beta\Delta G} = \langle e^{-\beta W} \rangle \quad (3.1)$$

donde  $\beta = (kT)^{-1}$  es la constante de Boltzmann multiplicada por la temperatura (en K) (Crooks, 1998). La ecuación 3.2 es una cumalante de segundo orden de la ecuación 3.1 la cual está demostrada ser más exacta en muestras finitas (Park *et al.*, 2003).

$$\Delta G = \langle W \rangle - \frac{\beta}{2} [\langle W^2 \rangle - \langle W \rangle^2] \quad (3.2)$$

$\sigma^2 = \langle W^2 \rangle - \langle W \rangle^2$  es la varianza de la muestra.

Quedando para una muestra finita:

$$\Delta G = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M W_i - \frac{\beta}{2} \left[ \frac{1}{M} \left( \sum_{i=1}^M W_i^2 \right) - \frac{1}{M} \left( \sum_{i=1}^M W_i \right)^2 \right] \quad (3.3)$$

**3.11 Cepas, condiciones de cultivo** Se utilizaron *E. coli* XL10-Gold (Stratagene) para la transformación y amplificación de plásmidos, y *E. coli* BL21-CodonPlus (Stratagene) para la obtención del gen *ecppx* y sobreexpresión de los genes. Las bacterias fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) suplementado de ser necesario con ampicilina  $150 \mu\text{g.ml}^{-1}$ .

**3.12 Metodología de ADN** Las amplificaciones por reacción en cadena de polimerasa (PCR), transformaciones, ligaciones, digestiones con enzimas de restricción, etc., fueron llevadas cabo como se describe en Sambrook y Russell (2001) y de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Las preparaciones de ADN cromosomal se llevó a cabo empleando los kits QIAamp ADN (Qiagen). Para la extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa, se utilizó el kit Gel extraction (Qiagen). Dichos kits fueron utilizados según las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

**3.13 PCR** Se amplificó por PCR, con la enzima *Pfu* (PB-L Productos Bío-Lógicos) el gen *ppx* gi:242378100 utilizando como molde el ADN cromosómico de *E. coli* BL21. A los cebadores empleados, se agregaron sitios de restricción para permitir el clonado de los amplicones directamente en el vector de expresión pET15b: *Nde*I al cebador corriente arriba 5' aacctgaataacCATATGcca 3' y *Bam*HI al cebador corriente abajo 5' cgGGATCCgaaagtgctgaataat 3' (en mayúscula se indica el sitio de corte introducido). El resultado de PCR fue precipitado con isopropanol igual volumen, incubado 1 hora a -20° y centrifugado 20 min a 1000 g, antes del corte con *Nde*I y *Bam*HI. Luego del corte con las enzimas de restricción, ambos, el fragmento de PCR y el vector de expresión, fueron separados electroforéticamente para eliminar fragmentos residuales, y extraídos para la ligación generando el plásmido pET-15b::*ecppx*. Posteriormente se transformó en *E. coli* XL10. La verificación del inserto se realizó mediante PCR en colonia con el cebador de corriente abajo y el promotor T7; y secuenciamiento parcial del plásmido conteniendo el gen. La purificación de plásmido se realizó mediante extracción alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

**3.14 Mutaciones sitio dirigidas** Las mutaciones puntuales (Tabla 3.1) se realizaron empleando el kit QuickChange Lightning Site-Direct Mutagenesis de Agilent Technologies. Para ello se utilizó el vector de expresión pET-15b::*ecppx* como molde, los primer mutagénicos se diseñaron según intrucciones del fabricante de manera que tengan una  $T_m$  mayor a 68 °C. Brevemente, Los plásmidos con el gen *ecppx*-WT previamente amplificados en *E. coli* XL10 C+, fueron mutados con el par de cebadores correspondiente. Al producto de la reacción se le agregó enzima *Dpn*I para eliminar cadenas parentales de la WT. Los plásmidos resultantes fueron clonados y enviados a secuenciación (CERELA) para verificar la mutación.

**Tabla 3.1 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo:** 1 y 2- para el clonado del gen *ecppx*, subrayado se indican los sitios de corte insertos. 3- cebadores mutagénicos, se subrayan las bases mutadas (solo se muestra el oligonucleótido correspondiente a la cadena codificante)

Nombre	Secuencia
1 Up- <i>NdeI-ecPpx</i>	5'- AACCTGAATAACCATATGCCA -3'
2 Dw- <i>ecPpx-BamHI</i>	5'- CGGGATCCGAAAGTGCCTGAATAAT -3'
3 H378A	5'- CGGGTTGAATATCAACGCCAGCGGTTTGCATCGCC -3'

**3.15 Purificación de *ecPpx*** Para la sobreexpresión de *ecppx* el plásmido pET-15::*ecppx* fusionado en el extremo N-terminal a una cola de histidinas fue transformado en la cepa de expresión *E. coli* BL21 según las instrucciones del manual The QIAexpressionist (QIAGEN), a bacterias crecidas en 200 ml de medio Luria-Bertani suplementado con ampicilina 150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a una  $\text{DO}_{660}$  final de 0,6, se indujo la sobreexpresión del gen mediante el agregado de IPTG 1 mM y se agitó durante toda la noche a 22°C a 60-80 rpm. La purificación de *ecPpx* se realizó con columnas de HisLink (Promega). Brevemente, se cosecharon las células a 6000 rpm 5 min y se lavaron con Tris-HCl pH=8,0, para volver a resuspender en Tris-HCl pH=8,0 NaCl 100 mM imidazol 10 mM, a un volumen 30 veces menor al cultivo inicial. Las células fueron lisadas mediante tres sucesivos congelamientos y descongelamientos en  $\text{N}_2$  líquido intercalado con 3 sonicaciones a 40 mWatts, con pulsos de 5 segundos durante 2 minutos. Se centrifugó a 10000 rpm 10 min y se descartó el precipitado. Al resultante, se lo incubó con la resina de HisLink durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Luego, se eluyó en una columna la fracción no retenida (FT - “flow-throw”) y se lavó con 20 volúmenes de Tris-HCl pH=8,0 NaCl 500 mM imidazol 50 mM. La proteína pura se obtuvo mediante la elución con Tris-HCl pH=8,0 NaCl 500 mM imidazol 400 mM.

Finalmente, se dializó contra buffer Tris-HCl pH=8,0 NaCl 100 mM Glicerol 30 % y EDTA 100 mM para evitar precipitación. El análisis de la sobreexpresión y purificación se corroboró por SDS-PAGE (12 %) confrontado con el marcador de PM.

**3.16 Determinación de la concentración de proteínas** La medición de la concentración de proteínas se realizó por absorción UV a 280 nm. Para ello, se calculó el coeficiente de extinción molar usando la secuencia aminoacídica de cada proteína con la herramienta protParam en el servidor Expasy.

**3.17 Ensayos enzimáticos** La actividad enzimática se determinó en 500  $\mu\text{l}$  de volumen final usando 10  $\mu\text{l}$  de muestra en buffer Tris-HCl 20mM pH 8,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, KCl 175  $\mu\text{M}$  y concentraciones variables de sustrato -PP<sub>25</sub>, PP<sub>65</sub> (Sigma); P<sub>700</sub> (Kerafast) (Bolesch y Keasling, 2000a), se incubó por 15 min a 37 °C. y la reacción revelada con verde de malaquita (Baykov *et al.*, 1988). Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se midió la liberación de P<sub>i</sub> como se describe anteriormente, a diferentes temperaturas (0, 4, 12, 23 y 37 °C), utilizando como sustrato PP<sub>25</sub> y PP<sub>65</sub> a una concentración  $\sim 10$  veces su  $K_m$ . Los datos se analizaron según Massey *et al.* (1966).

# Resultados y Discusión



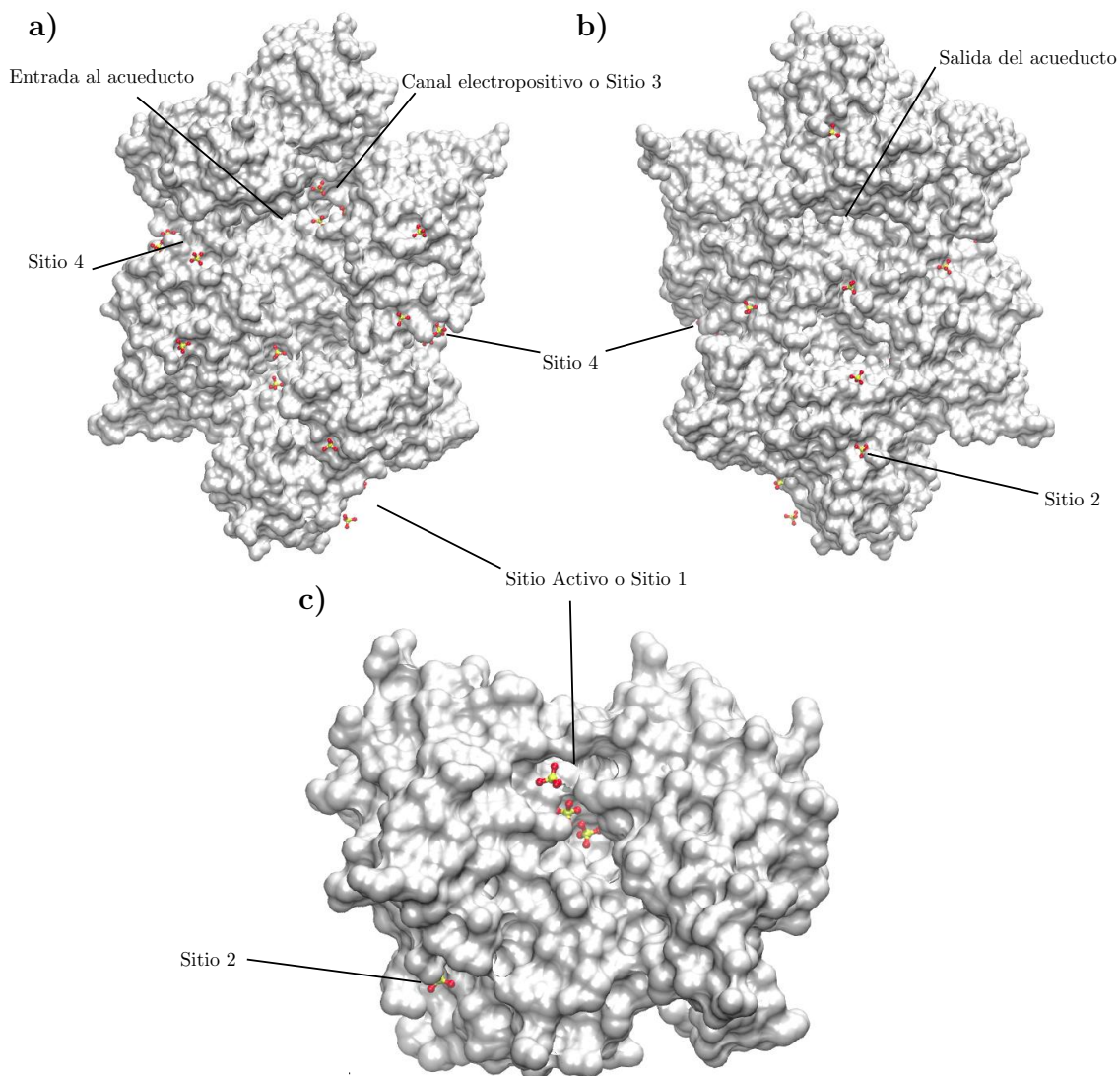
# Capítulo 4

## Sitios de unión favorables

Para mejor comprensión de los resultados presentados de aquí en adelante, en la Figura 4.1 se representan diferentes orientaciones de la enzima en estudio, *ecPpx*: frente (Figura 4.1 a), atrás (Figura 4.1 b) y sitio activo (Figura 4.1 c). Asimismo, se representan en la misma figura los diferentes sitios según fueron definidos por Alvarado *et al.* (2006) y Rangarajan *et al.* (2006). Los sitios mencionados aquí y las orientaciones de la proteína serán referenciados reiteradas veces en adelante.

### 4.1 Potencial electrostático

Para comprender el modo de unión de polyP a *ecPpx*, inicialmente se realizaron cálculos de potencial electrostático mediante APBS (Baker *et al.*, 2001) a diferentes pH, calculando las cargas de los residuos según el software propKa (Li *et al.*, 2005). PropKa calcula los  $pK_a$  de los residuos basándose en los residuos circundantes y la exposición a solvente. Este cálculo del  $pK_a$  lleva aparejado un elevado error, de hasta 2 unidades, sin embargo da una idea aproximada de la diferencia de potencial electrostático de la proteína, debido a que se calculó el potencial electrostático con una diferencia mínima en 2 puntos de pH. En la Figura 4.2 a), b) y c) se representan el potencial electrostático a pH 6,0 en diferentes orientaciones de la proteína *ecPpx*, mientras que d) e) y f) corresponde al potencial calculado a pH 8,0 (valor de pH óptimo para la actividad enzimática). Aquí se evidencia que, a pH 8 la cara opuesta al canal electropositivo, más precisamente a la salida del acueducto, el potencial electrostático se vuelve negativo,

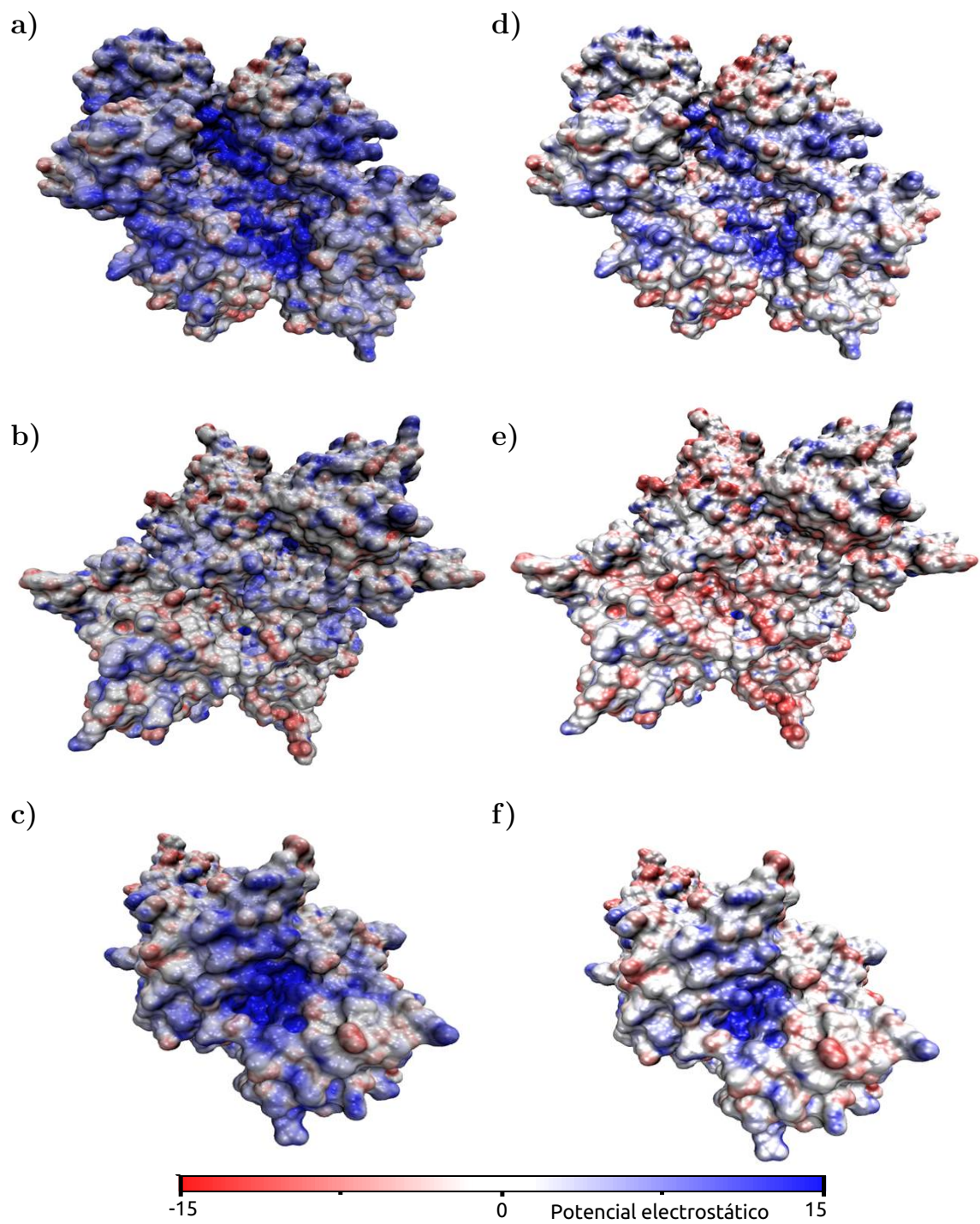


**Figura 4.1** Representación de la superficie de ecPpx con los  $\text{SO}_4^{2-}$  presentes en la estructura PDB:1U6Z (esferas y bastones): a) vista de frente, se marca el canal electropositivo junto a la entrada al acueducto; b) vista de detrás, se muestra la salida del acueducto y el sitio 2 ( $\text{SO}_4^{2-}$  4); y c) vista del sitio activo.

lo que podría llevar a la repulsión del polyP. En este punto, estos resultados están en contraste con lo sugerido por Alvarado *et al.* (2006). Por otro lado, la diferencia de potencial en ambas caras de la enzima, formaría un campo gobernado por potencial electropositivo que guiaría las cargas negativas hacia el canal, siendo éste el primer sitio de interacción con polyP.

Estos resultados no implican que deba ser refutado el modo de unión propuesto por Alvarado *et al.* (2006), ya que la cadena de polyP podría interaccionar con esta región





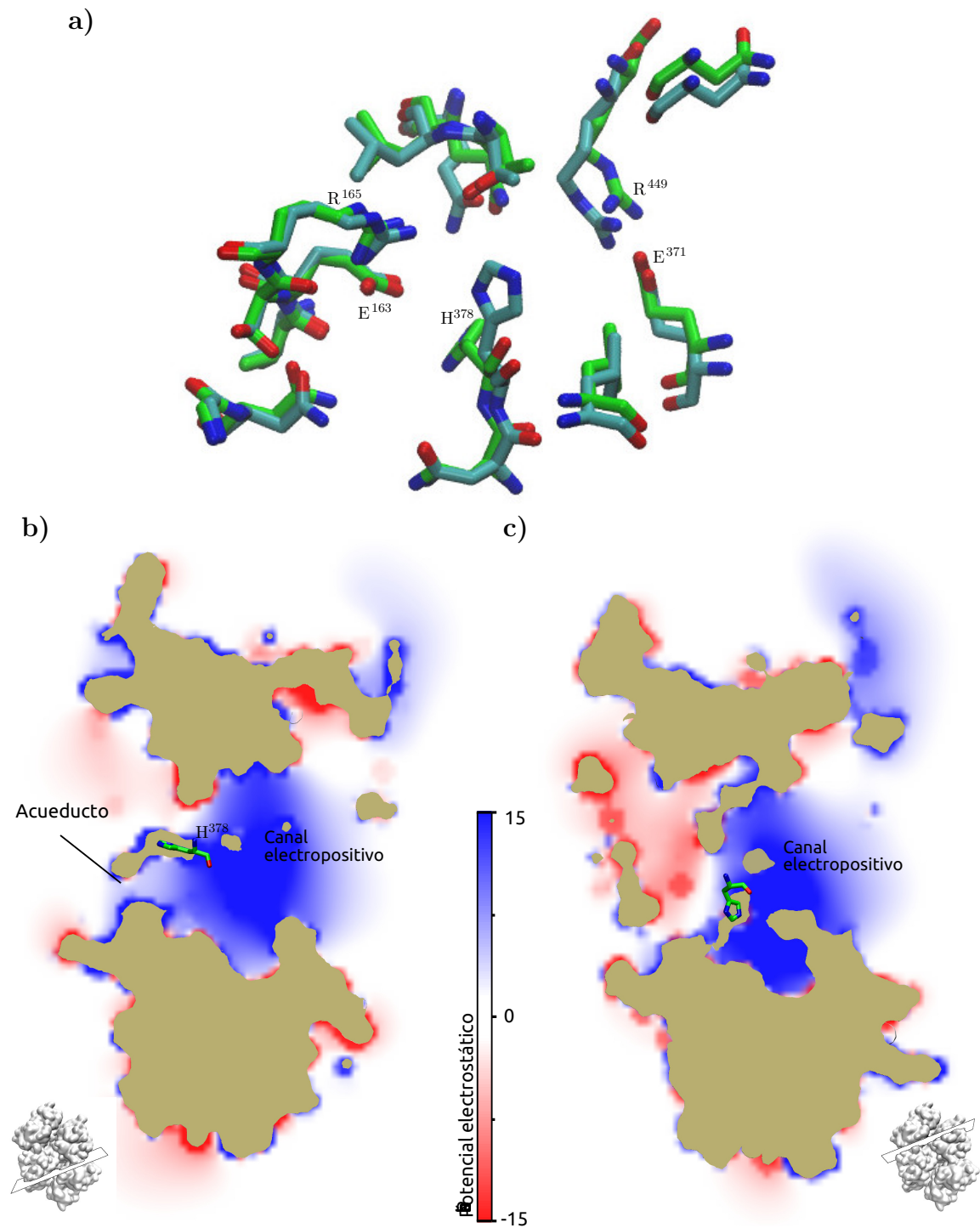
**Figura 4.2** Potencial electrostático de Ppx. a), b) y c) pH=6 ( $Ppx^{+16}$ ), d) e) y f) pH=8 ( $Ppx^{-1}$ ). Se observa un potencial electrostático altamente positivo en la región del canal formado por ambos dímeros (A y D) y en el bolsillo del posible sitio activo (c y f) donde las regiones de mayor potencial se localizan cercana a  $Mg^{+2}$  en el sitio activo y dentro del canal. Por otro lado a pH 8 Ppx muestra un potencial electrostático negativo del lado opuesto al canal.

**Tabla 4.1 Valores de  $pK_a$  de residuos ionizables del acueducto**

Cadena	Residuo		$pK_a$	Carga
B	GLU	163	5,2	(-)
A	GLU	371	2,6	(-)
A	HIS	378	3,6	(+)
A	GLU	163	2,6	(-)
B	GLU	371	2,9	(-)
B	HIS	378	7,9	N

de manera débil, permitiendo una mayor movilidad del mismo, y si la unión es débil es probable que el sitio no se evidencie fácilmente.

A partir de estos resultados, se profundizó en el estudio del potencial electrostático en la región del acueducto. En la Tabla 4.1 se muestran los valores de  $pK_a$  de los residuos ionizables involucrados en la formación del acueducto. La histidina en posición 378,  $H^{378}$  en el monómero A tiene un  $pK_a$  de 3,55 mientras que la misma histidina de la cadena B tiene un  $pK_a$  de 7,92. En la Figura 4.3 a) se observa superpuestas ambas histidinas donde se aprecia una diferencia posicional. Teniendo en cuenta la poca diferencia entre el  $pK_a$  y el pH óptimo para la actividad de *ecPpx* que es de 8,0, se volvió a realizar un cálculo de potencial electrostático con la  $H^{378}$  de la cadena B cargada positivamente. La Figura 4.3 b) muestra un corte transversal de ambos acueductos. Aquí se observa un gradiente más suave, que va desde una zona cargada positivamente (en la entrada al acueducto) a una región cargada negativamente. A pesar de ser un gradiente más suavizado de potencial electrostático, se observa una gran diferencia con lo que ocurre en transportadores de moléculas iónicas pequeñas, donde de un lado del canal y del otro se observan potenciales electrostáticos del mismo signo, y graficas de isopotencial se ven como una superficie bicónica o formando una especie de embudo (como se ejemplifica en Dehez *et al.* (2008)). Esto no ocurre en *ecPpx* dado que aunque se hace más gradual el cambio de potencial, hacia ambas caras del acueducto presenta signos opuestos.



**Figura 4.3** Superposición de los residuos involucrados en la formación de los acueductos en ecPpx (1U6Z). En cian acueducto formado por el residuo H<sup>378</sup> de la cadena A y verde por el residuo H<sup>378</sup> de la cadena B. b) y c) corte transversal del acueducto (líneas punteadas) para el residuo H<sup>378</sup> de la cadena B y A respectivamente.

## 4.2 Docking

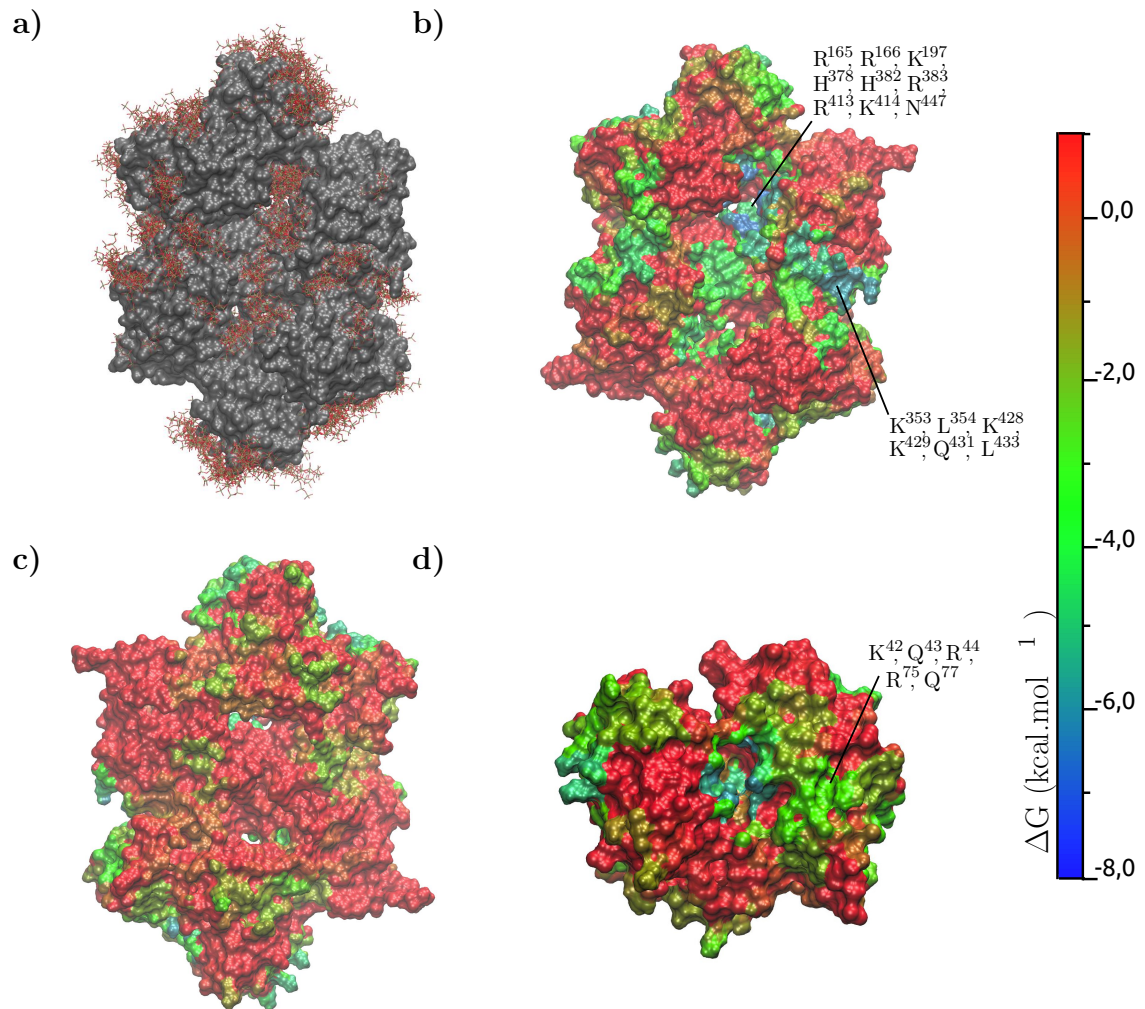
### 4.2.1. Docking sobre la superficie completa de la proteína

Con el fin de conocer el modo de interacción de cadenas largas de polyP con *ecPpx*, inicialmente se realizaron una serie de ensayos de docking alrededor de toda la superficie proteica con un polyP de cadena corta de modo de encontrar posibles sitios de interacción. Para esto, se construyeron 165 mapas como se describe en la sección 3.3 utilizando el software AutoGrid4. Este software construye grillas tridimensionales con el costo energético de poner en cada punto un determinado tipo de átomo o una carga equivalente a +1. Esto permitió luego realizar los cálculos de docking con mayor rendimiento. Por cada grilla, se realizaron 10 corridas de docking utilizando el software AutoDock, con un polyP de cadena corta (PP<sub>5</sub>).

En la Figura 4.4 a) se muestran todas las conformaciones que presentaron una energía de unión favorable. Para una mejor representación, en la Figura 4.4 b), c) y d) se muestra la superficie accesible a solvente de *ecPpx* coloreado en escala según la menor energía de unión de los ligandos a 5 Å de distancia. Se esquematiza una orientación de frente al canal electropositivo, detrás del mismo y por encima del sitio activo, respectivamente. Tanto el potencial altamente electropositivo, como describió Rangarajan *et al.* (2006), como las bajas energías de unión presentados en los sitios indicados en la Figura 4.4 b) y c), sugieren a estas regiones como sitios de unión primaria a polyP. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con parte de lo postulado por Alvarado *et al.* (2006), ya que en la región saliente del acueducto se presentan energías desfavorables (Figura 4.4 d), lo cual no apoya la hipótesis de que ésta sea una región de unión de polyP. Como consecuencia, se propusieron nuevas formas de unión, sin la necesidad de que polyP atravesara el acueducto y se tuvieron en cuenta a lo largo de este estudio. En este caso, polyP se uniría al canal electropositivo (sitio 3) inicialmente, para luego unirse al sitio 2 y finalmente hacia el sitio activo (Figura 1.1 a, 8.1 a).

### 4.2.2. Docking y bolsillos de unión

Teniendo una visión global de los posibles sitios de unión a partir de los resultados de docking mapeando toda la proteína, se buscaron bolsillos o túneles donde pueda unirse



**Figura 4.4** Ensayos de docking con PP<sub>5</sub> sobre ecPpx. a) vista de frente al canal electropositivo de todas las conformaciones con  $\Delta G$  negativos; b) c) y d) superficie accesible a solvente de Ppx coloreado según la menor energía de unión de los ligandos a 5 Å de distancia. Vistas del frente (b) y cara opuesta al canal electropositivo (c) y sitio activo (d), respectivamente.

polyP con el fin de realizar docking más localizado y exhaustivo. Para ello, se utilizó la aplicación icmPocketFinder de ICMpro (Molsoft), y los programas MOLE (Berka *et al.*, 2012) y CASTp (Binkowski *et al.*, 2003) los cuales permiten encontrar bolsillos, cavidades o hendiduras. En la Figura 4.5 se observan los bolsillos encontrados por icmPocketFinder donde se observa principalmente 4 bolsillos, uno correspondiente al sitio activo, otro que coincide con el canal electropositivo y continúa hacia el acueducto; también se observa un bolsillo en la región donde se unen los dominios I y III (descrito por Alvarado *et al.* (2006) por tener un grupo de residuos de lisina, el cual coincide con una región donde se han reportado grupos de sulfatos unidos (sitio 4), y por último en la unión entre el dominio II y IV que corresponde a una continuación del canal electropositivo.

Un análisis utilizando CASTp arrojó resultados similares a los obtenidos por ICMpro, mientras que en MOLE se observó en el sitio activo los residuos K<sup>24</sup>, K<sup>42</sup>, R<sup>267</sup> y G<sup>218</sup> que producen un pequeño cuello de botella en la región correspondiente al 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> sulfato descrito por Alvarado *et al.* (2006) lo cual podría tener un papel crucial en la especificidad por el polyP en lugar de nucleósidos trifosfatados (Figura 4.5 a y c).

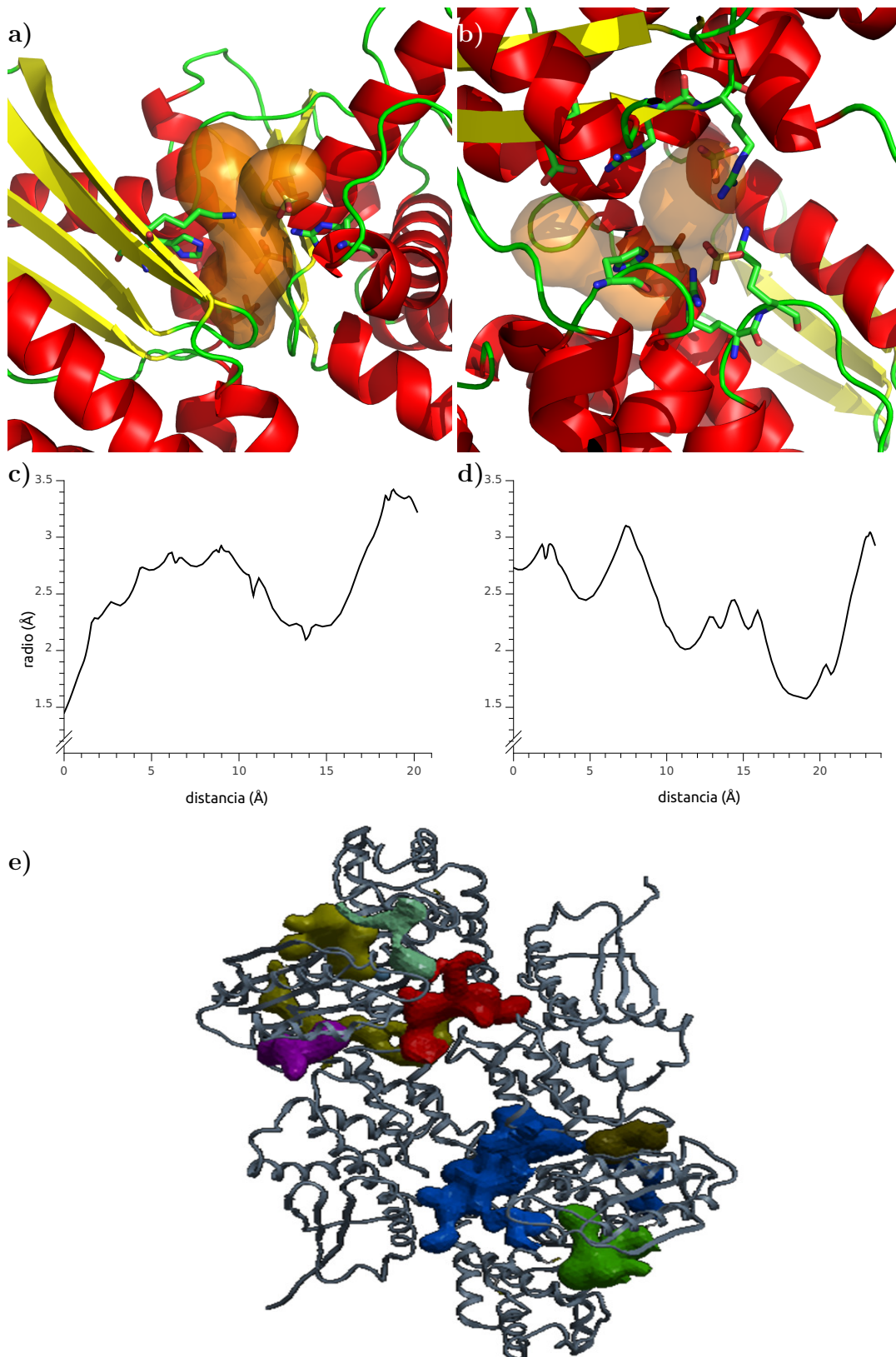
Por otro lado, MOLE (utilizando los parámetros de búsqueda por default) solo detecta uno de los dos acueductos formados en la unión de los dos monómeros, probablemente debido al cambio en la orientación de la cadena lateral de la H<sup>378</sup>. En este caso, la histidina que no interacciona directamente con el E<sup>163</sup> del otro monómero, aunque si forma un cuello de botella junto a T<sup>200</sup>, E<sup>371</sup> y R<sup>449</sup> e interactúa con un sulfato, lo cual sugiere una posible función de bisagra del residuo H<sup>378</sup>.

### 4.2.3. Docking sobre el sitio activo

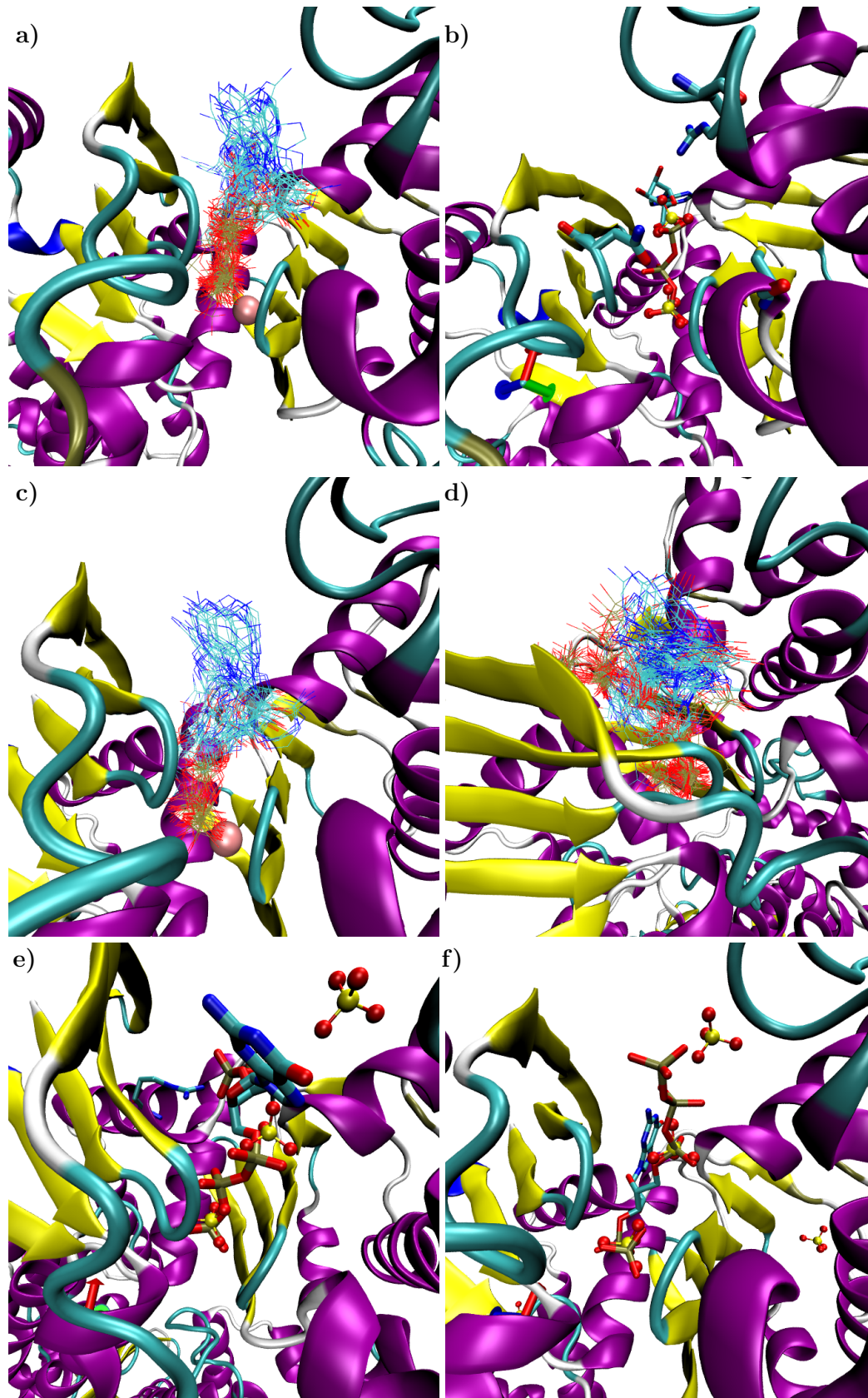
Como fue mencionado en la sección 1.4, Alvarado *et al.* (2006) discuten que la poca capacidad del ATP para inhibir la enzima, se debe a choques producidos entre el nucleósido del ATP y los residuos N<sup>21</sup>, C<sup>169</sup> y R<sup>267</sup>. Con el fin de conocer la capacidad del sitio activo de unirse a diferentes ligandos, se realizó docking en el sitio activo con diferentes nucleótidos (ATP ADP y pppGpp) o polyP utilizando el software ICMpro.

En la Figura 4.6 se muestran los resultados de docking con los tres nucleótidos. En todos los casos se observa que el acoplamiento molecular es dirigido principalmente por la porción polyP, dado que en todas las conformaciones obtenidas se observa poca





**Figura 4.5** Esquematzación de los túneles calculados mediante MOLE en *ecPpx*. Se muestran sitio activo a) y el canal electropositivo junto al acueducto b). c) y d) representan los radios respectivamente; e) bolsillos calculados con icmPocketFinder, en celeste se observa el canal electropositivo y en verde el sitio activo. También se pueden observar pequeños bolsillos en la intersección entre dominio I y III (marrón).



**Figura 4.6** Docking en el sitio activo de ATP (a y b); ADP (c); y GTP (d, e y f). a), c) y d) muestran todas las conformaciones obtenidas; b) y e) mejor conformación obtenida.



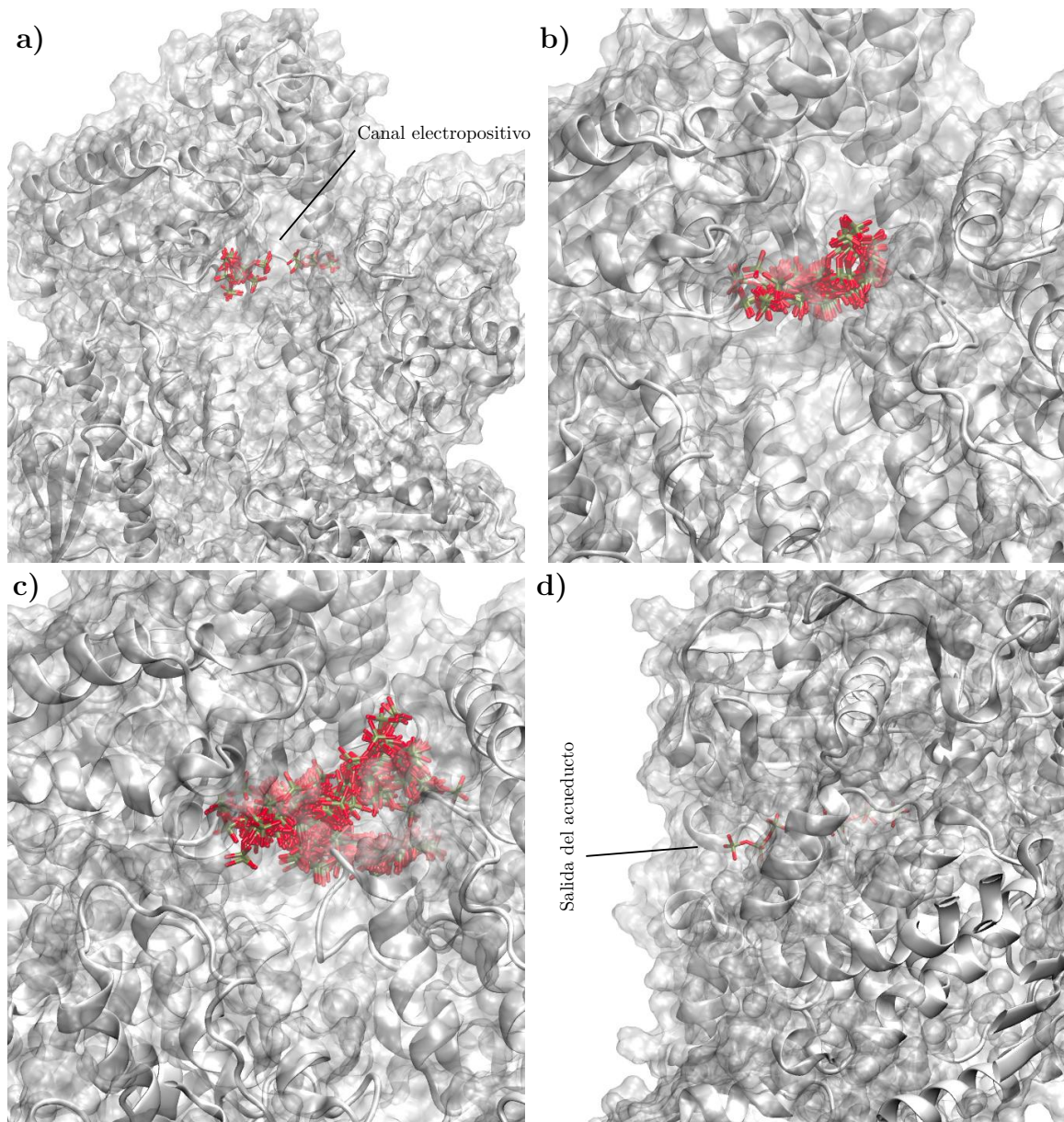
variación. En cambio, la porción de la base nitrogenada posee alto grado de variación (mayor rmsd), que disminuye a medida que la porción polyP es mayor, como se observa al comparar el docking de ATP (Figura 4.6 a) y con ADP (b). En la Figura 4.6 d) se presentan las conformaciones para pppGpp, en este caso se observan dos conformaciones, el primer caso con el trifosfato (extremo 5') dirigido al sitio activo Figura 4.6 e) y el bifosfato (extremo 3') dirigido a la R<sup>298</sup>. Por otra parte en la Figura 4.6 f), es el extremo 3' el que se dirige al sitio activo, mientras que el trifosfato se dirige hacia la región ocupada por el tercer residuo de sulfato descrito por Alvarado *et al.* (2006).

Teniendo en cuenta estos resultados, la dificultad de unir ADP o ATP de la enzima, posiblemente se deba a la alta polaridad y a los residuos cargados positivamente presentes a la salida del sitio activo, más que, a posibles choques con las cadenas laterales, ya que como fue mencionado anteriormente, *ecPpx* tendría la capacidad de realizar pequeños movimientos de apertura del N-terminal. Más aun, el que pppGpp sea un buen inhibidor, sugiere que no es el tamaño de la base nitrogenada lo que afectaría la unión del ligando al sitio activo, sino que la unión se ve facilitada por la cantidad de residuos de fosfato del mismo.

#### 4.2.4. Docking sobre el canal electropositivo y el acueducto

Para comprender el modo de unión del polyP y la posibilidad de atravesar el acueducto formado por la unión de monómeros, en la región del canal electropositivo, se realizaron una serie de ensayos de dockings en este bolsillo con el software ICMpro. En la Figura 4.7 se muestran las conformaciones obtenidas para PP<sub>3</sub> (a), PP<sub>6</sub> (b) y PP<sub>9</sub> (c). En los dos primeros casos se observan a PP<sub>3</sub> y PP<sub>6</sub> que se unen al canal electropositivo, mostrando varias conformaciones posibles alrededor del mismo. A diferencia de PP<sub>3</sub>, PP<sub>6</sub> produce un quiebre, dirigiéndose hacia el residuo de H<sup>378</sup>, (donde se encontraron residuos sulfato (Alvarado *et al.*, 2006), 1U6Z. Sin embargo, recién cuando se utiliza un polyP de mayor tamaño, como PP<sub>9</sub> (c) o PP<sub>12</sub> (no se muestra) se observa que el ligando es capaz de atravesar el acueducto.

Estos resultados, sumado al potencial electrostático obtenido en la sección 4.1, nos permiten pensar que una partícula cargada negativamente podría acercarse al sitio de unión, pero nunca podría atravesar el acueducto. Sin embargo, al tratarse el polyP de un polímero, podría unirse al canal electropositivo y a medida que el fosfato terminal



**Figura 4.7** Docking mapeando una región que abarca el canal electropositivo y acueducto con: a) PP<sub>3</sub>; b) PP<sub>6</sub>; c) PP<sub>9</sub> y d) una de las conformaciones de PP<sub>9</sub> atravesando el acueducto.

avanza, el potencial electrostático se modificaría impulsando el avance del polyP, con lo cual el recorrido propuesto por Alvarado *et al.* (2006) podría ser factible pese a lo indicado según los ensayos de docking anteriores.



# Capítulo 5

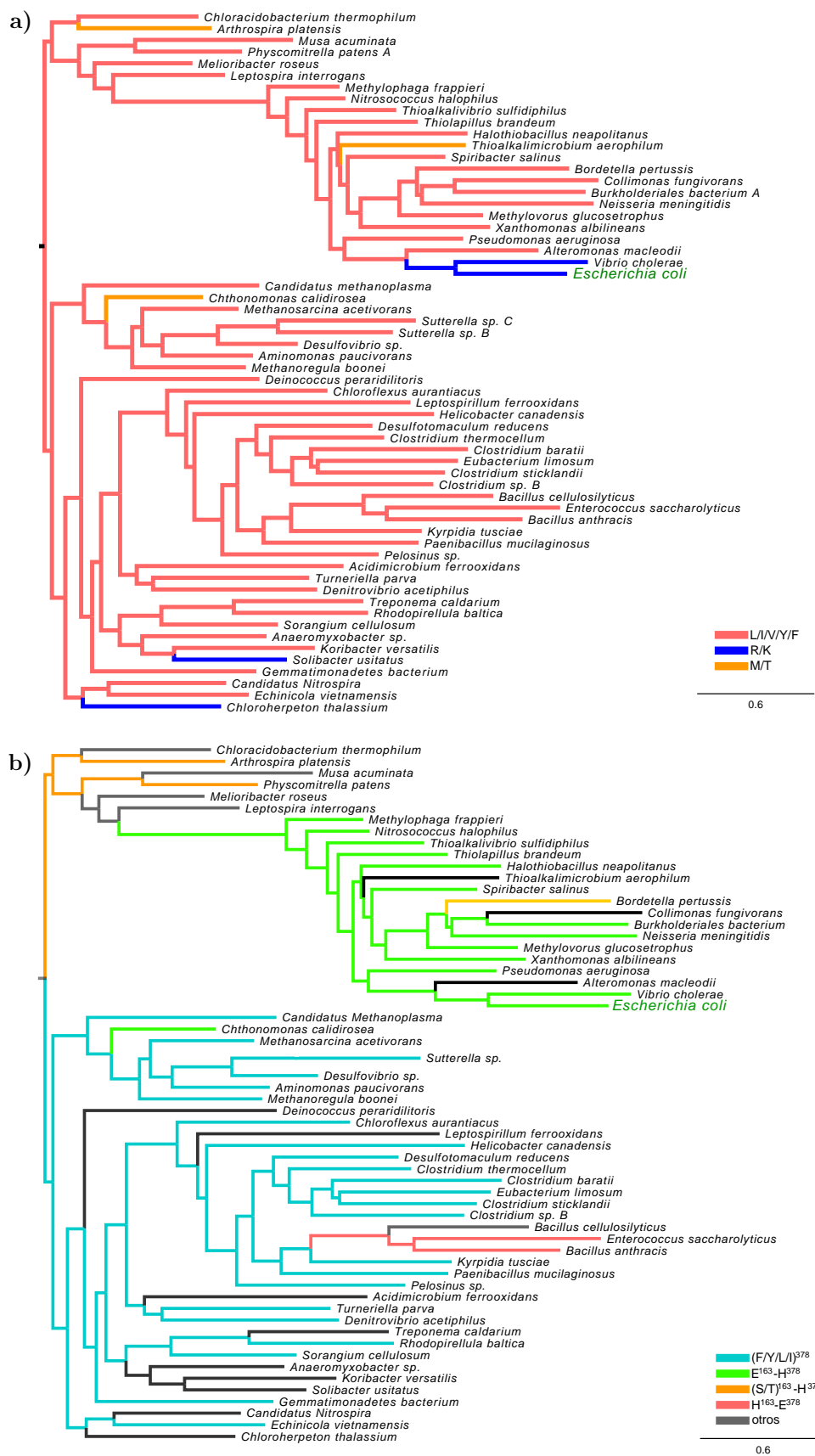
## Homólogos

La relación estructura función puede surgir de la comparación de las proteínas, ya sea en base a la secuencia de aminoácidos o a las similitudes o diferencias en la estructura tridimensional entre ellas. A continuación se presenta un estudio sobre diferentes homólogos o proteínas con estructura similar a *ecPpx* con el fin de establecer una relación entre la estructura, la función y el nivel de conservación de la secuencia de aminoácidos de esta enzima.

### 5.1 Árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se buscaron en la base de datos de UniProt las secuencias utilizando pHMMER. Para asegurar que se consideren solo ortólogos y no posibles parálogos en este estudio, de las 1693 secuencias obtenidas, se buscó contra las secuencias de proteínas de *E. coli* y se observó el mayor puntaje. 909 secuencias se correspondieron con *ecPpx*, mientras que 781 secuencias con la guanosina-5'-trifosfato,3'-difosfato pirofosfatasa y 3 con la 3-dehidroquinato sintasa. Solo se consideraron las primeras.

A su vez, gran cantidad de las secuencias obtenidas solo cubrieron alrededor del 60% o menos de la secuencia de *ecPpx* que corresponde a la región N-terminal. Dado el interés en caracterizar la unión de polyP a Ppx, principalmente de cadena larga, solo fueron consideradas aquellas que superaron un 77% de cobertura, asegurando la presencia de la región C-terminal en todas las secuencias analizadas. Por último



**Figura 5.1** Árbol filogenético simplificado y coloreado según el residuo presente en posición equivalente a R<sup>165</sup> (a); y E<sup>163</sup> y H<sup>378</sup> (b)

se eliminaron aquellas secuencias con un E-valor mayor a  $10^{-17}$ . Las 475 secuencias resultantes fueron alineadas y se construyó el árbol filogenético como se describe en materiales y métodos (sección 3.4).

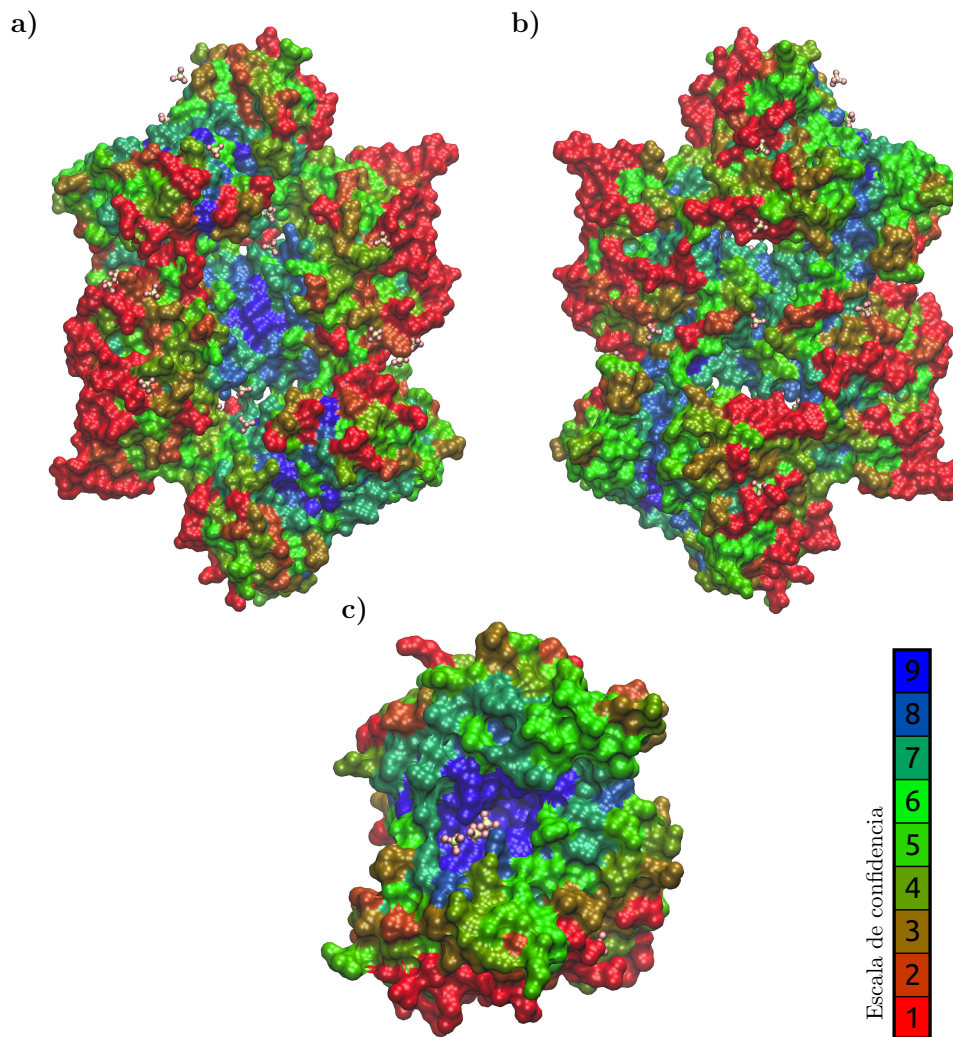
Para analizar la funcionalidad de los aminoácidos en base a la conservación de los mismos, se realizó un estudio de traza evolutiva mediante el servidor ConSurf. En la Figura 5.2 se representa la superficie de *ecPpx* coloreada según el nivel de conservación de los residuos.

Los residuos que conforman la superficie del canal electropositivo son altamente conservados. Sin embargo existen diferencias sustanciales en estos residuos, sobre todo en el dominio II. Mientras *ecPpx* posee residuos básicos, en otras especies se observan algunas sustituciones por residuos neutros o ácidos, como así es el caso de *paPpx*, que sustituye R<sup>165</sup>, R<sup>166</sup> y K<sup>197</sup> de *ecPpx* por L<sup>171</sup>, Q<sup>172</sup> y E<sup>203</sup>, respectivamente. De hecho, la gran mayoría de las Ppx analizadas, contienen en la posición equivalente a R<sup>165</sup> una cadena alifática: valina, isoleucina o leucina (Figura 5.1 a).

La R<sup>166</sup> se observa en el cristal de *ecPpx* orientada hacia el acueducto y como se ha mencionado antes, interaccionando directamente con sulfatos cristalográficos. Además se encuentra interaccionando con el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> la cadena principal de la S<sup>164</sup> altamente conservada y K<sup>197</sup>.

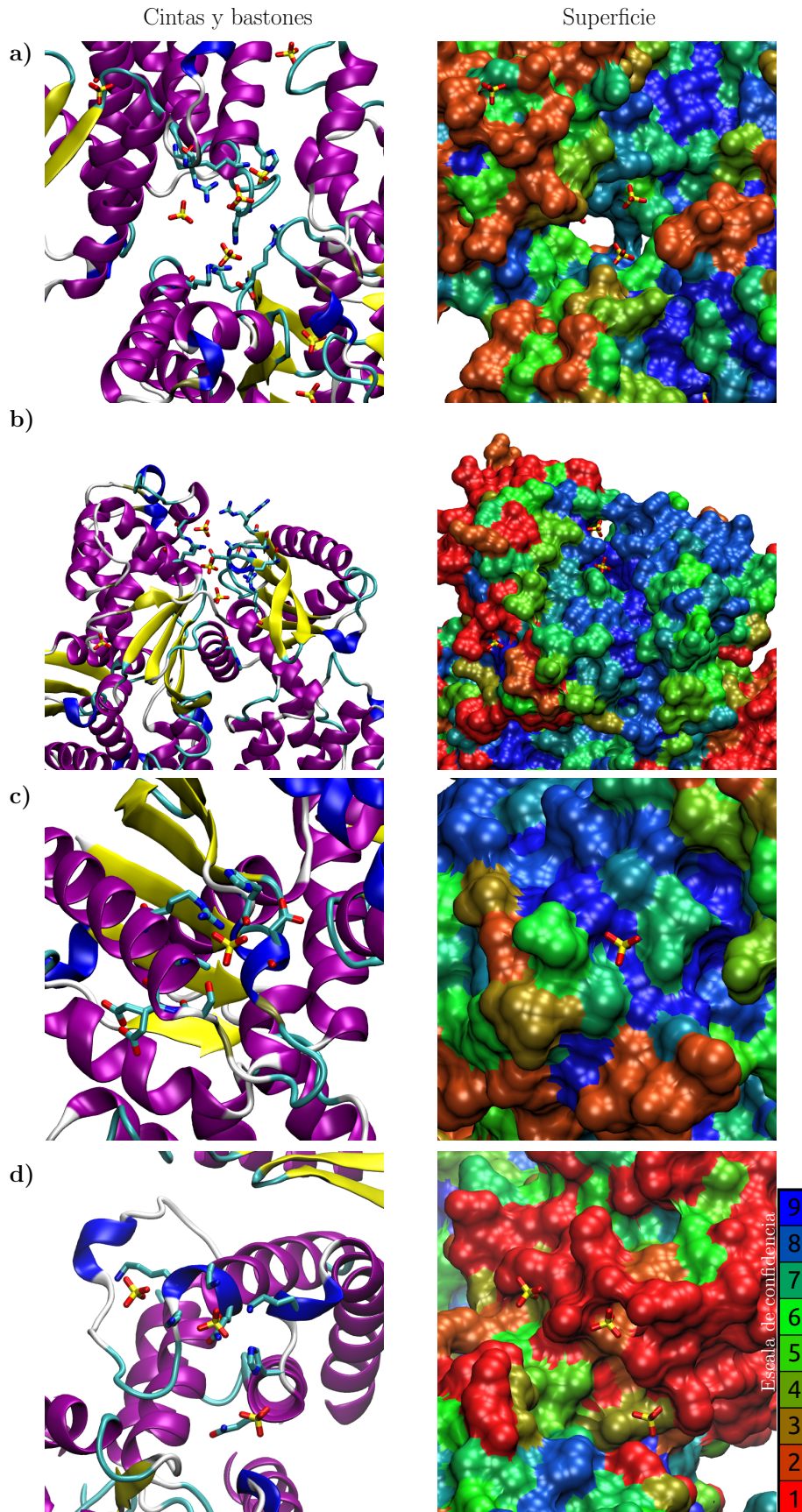
Por otro lado, en la misma región pero correspondiente al otro monómero en el dominio III, se encuentran la H<sup>384</sup> altamente conservada, como así también, H<sup>378</sup>, R<sup>413</sup> y K<sup>414</sup>; mientras que K<sup>488</sup> no lo es. Otros residuos de interés son S<sup>379</sup>, H<sup>382</sup>, R<sup>383</sup> y N<sup>447</sup> todos estos con buen grado de conservación (valores de 6 o 7). El residuo de H<sup>378</sup>, si bien es conservado, varía a lo largo del árbol, de hecho, la presencia o no de una histidina permite la separación en dos grandes grupos (Figura 5.1 b) lo que sugiere a este residuo como un importante factor en la divergencia de estas enzimas.

Analizando otros residuos básicos, se observa interaccionando con los sulfatos del sitio activo a los residuos: R<sup>267</sup> e H<sup>24</sup> interaccionando con el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en posición 2 (representaría al residuo tres de la cadena de polyP según lo propuesto por Alvarado *et al.* (2006)) (Figura 5.3 b) y los residuos R<sup>267</sup>, R<sup>44</sup> y K<sup>42</sup> interaccionando con el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 3 (residuo 5 de polyP). Siguiendo la misma línea de residuos, se pueden observar a R<sup>298</sup>, K<sup>221</sup>, R<sup>40</sup>, y un poco más alejado H<sup>131</sup>, R<sup>317</sup> y R<sup>323</sup>. Estos residuos describen un camino similar a aquel propuesto por Alvarado *et al.* (2006) en el sentido que el ca-



**Figura 5.2** Representación de la superficie: a) vista de frente; b) vista de atrás; c) vista desde arriba del sitio activo y d) vista del costado del dominio I; coloreada según la conservación de residuos obtenidos mediante ConSurf desde 1 (rojo) menos conservado a 9 (azul) más conservado.





**Figura 5.3** Se representa a) canal electropositivo y acueducto; b) hendidura segmento N-terminal; c) región intermedia entre el sitio activo y el canal electropositivo; d) zona interdomino I y II; izquierda representación cintas y bastones, derecha superficie.

mino del polyP iría por detrás del sitio activo y del canal para atravesar el acueducto. Sin embargo, este caso no contempla a R<sup>288</sup> que interacciona con un sulfato, la cual se encuentra poco conservada. Cabe destacar que todos estos residuos se encuentran cercanos a la interface de los dominios I y II, por lo que su conservación puede ser de naturaleza estructural, y no porque interaccione directamente con el sustrato.

Se observa por otro lado un parche de residuos conservados en la región adyacente al sitio activo y extendiéndose hacia el costado del dominio I, donde se distinguen R<sup>40</sup> y R<sup>75</sup>. Este parche altamente conservado junto a la hendidura (Figura 5.3 b) podría formar una región de interacción con polyP, quizás marcando el final del recorrido de la cadena previa su llegada al sitio activo.

De manera contraria, se encuentra desde el lado del frente, también bien conservados, e interaccionando con SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> un grupo de residuos (Figura 5.3 c) formado por H<sup>46</sup>, S<sup>58</sup>, R<sup>64</sup> y N<sup>97</sup>.

Con respecto al sitio 4, donde se observan 4 sulfatos consecutivos, tres de los cuales están unidos a un grupo de lisinas; llama la atención que ninguno de estos residuos están conservados, por lo contrario son altamente variables (Figura 5.3 d).

Estos resultados, sumados a los presentados en el capítulo 4, nos llevaron a desestimar la posibilidad de unión del polyP a los sitios 2 y 4, y no se tuvieron en cuenta en los estudios que continuaron.

## 5.2 Modelados estructurales

### 5.2.1. Sitio Activo

En la introducción se hizo mención a dos modelos posibles del sitio activo, en resumen Rangarajan *et al.* (2006) basándose en *aaPpx* (PDB:1T6C) proponen que *ecPpx* podría cambiar de conformación de cerrada a abierta y así incorporar el sustrato al sitio activo. Mientras que Alvarado *et al.* (2006) hacen una comparación con otros miembros de la familia ASKHA, y sin hacer mención de posibles cambios conformacionales, hacen referencia a una superposición entre sulfatos encontrados en el cristal (PDB:1U6Z) con los fosfatos del ATP en una FtsA de *T. maritima* (PDB:1E4G).

En el caso de *aaPpx*, además de la estructura abierta, presenta unido un ion Ca<sup>2+</sup> al sitio activo, sobre un loop rico en glicinas (<sup>143</sup>GGG<sup>145</sup>), con la particularidad de que a

pesar de ser altamente conservada esta región, en ambos cristales de *ecPpx* (PDB:1U6Z, 2FLO) se encuentran relajados, mientras que en *aaPpx* se encuentra con una pequeña torsión en la G<sup>143</sup> que le permitiría al oxígeno de la cadena principal, interactuar con el metal.

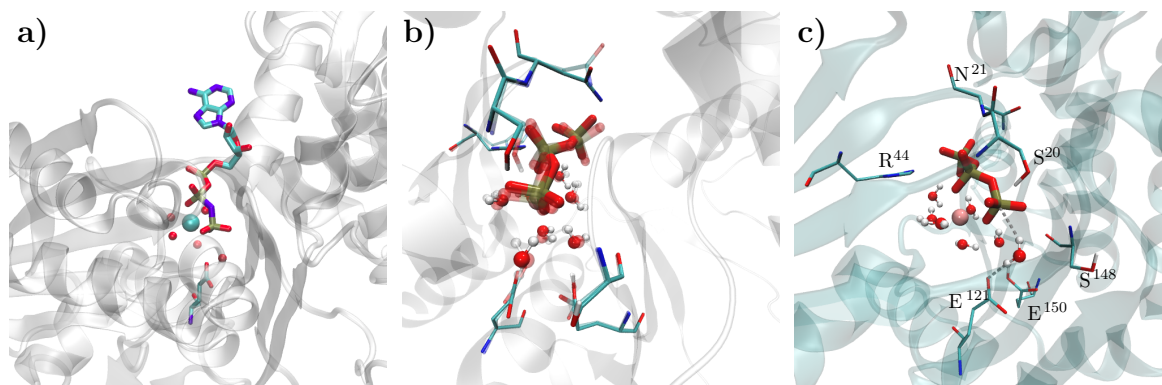
De este modo, tal como se hizo con la FtsA de *T. maritima*, se realizó una búsqueda en BLAST, para comparar solo la región N-terminal de *ecPpx* contra la base de datos PDB. En todos los casos observados, este loop se encontró de manera relajado (PDBs: 1T6C,1U6Z,2FLO,3CER,3CJA,3HI0,3MDQ) sin importar la presencia o no de ligando. Esto conduce a pensar que al menos cuando el polyP es el sustrato, este se comporta al igual que en la FtsA.

Zebisch y Sträter (2008), describen en mecanismo de unión y catálisis de nucleótidos de otro miembro de la ASKHA, una fosfodihidrolasa (NTPDasa2) de *Rattus norvegicus* donde se cuenta con 3 modelos (PDB: 3CJ1 proteína en su forma apo, 3CJ7 unida a AMP, 3CJ9 unida a AMP, P<sub>i</sub> y Ca<sup>2+</sup>, 3CJA unida a ANP o adenilato fosfoamino-fosfónico y Ca<sup>2+</sup>). Alvarado *et al.* (2006) realizan una comparación con el sitio activo de esta NTPDasa y *ecPpx*, por lo que en este trabajo se utilizó esta enzima para explicar la unión del polyP al sitio activo.

En la Figura 5.4 a) se muestran el sitio activo de la NTPDasa2 unido al análogo de sustrato ANP. En la Figura 5.4 b) el modelo resultante obtenido por superposición y minimizado por QM/MM mediante el software Qsite de la plataforma Maestro (Schrödinger). Aquí se observa, que a diferencia de lo sucedido en *aaPpx*, el metal Mg<sup>2+</sup> solo interactúa con moléculas de agua o los oxígenos del PP<sub>3</sub>, llevándolo a este a una conformación eclipsada. De este modo, el modelo explica las interacciones y las distancias necesarias para realizar la reacción de fosfohidrólisis del polyP y de manera congruente con los SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> SA1 y SA2 encontrados en el cristal PDB:1U6Z.

### 5.2.2. Modelado *ecPpx* estructura abierta

Rangarajan *et al.* (2006) proponen que *ecPpx* debe sufrir un cambio conformacional desde la conformación cerrada a la abierta que junto al canal electropositivo permitiría la formación del sitio de unión. Si esto ocurre, es fundamental contar con una estructura abierta para los estudios de simulación molecular, para lo cual se decidió generar la conformación abierta mediante modelado comparativo. Para lo cual se utilizó el servidor



**Figura 5.4** Sitio activo de: a) NTPDase2 de *Rattus norvegicus*, se presenta el ion  $\text{Ca}^{2+}$  interaccionando con 4 moléculas de agua y dos átomos de oxígeno del ANP; b) modelo para *ecPpx* ubicados por superposición con la NTPDase2 (transparente) y optimizado por QM/MM; c) vista de perfil, se observa con línea punteada la orientación de la molécula de agua involucrada en el ataque nucleofílico, interaccionando directamente con el E<sup>121</sup>.

de MODELLER (Šali *et al.*, 1995). Se alineó la secuencia de *ecPpx*, con la GPPA/PPX de *A. aeolicus* para el N-ter y con el C-ter de 1U6Z de *ecPpx*.

Dado que se pretendía modelar la conformación abierta, se puso especial atención en la región donde ocurre el cambio estructural entre los dominios I y II para generar la apertura, y se procuró mantener las coordenadas atómicas cristalinas en el resto de proteína no involucrada en dicho cambio conformacional. Así, se consideraron del modelo, las coordenadas atómicas de los residuos correspondientes al péptido que une dominio I y II (111 a 164); y aquellos que unen los dominios II y III (297 a 311). Mientras que el C-terminal se mantuvo con las coordenadas atómicas originales y los dominios I (12 – 110) y II (165-296) fueron tomados del PDB:1U6Z y alineados con aquellos del modelo obtenido Figura 5.5 a).

Con el objeto de conseguir el mejor posicionamiento de las subunidades N-terminal (12 a 297) y C-terminal (312 a 506), se realizó docking proteína-proteína empleando el software HEX (Ritchie *et al.*, 2008). Se obtuvieron dos conformaciones posibles principales. La primera (Figura 5.5 b) en la cual la región N-terminal se encuentra girado en sentido antihorario respecto a la región C-terminal. A diferencia de lo que propone Rangarajan *et al.* (2006), en esta conformación no hay continuidad de la hendidura entre dominios I y II con el canal electropositivo. Se debe tener en cuenta además que en esta conformación se generan choques con la hélice que une el dominio II y III, y

no se logró modelar una estructura que no posea dichos choques.

La segunda conformación obtenida (Figura 5.5 c) presenta una superposición mayor con aquella de la estructura 1U6Z y el canal electropositivo presentó continuidad con la hendidura, de manera similar a lo propuesto por Rangarajan *et al.* (2006). Teniendo en cuenta estos aspectos, se seleccionó esta conformación (Figura 5.5 c).

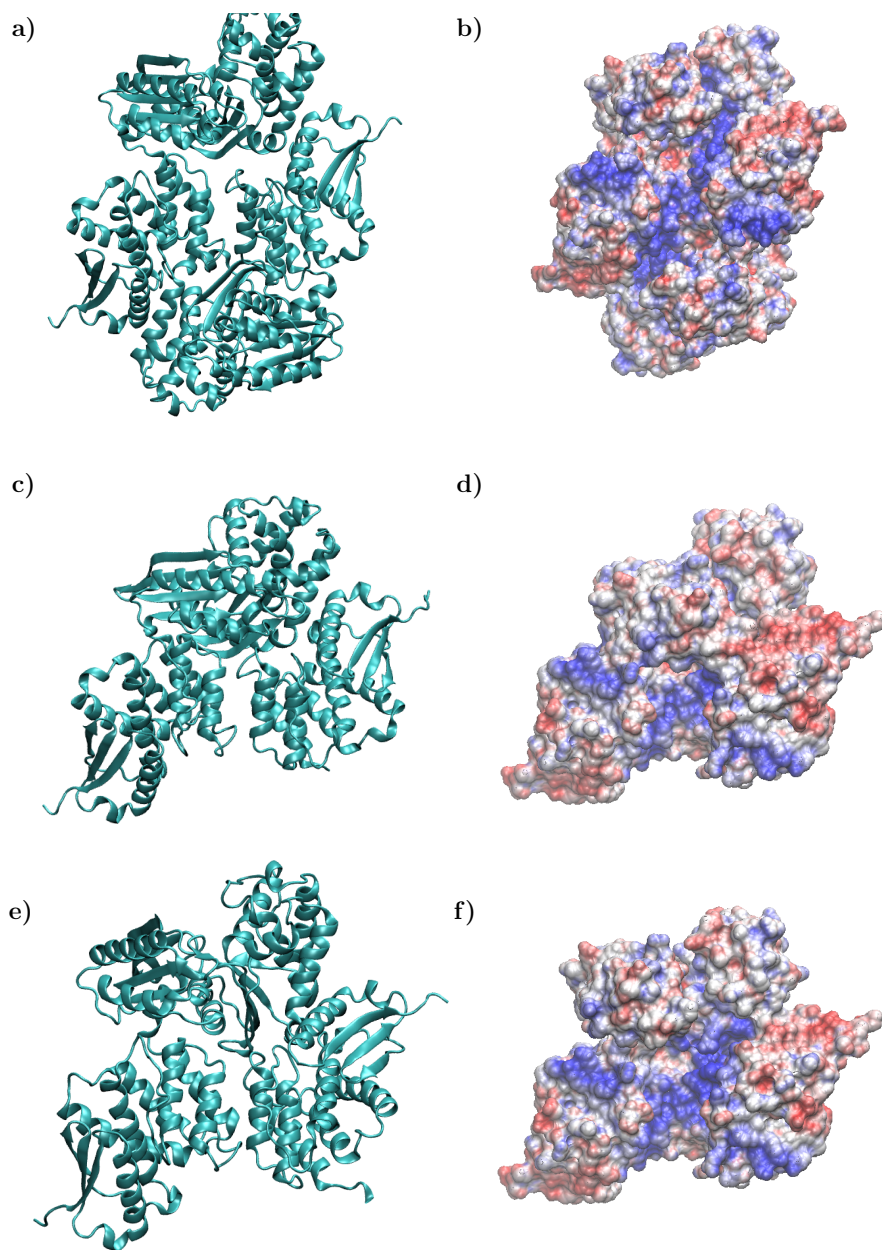
Para finalizar el modelo, éste se superpuso con la estructura de GPPA/Ppx de *A. aeolicus* y se utilizaron las coordenadas del  $\text{Ca}^{2+}$  (PDB:1T6C) para asignárselas al  $\text{Mg}^{2+}$ . Luego se realizó una relajación del sistema por MD manteniendo las siguientes restricciones: a) restricciones harmónicas sobre las coordenadas atómicas de la cadena principal del C-terminal (313 a 493); b) restricciones harmónicas de rmsd para la región N-terminal (15 a 293) en la cadena principal, en este sentido, se aplicaron estas restricciones para mantener la estructura general de los fragmentos N-terminal y C-terminal, pero a su vez lo suficientemente independientes para permitir el acomodamiento entre ellos; c) restricciones harmónicas de enlace y ángulo de valencia en el sitio de unión a  $\text{Mg}^{2+}$ , debido a que las interacciones de coordinación del  $\text{Mg}^{2+}$  no están parametrizadas en el campo de fuerzas utilizado; d) restricciones de enlace entre  $\text{C}_\gamma$  de  $\text{E}^{199}$  y  $\text{C}_\beta$  de  $\text{D}^{415}$ , ya que tanto en *ecPpx* en PDB:1U6Z como en el resultado del docking se mantiene esta unión, se le dio importancia a la misma.

En la Figura 5.6, se muestra el sitio activo de *ecPpx* en conformación abierta a relajado. Se observa que el loop enriquecido en glicinas produce un giro que permite a G145 interactuar directamente con  $\text{Mg}^{2+}$  junto a  $\text{S}^{148}$ ,  $\text{D}^{143}$  y  $\text{E}^{150}$  tal lo descrito por Rangarajan *et al.* (2006), que a diferencia de lo ocurrido en PDB:1U6Z este loop se encuentra de manera relajada y no podría ser llevada a cabo dicha interacción.

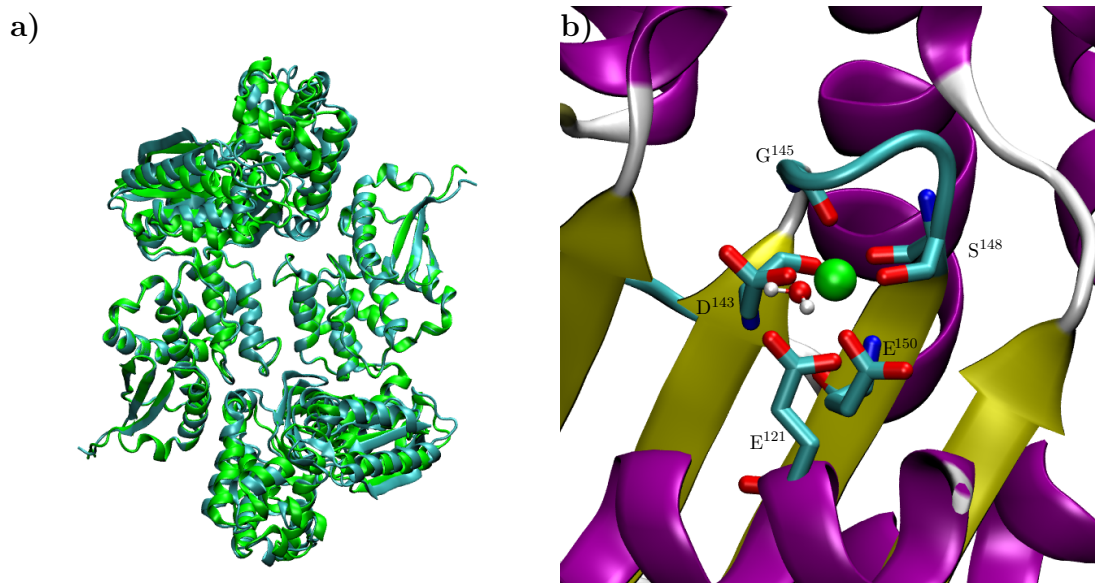
### 5.2.3. Modelado *paPpx*

El modelo de *paPpx* con el que cuenta en el laboratorio para el estudio comparativo con otras Ppx en esta tesis, fue construido con la proteína molde (PDB:1U6Z) mediante el software ICM (Abagyan *et al.*, 1994). A partir del análisis del alineamiento obtenido en el estudio de “evolutionary trace”, se realizó una comparación con el alineamiento realizado por Gallarato (2012), haciendo principal énfasis en la inserción de gaps. De estas inserciones de gaps, la mayoría presentaron alguna diferencia, pero al encontrarse en loops, no afectaron al modelo. Sin embargo llamó la atención la presencia





**Figura 5.5** Representación de posibles orientaciones de la región N-terminal en *ecPpx*: a) resultado directo de modelar con *aaPpx* y *ecPpx*; b y c) conformaciones obtenidas por docking proteína-proteína, b) conformación más favorable, el canal no se continua con la hendidura del sitio activo mientras que si ocurren mayor continuidad en c); izquierda representación NewCartoon, derecha Superficie coloreado con potencial electrostático.



**Figura 5.6** Modelo de *ecPpx* en conformación abierta: a) representación en cintas de proteína completa en verde superpuesta PDB:1U6Z en cyan; b) en cintas y bastones sitio activo, en esfera verde  $Mg^{2+}$ , nótese la molécula de agua que completa la esfera de coordinación tetraédrica del  $Mg^{2+}$ .

de un gap en *paPpx*  $^{446}\text{HHIRGTQEMPS-VRLKA}^{458}$  que anteriormente fue modelado presentando el gap en  $^{446}\text{HHR-GTQEMPSVRLKA}^{458}$ . Esta diferencia resultó en un posicionamiento de la cadena lateral de la R<sup>449</sup> totalmente diferente a la de su par en *ecPpx*, a pesar de estar estos muy conservados. Como se aprecia en la Figura 2 b), este residuo en *ecPpx* realiza un puente salino con E<sup>371</sup>, y la importancia en la actividad de la enzima de este residuo fue demostrado por Alvarado *et al.* (2006).

Uno de los objetivos de este trabajo fue realizar una comparación entre la estructura de *ecPpx* y *paPpx* y así explicar diferencias observadas en estudios previos. Debido a que esta diferencia involucra un residuo esencial según Alvarado *et al.* (2006) se modeló nuevamente *paPpx* teniendo en cuenta esta modificación. En la Figura 5.7 se muestra el resultado del modelado a), como podemos apreciar en b), la R<sup>444</sup> se encuentra en este caso en orientación similar a aquella en *ecPpx*, presentándose mayor diferencia en el loop adyacente.

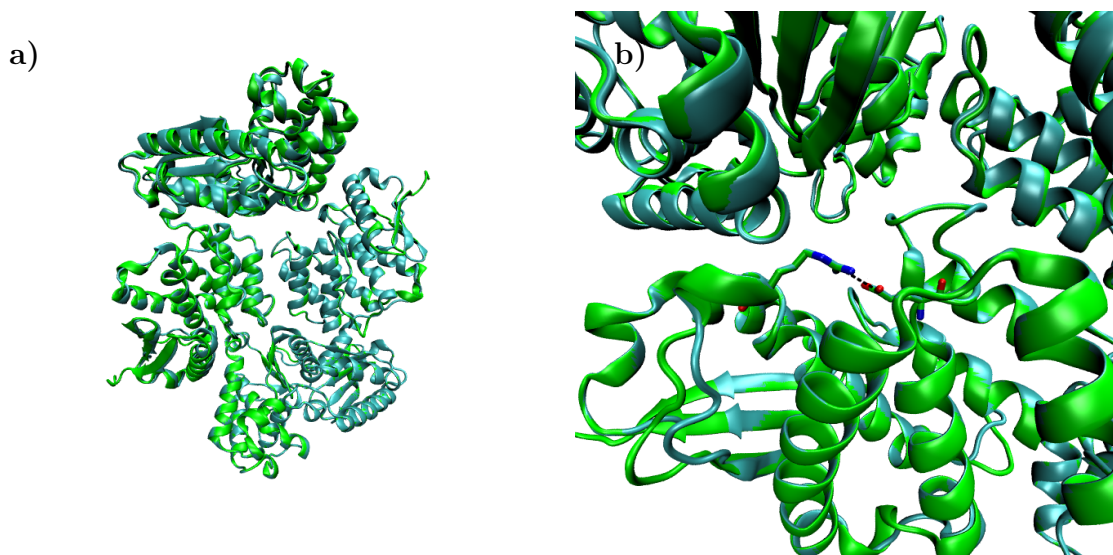
En la Figura 5.8, se muestra el potencial electrostático de la superficie de *paPpx*. Éste, es similar a *ecPpx*, pero como fue mencionado anteriormente, es menos electropositivo. A su vez en estudios cinéticos se demostró que la concentración óptima de KCl

es 80 mM, aproximadamente la mitad necesaria para *E. coli* (Gallarato, 2012; Beassoni *et al.*, 2015). Esto sumado a los experimentos de Bolesch y Keasling (2000a,b), podrían explicar la importancia de los cationes monovalentes, en apantallar o contrarrestar las cargas del polyP en su interacción con Ppx.

### 5.3 Ppx de *A. tumefaciens*

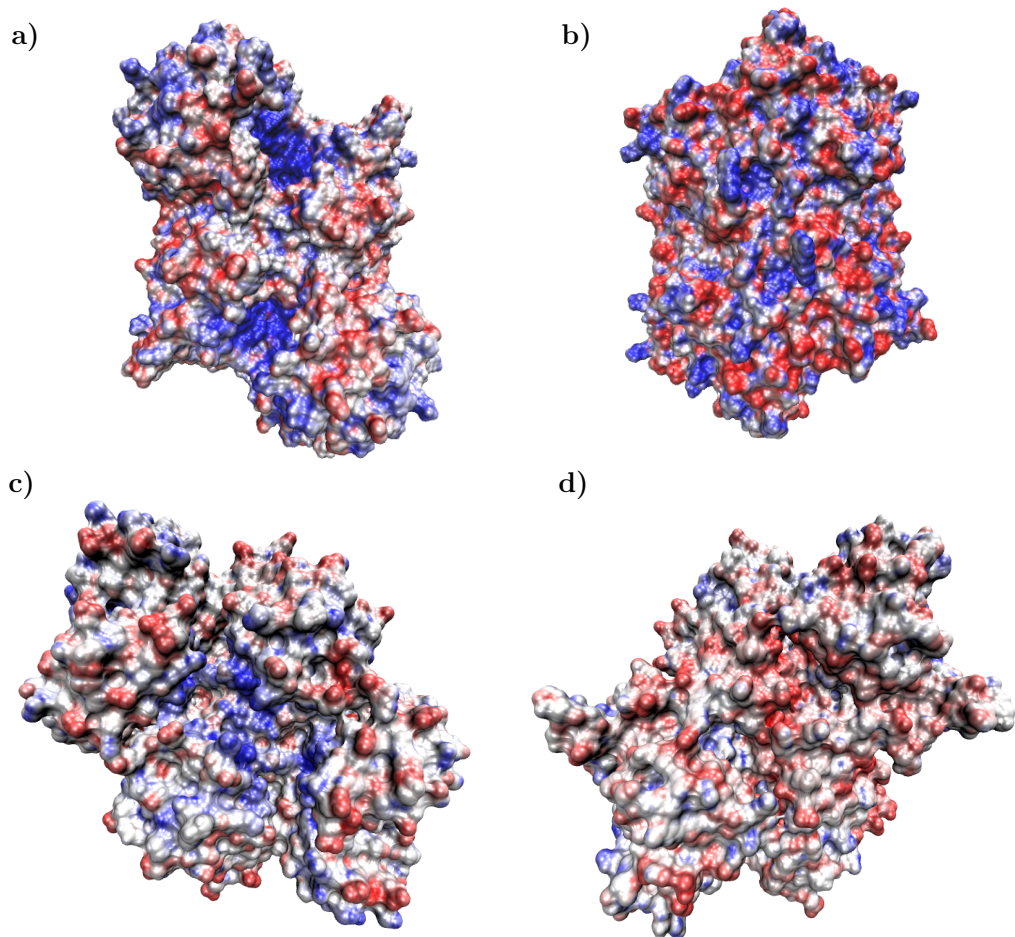
La estructura de una hipotética exopolifosfatasa de *A. tumefaciens* (*atPpx*) fue resuelta en 2009 por el grupo “Joint Center for Structural Genomics” (PDB:3HI0, no publicado). La misma posee un 27% de identidad y un 45% de positividad con el N-terminal de *ecPpx*, sumado a una superposición con un rmsd=1,89 Å de la cadena principal (Figura 5.9 a). Respecto a la región C-terminal la similitud es menor (37%, 15% de identidad) y un rmsd mayor (4.68 Å cuando se superpone un monómero de cada C-terminal; 6,59 Å cuando se superponen los C-terminal formando dímero; Figura 5.9 b) y c) respectivamente), aunque poseen una organización semejante con algunas diferencias en el alineamiento.

Sin embargo, se encuentran grandes diferencias en la manera en que se organizan los dominios debido a un giro en el loop que une el segmento N-terminal con el C-terminal

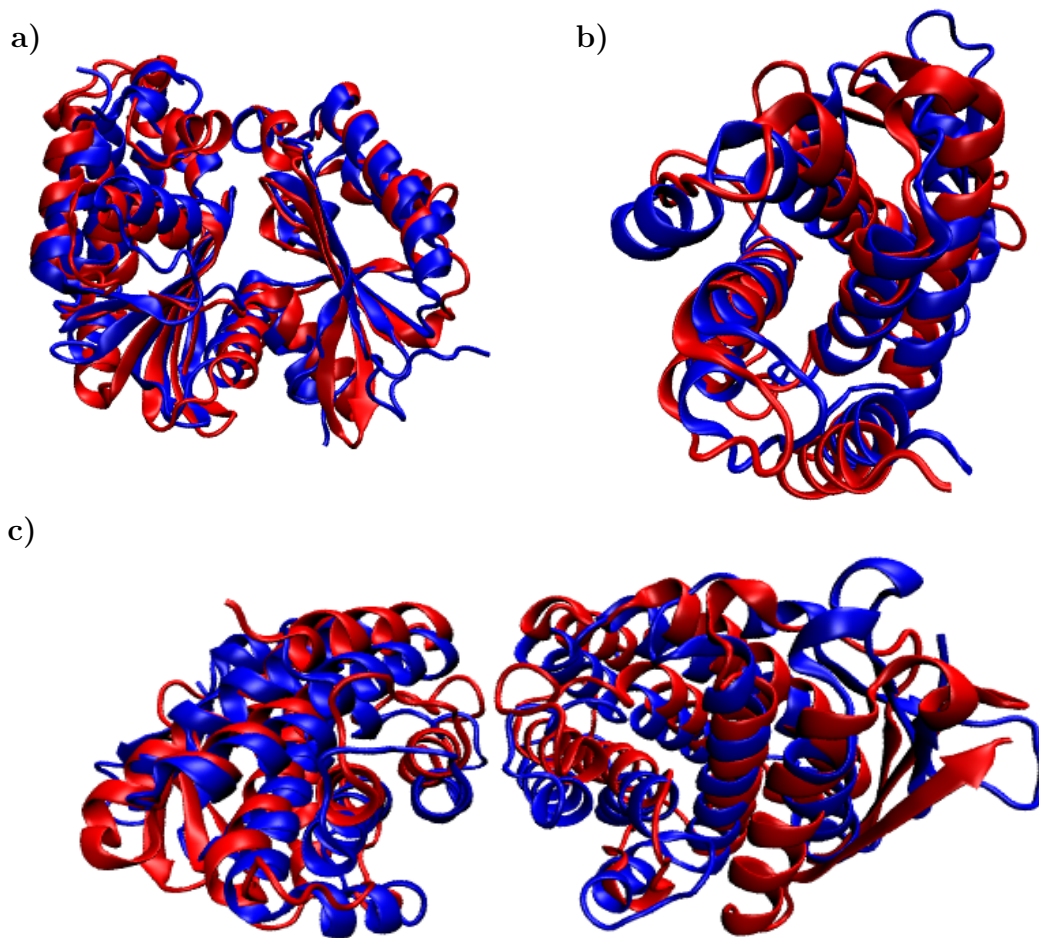


**Figura 5.7** Superposición de el modelo de *paPpx* (cyan) con la estructura de *ecPpx* (pdb 1U6Z; verde): a) dímero completo; b) puente salino entre E<sup>371</sup> y R<sup>449</sup> de *ecPpx*, se muestran los residuos equivalentes en *paPpx* formando puente salino; y el loop adyacente al ser más corto, presenta estructura diferente.



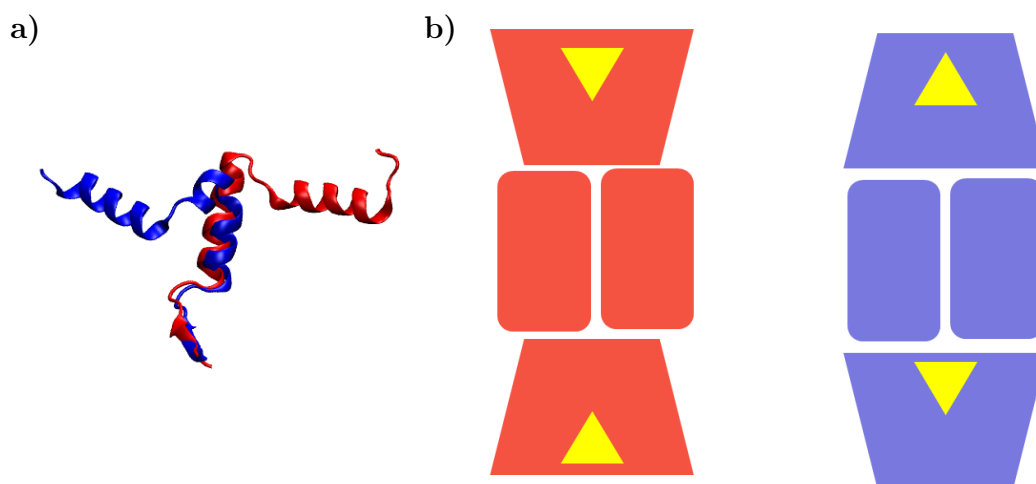


**Figura 5.8** Potencial electrostático de *atPpx* (a y b) y *paPpx* (c y d). Vistas desde el frente y detrás (izquierda y derecha respectivamente). Cálculos realizados con APBS a pH=8.



**Figura 5.9** Superposición entre *atPpx* y *ecPpx*: a) N-terminal (rmsd 1,89); b) C-terminal (rmsd 4,68) y c) dímero C-terminal (rmsd 6,59) Å.

(Figura 5.10 b). En la Figura 5.10 b) se representa la orientación del sitio activo (en el N-terminal) respecto al C-terminal. En *ecPpx* el sitio activo está opuesto a la región C-terminal, y así al canal electropositivo descrito anteriormente. En cambio, en *atPpx* se muestra un giro de 180° de la región N-terminal, lo que orienta al sitio activo hacia el canal electropositivo.

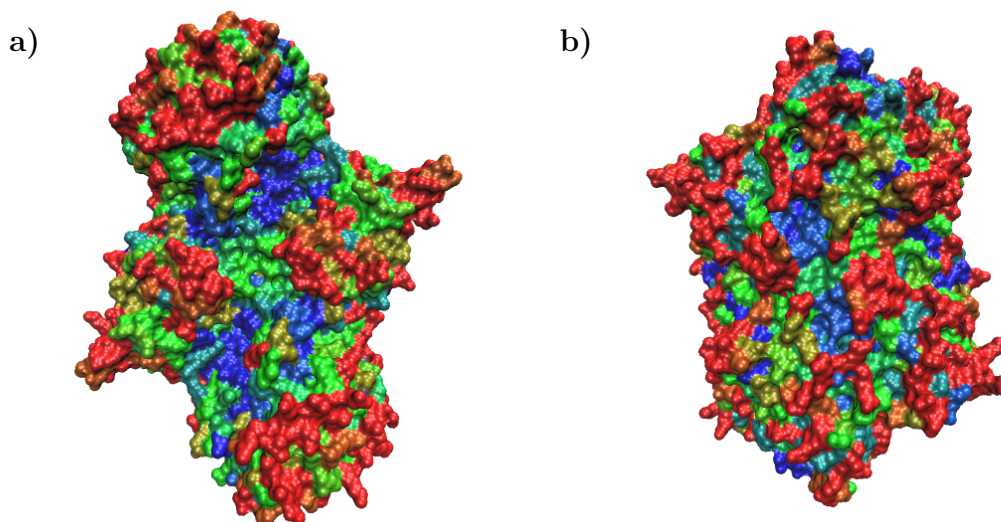


**Figura 5.10** Representación de las diferencias entre *atPpx* (azul) y *ecPpx* (rojo): a) superposición del segmento que une la región N-terminal con C-terminal; b) esquema representando la disposición de la región N-terminal (trapezoido) con sitio activo (triángulo amarillo) respecto de las subunidades C-terminal (rectángulo).

Si bien, la estructura de esta enzima está depositada en 3HI0, no hay una publicación asociada para discutir lo observado por los autores. Sin embargo, del análisis de esta estructura, llama la atención la conformación diferente de *ecPpx*. Mientras que la estructura general, teniendo en cuenta las subunidades N-terminal y C-terminal por separado, son similares, sin embargo, la forma en que interactúan entre sí es completamente diferente. Esto podría deberse a que las enzimas son diferentes, o bien que las diferencias sean consecuencia de las condiciones de cristalización y que la enzima pueda estar en uno de los dos estados. De ser posible este giro en dicho loop, se plantearía un nuevo modo de unión en la que el polyP conectaría directamente el canal electropositivo con el sitio activo.

Dadas estas diferencias entre *ecPpx* y *atPpx*, nos centramos en hacer un modelado evolutivo para ver diferencias, en un principio en la conservación de los residuos. En la

Figura 5.11 se observan representaciones de la conservación de los residuos superficiales de *atPpx*. En la Figura 5.11 a) se ve la vista de frente, donde la región más conservada es la cavidad formada entre el sitio activo y la región C-terminal. En b) se observa desde el lado opuesto, donde solo se observa un parche en lo que correspondería por homología con *ecPpx* a la salida del acueducto.



**Figura 5.11** Representación de la superficie: a) vista de frente; b) vista de atrás coloreada según la conservación de residuos obtenidos mediante.

Siguiendo esta línea de estudio, se analizó también el potencial electrostático en *atPpx*. En la Figura 5.8 a) se observa una región de potencial electropositivo alto, en este caso en la cavidad formada por el sitio activo y la región C-terminal.

## 5.4 Estructuras similares

Con el objetivo de entender las diferencias y similitudes de *ecPpx* con proteínas de similar estructura, se realizó una búsqueda en el servidor DALI, utilizando ya sea la proteína completa, o las subunidades N- y C-terminales por separado. La búsqueda de homólogos estructurales se realizó prestando especial atención a:

- la conformación del loop <sup>142</sup>IDIGGGSTE<sup>150</sup>;
- la conservación de residuos debido a ser importantes estructuralmente más que funcionales;

- la orientación de la región N-terminal respecto a la C-terminal

De todas las estructuras similares al N-terminal, las únicas que presentaron un loop “torcido” fue la *aaPpx*, lo cual ubica a esta enzima como única entre las estudiadas, capaz de mantener dicha conformación. Esto puede que este intrínsecamente relacionado al pppGpp como sustrato, ya que como se observa en la estructura, de estar el loop “relajado”, colisionaría con el difosfato 3’.

Uno de los hechos que más llamó la atención, fue los residuos E<sup>371</sup> y R<sup>449</sup>, los cuales en *ecPpx* forman un puente salino entre sí. El primero, E<sup>371</sup>, fue propuesto por Alvarado *et al.* (2006) como fundamental para que el polyP atravesase el acueducto. Todas las estructuras similares al C-terminal de *ecPpx* mostraron tener conservada estos residuos, presentando un glutámico o aspártico y la arginina. Este hallazgo sugiere una importancia en estos residuos más bien estructural propio del dominio III en lugar de funcional para la unión de polyP.

Pocas exopolifosfatasas han sido resueltas estructuralmente al día de la fecha, y más aún, solo dos de ellas presentando ambas subunidades (*ecPpx* y *A. aeolicus*). La búsqueda mediante DALI tampoco arrojó otras proteínas que tengan similar estructura, siendo única de las exopolifosfatasas.



# Capítulo 6

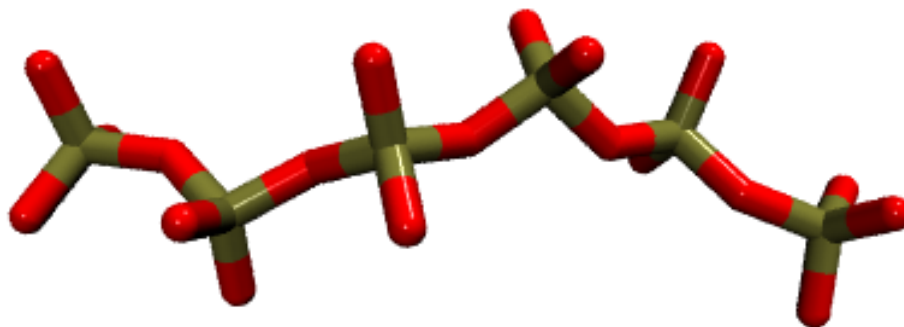
## Dinámicas moleculares

### 6.1 Parametrización de polyP

Desde hace muchos años que se considera al polyP una molécula de interés, debido a su importancia en los seres vivos, y muchos estudios se han basado en la síntesis e hidrólisis del mismo (Kulaev *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2009), o en estudios en fase condensada (Jost y Schulze, 1969; Kulaev *et al.*, 2004). Sin embargo, no ha sido posible encontrar información acerca de estudios que involucren MD de este compuesto con sus respectivos parámetros, para ninguno de los campos de fuerza mayormente conocidos: AMBER, CHARMM, OPLS, GROMACS, etc; sino haciendo referencia a metilpirofosfato o metiltrifosfato, como grupos funcionales de nucleótidos di y trifosfato, respectivamente (Foloppe y MacKerell, 2000; MacKerell y Banavali, 2000). Es por esto, que surgió la necesidad, como punto inicial para la continuidad de este trabajo, de parametrizar la molécula de polyP de manera que sean compatibles con CHARMM22.

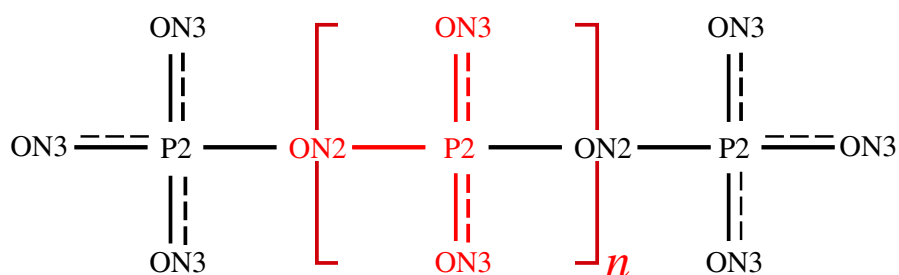
Inicialmente se utilizaron los parámetros de metiltrifosfato totalmente desprotonado, para asignárselos a polyP. Para definir la topología del mismo, se consideró al átomo de fósforo con sus dos oxígenos aniónicos y uno de los oxígenos que forman el enlace fosfodiéster adyacentes. Además se agregaron parches para los residuos de los extremos, de manera que modificaran la carga y completar la estructura (Figura 6.2).

Se minimizó un hexa-polyP totalmente desprotonado por mecánica cuántica con un nivel de teoría HF/6-31+G\* en vacío. Para asegurar un mínimo global, se realizó un scan para comprobar las posiciones escalares y eclipsadas con un incremento de 30



**Figura 6.1** Representación en bastones de una molécula de hexa-polifosfato luego de optimización por RHF/6-31+G\*.

° y el mínimo energético se reoptimizó sin restricciones. En la Figura 6.1 se muestra el resultado del mismo. Como parametrización inicial, los parámetros correspondientes a las fuerzas de repulsión (L-J) fueron tomadas del fosfato  $\gamma$  y  $\beta$  del ATP del campo de fuerzas CHARMM 22 (Foloppe y MacKerell, 2000; MacKerell y Banavali, 2000) y cargas parciales fueron asignadas según las cargas de ATP y también se probaron las calculadas mediante CHELPG. Sin embargo, esta última presentó cargas parciales con momentos dipolares muy elevados por lo que al realizar MD en sistema solvatado, los oxígenos ON3 interaccionaban con 4-5 moléculas de agua. Debido a esto, se utilizaron las cargas calculadas para el ATP.



**Figura 6.2** Representación de polyP. ON3 son los oxígenos aniónicos, ON2 los enlazantes. Los oxígenos enlazantes de los residuos extremos poseen cargas diferentes a los otros residuos de manera similar como ocurre con los oxígenos aniónicos y el fósforo (P2) estos últimos poseen una carga

Para las constantes de fuerza de enlace y ángulo de valencia, se realizaron cálculos de frecuencia.

Para la asignación de los parámetros de ángulo diedro se determinó la superficie



**Tabla 6.1 Parámetros para polyP:** Parámetros optimizados para polyP. Nótese la presencia de una serie de Fourier para el diedro P2 ON2 P2 ON2.

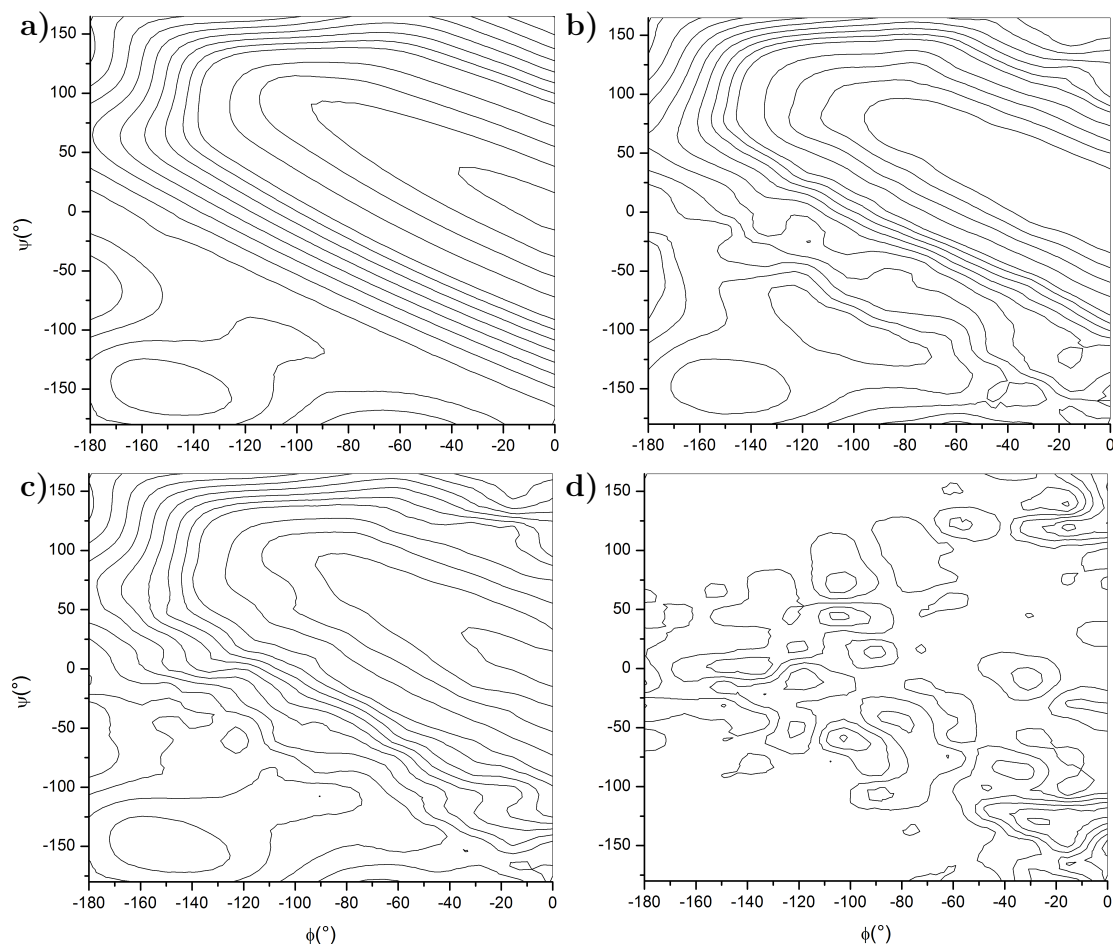
Enlace			
Tipo de átomo	$K_b$	$b_0$	
P2 ON2	236,09	1,6916	
P2 ON3	521,58	1,5140	

Ángulo			
Tipo de átomo	$K_\theta$	$\theta_0$	
ON2 P2 ON2	108,58	95,13	
ON2 P2 ON3	83,16	104,33	
ON3 P2 ON3	36,49	115,12	
P2 ON2 P2	24,24	169,09	

Diedro			
Tipo de átomo	$K_\chi$	n	$\sigma$
P2 ON2 P2 ON2	3,60	1	180
P2 ON2 P2 ON2	0,40	2	0
P2 ON2 P2 ON2	0,82	3	180
P2 ON2 P2 ON3	0,50	3	0

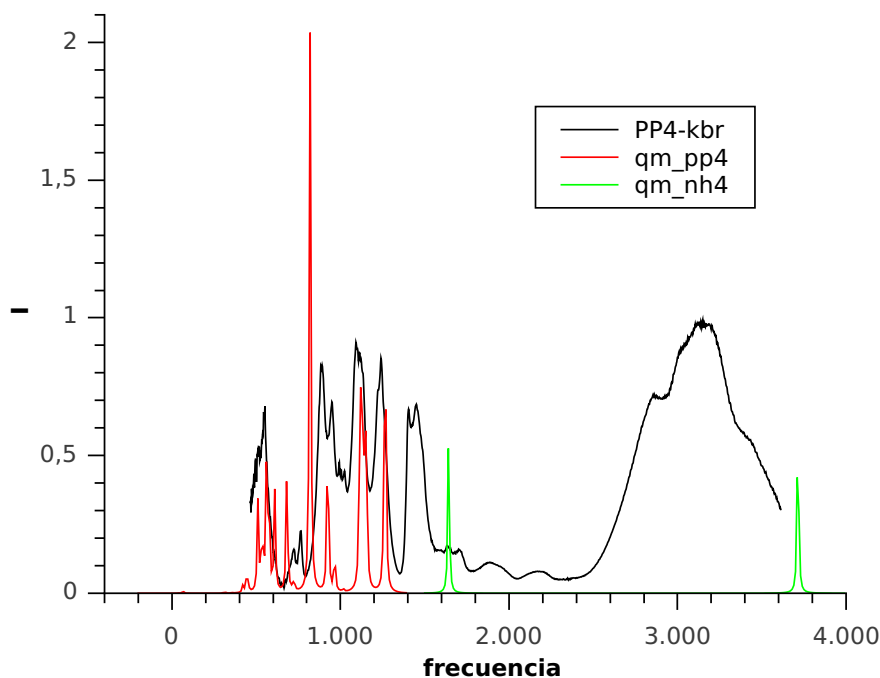


**Figura 6.3** Superficie de energía potencial en la rotación de los diedros  $\phi$  y  $\psi$  calculados por mecánica cuántica a) (RHF/6-31+G\*); y mecánica clásica: b) diedros incluidos, c) diedros + CMAP. d) diferencia en valores absolutos (—QM-MM—) entre a) y c) desde  $0,25 \text{ kcal.mol}^{-1}$  con incremento de  $0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . a b y c) incremento de  $1 \text{ kcal.mol}^{-1}$  hasta  $10 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , se muestran además  $12,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ,  $15,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ,  $17,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$  y  $20 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . d) desde  $0,25$  y con incremento de  $0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ .

de energía potencial (PES) de los ángulos diedros como se señala en la Figura 2, con un incremento de  $15^\circ$  al nivel de teoría HF/6-31+G\*. Debido a que en determinadas conformaciones el ángulo P-O-P alcanza valores cercanos a  $180^\circ$ , no se logró convergencia en la restricción del ángulo diedro, por lo que éstos finalizaron en error. Para solucionar esto, se agregaron restricciones en este ángulo en  $175^\circ$ . Si bien estas restricciones afectan a la PES, como ocurren en conformeros de alta energía (entre  $10$  y  $20 \text{ kcal.mol}^{-1}$  del mínimo global), es poco probable que sean visitadas en una MD a temperaturas normales de experimentación ( $25 - 37^\circ\text{C}$ ). En la Figura 6.3, se muestran la PES para los cálculos por mecánica cuántica (a) y mecánica molecular con los diedros

optimizados (Figura 6.3 b), Tabla 6.1). El rms en las diferencias de energía relativa fue de  $1,41 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Sin embargo, no se logró representar el mínimo calculado por QM; observándose éste en  $\phi \approx -105$  y  $\psi \approx -105$  con valores de  $0,12 \text{ kcal.mol}^{-1}$  (Figura 6.3 b). A su vez, el incremento de energía hacia el máximo es mayor en MM que en QM, llegando a valores de  $3,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$  mayores.

A fin de mejorar la representación de la PES, se agregó una grilla de corrección (Mackerell *et al.*, 2004) la cual deriva de la diferencia de entre QM y MM. En la Figura 6.3 c), se muestra la PES por MM teniendo a partir de la suma de CMAP, donde el rms de diferencias relativas de energías fue de  $0,59 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . En el gráfico de la Figura 6.3, se observan las diferencias entre esta PES y el calculado por QM. Aquí se detalla la persistencia de errores en una región diagonal entre los diedros de  $\phi=0$  y  $\psi=0$ , los cuales son azarosos y no pudieron ser corregidos por la función de suavizado CMAP.



**Figura 6.4** Espectro infrarrojo de tetrafosfato de amonio (negro) en comparación al espectro calculado por QM de tetrafosfato (rojo) y amonio (verde)

## 6.2 Espectro IR

Con el objeto de validar los parámetros obtenidos se realizó la determinación experimental de algunos de ellos mediante IR. En la Figura 6.4 se muestra el espectro experimental obtenido para tetrafosfato de amonio. El mismo se lo compara con el espectro calculado por mecánica cuántica (Figura 6.4). Aquí se observa una buena correspondencia en la mayoría de los picos, salvo el de mayor intensidad en QM con una frecuencia alrededor de 900. Estos resultados muestran que el nivel de teoría en los estudios de mecánica cuántica durante la parametrización del polyP es suficiente para explicar la estructura del polyP. Luego se compara QM-IR con MM-IR, en este caso no hay acuerdo entre ambos cálculos probablemente por falla en la predicción de las constantes de fuerzas o algún efecto de inducción de cargas, al tratarse de un polianión, que no puede ser parametrizado.

A los fines de este trabajo de tesis, se consideraron los parámetros del polyP como suficientes para las predicciones a desarrollarse.

## 6.3 Dinámica molecular

Para los estudios de MD de *ecPpx*, se preparó el sistema en VMD. Inicialmente se consideraron los estados de ionización calculados anteriormente (sección 4.1). La proteína fue orientada para que el acueducto coincida con el eje  $z$ . El sistema fue solvatado en una caja cúbica de  $140 \times 140 \times 140 \text{ \AA}$ , de manera que el potencial electrostático de la proteína no afecte al de la proteína contigua (debido a la utilización de condiciones continuas de entorno), y a su vez, en el eje  $z$  se respetó la misma longitud de caja para que el polyP al salir del acueducto en los siguientes ensayos, no se vea afectado. Para simular las condiciones en la naturaleza, el sistema fue neutralizado con KCl con una concentración de 160 mM (320 osmolar).

Se realizaron dinámicas moleculares de 3 sistemas diferentes: *ecPpx*-apo, *ecPpx*-PP<sub>6</sub> y *ecPpx*-PP<sub>20</sub>. Luego de 5 ns, se observó que todos los sistemas llegaron a convergencia, manteniendo un rmsd constante. También, se calculó el potencial electrostático mediante el plugin *PME electrostatics* de VMD promediando el último nanosegundo, donde se verificó que la carga del complejo Ppx-polyP no afecte el complejo adyacente.

## 6.4 Cálculo de energía libre de disociación

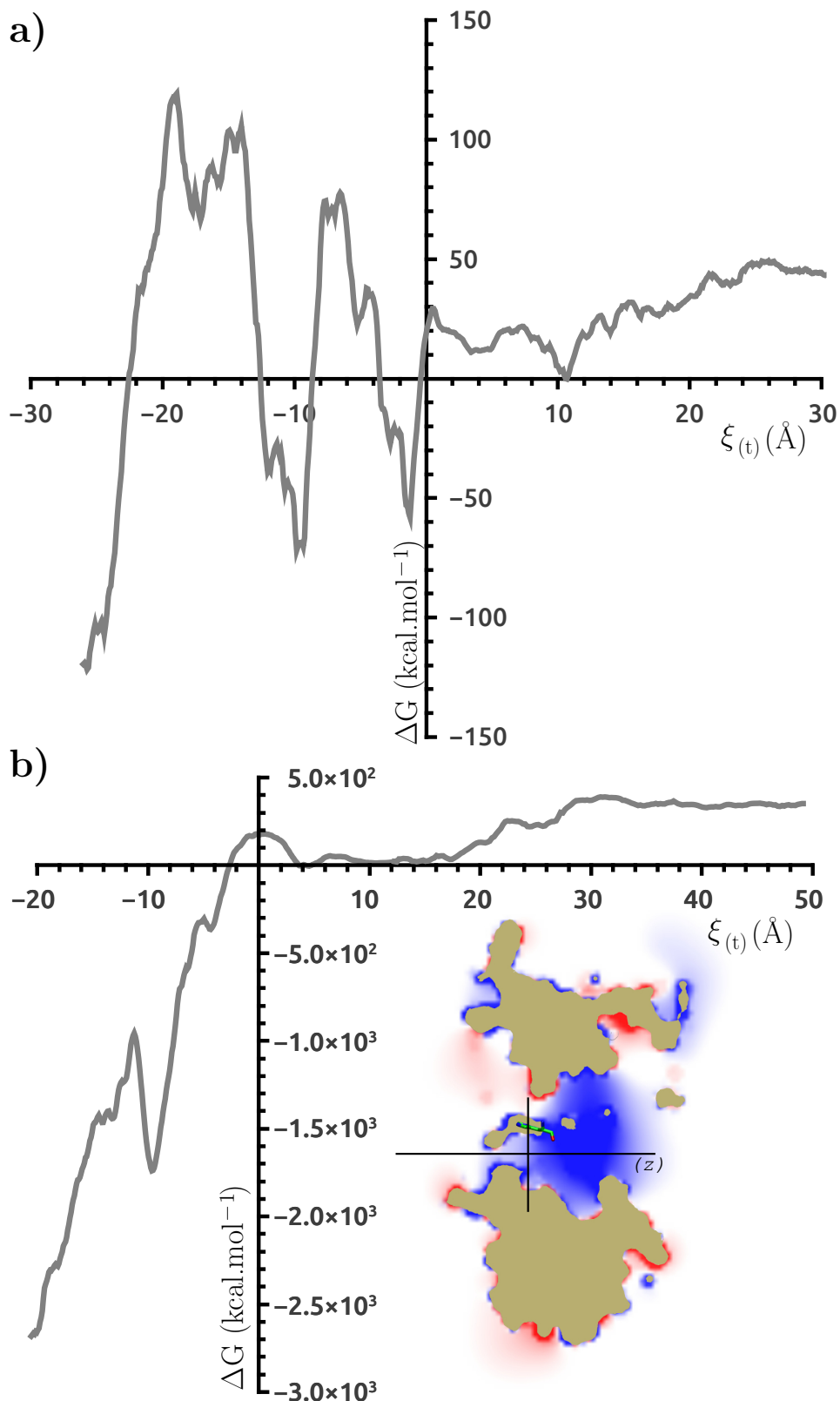
En la sección 4.1 se presentó un estudio de potencial electrostático de *ecPpx* y ensayos de docking con polyP de 5 residuos. Allí se hizo énfasis en que la cadena de polyP difícilmente interaccionaría con la región a la salida del acueducto, la cual es de potencial electronegativo.

Para conocer la posibilidad de que el polyP atravesase el acueducto para luego unirse al sitio activo, se realizaron cálculos de energía de disociación de una molécula de polyP que atravesase completamente el acueducto formado entre los dominios III y N-terminal de *ecPpx*. Se realizaron todos los ensayos con restricciones espaciales (**constrains on**) en los carbonos  $\alpha$  a 10 Å de distancia del acueducto y una constante de fuerza de 1 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-1</sup>.

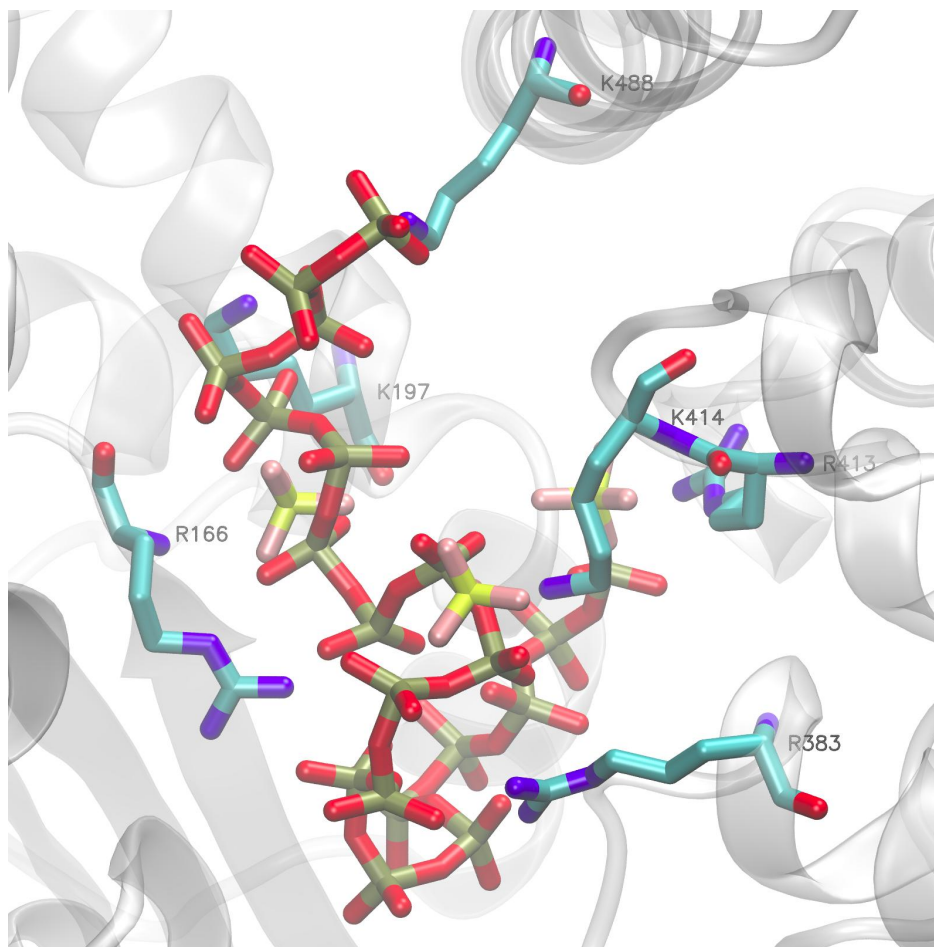
A partir de 10 dinámicas moleculares en ambas direcciones, se calculó el potencial de fuerza media (PMF, del inglés “*potential of mean force*”) utilizando la ecuación 3.3 para un PP<sub>6</sub> que de estar completamente solvatado en un principio, se una al canal electropositivo, atraviesa el acueducto y se libera de la enzima. La Figura 6.5 muestra que a medida que el ligando se aproxima al canal electropositivo, el  $\Delta G$  disminuye hasta un mínimo energético. Luego, cuando este se aproxima al residuo H<sup>378</sup>, donde el acueducto logra su máxima constricción, se alcanza un pico en el  $\Delta G$ . Una vez que el primer fosfato supera el residuo “bisagra”, el  $\Delta G$  disminuye bruscamente. A partir de este punto, nuevos aumentos y disminuciones bruscas en el  $\Delta G$  se observan a medida que el polyP libera o une, respectivamente, a residuos principalmente básicos.

Utilizando un protocolo similar para un PP<sub>20</sub>, se comenzó sobre el canal electropositivo, y se aplicó una fuerza sobre todos los átomos de fósforo del polyP. En este caso, el fosfato terminal no fue el primero en alcanzar la H<sup>378</sup>, en cambio este se mantuvo unido a la R<sup>413</sup>. Si alineamos esta estructura con aquella del PDB:1U6Z Alvarado *et al.* (2006), se observa una buena superposición de los fosfatos con la triada de sulfatos, respectivamente (Figura 6.6).

En la Figura 6.5 b) se muestra el  $\Delta G$  para el PP<sub>20</sub> atravesando el acueducto partiendo del canal electropositivo. De manera similar a lo observado con PP<sub>6</sub>, a medida que se aproxima a la H<sup>378</sup>, la energía aumenta, sin embargo, se diferencia de esta, que una vez atravesada esta región, el  $\Delta G$  disminuye, manteniéndose negativa respecto al



**Figura 6.5** Cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) para (a) PP<sub>6</sub> y (b) PP<sub>20</sub> iniciando unido al canal electropositivo en dirección hacia y opuesta al acueducto hasta soltarse de la proteína. Eje de coordenadas centradas en cadena lateral de H<sup>378</sup>. Ensamble NTP,  $k=100$  kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-2</sup>, tiempo de integración 1 fs, velocidad 10 Å.ns<sup>-1</sup>



**Figura 6.6** Superposición de un estado de la dinámica molecular dirigida, con los  $\text{SO}_4^{2-}$  6B 7A y 8B del cristal PDB:1U6Z.

estado inicial.

Teniendo en cuenta estas diferencias, y comparando con los resultados mostrados en la sección 4.1 (Figura 4.3), es de esperarse que una partícula pequeña cargada negativamente, como ser un  $\text{P}_i$  o un polyP de cadena corta ( $\text{PP}_6$ ), no pueda atravesar el acueducto, dado que tiene que pasar de una región favorable con carga positiva, a una desfavorable con carga negativa. Sin embargo, teniendo en cuenta que el polyP es un polímero de aniones y que mantiene una región sin unirse a la proteína, a medida que un residuo del polyP atraviesa el acueducto, un nuevo residuo del otro extremo puede unirse al canal electropositivo, y así este aportaría la energía necesaria para que un nuevo residuo avance. Esto se observa claramente comparando las Figura 6.5 a) y b), donde un polyP de cadena corta muestra cambios bruscos de energía que impedirían el paso de la molécula, mientras que una cadena larga como  $\text{PP}_{20}$  se ve favorecida.





# Capítulo 7

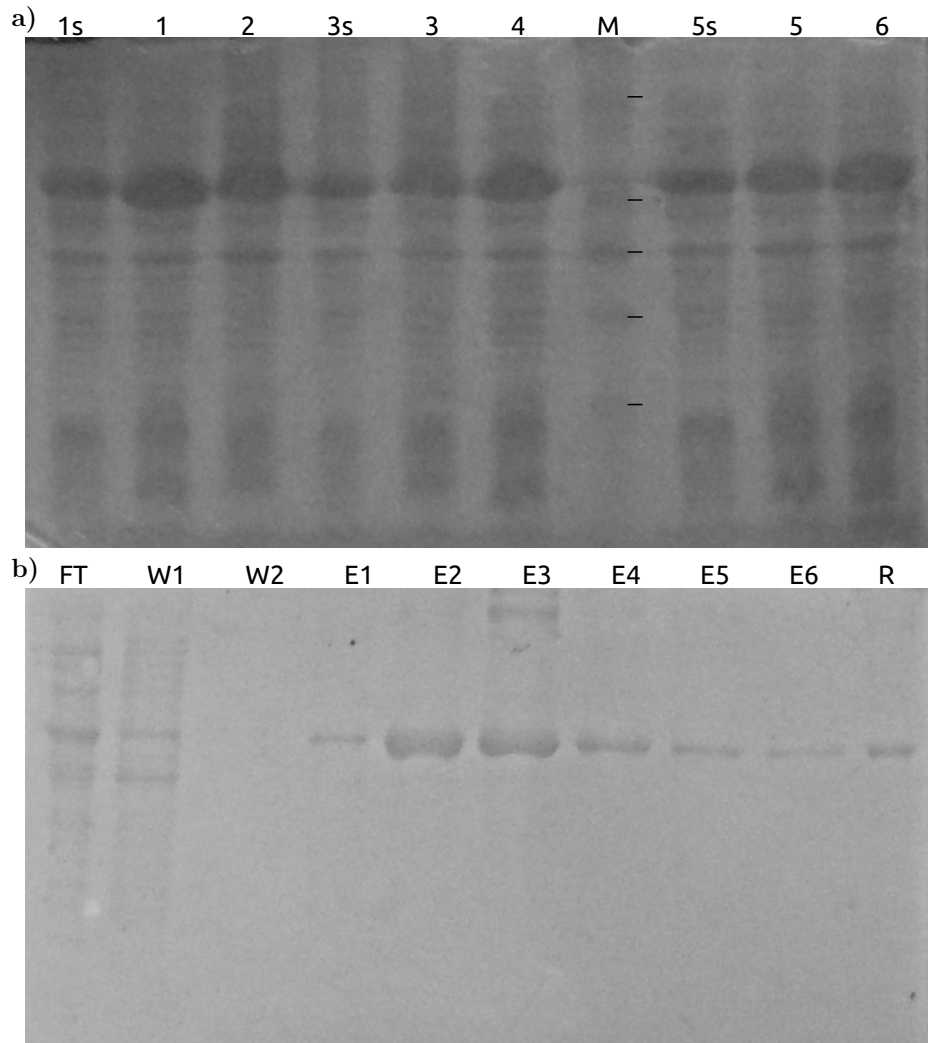
## Experimentos húmedos

### 7.1 Clonado de *ecppx*

Con el objeto de realizar estudios a nivel experimental, para buscar correlación con los ensayos *in silico* se clonó el gen que codifica para Ppx de *E. coli* BL21. Para ello se diseñaron cebadores flanqueando el gen *ecppx* con el añadido de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, como se señala en materiales y métodos. Luego del corte enzimático del vector y el fragmento conteniendo el gen, se separó el producto por electroforesis y se recuperaron los fragmentos deseados para continuar con la ligación. El resultado fue transformado en *E. coli* XL10 competentes, obteniéndose células transformantes. Se realizó verificación del inserto por PCR y secuenciamiento del gen.

### 7.2 Sobreexpresión de *ecppx* WT y mutante

El gen *ecppx* expresada en la cepa *E. coli* BL21 C+ y su producto purificado mediante columna de Ni<sup>+2</sup>-HisLink (Promega) con gradiente de imidazol. En la Figura 7.1 a) se observa el resultado de la sobreexpresión donde se seleccionó la cepa 4. En la Figura 7.1 b) se muestran los resultados de la purificación. A su vez, en cada fracción fue verificada la presencia o ausencia de actividad, como se indica en materiales y métodos, obteniéndose actividad en todas las fracciones eluidas. Se juntaron todas estas fracciones y se dializaron contra 200 ml de buffer de diálisis Tris-HCl 10 mM se agregó NaCl 500 mM e imidazol 200 mM y durante el proceso se agregó progresivamente buffer



**Figura 7.1** Electroforesis SDS-PAGE: a) control de sobreexpresión, 1-6) las diferentes cepas, 1s 3s y 5s control sin inducir, M) marcador de peso molecular (82, 61, 45, 34, y 27 KDa); b) control de purificación en columna de Ni<sup>2+</sup>, FT fracción no retenida, W1 primer volumen de lavado, W2 último volumen de lavado, E1, E2, E3, E4, E5 y E6, eluidos 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mM de imidazol, R resina

Tris-HCl hasta llegar a los 1000 ml, y lograr una concentración 100 mM de NaCl. Se realizaron 6 ciclos de diálisis de manera similar con buffer Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM y EDTA 100 mM. En la última diálisis se agregó glicerol al 30% para el mantenimiento de la enzima. La medición de la concentración se llevó a cabo como se muestra en materiales y métodos, utilizando un  $\epsilon_{280} = 1.775 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  obteniéndose una concentración de 2,7 mg/ml para *ecPpx*-WT y 0,87 mg/ml para *ecPpx*-H378A.

### 7.3 Caracterización cinética de *ecPpx*

En Beassoni *et al.* (2015) se demostró que *paPpx* presenta mayor afinidad por sustratos de cadena larga (PP<sub>40</sub>, PP<sub>65</sub> y PP<sub>75</sub>), que por sustratos de cadena corta (PP<sub>15</sub> y PP<sub>25</sub>), siendo estos resultados consistentes con los ensayos de unión de polyP a *ecPpx* observados por Bolesch y Keasling (2000a). En base a esto, se realizaron experimentos similares los realizados por Gallarato (2012) en *ecPpx* con PP<sub>25</sub> como cadena corta (este no llegaría a unirse al SA y al canal electropositivo al mismo tiempo), y PP<sub>65</sub> como cadena larga (fragmento observado en experimentos de pseudo-procesividad ~50) y PP<sub>700</sub> (de síntesis enzimática).

La Tabla 7.1 muestra los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  de *ecPpx*, donde sin importar el

**Tabla 7.1 Parámetros enzimáticos**

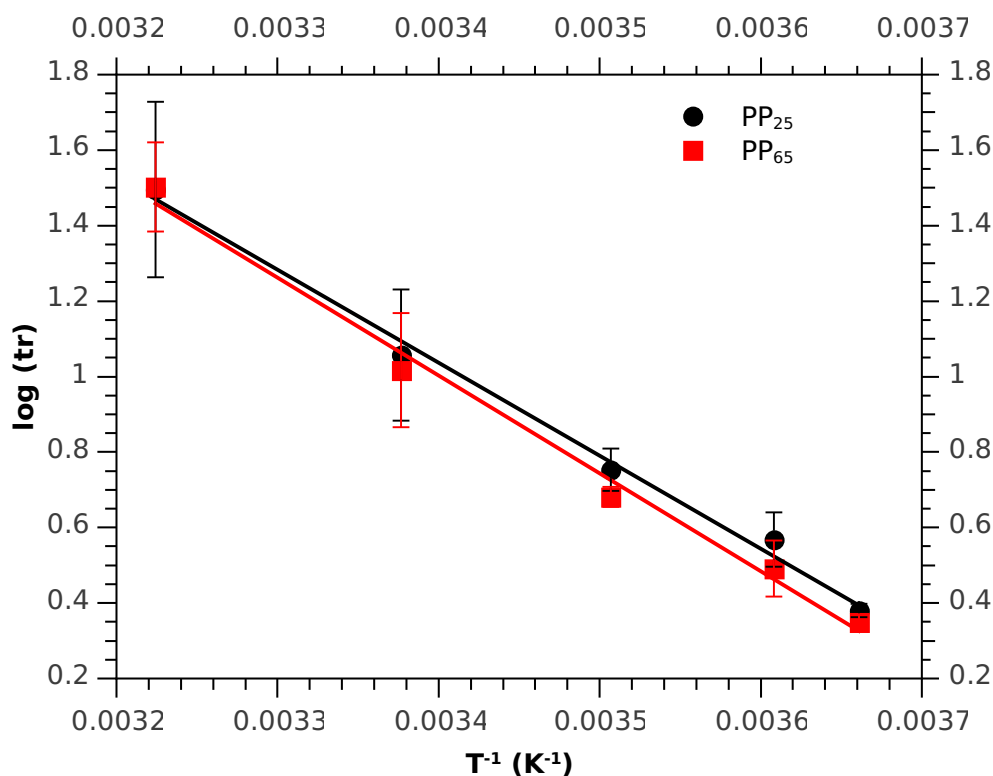
	PP <sub>25</sub>	PP <sub>65</sub>	PP <sub>700</sub>
WT			
$K_m$ (nM)	260 ± 90	90 ± 10	3,5 ± 0,3
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	34 ± 2	35 ± 6	36 ± 6
Ef. Cat. (s <sup>-1</sup> . $\mu$ M <sup>-1</sup> )	131	389	10256
H378A			
$K_m$ ( $\mu$ M)	3,0 ± 0,1	6,6 ± 0,9	N/D
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	85,2 ± 0,7	38 ± 9	N/D
Ef. Cat. (s <sup>-1</sup> . $\mu$ M <sup>-1</sup> )	28,4	5,76	N/D

ND no determinado. No se pudo llegar a saturación del sustrato.

tamaño del sustrato, la  $k_{cat}$  se mantiene. Incluso, ésta es de valores similares a los obtenidos para *paPpx* Beassoni *et al.* (2015). En cambio, se observa que el  $K_m$  para los diferentes sustratos varía según su longitud, siendo menor al incrementar el largo del polyP. Esto sugiere que ambas enzimas, así como otros homólogos, presentan un mecanismo enzimático similar.

## 7.4 Cambios conformacionales

Para conocer la posibilidad de un cambio conformacional, ya sea en esta enzima en *ecPpx* o su homólogo *atPpx*, se midió la actividad enzimática de *ecPpx* a diferentes temperaturas con un sustrato de cadena larga y uno de cadena corta. Los resultados se muestran en la Figura 7.2, donde se representa el  $\log v$  en función de  $1/T$ , según la ecuación de Arrhenius en  $\log k = \log A - 0,434 * E_a / (R * T)$ . En este caso, se consideró que concentraciones de sustrato saturante como la utilizadas,  $v$  (expresada como tasa de recambio en  $s^{-1}$ ), se aproxima a  $k_{cat}$ .



**Figura 7.2** Dependencia de la actividad enzimática en función de la temperatura. ● PP<sub>25</sub>, ■ PP<sub>65</sub>, Mg<sup>2+</sup> 1 mM.

Estos datos sugieren la ausencia de un cambio conformacional lo suficientemente grande como para invertir la disposición de la subunidad N-terminal respecto al C-terminal. Por otro lado, probablemente la apertura de la subunidad N-terminal, según lo sugieren Rangarajan *et al.* (2006), tampoco tenga lugar, o al menos no con polyP como sustrato, aunque en el caso de *paPpx* pudiese ocurrir cuando la misma presenta actividad transferasa frente a ADP.

## 7.5 Rol de H<sup>378</sup> en el reconocimiento del largo del sustrato

En Beassoni *et al.* (2015) y en Gallarato (2012) se demostró la preferencia de *paPpx* por polyP de cadena más larga. La Tabla 7.1 muestra las constantes cinéticas para *ecPpx* y *paPpx*, donde se observan comportamientos similares: mayor preferencia por sustratos de cadena larga, donde se ve una disminución del  $K_m$  y no así la  $k_{cat}$ . Esto es congruente con la procesividad de la enzima *ecPpx*, la presencia de más de un sitio de unión y la mayor afinidad de la subunidad C-terminal respecto de la N-terminal (Alvarado *et al.*, 2006; Rangarajan *et al.*, 2006; Bolesch y Keasling, 2000a).

En Bolesch y Keasling (2000a), Beassoni *et al.* (2015) y en Gallarato (2012) se observó que la delección de la subunidad N-terminal llevó a la pérdida de procesividad Bolesch y Keasling (2000a) de Ppx y la falta de capacidad de diferenciar entre polyP de cadena corta o larga. Con el fin de confirmar la implicancia del residuo H<sup>378</sup> como "gatekeeper" (del inglés: portero) para permitir la llegada del sustrato unido al canal electropositivo al sitio activo, se llevó a cabo mutaciones sitio-dirigidas reemplazando a este residuo aminoacídico por alanina. En la Tabla 7.1 se observan los valores de  $K_m$  y constante catalítica ( $k_{cat}$ ) para *ecPpx*. De la misma manera que ocurre cuando se suprime el C-terminal, la mutante H378A es incapaz de diferenciar los sustratos según su peso molecular, demostrando la importancia de H<sup>378</sup> como "gatekeeper" en permitir que un polyP pueda unirse a ambos sitios a la vez (canal electropositivo y sitio activo), o en otras palabras, unirse al canal electropositivo como sitio de unión primario, atravesar el acueducto para alcanzar finalmente el sitio activo. En el caso de la mutante H378A, el polyP podría unirse a ambos sitios por separado, siendo catalizado únicamente si se une correctamente al sitio activo, o unirse a ambos sitios formando un complejo no productivo. Esto último podría explicar por qué además de no diferenciar

los sustratos, presenta una disminución en la afinidad para ambos sustratos.

# Conclusiones





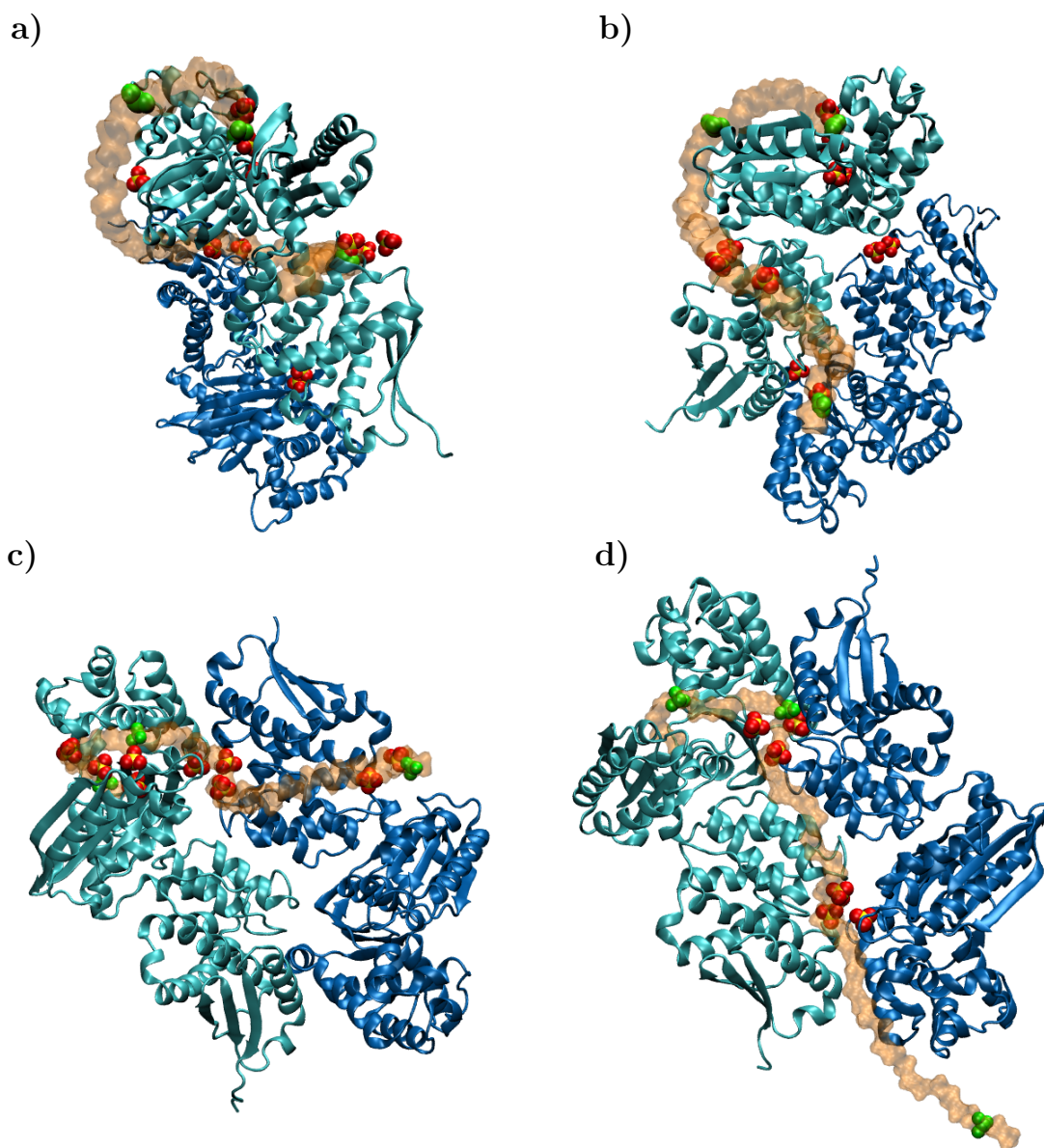
# Capítulo 8

## Observaciones finales

En condiciones de pseudo-procesividad, se observó que a medida que aumenta la concentración de KCl, se liberan fragmentos de diferente tamaño (Bolesch y Keasling, 2000a). A concentraciones menores de KCl se encontraron fragmentos de 2 y 3 residuos mientras que, a medida que la concentración de la sal aumentaba, se liberaban fragmentos de 14 y 50 residuos de longitud.

Según los cálculos de docking y potencial electrostático, sumado a la presencia de una triada de sulfatos en el cristal PDB:1U6Z, la región del canal electropositivo es un sitio de unión fuerte, mientras que el sitio del  $\text{SO}_4^{2-}$  SA4 (Figura 1.1) (Alvarado *et al.*, 2006), es un sitio de unión más débil. Teniendo en cuenta el modo de unión propuesto por estos autores (Figura 8.1 a), el residuo 14 no se encontraría en una región favorable de unión, ni tampoco llega a la posición del residuo R<sup>298</sup> sumado a que la región de este residuo está pobremente conservada. Por otra parte, el residuo 50 se uniría al sitio 4 descrito, el cual se observó también muy bajos niveles de conservación. A su vez, llama la atención que en este modelo no se observa una correspondencia entre el sitio más fuerte de unión y los PP<sub>50</sub> observados en los experimentos de pseudo-procesividad.

El modelo presentado en la Figura 8.1 b), donde se muestra un posible modo de unión de polyP según las energías obtenidas por docking, tampoco es muy alentador: el sitio 14 se encuentra en una región con baja energía de unión, donde se encuentran los residuos S<sup>22</sup>, H<sup>24</sup>, K<sup>42</sup>, Q<sup>43</sup>, R<sup>44</sup>, R<sup>75</sup> y Q<sup>77</sup> del dominio I, aunque no se observaron sulfatos en el cristal; a la altura de 22 residuos finaliza el segundo sitio de unión, y al igual que en el caso del modelo anterior, tampoco se observan fragmentos de 20 residuos;



**Figura 8.1** Representación del modo de unión de polyP. En cartoon la estructura secundaria de Ppx, en color naranja se representa la cadena de polyP; representados como esferas verdes los residuos 3, 14 y 50 de polyP y en esferas rojas y amarillas iones sulfato cristalográficos: a) polyP unido según Alvarado *et al.* (2006); b) posible recorrido según resultados del docking; c) y d) descripción según Rangarajan *et al.* (2006) con la región N-terminal en conformación cerrada o abierta, respectivamente.

y por último el residuo 50 se encuentra posterior al sitio de unión. Este modelo sugerido principalmente por los ensayos de docking y potencial electrostático fue descartado, ya que no representa los resultados empíricos observados por Bolesch y Keasling (2000a).

Finalmente, en la Figura 8.1 c y d) se esquematiza lo propuesto por Rangarajan *et al.* (2006), suponiendo que la región N-terminal se encuentre cerrada o abierta, respectivamente. En la misma se observa que el residuo 14 se encuentra en uno de los canales (equivalente a la posición del  $\text{SO}_4^{2-}$  6 de la cadena A del cristal PDB:1U6Z), mientras que el residuo 32 se localiza en el otro canal. A simple vista, los resultados parecen estar en acuerdo con lo sugerido por Bolesch y Keasling (2000a), respecto al residuo 14, sin embargo, el  $\text{PP}_{14}$  fue encontrado tanto en ensayos de pseudo-procesividad, como en concentraciones óptimas de KCl, en ausencia total de la región C-terminal, lo que implica que el este sitio de interacción se encuentre en el N-terminal y no en una intersección del dominio II y III como se observa en el modelo. A esto se suma que el residuo 50 no se encuentra interaccionando con la enzima. En este sentido, el modelo propuesto por Rangarajan *et al.* (2006) no responde a lo observado en la literatura (Bolesch y Keasling, 2000a), o los ensayos cinéticos presentados en esta tesis, ya que no indican que la región N-terminal sufra una apertura para el ingreso del ligando. Finalmente, en la Figura 8.1 c y d) se esquematiza lo propuesto por Rangarajan *et al.* (2006), suponiendo que la región N-terminal se encuentre cerrada o abierta, respectivamente. En la misma se observa que el residuo 14 se encuentra en uno de los canales (equivalente a la posición del  $\text{SO}_4^{2-}$  6 de la cadena A del cristal PDB:1U6Z), mientras que el residuo 32 se localiza en el otro canal. A simple vista, los resultados parecen estar en acuerdo con lo sugerido por Bolesch y Keasling (2000a), respecto al residuo 14, sin embargo, el  $\text{PP}_{14}$  fue encontrado tanto en ensayos de pseudo-procesividad, como en concentraciones óptimas de KCl, en ausencia total de la región C-terminal, lo que implica que el este sitio de interacción se encuentre en el N-terminal y no en una intersección del dominio II y III como se observa en el modelo. A esto se suma que el residuo 50 no se encuentra interaccionando con la enzima. En este sentido, el modelo propuesto por Rangarajan *et al.* (2006) no responde a lo observado en la literatura (Bolesch y Keasling, 2000a), o los ensayos cinéticos presentados en esta tesis, ya que no indican que la región N-terminal sufra una apertura para el ingreso del ligando.

Los resultados de docking y potencial electrostático en un principio fueron desalen-

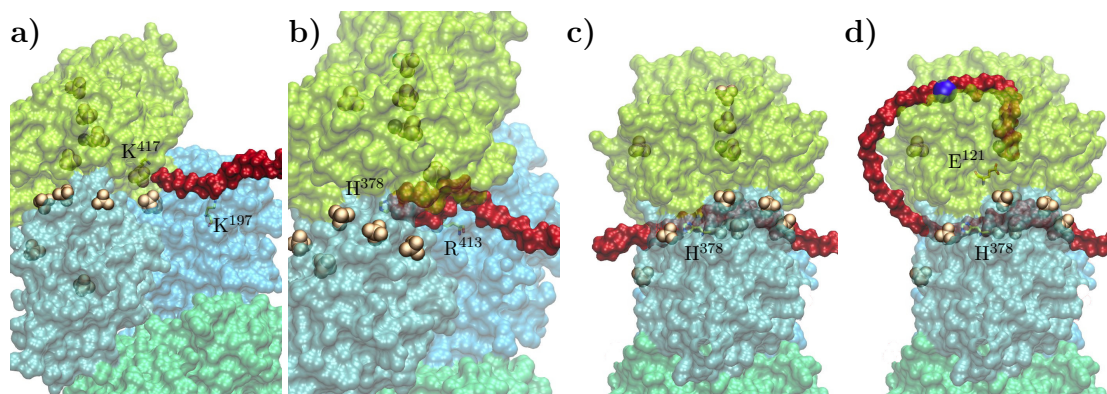
tadores para un modelo en el cual el polyP atravesase el acueducto, y más aún, la unión del polyP a la cara posterior de *ecPpx* parecía imposible. Sin embargo, un análisis más detallado de los residuos involucrados en la formación del acueducto, y el análisis de la conservación de los residuos a ambos lados del acueducto, dieron el punta pie inicial para profundizar sobre esta posibilidad. De hecho, la presencia de un potencial electrostático fuertemente negativo a la salida del acueducto, podría ser el motor para el avance del polyP a través del acueducto.

Dado esto, se procedió a hacer un análisis del coste energético de atravesar el acueducto, ya sea para un ligando corto ( $PP_6$ ) o largo ( $PP_{20}$ ). La Figura 6.5, muestra en primera instancia que una partícula cargada negativamente no podría atravesar el acueducto, debido al cambio en el potencial eléctrico de positivo a negativo. Sin embargo, un aumento en el largo del polyP, lo suficientemente largo para que cuando el fosfato terminal atravesase completamente el acueducto, nuevos residuos de polyP se unan al canal electropositivo y así aportar la energía necesaria para el avance del ligando.

En este punto, el residuo  $H^{378}$  evidentemente tiene una función crucial regulando el paso del sustrato, desde que se encuentra en la máxima constricción del acueducto, y una pequeña rotación en la cadena lateral puede significar la apertura del mismo y cambiando su estado de protonación, comportándose así como portero (“*gatekeeper*”). Siguiendo esta línea, se realizaron ensayos cinéticos con la mutante  $H378A$ , los cuales demostraron que la misma tiene un comportamiento similar a la enzima N-terminal sola de *ecPpx* donde no se diferencia el largo del sustrato.

En base a lo planteado a lo largo de esta tesis, se planteó un modelo de unión para polyP:

1. El polyP se une al canal electropositivo interactuando con los residuos  $R^{166}$ ,  $R^{410}$ ,  $R^{413}$ ,  $K^{414}$  y  $K^{417}$  (Figura 8.2 a).
2. Mientras el polyP se une al canal electropositivo y alcanza el acueducto, el fosfato terminal permanece unido a la  $R^{413}$ , lo que forma un bucle (Figura 8.2 b).
3. el fosfato terminal libera a  $R^{413}$  para alcanzar el acueducto y la  $H^{378}$ .
4. A medida que el polyP avanza, el siguiente residuo se une al canal, haciendo que el avance sea energéticamente posible. En este paso es importante la presencia de  $K^+$ .



**Figura 8.2** Mecanismo propuesto de unión para polyP (rojo) a *ecPpx*: a) cerca del canal electropositivo; b) formando un bucle; c) el polyP atraviesa el acueducto; y d) alcanza el sitio activo (el residuo 14 del polyP, contando desde el sitio activo, se resalta en esfera azul). Aniones  $\text{SO}_4^{2-}$  se muestran en representación de esferas ocre.

5. Una vez que los primeros residuos abandonan el acueducto, la superficie negativa en este lado de la proteína impulsa al polyP a seguir avanzando por repulsión electrostática (Figura 8.2 c).
6. El polyP alcanza los alrededores del sitio activo (residuos  $\text{R}^{42}$ ,  $\text{K}^{44}$  y  $\text{R}^{75}$ ), para luego unirse al sitio activo propiamente para la catálisis (Figura 8.2 d).
7. el polyP es hidrolizado hasta que el otro extremo alcance el canal. En este punto, fragmentos de  $\text{PP}_{40-50}$  podrían soltarse de la enzima para luego ser completamente hidrolizados por el N-terminal independientemente del C-terminal.

El modelo propuesto es consistente con lo propuesto por Alvarado *et al.* (2006) y Rangarajan *et al.* (2006) en cuanto a que el polyP se une al sitio activo y al canal electropositivo y a su vez concuerda con Alvarado *et al.* (2006) en que el polyP atraviesa el acueducto para llegar al sitio activo. Sin embargo, difiere de este en dos puntos principales: el sitio 4 podría ser un sitio de interacción para polyP pero su importancia podría verse confinada solo a *ecPpx* y homólogos muy cercanos dada su baja conservación de los residuos involucrados; por otro lado este modelo no considera que el polyP interaccione fuertemente con la cara reversa de *ecPpx* debido a la carga electronegativa de esta superficie y la baja conservación de los residuos del sitio 2. En cambio, es el potencial electronegativo el que permite el avance del sustrato para alcanzar los alrededores del sitio activo y finalmente ser catalizado.

Los residuos H<sup>24</sup>, R<sup>42</sup>, K<sup>44</sup> y R<sup>75</sup> se encuentran a 14 residuos de fosfato del sitio activo, lo que es consistente con los PP<sub>14</sub> encontrados en condiciones de pseudo-procesividad o en ausencia de la región C-terminal (Bolesch y Keasling, 2000a), sumando a lo presentado anteriormente en esta tesis, indican a este sitio como segundo sitio de unión, siendo crucial para que el polyP alcance el sitio activo.

Si bien se realizó un estudio del sitio activo y las implicancias en diferenciar polyP de otros ligandos, debido a la similitud del N-terminal con transferasas, fosfatasas y otras enzimas relacionadas al metabolismo de polifosfatos orgánicos (NTP, NDP, gggGpp, etc.) ampliamente distribuidos tanto en organismos procariotas como eucariotas, en esta tesis se puso principal énfasis en las características distintivas de Ppx. Al respecto, no se reportó en eucariotas proteínas con una organización estructural semejante, esto es, que contemplen tanto la subunidad N- como C-terminal, lo cual sitúa a esta características y las derivada de ella, como es la presencia del canal electropositivo y acueducto propias de bacterias. Finalmente la importancia del residuo H<sup>378</sup> como “gatekeeper” y el conocimiento de la estructura/función del canal electropositivo y acueducto puede ser utilizado como potencial blanco farmacológico y diseño de drogas no afectando a enzimas humanas sino específico de bacterias patógenas.

# Apéndice





# Apéndice A

## Scripts utilizados

### A.1 Minimización y equilibrado de sistema

```
# JOB DESCRIPTION

# Relajación ecPpx
# Ensemble NPT - NVT

structure nombre.psf
coordinates nombre.pdb
outputName min_eq_nombre
set temperature 310

# SIMULATION PARAMETERS
temperature $temperature
# Periodic Boundary Conditions
cellBasisVector1 141.0 0.0 0.0
cellBasisVector2 0.0 141.0 0.0
cellBasisVector3 0.0 0.0 141.0
cellOrigin 0.0 0.0 0.0

# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_lipid.prm
parameters PP6_second.par

# Force-Field Parameters
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
cutoff 12.0
switching on
switchdist 10.0
```

```
pairlistdist 13.5
margin 5.0

wrapAll on

# Integrator Parameters
timestep 1.0 ;# 1fs/step (2)
rigidBonds water ;# needed for 1fs steps (2)
nonbondedFreq 2
fullElectFrequency 4
stepspercycle 20

# Constant Temperature Control
langevin on ;# do langevin dynamics
langevinDamping 1 ;# damping coefficient ( $\gamma$ ) of 10/ps (5)
langevinTemp $temperature
langevinHydrogen yes

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME yes
PMEGridSpacing 1.0

# use lighter damping now that system is equilibrated
langevinPiston on
langevinPistonTarget 1.01325
langevinPistonPeriod 100
langevinPistonDecay 300
langevinPistonTemp 300
useGroupPressure yes # smaller fluctuations
useFlexibleCell no # allow dimensions to fluctuate independently
useConstantRatio no # fix shape in x-y plane
UseConstantArea no

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

# FIX
fixedAtoms on
fixedAtomsForces yes
fixedAtomsFile nombre.pdb
fixedAtomsCol 0

# restraint
constraints on
consRef nombre.pdb
consKFile nombre.pdb
consKCol B
constraintScaling 10.0
```

```
# extrabond
ExtraBonds on
ExtraBondsFile extraBonds.in

# running section
minimize 0 ;# run for getting into the script
langevinPiston off
minimize 5000 ;# fixed atoms
fixedAtoms off
minimize 5000 ;# unfixed atoms
run 100000 ; # heating the system
foreach cS {5 2 1} {
constraintScaling $cS
run 100000
}
constraintScaling 0.5000
run 5000000
```

## A.2 SMD

```
# JOB DESCRIPTION

# Steered Molecular Dynamics ecPpx - polyP
# Ensemble NVT

structure nombre.psf
coordinates nombre.pdb
outputName smd_nombre
set temperature 310

# SIMULATION PARAMETERS
set inputname min_eq_nombre
binCoordinates $inputname.restart.coor
binVelocities $inputname.restart.vel
extendedSystem $inputname.restart.xsc

# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_lipid.prm
parameters PP6_second.par

# Force-Field Parameters
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
cutoff 8.0
switching on
switchdist 7.0
pairlistdist 10.0
```

```
margin 5.0

wrapAll on

# Integrator Parameters
timestep 1.0 ;# 1fs/step
rigidBonds water ;# needed for 1fs steps (2)
nonbondedFreq 1
fullElectFrequency 3
stepspercycle 12

# Constant Temperature Control
langevin on ;# do langevin dynamics
langevinDamping 1 ;# damping coefficient ( $\gamma$ ) of 10/ps (5)
langevinTemp $temperature
langevinHydrogen yes

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME yes
PMEGridSpacing 1.0

# use lighter damping now that system is equilibrated
langevinPiston on
langevinPistonTarget 1.01325
langevinPistonPeriod 100
langevinPistonDecay 300
langevinPistonTemp 300
useGroupPressure yes # smaller fluctuations
useFlexibleCell no # allow dimensions to fluctuate independently
useConstantRatio no # fix shape in x-y plane
UseConstantArea no

# Output
binaryoutput no
outputEnergies 1008
outputTiming 1008
xstFreq 1008
dcdFreq 10080
vel dcdFreq 10080
restartfreq 1008

# restraint
constraints on
consRef nombre.ref
consKFile nombre.ref
consKCol B
constraintScaling 1.0

# extrabond
ExtraBonds on
ExtraBondsFile extraBonds.in

# SMD section
```

```
SMD on
SMDfile nombre.ref
SMDk 100
SMDVel 0.00001
SMDdir 0.0 0.0 -1.0
SMDOutputFreq 100

# running section
run 5009760 ;# to be multiple of stepspercycle
```



# Apéndice B

## Archivos de parámetros y topología

### B.1 Archivo de parámetros para polyP

```
BONDS
!atom type      Kb          b0
P2  ON2          236.1      1.6916
P2  ON3          521.6      1.5140

ANGLES
!atom types      Ktheta      Theta0      Kub          S0
ON2 P2  ON2      102.94      97.28
ON2 P2  ON3      41.47       109.24
ON3 P2  ON3      46.76       128.61
P2  ON2  P2      79.94       148.06

DIHEDRALS
!atom types      Kchi        n      delta
P2  ON2 P2  ON2      8.04        1      180
P2  ON2 P2  ON2      0.16        2      180
P2  ON2 P2  ON2      0.46        3      180
P2  ON2 P2  ON3     -0.50        3      180

CMAP
! polyP map
P2 ON2 P2 ON2 ON2 P2 ON2 P2 24

!-180
-1.1950 -1.1924 -1.2731 -1.1954 -0.7124
 0.2106  1.2895  2.1692  2.6082  2.6159
 2.2729  1.8692  1.2374  1.6227  2.3357
 2.6111  2.5547  2.2081  1.2887  0.2154
-0.7140 -1.1901 -1.2728 -1.1905

!-165
```

-1.2053 -1.6852 -1.5873 -1.2601 -0.5986  
0.3290 1.3188 2.1521 2.6101 2.6429  
2.1382 1.3464 1.5402 1.4823 1.7749  
1.7201 2.2443 1.8895 0.9997 -0.0082  
-0.7248 -0.9733 -0.9081 -0.9128  
!-150  
-1.2719 -1.5893 -1.4288 -0.9645 -0.3998  
0.2818 1.2277 2.0698 2.4786 2.2101  
2.0577 1.9351 0.7849 0.9498 1.1431  
1.4626 1.3106 1.3363 0.4870 -0.3192  
-0.8522 -0.9760 -0.8573 -0.9093  
!-135  
-1.1900 -1.2513 -1.0415 -0.5244 -0.3330  
0.2306 1.5197 2.5685 3.0133 2.8337  
1.8025 1.1920 0.4878 0.1574 0.3084  
0.5742 0.6649 0.4644 -0.1217 -0.7772  
-1.1937 -1.2082 -0.9763 -0.9737  
!-120  
-0.7115 -0.5831 -0.4590 -0.4437 0.2261  
1.1149 2.2863 3.1515 2.9000 2.5369  
1.6142 0.6686 -0.0491 -0.4185 -0.3835  
-0.5068 -0.4988 -0.5540 -0.6847 -1.1499  
-1.3874 -1.1932 -0.8484 -0.7232  
!-105  
0.2086 0.3310 0.3402 0.2759 1.1110  
2.1350 3.2812 3.1800 3.1082 2.4147  
1.4634 0.5095 -0.2014 -0.5918 -0.9691  
-1.4914 -2.2521 -1.9380 -1.1433 -1.1500  
-1.1596 -0.7752 -0.3208 -0.0139  
!-90  
1.3015 1.3247 1.4252 1.5373 2.3583  
3.2129 3.7631 3.5753 3.1997 2.4616  
1.4896 0.6686 -0.2449 -1.1746 -2.1045  
-3.0478 -3.3580 -4.1255 -3.2047 -1.1630  
-0.7273 -0.1318 0.4910 0.9976  
!-75  
2.1871 2.1604 2.1114 2.5359 3.2289  
2.5861 3.5875 3.5249 3.0414 2.4113  
1.5127 0.4570 -0.6755 -1.9938 -3.0109  
-4.1310 -5.3507 -4.5000 -3.9348 -1.7963  
-0.4338 0.4783 1.2787 1.8724  
!-60  
2.5997 2.5925 2.4685 2.9582 2.4332  
3.2009 3.1588 3.1233 2.7529 2.1315  
1.1098 -0.2897 -1.4256 -3.3488 -4.5779  
-5.4101 -5.1000 -4.8077 -3.0212 -1.9143  
-0.4091 0.7259 1.3569 2.2093  
!-45  
2.6623 2.6913 2.5212 1.9159 2.5535  
2.4461 2.4585 2.4602 2.0794 1.1653  
0.1643 -1.0498 -3.5745 -3.2227 -5.4591  
-5.4530 -5.4525 -4.6803 -2.4195 -1.3985  
-0.4589 0.4456 1.4612 1.7684



```

!-30
 2.3779  1.8656  1.7608  2.0216  1.5736
 1.4527  1.4591  1.3875  1.0556  0.1761
-1.1347 -2.1972 -3.7592 -5.2738 -6.1406
-5.2552 -3.9033 -2.5890 -2.4274 -1.1821
-0.5029  0.2222  1.1216  0.7354

!-15
 1.7333  1.4996  0.3231  1.0870  0.7002
 0.4882  0.6540  0.1835 -0.3057 -1.0398
-2.2630 -3.2561 -4.9647 -5.5060 -5.3994
-3.5432 -2.9497 -1.6988 -1.5250 -0.6964
-0.2787  0.1693  0.9383  1.1623

!0
 1.0159  1.4368  0.4089  0.4603 -0.1247
-0.1327 -0.1702 -0.8790 -1.6234 -2.4939
-3.2098 -3.7912 -5.9000 -5.7147 -3.0958
-2.5612 -1.4598 -0.6126 -0.1530 -0.1186
-0.0823  0.4927  1.2436  1.5892

!15
 1.7333  1.1623  0.9383  0.1693 -0.2787
-0.6964 -1.5250 -1.6988 -2.9497 -3.5432
-5.3994 -5.5060 -4.9647 -3.2561 -2.2630
-1.0398 -0.3057  0.1835  0.6540  0.4882
 0.7002  1.0870  0.3231  1.4996

!30
 2.3779  0.7354  1.1216  0.2222 -0.5029
-1.1821 -2.4274 -2.5890 -3.9033 -5.2552
-6.1406 -5.2738 -3.7592 -2.1972 -1.1347
 0.1761  1.0556  1.3875  1.4591  1.4527
 1.5736  2.0216  1.7608  1.8656

!45
 2.6623  1.7684  1.4612  0.4456 -0.4589
-1.3985 -2.4195 -4.6803 -5.4525 -5.4530
-5.4591 -3.2227 -3.5745 -1.0498  0.1643
 1.1653  2.0794  2.4602  2.4585  2.4461
 2.5535  1.9159  2.5212  2.6913

!60
 2.5997  2.2093  1.3569  0.7259 -0.4091
-1.9143 -3.0212 -4.8077 -5.1000 -5.4101
-4.5779 -3.3488 -1.4256 -0.2897  1.1098
 2.1315  2.7529  3.1233  3.1588  3.2009
 2.4332  2.9582  2.4685  2.5925

!75
 2.1871  1.8724  1.2787  0.4783 -0.4338
-1.7963 -3.9348 -4.5000 -5.3507 -4.1310
-3.0109 -1.9938 -0.6755  0.4570  1.5127
 2.4113  3.0414  3.5249  3.5875  2.5861
 3.2289  2.5359  2.1114  2.1604

!90
 1.3015  0.9976  0.4910 -0.1318 -0.7273
-1.1630 -3.2047 -4.1255 -3.3580 -3.0478
-2.1045 -1.1746 -0.2449  0.6686  1.4896
 2.4616  3.1997  3.5753  3.7631  3.2129

```

```

2.3583  1.5373  1.4252  1.3247
!105
0.2086 -0.0139 -0.3208 -0.7752 -1.1596
-1.1500 -1.1433 -1.9380 -2.2521 -1.4914
-0.9691 -0.5918 -0.2014  0.5095  1.4634
2.4147  3.1082  3.1800  3.2812  2.1350
1.1110  0.2759  0.3402  0.3310
!120
-0.7115 -0.7232 -0.8484 -1.1932 -1.3874
-1.1499 -0.6847 -0.5540 -0.4988 -0.5068
-0.3835 -0.4185 -0.0491  0.6686  1.6142
2.5369  2.9000  3.1515  2.2863  1.1149
0.2261 -0.4437 -0.4590 -0.5831
!135
-1.1900 -0.9737 -0.9763 -1.2082 -1.1937
-0.7772 -0.1217  0.4644  0.6649  0.5742
0.3084  0.1574  0.4878  1.1920  1.8025
2.8337  3.0133  2.5685  1.5197  0.2306
-0.3330 -0.5244 -1.0415 -1.2513
!150
-1.2719 -0.9093 -0.8573 -0.9760 -0.8522
-0.3192  0.4870  1.3363  1.3106  1.4626
1.1431  0.9498  0.7849  1.9351  2.0577
2.2101  2.4786  2.0698  1.2277  0.2818
-0.3998 -0.9645 -1.4288 -1.5893
!165
-1.2053 -0.9128 -0.9081 -0.9733 -0.7248
-0.0082  0.9997  1.8895  2.2443  1.7201
1.7749  1.4823  1.5402  1.3464  2.1382
2.6429  2.6101  2.1521  1.3188  0.3290
-0.5986 -1.2601 -1.5873 -1.6852

```

```

NONBONDED nbxmod 5 atom cdiel shift vatom vdistance vswitch -
cutnb 14.0 ctofnb 12.0 ctonnb 10.0 eps 1.0 e14fac 1.0 wmin 1.5
!atom ignored epsilon Rmin/2 ignored eps,1-4 Rmin/2,1-4
ON2 0.0 -0.1521 1.77
ON2E 0.0 -0.1521 1.77
ON3 0.0 -0.1200 1.70
ON3E 0.0 -0.1200 1.70
P2 0.0 -0.585 2.15

```

```
END
```

## B.2 Archivo de topología para polyP

```
read rtf card append
```

```
NAD, PPI topology
```

```
31 1
```

```

MASS 1 ON2 15.999400 0 ! Nucleic acid phosphate ester oxygen
MASS 2 ON3 15.999400 0 ! Nucleic acid =O in phosphate
MASS 3 P2 30.974000 P ! pyrophosphate phosphorus (see toppar_all127_na_nad_ppi

```

!PP section

```

DECL +O3B
DECL -PB
DECL -O3B
DEFA FIRS INI LAST FIN
AUTO ANGLES DIHE

```

```

RESI PHO -1.00
ATOM PB P2 1.380
ATOM O1B ON3 -0.820
ATOM O2B ON3 -0.820
ATOM O3B ON2 -0.740
BOND PB O1B PB O2B PB O3B
!BOND -PB O3B
BOND PB +O3B
CMAP -O3B -PB O3B PB -PB O3B PB +O3B
IC +PB +O3B PB O3B 0.0000 000.00 180.0 000.00 0.0000
IC +PB +O3B PB O1B 0.0000 000.00 60.0 000.00 0.0000
IC +PB +O3B PB O2B 0.0000 000.00 -60.0 000.00 0.0000
IC -PB O3B PB +O3B 0.0000 000.00 180.0 000.00 0.0000
IC -PB O3B PB O1B 0.0000 000.00 -60.0 000.00 0.0000
IC -PB O3B PB O2B 0.0000 000.00 60.0 000.00 0.0000

```

! you have to hand wipe INI and FIN crossterm

```

PRES INI -2.37
ATOM PB P2 1.10
ATOM O3B ON3 -0.90
ATOM O1B ON3 -0.90
ATOM O2B ON3 -0.90
ATOM +O3B ON2 -0.77
!IC +PB +O3B PB O3B 0.0000 000.00 180.0 000.00 0.0000
!IC +PB +O3B PB O1B 0.0000 000.00 60.0 000.00 0.0000
!IC +PB +O3B PB O2B 0.0000 000.00 -60.0 000.00 0.0000
PATCH FIRST INI

```

```

PRES FIN -2.37
ATOM PB P2 1.10
ATOM O4B ON3 -0.90
ATOM O2B ON3 -0.90
ATOM O1B ON3 -0.90
ATOM O3B ON2 -0.77
BOND PB O4B
!IC -PB O3B PB O4B 0.0000 000.00 180.0 000.00 0.0000
!IC -PB O3B PB O1B 0.0000 000.00 -60.0 000.00 0.0000
!IC -PB O3B PB O2B 0.0000 000.00 60.0 000.00 0.0000
PATCH LAST FIN

```

end



# Bibliografía

- Abagyan, R., Totrov, M., y Kuznetsov, D. (1994). ICM — a new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J. Comput. Chem.*, 15(5):488–506.
- Akiyama, M., Crooke, E., y Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. the enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.*, 268(1):633–639.
- Alvarado, J., Ghosh, A., Janovitz, T., Jauregui, A., Hasson, M. S., y Sanders, D. A. (2006). Origin of exopolyphosphatase processivity: Fusion of an ASKHA phosphotransferase and a cyclic nucleotide phosphodiesterase homolog. *Structure*, 14:1263–1272.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., y McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:10037–10041.
- Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., y Avaeva, S. M. (1988). A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.*, 171(2):266–270. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90484-8.
- Beassoni, P. R., Gallarato, L. A., y Garrido, M. N. (2007). Characteristics of N-terminal domain of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 recombinant polyphosphatase. En *CORROBORAR*, volumen 31, p. 37. BIOCELL.
- Beassoni, P. R., Gallarato, L. A., Boetsch, C., Garrido, M. N., y Lisa, A. T. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* exopolyphosphatase is also a polyphosphate: Adp phosphotransferase. *Enzyme Res.*, 2015.

- Berka, K., Hanák, O., Sehnal, D., Banáš, P., Navrátilová, V., Jaiswal, D., Ionescu, C.-M., Vařeková, R. S., Koča, J., y Otyepka, M. (2012). MOLEonline 2.0: interactive web-based analysis of biomacromolecular channels. *Nucleic Acids res.*, 40(W1):W222–W227. DOI: 10.1093/nar/gks363.
- Binkowski, T. A., Naghibzadeh, S., y Liang, J. (2003). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids res.*, 31(13):3352–3355.
- Bolesch, D. G. y Keasling, J. D. (2000)a. Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 275(43):33814–33819. DOI: 10.1074/jbc.M002039200.
- Bolesch, D. G. y Keasling, J. (2000)b. The effect of monovalent ions on polyphosphate binding to *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274(1):236–241.
- Chatterji, D. y Ojha, A. K. (2001). Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4(2):160–165. DOI: 10.1016/S1369-5274(00)00182-X.
- Chipot, C., Angyan, J. G., Maigret, B., y Scheraga, H. A. (1993). Modeling amino acid side chains. 2. determination of point charges from electrostatic properties: toward transferable point charge models. *J. Phys. Chem.*, 97(38):9788–9796. DOI: 10.1021/j100140a042.
- Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N. N., y Kornberg, A. (1994). Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 269:6290–6295.
- Crooks, G. E. (1998). Nonequilibrium measurements of free energy differences for microscopically reversible Markovian systems. *J. Statistical Physics*, 90:1481–1487.
- Dehez, F., Pebay-Peyroula, E., y Chipot, C. (2008). Binding of ADP in the mitochondrial ADP/ATP carrier is driven by an electrostatic funnel. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(38):12725–12733. DOI: 10.1021/ja8033087.
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., y Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.*, 32:W665–W667.

- Dolinsky, T. J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J. E., Jensen, J. H., Klebe, G., y Baker, N. A. (2007). Pdb2pqr: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.*, 35:522–525.
- Domenech, C. E., Garrido, M. N., y Lisa, T. A. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* cholinesterase and phosphorylcholine phosphatase: two enzymes contributing to corneal infection. *FEMS microbiol. lett.*, 82(2):131–135.
- Finn, R. D., Clements, J., y Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids res.*, p. gkr367.
- Foloppe, N. y MacKerell, A. D. (2000). All-atom empirical force field for nucleic acids: 2) parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J. Comput. Chem.*, 21(2):86–104.
- Gallarato, L. A. (2012). *Estudios bioquímicos y moleculares de la polifosfato fosfatasa (PA5241) de Pseudomonas aeruginosa PAO1*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Gasteiger, J. y Marsili, M. (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36(22):3219–3228.
- Glaser, F., Pupko, T., Paz, I., Bell, R. E., Bechor-Shental, D., Martz, E., y Ben-Tal, N. (2003). ConSurf: Identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinf. Appl. Note*, 19(1):163–164. DOI: 10.1093/bioinformatics/19.1.163.
- Grumelli, S. (1998). *Bioenergética de la incorporación de fosforo y acumulación de polifosfatos por colina en Pseudomonas aeruginosa*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Guvench, O. y MacKerell, A. D. (2008). Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. molecular modeling of proteins. *Methods Mol. Biol.*, 1(443): 63–88. DOI: 10.1007/978-1-59745-177-2\_4.
- Hara, A. y Sy, J. (1983). Guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate 5'-phosphohydrolase. purification and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 258(3): 1678–1683.

- Humphrey, W., Dalke, A., y Schulten, K. (1996). VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*, 14:33–38.
- Hurley, J. H. (1996). The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 25(1):137–162.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., y Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.*, 8(3):275–282.
- Jost, V. K. H. y Schulze, H. J. (1969). Zur Phasentransformation des Kaliumpolyphosphates  $(KPO_3)_x$ . *Acta Crystallogr. B*, 25(6):1110–1118. DOI: 10.1107/S0567740869003608.
- Keasling, J. D., Bertsch, L., y Kornberg, A. (1993). Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:7029–7033.
- Kristensen, O., Laurberg, M., Liljas, A., Kastrup, J. S., y Gajhede, M. (2004). Structural characterization of the stringent response relate exopolyphosphatase/gaunosine pentaphosphate phosphohydrolase protein family. *Biochem.*, 43(28):8894–8900.
- Kulaev, I. S., Vagabov, V. M., y Kulakovskaya, T. V. (2004). *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*. John Wiley and Sons, 2 edición. ISBN 0-470-85810-9.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., y Kornberg, A. (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 272:21240–21243. DOI: 10.1074/jbc.272.34.21240.
- Lasdon, L. S. y Waren, A. D. (1981). GRG2: an all FORTRAN general purpose nonlinear optimizer. *ACM SIGMAP Bulletin*, (30):10–11. DOI: 10.1145/1111268.1111270.
- Li, H., Robertson, A. D., y Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pka values. *Proteins.*, 61:704–721.
- Lisa, A. T., Beassoni, P. R., Massimelli, M. J., Otero, L. H., y Doménech, C. E. (2007). A glance on *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase, an enzyme



- whose synthesis depends on the presence of choline in its environment. *Comm. Curr. Res. Educ. Topics Trends Appl. Microbiol.*, 1:255–262.
- Lisa, T. A., Lucchesi, G. I., y Domenech, C. E. (1994). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to the choline metabolism through the action of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C. *Curr. Microbiol.*, 29(4):193–199.
- MacKerell, A. D. y Banavali, N. (2000). All-atom empirical force field for nucleic acids: 2) application to molecular dynamics simulations of dna and rna in solution. *J. Comput. Chem.*, 21(2):105–120.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fisher, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, F., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., y Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, 102(18):3586–3616. DOI: 10.1021/jp973084f.
- Mackerell, A. D., Feig, M., y Brooks, C. L. (2004). Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, 25(11):1400–1415. DOI: 10.1002/jcc.20065.
- Massey, V., Curti, B., y Ganther, H. (1966). A temperature-dependent conformational change in D-amino acid oxidase and its effect on catalysis. *J. Biol. Chem.*, 241(10):2347–2357.
- Meng, E. C., Shoichet, B. K., y Kuntz, I. D. (1992). Automated docking with grid-based energy evaluation. *J. Comput. Chem.*, 13:505–524.
- Miyake, T., Shiba, T., Kameda, A., Ihara, Y., Munekata, M., Ishige, K., y Noguchi, T. (1999). The gene for an exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.*, 6(2):103–108. DOI: 10.1093/dnares/6.2.103.

- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., y Olson, A. J. (1998). Automated Docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.*, 19:1639–1662.
- Morris, G. M., Huey, R., y Olson, A. J. (2008). Using AutoDock for ligand-receptor Docking. *Curr. Protoc. Bioinformatics*.
- Park, S., Khalili-Araghi, F., Tajkhorshid, E., y Schulten, K. (2003). Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. *J. Chem. Phys.*, 119(6):3559–3566.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, L., y Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, 26:1781–1802.
- Rangarajan, S., Nadeau, G., Li, Y., Wagner, J., Hung, M. N., Schrag, J. D., Cygler, M., y Matte, A. (2006). The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains. *J. Mol. Biol.*, 359:1249–1260.
- Rao, N. N., Gómez-García, M. R., y Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.*, 78:605–647.
- Remonsellez, F., Orell, A., y Jerez, C. A. (2006). Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology*, 152:59–66. DOI: 10.1099/mic.0.28241-0.
- Reusch, R. N. y Sadoff, H. L. (1988). Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85(12):4176–4180.
- Ritchie, D. W., Kozakov, D., y Vajda, S. (2008). Accelerating and focusing protein-protein docking correlations using multi-dimensional rotational FFT generating functions. *Bioinformatics*, 24(17):1865–1873. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn334.
- Šali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H., y Karplus, M. (1995). Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins Struct. Funct. Bioinformatics*, 23(3):318–326. DOI: 10.1002/prot.340230306.

- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, 3 edición.
- van den Ent, F. y Löwe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *The EMBO journal*, 19(20):5300–5307. DOI: 10.1093/emboj/19.20.5300.
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., y Mackerell, A. D. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.*, 31(4):671–690. DOI: 10.1002/jcc.21367.
- Wells, D. B., Bhattacharya, S., Carr, R., Maffeo, C., Ho, A., Comer, J., y Aksimentiev, A. (2012). Optimization of the molecular dynamics method for simulations of DM and ion transport through biological nanopores. En *Nanopore-Based Technology*, volumen 870, pp. 165–186. Springer. DOI: 10.1007/978-1-61779-773-6\_10.
- Wideman, J. G. (2015). The ubiquitous and ancient ER membrane protein complex (EMC): tether or not? *F1000Research*, 4.
- Zago, A., Chugani, S., y Chakrabarty, A. (1999). Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. *Applied and environmental microbiology*, 65(5):2065–2071.
- Zebisch, M. y Sträter, N. (2008). Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(19):6882–6887. DOI: 10.1073/pnas.0802535105.