



TESIS DOCTORAL

Estudio de las Actividades y los Centros Activos de las Enzimas ADPRibasa-Mn y Trioquinasa/FMN ciclasa

Joaquim Rui de Castro Rodrigues

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

Conformidad de los Directores

Fdo: José Carlos Cameselle Viña

Fdo: Alicia Cabezas Martín

2013

GOBIERNO DE EXTREMADURA

Consejería de Empleo, Empresa e Innovación



La investigación descrita en esta Tesis Doctoral ha sido financiada por ayudas concedidas por los Ministerios de Educación y Ciencia y de Ciencia e Innovación del Gobierno de España (BFU2006-510, BFU2009-07296) y la Junta de Extremadura (GRU08043, GRU09135, GR10133) con cofinanciación de FEDER y FSE.

Agradecimientos

A mis Directores de Tesis, Carlos Cameselle, por haberme acogido en su laboratorio, por la forma como orientó este trabajo, por la constante disponibilidad (incluso a más de 200 km de distancia) y, por encima de todo, por su amistad, y Alicia Cabezas, por la forma con que me orientó en el laboratorio, por transmitirme trucos que no encuentro en los libros, por la energía y por la paciencia,

A Virgíno García-Martínez, mi tutor de doctorado, por orientarme hacia el laboratorio de Carlos Cameselle,

A María Jesús Costas, que fue como una tercera orientadora, por la ayuda y el apoyo en tantas y tantas cosas,

A João Meireles Ribeiro, por sus preciosas contribuciones y por hallar orden en el caos de los números y de las conformaciones,

A José Canales, por las palabras amistosas y por la disponibilidad que siempre demostró, especialmente con las enseñanzas sobre cromatógrafos,

A Rosa María Pinto, por concebir ensayos cinéticos intercalados y entremezclados como nadie, por la alegría, y por explicarme los chistes españoles,

A Ascensión Fernández, por las palabras amigas y por el cariño que demostró a lo largo de todo este tiempo,

A Paco, por las charlas, por la ayuda con un colorido problema de salud que yo tuve y por los buenos consejos (“aléjate de los médicos”),

À Ana Couto, pelas ajudas, pelas conversas e pelos conselhos, dentro e fora do laboratório,

Ao Rui e à Isabel, por trazerem ventos de Portugal e dos Algarves aquando das suas visitas a Badajoz,

A Pablo y a Pepi, por la buena convivencia diaria,

Aos companheiros da luta, Ricardo Lagoa e Ana Pombo (e também Ana Santos), pela amizade, pelas conversas ao jantar e pelo espírito de camaradagem e solidariedade,

A Dorinda y a Ilaria, por las risas y los cafés,

Aos meus pais, pelo apoio e pela forma como suportam as minhas ausências,

À Catarina, pela paciência infinita e pela impaciência finita,

A la Escola de Tecnologia e Gestão de Leiria, por la dispensa de servicio sin la cual esta Tesis no habría sido posible,

Toda mi gratitud

Índice general

| | |
|---|-----------|
| Índice de figuras | iv |
| Índice de tablas | vi |
| Abreviaturas | vii |
| Resumen | ix |
| Summary | ix |
| Resumen Ejecutivo | x |
| Executive Summary | xi |
| Preámbulo | 1 |
| 1. ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES Y CENTRO ACTIVO DE LA ADPRibasa-Mn DE <i>RATTUS NORVEGICUS</i> Y DE <i>DANIO RERIO</i> | 3 |
| 1.1 Antecedentes | 3 |
| 1.2 Resultados: ADPRibasa-Mn de rata | 9 |
| 1.2.1 Definición del centro activo por simulación de la unión de ADP-ribosa a una estructura teórica de la ADPRibasa-Mn de rata | 9 |
| 1.2.2 Identificación de cADPR como un ligando del centro activo de la ADPRibasa-Mn de rata | 13 |
| 1.2.3 Hidrólisis de la unión fosfoanhídrido de cADPR por la ADPRibasa-Mn de rata formando N ¹ -(5-fosforribosil)-adenosina-5'-monofosfato o pRib-AMP como producto | 13 |
| 1.2.4 Exploración del comportamiento del centro activo de la ADPRibasa-Mn de rata por simulaciones de la dinámica de la proteína y sus complejos con ADP-ribosa y cADPR..... | 15 |
| 1.2.5 Interacciones observadas en las simulaciones de <i>docking</i> y de dinámica molecular entre los sustratos ADP-ribosa o cADPR y aminoácidos de la proteína ADPRibasa-Mn de rata..... | 22 |
| 1.3 Resultados: ADPRibasa-Mn de pez cebra | 34 |
| 1.3.1 Caracterización enzimática de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> como ADP-ribosa/CDP-alcohol difosfatasa dependiente de Mn ²⁺ : falta de actividad sobre cADPR y nueva actividad sobre 2',3'-cAMP | 34 |
| 1.3.2 Respuesta compleja de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> a los cambios de concentración de Mn ²⁺ | 36 |
| 1.3.3 Activación parcial de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> por Mg ²⁺ | 41 |
| 1.3.4 Dependencia de las actividades de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> respecto del pH | 43 |
| 1.3.5 Caracterización del mutante H97A-ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> | 43 |
| 1.3.6 Evaluación del papel del agua cristalográfica unida al centro dimetálico de la proteína de <i>D. rerio</i> | 46 |
| 1.3.7 Simulación de la unión de sustratos a la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn: orientación respecto a la His ⁹⁷ y a la molécula de agua coordinada con el centro dimetálico | 48 |
| 1.4 Discusión: ADPRibasa-Mn..... | 51 |
| 1.4.1 Caracterización de la familia de metalofosfatasas similares a la ADPRibasa-Mn o <i>ADPRibase-Mn-like</i> | 51 |
| 1.4.2 Especificidad de sustrato de las enzimas ADPRibasa-Mn: preferencia por ADP-ribosa/CDP-alcoholes y significado de las actividades sobre 2',3'-cAMP y cADPR..... | 52 |

| | |
|--|------------|
| 1.4.3 El centro activo de la ADPRibasa-Mn..... | 54 |
| 1.4.4 Mecanismo de reacción de la ADPRibasa-Mn: papel de la molécula de agua bidentada con el centro dimetálico | 55 |
| 1.4.5 Mecanismo de reacción de la ADPRibasa-Mn: papel de la histidina del motivo GNH[D/E] como catalizador por orientación e independencia de la actividad 2',3'-cAMP fosfodiesterasa respecto a dicho aminoácido | 56 |
| 1.4.6 Mecanismo de reacción de la ADPRibasa-Mn: papel de una arginina que interacciona electrostáticamente de forma favorable con los fosfatos del sustrato | 58 |
| 1.4.7 Sitios de unión de Mn ²⁺ y efectos sobre las actividades de las enzimas ADPRibasa-Mn ... | 58 |
| 2. ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES Y CENTRO ACTIVO DE LA TRIOQUINASA/FMN CICLASA HUMANA..... | 61 |
| 2.1 Antecedentes | 61 |
| 2.2 Resultados y discusión: estudios de modelado molecular..... | 70 |
| 2.2.1 Construcción de un modelo molecular de la trioquinasa/FMN ciclase dimérica formando complejo con dihidroxiacetona, ATP y dos iones de Mg ²⁺ | 70 |
| 2.2.2 Unión de FAD al centro activo de la trioquinasa/FMN ciclase | 76 |
| 2.2.3 Dinámica molecular de la trioquinasa/FMN ciclase y sus complejos con sustratos de las actividades quinasa y liasa ciclante..... | 79 |
| 2.2.4 Aproximación de los sustratos ATP y DHA durante la dinámica molecular de hTKFC: un movimiento necesario para explicar la transferencia de fosfato | 96 |
| 2.2.5 Análisis de las trayectorias de dinámica molecular según los principios de la dinámica esencial: diferencias entre los tres sistemas estudiados | 99 |
| 2.2.6 El análisis de los modos normales confirma la tendencia de los dominios K a aproximarse a los dominios L | 102 |
| 2.3 Resultados y discusión: experimentos de mutagénesis..... | 110 |
| 2.3.1 La actividad quinasa requiere los dos dominios K y L, pero el dominio L es suficiente para la actividad liasa ciclante, aunque ésta se hace insensible a la inhibición por dihidroxiacetona y gliceraldehído | 110 |
| 2.3.2 La mutación de residuos del dominio K afecta fuertemente a las actividades de tipo quinasa y a las inhibiciones producidas por dihidroxiacetona y gliceraldehído sobre la liasa ciclante pero afecta muy poco a esta actividad | 112 |
| 2.3.3 La mutación de residuos del dominio L afecta a las actividades quinasa y liasa ciclante o sólo a esta última, pero no afecta a las inhibiciones producidas por dihidroxiacetona y gliceraldehído sobre la liasa ciclante | 116 |
| 3. SECCIÓN EXPERIMENTAL..... | 119 |
| 3.1 Materiales..... | 119 |
| 3.1.1 Equipamiento de laboratorio | 119 |
| 3.1.2 Productos comerciales..... | 120 |
| 3.1.3 Purificación de cADPR..... | 121 |
| 3.1.4 Preparación de pRib-AMP | 121 |
| 3.1.5 Preparación de disoluciones de DHA | 121 |
| 3.1.6 Composición de tampones | 121 |
| 3.1.7 Plásmidos | 122 |
| 3.1.8 Medios informáticos empleados para modelado molecular..... | 123 |
| 3.2 Mutagénesis..... | 125 |
| 3.2.1 Construcción de mutantes puntuales..... | 125 |
| 3.2.2 Construcción de mutantes truncados..... | 125 |
| 3.2.3 Secuenciación de los plásmidos mutados | 127 |
| 3.3 Expresión de proteínas recombinantes..... | 131 |
| 3.4 Purificación de proteínas recombinantes | 131 |
| 3.4.1 Proteínas expresadas desde plásmidos pGEX-6P-3 como fusiones con la etiqueta GST.. | 131 |
| 3.4.2 Proteínas expresadas desde plásmidos pVP16 como fusiones con las etiquetas polihistidina y MBP | 132 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.3 Determinación de la concentración de proteína..... | 132 |
| 3.5 Electroforesis en gel | 133 |
| 3.5.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa..... | 133 |
| 3.5.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes | 133 |
| 3.6 Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)..... | 134 |
| 3.7 Valoraciones enzimáticas..... | 135 |
| 3.7.1 Actividades fosfohidrolasa de la ADPRibasa-Mn | 135 |
| 3.7.2 Actividades de tipo liasa ciclante..... | 136 |
| 3.7.3 Actividades de tipo quinasa | 136 |
| 3.7.4 Valoraciones enzimáticas de AMP y D-ribosa-5-fosfato..... | 138 |
| 3.8 Preparación de modelos moleculares de proteínas | 139 |
| 3.8.1 Preparación de un modelo de la ADPRibasa-Mn de rata | 140 |
| 3.8.2 Preparación de un modelo de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> | 141 |
| 3.8.3 Preparación de modelos de la DHA quinasa de <i>Citrobacter braaki</i> | 142 |
| 3.8.4 Preparación de un modelo dimérico de hTKFC | 142 |
| 3.9 Simulación de unión de ligandos a modelos proteicos | 143 |
| 3.10 Simulaciones de dinámica molecular | 144 |
| 3.10.1 Dinámica molecular de la ADPRibasa-Mn de rata y sus complejos con ADP-ribosa y cADPR..... | 145 |
| 3.10.2 Dinámica molecular de trioquinasa/FMN ciclasa humana (hTKFC) libre y unida a sustratos | 146 |
| 3.10.3 Análisis de dinámica esencial o de los componentes principales de las trayectorias dinámicas de la trioquinasa/FMN ciclasa humana (hTKFC) y sus complejos..... | 148 |
| 3.11 Análisis de los modos normales de hTKFC libre y unida a sustratos | 149 |
| 3.12 Preparación de modelos de ligandos para experimentos de <i>docking</i> | 151 |
| 3.13 Parametrización de ligandos para experimentos de dinámica molecular | 153 |
| 3.14 Modelado del residuo 221 de la trioquinasa/FMN ciclasa humana (hTKFC) unida a DHA: N^{ϵ}-(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina..... | 154 |
| 3.14.1 Tratamiento del radical trihidroxi-prop-2-ilo para el modelado de la trioquinasa/FMN ciclasa humana (hTKFC) con <i>Modeller</i> | 154 |
| 3.14.2 Parametrización de N^{ϵ} -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina para simulaciones de dinámica molecular con <i>GROMACS</i> | 155 |
| 4. CONCLUSIONES | 158 |
| 5. REFERENCIAS | 161 |
| 6. CONTENIDO DEL SUPLEMENTO CD-ROM..... | 173 |
| 6.1 Artículos | 173 |
| 6.2 Estructuras..... | 173 |
| 6.3 Vídeos | 174 |
| 6.4 Topologías y parámetros | 175 |
| 6.5 Copia de la Tesis en formato PDF | 175 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Reacciones catalizadas por la ADP-ribosa/CDP-alcohol pirofosfatasa dependiente de Mn^{2+} (ADPRibasa-Mn) de rata. | 5 |
| Figura 2: Separación de tres ADP-ribosa pirofosfatasas (ADPRibasas) por cromatografía de intercambio iónico a partir de diversos tejidos. | 6 |
| Figura 3: Estructura de la ADPRibasa-Mn. | 8 |
| Figura 4: Modelos teóricos del complejo ADPRibasa-Mn(rata):ADP-ribosa. | 11 |
| Figura 5: Modelo teórico del complejo ADPRibasa-Mn(rata):cADPR. | 12 |
| Figura 6: Conversión de cADPR en pRib-AMP por la ADPRibasa-Mn de rata. | 14 |
| Figura 7: Espectro ultravioleta de pRib-AMP producido por la ADPRibasa-Mn. | 14 |
| Figura 8: Hidrólisis de la unión fosfoanhídrido de cADPR por la ADPRibasa-Mn para generar pRib-AMP. | 16 |
| Figura 9: Cinética de saturación de la actividad cADPR fosfohidrolasa de la ADPRibasa-Mn de rata. | 16 |
| Figura 10: Dinámica molecular de ADPRibasa-Mn de rata y sus complejos ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa y ADPRibasa-Mn:cADPR. | 18 |
| Figura 11: Dinámica molecular de los ligandos ADP-ribosa y cADPR en sus complejos con ADPRibasa-Mn de rata. | 20 |
| Figura 12: Observación de una transición del centro activo de la ADPRibasa-Mn de rata de una forma cerrada a una forma abierta en la proteína libre o en complejo con cADPR, pero no en complejo con ADP-ribosa. | 21 |
| Figura 13: Puentes de hidrógeno entre ADPRibasa-Mn(rata) y ADP-ribosa detectados durante la simulación de dinámica del complejo proteína:ligando. | 25 |
| Figura 14: Contactos entre ADPRibasa-Mn(rata) y ADP-ribosa detectados durante la simulación de dinámica molecular del complejo proteína:ligando. | 27 |
| Figura 15: Puentes de hidrógeno entre ADPRibasa-Mn(rata) y cADPR detectados durante la simulación de dinámica del complejo proteína:ligando. | 29 |
| Figura 16: Contactos entre ADPRibasa-Mn(rata) y cADPR detectados durante la simulación de dinámica del complejo proteína:ligando. | 31 |
| Figura 17: Interacciones enzima-sustrato que aparecen durante la trayectoria de dinámica molecular del complejo ADPRibasa-Mn(rata):ADP-ribosa. | 32 |
| Figura 18: Interacciones enzima-sustrato que aparecen durante la trayectoria de dinámica molecular del complejo ADPRibasa-Mn(rata):cADPR. | 33 |
| Figura 19: Hidrólisis de 2',3'-cAMP por la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> y su mutante H97A formando mayoritariamente 3'-AMP. | 35 |
| Figura 20: Curvas de saturación de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> por sustratos. | 37 |
| Figura 21: Respuestas cinéticas de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> a los cambios de concentración Mn^{2+} con distintos sustratos. | 40 |
| Figura 22: Esquema de reacción de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> incluyendo dos sitios de unión de metal que afectan a la cinética. | 41 |
| Figura 23: Activación parcial de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> por Mg^{2+} | 42 |
| Figura 24: Inhibición de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> por Zn^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} | 44 |
| Figura 25: Respuesta de las actividades de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> y su mutante H97A a los cambios de pH. | 44 |

| | |
|--|-----|
| Figura 26: Efecto de la presencia de una molécula de agua cristalográfica en la unión de fosfato al centro dimetálico de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> . | 47 |
| Figura 27: Sustratos unidos al centro activo de la ADPRibasa-Mn de <i>D. rerio</i> . | 49 |
| Figura 28: Vía de Hers para el metabolismo de la fructosa. | 62 |
| Figura 29: Reacciones catalizadas por la trioquinasa. | 64 |
| Figura 30: Reacción principal de la FMN ciclasa. | 65 |
| Figura 31: Estructura de la DHA quinasa de <i>Citrobacter braaki</i> por difracción de rayos X. | 68 |
| Figura 32: Alineamiento entre la DHA quinasa de <i>C. braaki</i> (CbDK) y la hTKFC. | 71 |
| Figura 33: Modelado comparativo de hTKFC. | 72 |
| Figura 34: Sitios de unión de DHA a CbDK y hTKFC. | 74 |
| Figura 35: Sitios de unión de ATP a CbDK y hTKFC. | 75 |
| Figura 36: Modelos teóricos del complejo hTKFC:FAD, con FAD unido al sitio K2L1 de hTKFC. | 78 |
| Figura 37: Dinámica molecular de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD. | 82 |
| Figura 38: Fluctuación de los C α durante las simulaciones de dinámica molecular de los tres sistemas estudiados. | 83 |
| Figura 39: Dinámica del ATP y DHA en el sistema hTKFC:2DHA:2ATP. | 85 |
| Figura 40: Puentes de hidrógeno entre hTKFC y los sustratos DHA y ATP detectados durante la simulación de dinámica molecular del sistema hTKFC:2DHA:2ATP. | 89 |
| Figura 41: Contactos entre hTKFC y ATP detectados durante la simulación de dinámica con el sistema hTKFC:2DHA:2ATP. | 90 |
| Figura 42: Dinámica de FAD en el sistema hTKFC:FAD. | 92 |
| Figura 43: Puentes de hidrógeno entre hTKFC y el sustrato FAD detectados durante la simulación de dinámica molecular del sistema hTKFC:FAD. | 93 |
| Figura 44: Contactos detectados entre hTKFC y FAD durante la simulación de dinámica con el sistema hTKFC:FAD. | 95 |
| Figura 45: Evolución de la distancia entre DHA y ATP, o sus respectivos sitios de unión, durante las simulaciones de dinámica molecular. | 97 |
| Figura 46: Conformación que corresponde a la mínima distancia medida entre ATP y DHA en la simulación dinámica del sistema de hTKFC:2DHA:2ATP. | 98 |
| Figura 47: Análisis de la dinámica esencial de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD: primeros vectores propios o componentes principales en orden decreciente de valor propio. | 100 |
| Figura 48: Comparación entre las direcciones de los primeros vectores propios o componentes principales encontrados en la dinámica esencial de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD. | 101 |
| Figura 49: Representación estática del primer vector propio o componente principal encontrado por análisis de dinámica esencial en los sistemas estudiados. | 103 |
| Figura 50: Representación estática de los tres primeros modos normales no triviales encontrados en los cuatro sistemas estudiados. | 107 |
| Figura 51: Representación simplificada de los primeros modos normales no triviales observados en los cuatro sistemas estudiados y su comparación con los modos universales de las estructuras que contienen dos dominios globulares unidos por una bisagra flexible. | 108 |
| Figura 52: Comparación entre los primeros modos normales de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP, hTKFC:FAD y hTKFC:2FAD. | 109 |
| Figura 53: Dominios K y L de hTKFC construidos y expresados por separado. | 111 |
| Figura 54: Localización de los aminoácidos de hTKFC mutados puntualmente. | 111 |
| Figura 55: Actividades enzimáticas de las formas mutantes de hTKFC. | 113 |
| Figura 56: Saturación de las actividades de tipo liasa ciclante del dominio L de hTKFC. | 114 |
| Figura 57: Inhibición de la actividad FMN ciclasa de formas mutantes de hTKFC por sustratos de la actividad quinasa. | 117 |
| Figura 58: Plásmidos utilizados para expresar las proteínas salvajes y para los experimentos de mutagénesis. | 122 |
| Figura 59: Cebadores utilizados en este trabajo. | 126 |
| Figura 60: Secuenciación de las secuencias codificadoras del mutante puntual H97A de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> . | 127 |

| | |
|---|-----|
| Figura 61: Secuenciación de las secuencias codificadoras de los mutantes puntuales de hTKFC..... | 129 |
| Figura 62: Secuenciación de las secuencias codificadoras de los dominios K y L de hTKFC. | 130 |
| Figura 63: Sistemas estudiados por simulaciones de dinámica molecular. | 147 |
| Figura 64: Ligandos empleados en las simulaciones de unión (<i>docking</i>) a las proteínas ADPRibasa-Mn y hTKFC..... | 152 |
| Figura 65: Geometrías optimizadas de <i>N</i> -acetil- <i>N</i> '-(1,2,3-trihidroxiprop-2-il)- <i>L</i> -histidina)- <i>N</i> '- metilamida..... | 156 |

Índice de tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 1: Especificidad de sustrato de enzimas ADPRibasa-Mn..... | 38 |
| Tabla 2: Evaluación de los modelos de hTKFC obtenidos por homología. | 74 |
| Tabla 3: Composición de los sistemas empleados para las simulaciones de dinámica molecular y para el análisis de modos normales..... | 80 |
| Tabla 4: Parámetros cinéticos de las formas mutantes de hTKFC que presentan actividad liasa ciclante y/o quinasa detectable(s). | 115 |

Abreviaturas

| | | | |
|------------------------|---|----------------------|--|
| aa | aminoácidos | L2-anti | sitio de unión de nucleótido en el dominio L de la cadena 2 de hTKFC, en el cual el enlace glicosídico entre la ribosa y la adenina está en conformación <i>anti</i> |
| ADP | adenosina 5'-difosfato | MBP | <i>maltose-binding protein</i> |
| ADPRibasa | ADP-ribosa difosfatasa | NAD | nicotinamida adenina dinucleótido |
| ADPRibasa-Mn | ADP-ribosa/CDP-alcohol difosfatasa dependiente de Mn ²⁺ | NADasa | nicotinamida adenina dinucleótido nucleosidasa |
| AMP | adenosina 5'-monofosfato | NDP-X | ribonucleósido-difosfato-X |
| AMPPNP | adenilil-imidodifosfonato | NM | modo normal |
| ATP | adenosina 5'-trifosfato | NMP | ribonucleósido-monofosfato |
| A_x | absorbancia a x nanómetros | PCA | análisis de componentes principales |
| cADPR | ADP-ribosa cíclica | PDB | <i>protein data bank</i> , un repositorio de estructuras de macromoléculas y también un formato de archivo |
| cAMP | adenosina monofosfato cíclico | PDBQT | formato de archivo derivado del formato PDB, con información añadida de carga (Q) y tipo de átomo (T) |
| CbDK | dihidroxiacetona quinasa de <i>Citrobacter braaki</i> | Pi | fosfato inorgánico |
| cDNA | DNA complementario | pRib-AMP | N ¹ -(5-fosforribosil)-AMP |
| CDP | citidina 5'-difosfato | R² | coeficiente de determinación |
| cFMN | riboflavina 4',5'-fosfato cíclico | RMSD | <i>root mean square deviation</i> |
| CMP | citidina 5'-monofosfato | RMSF | <i>root mean square fluctuation</i> |
| DHA | dihidroxiacetona | RMSIP | <i>root mean square inner product</i> |
| DHAP | dihidroxiacetona fosfato | S.D. | desviación estándar |
| DOPE | <i>discrete optimized protein energy expressed sequence tag</i> | SCOP | <i>Structural Classification of Proteins</i> |
| EST | | SDS | dodecilsulfato sódico |
| FAD | flavina adenina dinucleótido | SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS |
| GA | D-gliceraldehído | TEV | <i>tobacco etch virus</i> |
| GSH | glutación reducido | TKFC | trioquinasa/FMN ciclasa |
| GST | glutación S-transferasa | TRPM2 | <i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2</i> |
| HPLC | cromatografía de líquidos de alta eficacia | U | Unidad de actividad enzimática (1 μmol de sustrato por minuto) |
| hTKFC | trioquinasa/FMN ciclasa humana | UDP | uridina 5'-difosfato |
| ID | identificador | | |
| IDP | inosina 5'-difosfato | | |
| k_{cat} | constante catalítica | | |
| K_M | constante de Michaelis-Menten | | |
| L1-syn | sitio de unión de nucleótido en el dominio L de la cadena 1 de hTKFC, en el cual el enlace glicosídico entre la ribosa y la adenina está en conformación <i>syn</i> | | |

Resumen (máximo 250 palabras)*

Se han investigado las actividades y centros activos de la ADP-ribosa/CDP-alcohol difosfatasa dependiente de Mn^{2+} (ADPRibasa-Mn) y la trioquinasa/FMN ciclasa (TKFC), obtenidas como proteínas recombinantes. Respecto a ADPRibasa-Mn se estudiaron las enzimas de rata (*Rattus norvegicus*) y de pez cebra (*Danio rerio*). Por vez primera se ha hecho coincidir información estructural y bioquímica en la misma proteína de la familia *ADPRibase-Mn*. Se han encontrado nuevas actividades de ADPRibasa-Mn, como ADP-ribosa cíclica fosfohidrolasa y fosfodiesterasa de nucleótidos 2',3'-cíclicos. A partir de la estructura de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, y por modelado molecular, se han definido los centros activos de ambas enzimas y se identificaron una molécula de agua y un residuo de histidina bien posicionados para la reacción hidrolítica. El papel de dicho residuo se confirmó por mutagénesis. Respecto a TKFC, se estudió la enzima humana (hTKFC), un homodímero de subunidades con dos dominios (L y K). Se construyeron modelos de hTKFC unida a sustratos de quinasa, de ciclasa o sin sustratos. Simulaciones de dinámica molecular desvelaron movimientos de los dominios K necesarios para la actividad quinasa. El modelado molecular permitió identificar interacciones relevantes de diversos aminoácidos. Los estudios bioquímicos hechos con hTKFC incluyeron la demostración de que K y L por separado no tienen actividad quinasa, mientras que K tiene actividad FMN ciclasa. Además se prepararon seis mutantes puntuales que, añadidos a un séptimo anteriormente preparado, dieron información relevante sobre el centro activo y el papel de ambos dominios en la catálisis.

Summary (maximum 250 words)

The activities and the active centers of Mn^{2+} -dependent ADP-ribose/CDP-alcohol diphosphatase (ADPRibase-Mn) and triokinase/FMN cyclase (TKFC), both obtained as recombinant proteins, were investigated. Concerning ADPRibase-Mn, the enzymes from rat (*Rattus norvegicus*) and zebrafish (*Danio rerio*) were studied. For the first time, structural and biochemical information were put together for the same protein of the ADPRibase-Mn family. Novel ADPRibase-Mn activities were found, namely cyclic ADP-ribose phosphohydrolase and 2',3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. The active centers of both ADPRibase-Mn enzymes were defined from the structure of the *D. rerio* protein and by molecular modeling. A molecule of water and a histidine residue well positioned for the hydrolytic reaction were identified. The role of such residue was confirmed by mutagenesis. The study of TKFC was centered on the human enzyme (hTKFC), a homodimer of two-domain (K and L) subunits. hTKFC models bound to kinase substrates, cyclase substrate, or without substrates, were constructed. Molecular dynamics simulations revealed movements of the K domains necessary for the kinase activity. Molecular modeling led to the identification of relevant interactions of several aminoacids. Biochemical studies performed with hTKFC included the demonstration that individual K and L domains are devoid of kinase activity, while K alone is active as FMN cyclase. In addition, six point mutants were prepared and, together with another previously prepared one, gave relevant information on the active center and the role of both domains in catalysis.

*Este resumen tiene las dimensiones indicadas por la Universidad de Extremadura. Como nos parecía que podía resultar algo corto para resumir con cierto detalle el contenido de la Tesis, en las páginas siguientes se ha incluido un resumen más extenso (Resumen Ejecutivo).

Resumen Ejecutivo

Se han estudiado de manera independiente dos enzimas: ADP-ribosa/CDP-alcohol difosfatasa dependiente de Mn^{2+} (ADPRibasa-Mn) y trioquinasa/FMN ciclasa (TKFC), ambas obtenidas por expresión en bacterias de secuencias clonadas. En ambos casos se han estudiado sus actividades y sus centros activos, por análisis enzimático, HPLC, modelado molecular, mutagénesis y expresión heteróloga, como principales técnicas empleadas.

ADPRibasa-Mn es una enzima descubierta en nuestro laboratorio en hígado de rata por sus actividades hidrolíticas dependientes de Mn^{2+} sobre ADP-ribosa y CDP-alcoholes (EC 3.6.1.53). Fue también identificada por clonación molecular como prototipo catalítico de una familia de metalofosfatasa (clasificada en SCOP como *ADPRibase-Mn-like*) cuyo prototipo estructural era una proteína de *Danio rerio* (pez cebra) sin función bioquímica conocida. Dentro de esta Tesis Doctoral hemos estudiado la ADPRibasa-Mn de rata y de *D. rerio*, con las siguientes conclusiones principales. **(a)** Por vez primera se hace coincidir información estructural y bioquímica en la misma proteína de la familia *ADPRibase-Mn* (la de *D. rerio*). **(b)** La ADPRibasa-Mn de rata hidroliza la unión fosfoanhídrido de ADP-ribosa cíclica (cADPR) formando como único producto N^1 -(5-fosforribosil)-adenosina 5'-monofosfato (pRib-AMP), siendo ésta la primera enzima que se demuestra que posee este tipo de actividad. **(c)** La ADPRibasa-Mn de *D. rerio* tiene actividad fosfodiesterasa sobre 2',3'-cAMP, que da 3'-AMP como principal producto. **(d)** La ADPRibasa-Mn de *D. rerio* responde al Mn^{2+} de manera diferente a la de rata, pues ésta presenta curvas de saturación hiperbólicas por dicho metal, mientras que la primera presenta distintos tipos de curvas dependiendo del sustrato. **(e)** El centro activo de las proteínas ADPRibasa-Mn se localiza en un bolsillo estructural cerrado en el que se acomodan bien los sustratos por técnicas de modelado molecular (*docking*). **(f)** Una molécula de agua presente en los cristales de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, y unida al centro dimetálico de la proteína, puede atacar en línea al P del enlace P-O escindible del sustrato, con la significativa excepción del cADPR que no es hidrolizado a velocidades significativas. **(g)** La cadena lateral de His⁹⁷ forma un puente de hidrógeno con el O del enlace P-O escindible y puede actuar como catalizador por orientación, con la excepción del sustrato rígido 2',3'-cAMP, cuya hidrólisis, a diferencia de los otros sustratos, se ve escasamente afectada en el mutante H97A de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*.

TKFC es una proteína con dos actividades enzimáticas diferentes: triosa quinasa o trioquinasa, que fosforila dihidroxiacetona (DHA) o D-gliceraldehído (GA) a partir de ATP (EC 2.7.1.28), y la descubierta en nuestro laboratorio FAD-AMP liasa ciclante o FMN ciclasa, que rompe FAD mediante un ataque interno que da lugar a AMP y riboflavina 4',5'-fosfato cíclico o FMN cíclico (EC 4.6.1.15). Dentro de esta Tesis Doctoral hemos estudiado la TKFC humana (hTKFC), con las siguientes conclusiones principales. **(h)** En una estructura homodimérica de hTKFC, modelada por homología con la DHA quinasa de *Citrobacter braaki*, cada subunidad (1 y 2) tiene dos dominios globulares (K1 y L1; K2 y L2) unidos por un largo espaciador, de manera que en el dímero se suceden de forma aproximadamente lineal los dominios L2-K1-K2-L1. **(i)** Los sustratos DHA y ATP se unen a centros activos abiertos entre los dominios K1L2 y K2L1, uniéndose DHA de forma covalente a His²²¹ (dominio K) e interaccionando el ATP con los dominios L, con la base adenina en un bolsillo hidrofóbico, la ribosa en puente de hidrógeno con Asp⁵⁵⁶, y el trifosfato coordinado con dos iones metálicos, que a su vez están coordinados por Asp³⁹⁶, Asp⁴⁰¹ y Asp⁴⁰³. **(j)** En esta estructura, la distancia entre DHA y ATP es de unos 14 Å, demasiado grande para la reacción de transferencia de fosfato. **(k)** En simulaciones de la dinámica molecular del complejo hTKFC:2ATP:2DHA se produce el cierre de uno de los centros activos con un acercamiento muy marcado de un hidroxilo de DHA al fósforo γ del ATP, a distancias próximas (≈ 5 Å) a las necesarias para la transferencia de fosfato. **(l)** En esta conformación se observa un puente de hidrógeno de Thr¹¹² (dominio K) con el grupo 6-amino del ATP (unido al dominio L enfrenteado), y otro puente de hidrógeno de Lys²⁰⁴ (dominio K) con el carbonilo del esqueleto peptídico de Arg³⁹⁷ o de Ala³⁹⁸ (dominio L), interacciones bien posicionadas para estabilizar la forma cerrada del centro activo. **(m)** La unión de FAD (*docking*) a uno de los centros activos de hTKFC ocurre de forma similar a la unión de ATP. **(n)** El FAD puede adoptar una conformación con el grupo 4'-OH bien orientado para un ataque nucleofílico interno sobre el fósforo proximal, como se espera que ocurra en la reacción monosustrato de la actividad liasa ciclante. **(o)** Los dominios K y L, expresados por separado, carecen de actividad quinasa, mientras que el dominio L (pero no el K) es activo como FMN ciclasa, con una k_{cat} próxima al 50% de hTKFC, aunque con una K_M 10 veces mayor que hTKFC. **(p)** Mutaciones en aminoácidos clave del dominio K (Thr¹¹² e His²²¹) eliminan o afectan fuertemente a las actividades quinasa, con efectos parciales sobre la FMN ciclasa. **(q)** Mutaciones en aminoácidos clave del dominio L (Asp⁴⁰¹, Asp⁴⁰³ y Asp⁵⁵⁶) eliminan las actividades quinasa y ciclasa, o bien (Cys⁴⁰⁴ y Ser⁴⁴⁶) afectan parcialmente, en distinto grado, a ambas actividades.

Executive Summary

Two enzymes have been independently studied: Mn^{2+} -dependent ADP-ribose/CDP-alcohol diphosphatase (ADPRibase-Mn) and triokinase/FMN cyclase (TKFC), both obtained by expression of cloned sequences in bacteria. Their activities and their active centers have been studied by enzymatic analysis, HPLC, molecular modeling, mutagenesis and heterologous expression as major techniques.

ADPRibase-Mn was discovered in our laboratory, in rat liver, by its Mn^{2+} -dependent hydrolytic activities on ADP-ribose and CDP-alcohols (EC 3.6.1.15). It was also identified by molecular cloning as the catalytic prototype of a metallophosphatase family (classified in SCOP as ADPRibase-Mn-like) of which the structural prototype was a *Danio rerio* (zebrafish) protein without known biochemical function. In this Thesis, we have studied ADPRibase-Mn from rat and *D. rerio* with the following major conclusions. **(a)** For the first time, structural and biochemical data are put together for the same ADPRibase-Mn protein (the one from *D. rerio*). **(b)** Rat ADPRibase-Mn hydrolyzes the phosphoanhydride linkage of cyclic ADP-ribose (cADPR) to form N^1 -(5-phosphoribosyl)-adenosine 5'-monophosphate (pRib-AMP) as the only product, being the first enzyme found to display this kind of activity. **(c)** *D. rerio* ADPRibase-Mn has phosphodiesterase activity on 2',3'-cAMP, which yields 3'-AMP as the major product. **(d)** *D. rerio* ADPRibase-Mn responds to Mn^{2+} different than the rat enzyme, as while the latter displays hyperbolic Mn^{2+} saturation curves, the former shows different curve types depending on the substrate. **(e)** The active center of ADPRibase-Mn proteins is located in a closed structural pocket where the substrates fit by molecular modeling techniques (docking). **(f)** A water molecule present in *D. rerio* ADPRibase-Mn crystals, bound to the dimetal center of the protein, can make an in-line attack over the P atom of the scissile P–O bond of the substrates, with the significant exception of cADPR which is not hydrolyzed at significant rates. **(g)** The side chain of His⁹⁷ forms a hydrogen bridge with the O atom of the scissile P–O bond, and may act as a catalyst by orientation, with the exception of the hydrolysis of the rigid substrate 2',3'-cAMP, which is scarcely affected in the H97A mutant of *D. rerio* ADPRibase-Mn.

TKFC is a protein with dual enzyme activity: triose kinase or triokinase, that phosphorylates dihydroxyacetone (DHA) or D-glyceraldehyde (GA) (EC 2.7.1.28) using ATP as donor, and FAD-AMP cyclizing lyase or FMN cyclase, that splits FAD by an internal attack yielding AMP and riboflavin 4',5'-cyclic phosphate or cyclic FMN (EC 4.6.1.15), as discovered in our laboratory. In this Thesis, we have studied human TKFC (hTKFC) with the following major conclusions. **(h)** In a homodimeric structure of hTKFC, modeled by homology to *Citrobacter braaki* DHA kinase, each subunit contains two globular domains (K1 and L1; K2 and L2) linked by a long spacer, such that the domains L2–K1–K2–L1 are almost linearly distributed in the dimer. **(i)** Substrates DHA and ATP bind to active centers open between domains K1L2 and K2L1, with DHA covalently bound to His²²¹ (K domain) and ATP interacting with the L domains, with the adenine ring in a hydrophobic pocket, ribose in hydrogen bond with Asp⁵⁵⁶, and the triphosphate coordinated to two metal ions which themselves are coordinated by Asp³⁹⁶, Asp⁴⁰¹ and Asp⁴⁰³. **(j)** In this structure, the distance between DHA and ATP is about 14 Å, too large for the phosphate transfer reaction. **(k)** In molecular dynamics simulations of the hTKFC:2ATP:2DHA complex, the closing of one of the active centers takes place with a marked approximation of a DHA hydroxyl to the γ -phosphorus of ATP, at a distance of \approx 5 Å, almost as needed for the phosphate transfer. **(l)** In this conformation, hydrogen bonds of Thr¹¹² (K domain) with the 6-amine group of ATP (bound to the opposed L domain), and of Lys²⁰⁴ (K domain) with the backbone carbonyl of Arg³⁹⁷ or Ala³⁹⁸ (L domain) were observed and seemed well positioned to stabilize the closed active center. **(m)** The docking of FAD to one of the hTKFC active centers occurs in a way that resembles the binding of ATP. **(n)** Bound FAD can adopt conformations with its 4'-OH group well oriented for an internal nucleophilic attack over the proximal phosphorus, as expected to occur in the monosubstrate reaction of the cyclizing lyase activity. **(o)** The K and L domains, separately expressed, are devoid of kinase activity, whereas the L, but not the K domain, is active as FMN cyclase with a k_{cat} near to the 50% of hTKFC, but with a K_M 10-fold higher than hTKFC. **(p)** Point mutants of key amino acids of the K domain (Thr¹¹² and His²²¹) eliminate or strongly affect the kinase activities with only partial effects on FMN cyclase. **(q)** Point mutants of key amino acids of the L domain either eliminate kinase and cyclase activities (Asp⁴⁰¹, Asp⁴⁰³ and Asp⁵⁵⁶), or affect both partially to different degrees (Cys⁴⁰⁴ and Ser⁴⁴⁶).

Preámbulo

La finalidad de este preámbulo es explicar las razones por las que esta Tesis Doctoral tiene dos capítulos, cada uno dedicado a una proteína enzimática diferente: ADP-ribosa/CDP-alcohol difosfatasa dependiente de Mn^{2+} o ADPRibasa-Mn (sección 1) y trioquinasasa/FMN ciclasa o TKFC (sección 2).

El Grupo de Enzimología de la Universidad de Extremadura, dentro de cuyo laboratorio se ha desarrollado este trabajo, tiene como *leitmotiv* de sus investigaciones el estudio de enzimas activas sobre derivados nucleotídicos biológicos cuyas estructuras son variaciones de la estructura general de los nucleótidos. Las dos proteínas estudiadas en esta Tesis forman parte de esa línea de investigación.

Unos años antes de comenzar mi trabajo, en el laboratorio se había identificado molecularmente y se había clonado un cDNA codificador de la proteína TKFC humana [1]. Coincidiendo con mi incorporación al Grupo, se estaba desarrollando el estudio enzimático detallado de la TKFC humana recombinante, como tema de otra Tesis Doctoral recientemente defendida [2], y hacía poco tiempo que se había logrado identificar y clonar la ADPRibasa-Mn de rata [3], en cuyo estudio bioquímico se estaba trabajando en aquel momento.

Durante los años de mi colaboración con el Grupo de Enzimología, mi trabajo se dividió entre ambas proteínas, y en los dos casos se aplicó a la consecución de objetivos de caracterización enzimática, identificación de aminoácidos implicados en los centros activos por experimentos de mutagénesis dirigida y simulaciones informáticas de unión de sustratos y dinámica molecular. A pesar de que éstos son puntos de contacto muy claros entre las dos partes de mi Tesis Doctoral, se trata de aspectos de tipo metodológico. Por ello, nos pareció totalmente necesaria la presentación en dos capítulos independientes en cuanto a sus respectivas secciones de Introducción, Resultados y Discusión. Sin embargo, era factible presentar, y así lo hemos hecho, secciones únicas de Materiales y Métodos, Conclusiones y Bibliografía.

En cada uno de los dos capítulos de la Tesis Doctoral se presentan como antecedentes, dentro de las respectivas secciones de Introducción, todos aquellos aspectos del estudio de estas proteínas en los que no he participado, y como Resultados, aquellos otros de los que he sido responsable principal o bien colaborador activo dentro del equipo de investigación.

1. ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES Y CENTRO ACTIVO DE LA ADPRibasa-Mn DE *RATTUS NORVEGICUS* Y DE *DANIO RERIO*¹

1.1 Antecedentes

La enzima ADP-ribosa/CDP-alcohol pirofosfatasa dependiente de Mn^{2+} (ADPRibasa-Mn; EC 3.6.1.53) fue identificada por primera vez en extractos de hígado de rata (*Rattus norvegicus*) [7] y más tarde clonada a partir de un cDNA de hígado de rata y expresada en *E. coli* [3,4]. Al comenzar esta Tesis se conocía que la enzima de rata hidroliza el enlace fosfoanhídrido de ADP-ribosa, CDP-alcoholes y ADP (Figura 1), una especificidad algo inesperada por las diferencias entre los dos tipos de sustratos NDP-X, y porque compuestos como ADP-glucosa y CDP-glucosa no son hidrolizados.

En mamíferos, la ADPRibasa-Mn es miembro de un grupo de hidrolasas celulares con actividad sobre ADP-ribosa que es convertida a AMP y ribosa-5-fosfato [7,8]:

- ADPRibasa-I o ADP-ribosa pirofosfatasa I: citosólica, hidroliza solamente ADP-ribosa y el sustrato no fisiológico IDP-ribosa en presencia de Mg^{2+} , aunque su especificidad se hace menos estricta en presencia de Mn^{2+} . Es una proteína de la superfamilia Nudix codificada por el gen *NUDT9* [9].
- ADPRibasa-m o ADP-ribosa pirofosfatasa mitocondrial: tiene una especificidad similar a la ADPRibasa-I y es codificada por el mismo gen [10].
- ADPRibasa-II o ADP-ribosa pirofosfatasa II: también citosólica, es menos específica que las anteriores. Su especificidad disminuye aún más en presencia de Mn^{2+} . Es una proteína Nudix codificada por el gen *NUDT5*, denominada también como ADP-azúcar pirofosfatasa [11,12].
- ADPRibasa-Mn: estudiada en esta Tesis, también citosólica, es distinta de las otras hidrolasas por requerir Mn^{2+} para su actividad sobre ADP-ribosa y por no ser una proteína

¹ Los primeros resultados de esta Tesis, correspondientes a estudios de modelado molecular del centro activo de la ADPRibasa-Mn de *R. norvegicus*, están publicados [4] junto a su clonación molecular y a estudios bioquímicos y bioinformáticos de expresión tisular, aspectos que no son parte formal de la Tesis. La mayor parte de los restantes resultados de la Tesis, relativos a las ADPRibasa-Mn de *R. norvegicus* y *D. rerio*, están incluidos en sendas publicaciones [5,6] de las cuales nuestros resultados constituyen una parte muy sustancial. Estas tres publicaciones están incluidas en el suplemento CD-ROM de la Tesis. Algunos resultados adicionales de modelado molecular de la ADPRibasa-Mn de rata, incluidos en esta memoria, están todavía inéditos.

Nudix, sino que pertenece a la superfamilia de las metalofosfatasa con un centro metálico dinuclear [4,7].

- Nucleótido pirofosfatasa o fosfodiesterasa I de amplia especificidad: ectoenzimáticas, además de ADP-ribosa, hidrolizan todo tipo de derivados fosfodiéster o fosfoanhídrido de 5'-nucleótidos [7,13].

Entre todas estas enzimas, los niveles intracelulares de ADP-ribosa en mamíferos son probablemente controlados más eficazmente por la ADPRibasa-I, que presenta un valor de K_M (sub)micromolar para dicho sustrato, aunque es posible también la intervención de otras enzimas [9,10,14,15,16].

La ADPRibasa-Mn requiere Mn^{2+} como activador a concentraciones de orden micromolar, y no es activada por Mg^{2+} , incluso a concentraciones de orden milimolar [7]. Fue esta especificidad lo que permitió distinguirla de las otras enzimas con actividades ADPRibasa en los extractos de hígado de rata donde fue aislada originalmente (Figura 2). Las concentraciones micromolares de Mn^{2+} necesarias para activar la enzima son compatibles con los niveles conocidos de este metal en hepatocitos de rata [17].

El análisis por espectrometría de masas de la huella peptídica ha permitido identificar a la ADPRibasa-Mn aislada de hígado de rata como un producto del gen *RGD1309906*, que entre eucariotas tiene ortólogos solamente en vertebrados, plantas y algas, no encontrándose en invertebrados y hongos. En el ratón (*Mus musculus*), el gen ortólogo es *2310004I24Rik* y en humanos (*Homo sapiens*) *c17orf48*².

Existen indicios de que la ADPRibasa-Mn tiene una función en el sistema inmunitario de vertebrados. Esto es apoyado por análisis de la expresión del gen *2310004I24Rik* en tejidos de ratón mediante una micromatriz de cDNA. Este gen es preferentemente expresado en células inmunitarias respecto a células no inmunitarias [18]. Además, en rata, los niveles de mRNAs de ADPRibasa-Mn y la actividad ADPRibasa-Mn son más elevados en timo y bazo que en otros tejidos (Figura 2) [4]. El papel de la ADPRibasa-Mn en el sistema inmunitario podría estar relacionado con la función de segundo mensajero de la ADP-ribosa. Ésta forma parte de la red de reguladores derivados de $NAD(P)^+$. Se genera a partir de NAD por hidrólisis del enlace *N*-glicosídico entre la nicotinamida y la ribosa, pero también puede formarse a partir de otros metabolitos de NAD [19,20]. La ADP-ribosa es un importante regulador intracelular de canales iónicos. Participa en la activación de los canales TRPM2 (*transient receptor potencial melastatin channel-2*), involucrados en la muerte celular mediada por Ca^{2+} [16,21,22,23,24,25]. El canal se abre en respuesta a ADP-ribosa, que actúa como un mediador de estrés oxidativo y nitrosativo. La enzima ADPRibasa-Mn podría participar en el recambio de ADP-ribosa y en la terminación de sus efectos en los canales TRPM2. En este sentido es de destacar que todos los tejidos que expresan TRPM2 también expresan ADPRibasa-Mn, pero la enzima es expresada en tejidos donde TRPM2 no lo es. Esto sugiere por tanto otras funciones para la ADPRibasa-Mn, que podrían estar relacionadas con su actividad sobre los CDP-alcoholes CDP-colina, CDP-etanolamina y CDP-glicerol. Los dos primeros son intermediarios clave en las vías de la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, respectivamente [26,27]. La ADPRibasa-Mn podría tener un papel regulador en el metabolismo fosfolipídico.

² Como resultado del trabajo de nuestro laboratorio, en buena parte correspondiente a esta Tesis, el nombre oficial de estos genes se ha modificado, siendo actualmente *ADP-ribose/CDP-alcohol diphosphatase, manganese-dependent*, y empleándose como símbolos *ADPRM*, *Adprm* o *adprm*, según la especie de que se trate (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene?LinkName=gene_homologene&from_uid=287406).

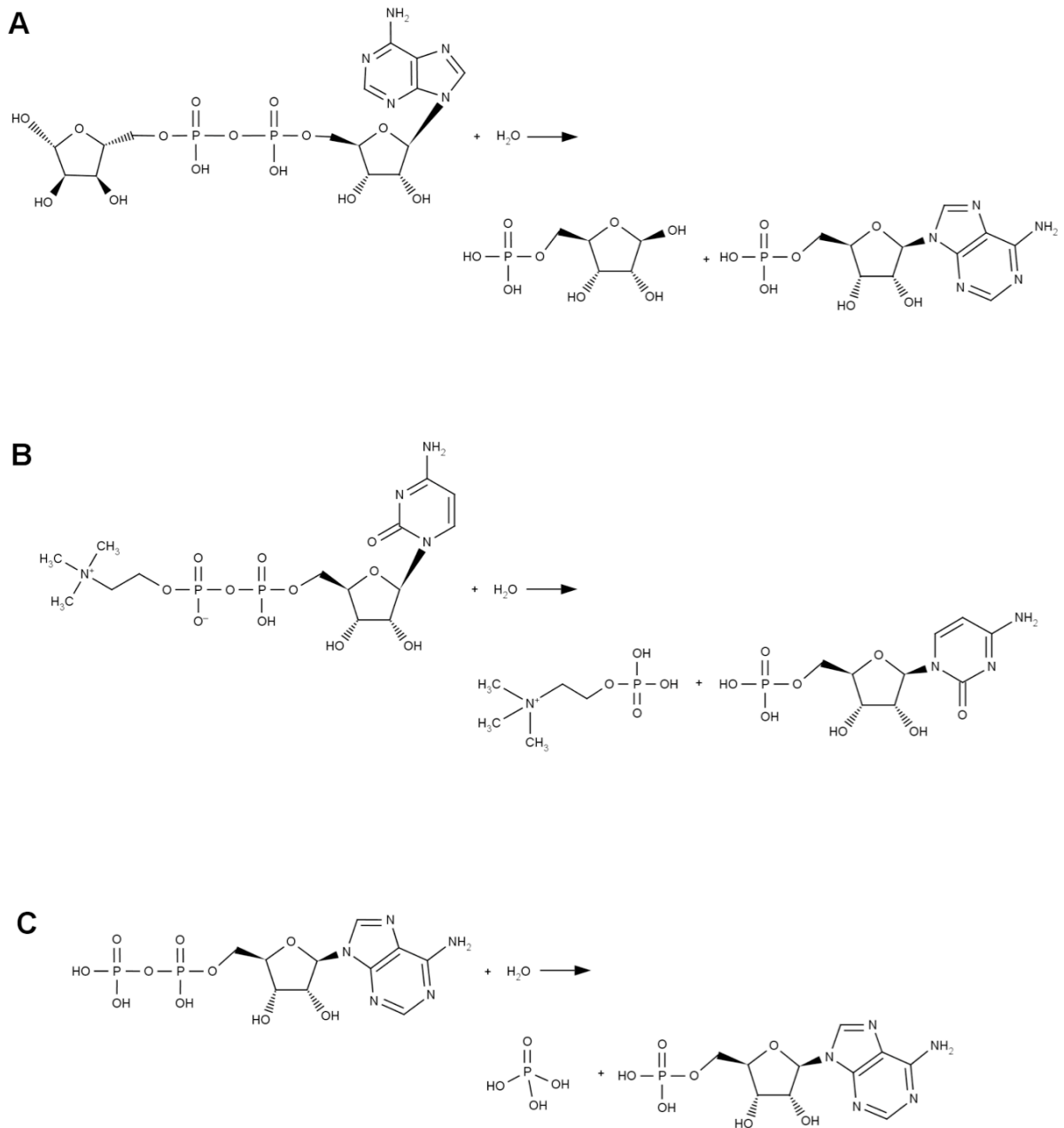


Figura 1: Reacciones catalizadas por la ADP-ribosa/CDP-alcohol pirofosfatasa dependiente de Mn^{2+} (ADPRibasa-Mn) de rata. A: La hidrólisis del enlace fosfoanhídrido de ADP-ribosa produce AMP y ribosa-5-fosfato. **B:** La hidrólisis de un CDP-alcohol, en este caso CDP-colina, produce CMP y el correspondiente fosfoalcohol, en este caso fosfocolina. La enzima también tiene actividad sobre CDP-etanolamina y CDP-glicerol. **C:** La hidrólisis del enlace fosfoanhídrido de ADP produce AMP y fosfato.

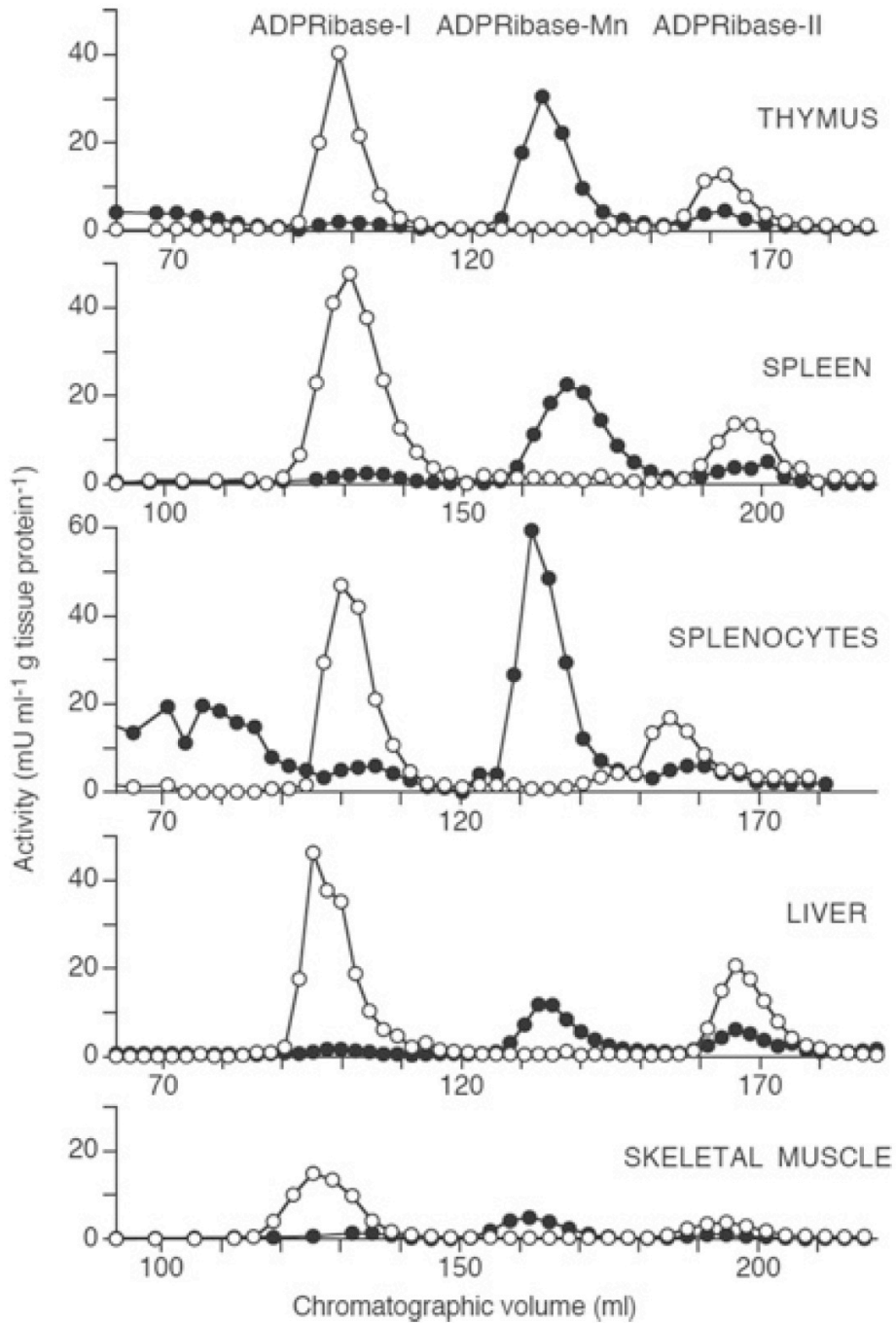


Figura 2: Separación de tres ADP-ribosa pirofosfatasa (ADPRibasas) por cromatografía de intercambio iónico a partir de diversos tejidos. Esta figura está tomada de la referencia [4]. Se muestra la actividad sobre ADP-ribosa en las fracciones cromatográficas recogidas durante la elución de una columna de DEAE-celulosa con un gradiente de KCl 50-400 mM. La buena resolución de las actividades de ADPRibasa-I, ADPRibasa-Mn y ADPRibasa-II permitió su cuantificación individual. La actividad ADP-ribosa hidrolasa fue valorada en la presencia de MgCl₂ (○) o MnCl₂ (●) y se presenta normalizada para un gramo de proteína tisular. Se observa la mayor actividad de ADPRibasa-Mn en células inmunitarias.

La secuencia de aminoácidos de la ADPRibasa-Mn permite identificarla como perteneciente a la superfamilia de las fosfatasas dependientes de metales o metalofosfatasas (SCOP ID 56300; <http://supfam.org/SUPERFAMILY>) [4] y descartar que se trate de una proteína Nudix, superfamilia a la que pertenecen ADPRibasa-I, ADPRibasa-m y ADPRibasa-II [28,29]. Las proteínas de la superfamilia de las metalofosfatasas contienen un centro dimetálico (con iones iguales o diferentes en diversas combinaciones), el motivo de estructura secundaria $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ insertado en un plegamiento compuesto por cuatro capas, dos hojas plegadas β flanqueadas por dos hélices α , y la secuencia conservada dispersa y repartida en cinco regiones: DX[H/X]X_nGDXX[D/X]X_nGNH[D/E]X_n[G/X]HX_nGHX[H/X] [30,31,32,33]. Esta superfamilia (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=56300>) se subdivide actualmente en doce familias. La más reciente adición a esta lista es la familia denominada "Similar a ADPRibasa-Mn" (*ADPRibase-Mn-like*), que se creó basándose en dos aspectos: (i) la estructura tridimensional de una proteína del pez cebra *Danio rerio*, que fue seleccionada para su análisis estructural por el *Center for Eukaryotic Structural Genomics (University of Wisconsin, Madison)* como parte de un proyecto de determinación de estructuras proteicas a gran escala [34] y que se encuentra depositada en el *Protein Data Bank* con el código de acceso 2NXF [35]; (ii) la clonación molecular y caracterización funcional en nuestro laboratorio de la ADPRibasa-Mn de rata, que resultó ser el probable ortólogo de la proteína de pez cebra [4]. Las estructuras de estas proteínas, una experimental y la otra teórica, presentan las características generales de la superfamilia. Aunque no está totalmente claro qué metales ocupan el centro activo, algunos datos apuntan que podría ser Mn y Fe [35].

En la Figura 3 se presenta la estructura experimental de la ADPRibasa-Mn de pez cebra, en la que están presentes un ión fosfato en la hendidura que posiblemente alberga el centro activo y cuatro iones metálicos, identificados como zinc, dos de ellos en el centro activo con factores de ocupación elevados (80 %), y otros dos más alejados con factores de ocupación bajos (10-20 %). Por otra parte, en bases de datos como *ModBase* y *SWISS-MODEL Repository* están disponibles varios modelos teóricos de proteínas ortólogas de ADPRibasa-Mn basados en la estructura cristalográfica de la proteína de pez cebra. La estructura teórica correspondiente a la ADPRibasa-Mn de rata se presenta también en la Figura 3.

Partiendo de lo descrito arriba, nuestro trabajo sobre estas proteínas se dedicó en primer lugar a completar el estudio de la ADPRibasa-Mn de rata ya iniciado en nuestro laboratorio [4]. Para definir su centro activo, se aplicaron técnicas de simulación de unión (*docking*) de ADP-ribosa a la estructura teórica. Como consecuencia de estas simulaciones, descubrimos que la proteína podía unir también ADP-ribosa cíclica (cADPR) y demostramos experimentalmente que este compuesto es hidrolizado por la ADPRibasa-Mn de rata de una forma completamente novedosa para este conocido regulador del calcio. En una segunda fase de nuestro estudio de las proteínas ADPRibasa-Mn, nos centramos en la ADPRibasa-Mn de pez cebra, incluyendo estudios bioquímicos y de bioinformática estructural, que entre otras cosas nos condujeron a definir enzimáticamente la proteína como ADPRibasa-Mn, a encontrar otra nueva actividad de estas proteínas sobre AMP 2',3'-cíclico (2',3'-cAMP), y a delimitar diferencias importantes entre la ADPRibasa-Mn de pez cebra y la de rata respecto a sus respuestas al Mg²⁺ y a su capacidad para hidrolizar cADPR.

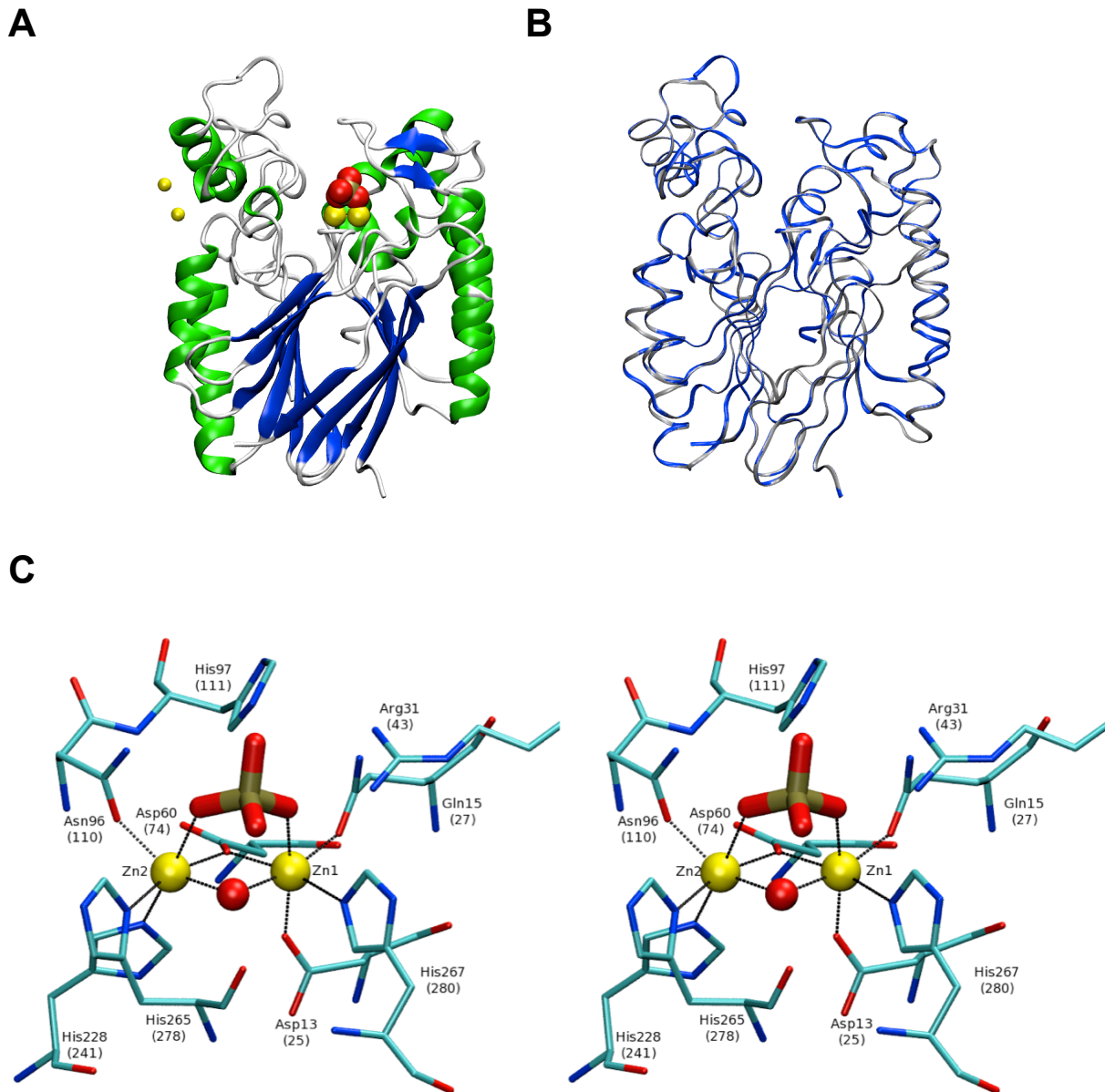


Figura 3: Estructura de la ADPRibasa-Mn. **A:** Estructura tridimensional, determinada por rayos X, de una proteína de 322 aa (PDB ID 2NXF; del pez cebra *Danio rerio*; contiene sólo los aa 16-322 [35]) cuya secuencia presenta un 51% de identidad con la ADPRibasa-Mn de rata. En la parte central se observa un conjunto de cuatro capas $\alpha/\beta/\beta/\alpha$, típico de metalofosfoesterasas, formado por dos hélices α (verdes), dos hojas plegadas β (azules) y otras dos hélices α . En la parte central superior aparecen dos iones que forman un centro dimetálico (esferas amarillas grandes), al cual está ligado una molécula de fosfato incluida en los cristales de proteína. A la izquierda aparecen otros dos iones metálicos detectados con un bajo factor de ocupación (esferas amarillas pequeñas). **B:** Modelo teórico de la ADPRibasa-Mn de rata (gris) tomado de *SWISS-MODEL Repository* (número de acceso Q5M886) y solapado con el modelo experimental de la proteína de *D. rerio* (azul). Nótese la gran similitud entre ambas estructuras. **C:** Imagen estereoscópica del centro activo de la proteína de pez cebra, evidenciando los dos iones metálicos (esferas amarillas) coordinados por residuos de proteína, un ión fosfato (en rojo y marrón) y una molécula de agua (esfera roja). Los residuos de proteína están coloreados por elemento: C, azul claro; N, azul oscuro; O, rojo. Todos los aminoácidos representados están conservados, en identidad y posición espacial, en la ADPRibasa-Mn de rata (los números entre paréntesis corresponden a la secuencia aminoacídica de esta última).

1.2 Resultados: ADPRibasa-Mn de rata

1.2.1 Definición del centro activo por simulación de la unión de ADP-ribosa a una estructura teórica de la ADPRibasa-Mn de rata

A la vista de las estructuras de las ADPRibasa-Mn de rata y de pez cebra, todo indicaba que el centro activo de la enzima debía ser una hendidura en cuyo fondo se ubican los iones del centro dimetálico y en la cual la proteína de pez cebra presenta unida una molécula de fosfato (Figura 3). Si esta suposición es cierta, en dicha hendidura debería poderse acomodar una molécula de sustrato. Para comprobarlo, utilizando el programa *AutoDock* [36], se simuló la unión de la ADP-ribosa a la estructura teórica de la ADPRibasa-Mn de rata (modelos preparados como se describe en las secciones 3.8.1 y 3.12) en una caja espacial que incluía dicha hendidura. De manera independiente, se obtuvieron 100 poses distintas de la ADP-ribosa dentro del espacio de búsqueda seleccionado (sección 3.9). Los resultados mostraron claramente que el sustrato encajaba en la hendidura de la ADPRibasa-Mn en cuyo fondo se encuentra el centro dimetálico. La Figura 4.ABC muestra distintas vistas de la pose energéticamente más favorable de la ADP-ribosa. El ligando está en una conformación relativamente extendida en forma de V, con el grupo pirofosfato cargado negativamente próximo al centro dimetálico positivo. El fosfato β de la ADP-ribosa se liga a los dos metales en puente bidentado, con los átomos de O del fosfato a 1,69 y 1,51 Å de Zn-1 y Zn-2, respectivamente. Esta forma de unión en puente bidentado es similar a la observada con el fosfato presente en la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn de *Danio rerio* [35], aunque las distancias en el modelo de *docking* a la ADPRibasa-Mn de rata son más cortas. Como se verá más adelante, esta diferencia puede deberse a que en el modelo teórico de la proteína de rata no se incluyó una molécula de agua que en la estructura cristalina de la proteína de *D. rerio* está coordinada con el núcleo dimetálico (ver sección 1.3.6). La identificación de residuos aminoacídicos que en el modelo de *docking* pueden interactuar con la ADP-ribosa se llevó a cabo analizando la estructura con los programas *LIGPLOT* [37] y *VMD* [38]. Esta cuestión se trata con detalle en la sección 1.2.5.

Es de notar que alguna de las 100 poses generadas por *AutoDock*, teniendo un nivel de energía más elevado (-9,00 kcal/mol) que la pose óptima (-10,13 kcal/mol), presentaba el ligando orientado "al revés" (Figura 4.D), es decir, con la mitad adenina ocupando una posición que en la pose de menor energía es ocupada por la ribosa-2. En esta pose "invertida", es el fosfato α el que se liga a los dos metales en puente bidentado con los átomos de O del fosfato. Este anclaje de la ADP-ribosa en dos orientaciones opuestas no es de extrañar, pues el fragmento ribosa-fosfato-fosfato-ribosa es simétrico en torno del O fosfoanhídrido. A falta de más datos, la naturaleza de la reacción catalizada por la ADPRibasa-Mn, en la que se hidroliza la unión fosfoanhídrido de ADP-ribosa, es posiblemente compatible con cualquiera de las dos poses.

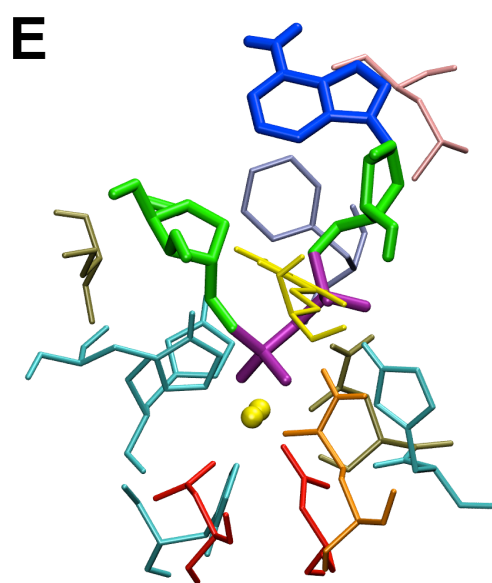
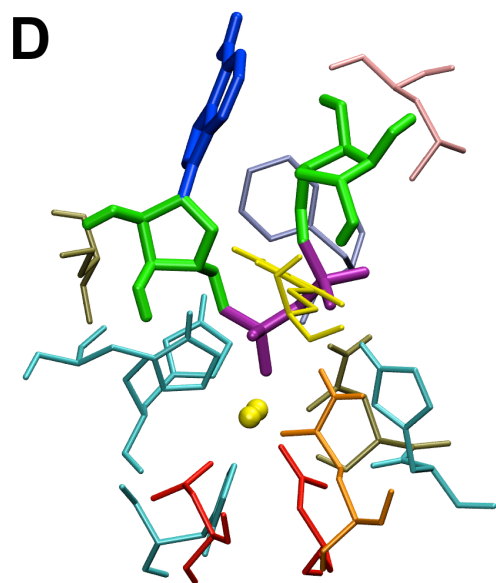
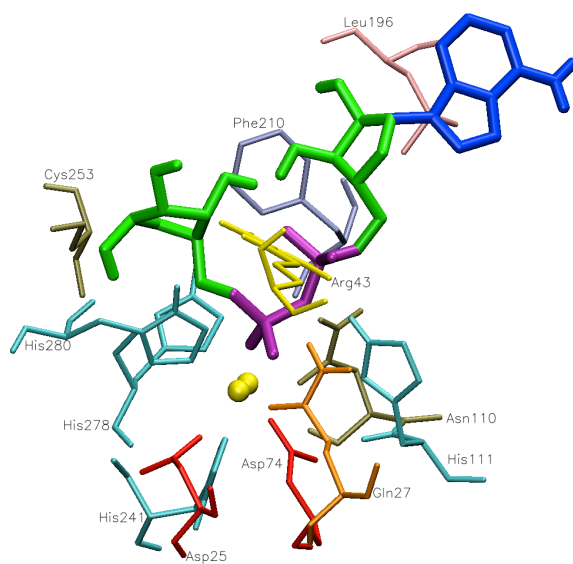
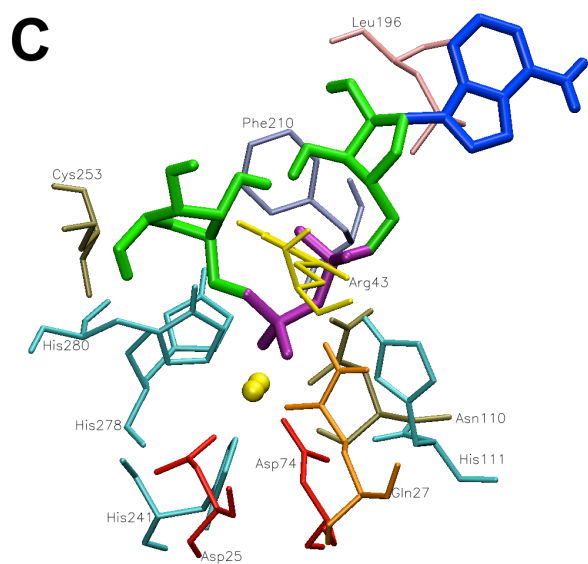
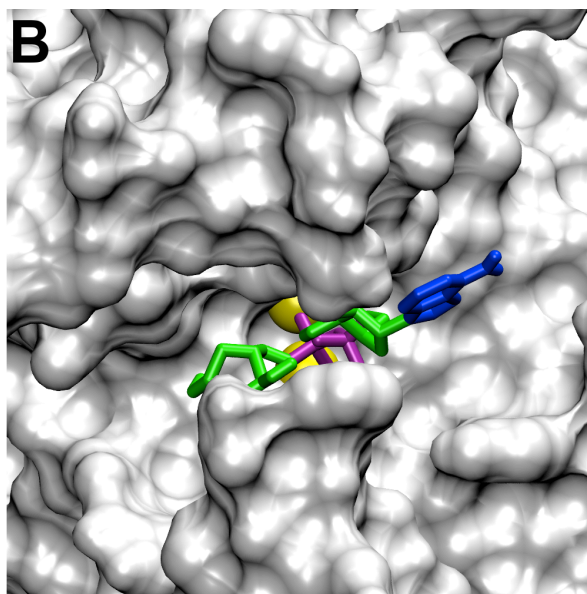
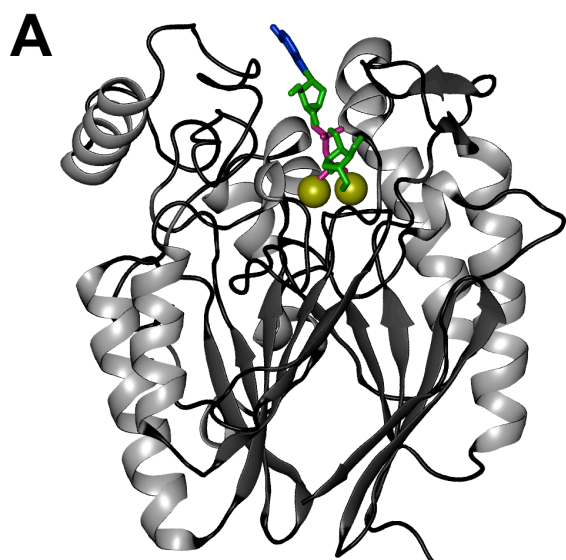


Figura 4: Modelos teóricos del complejo ADPRibasa-Mn(rata):ADP-ribosa. Los modelos se obtuvieron por simulación de *docking* empleando el programa *AutoDock*. Los dos iones del centro dimetálico se muestran como esferas amarillas y la ADP-ribosa se muestra en varillas gruesas de color azul (adenina), verde (ribosa-1 y ribosa-2, respectivamente proximal y distal respecto al grupo adenina en la ADP-ribosa) y magenta (pirofosfato). **A:** Vista general de la proteína con la ADP-ribosa unida en el sitio activo. **B:** Vista parcial de la superficie molecular de la proteína (vista desde arriba en A) mostrando la hendidura del sitio activo, con la ADP-ribosa y, al fondo, los dos iones metálicos. **C:** Vista estereoscópica de la mejor pose de ADP-ribosa obtenida por *docking*, con representación de los residuos que participan en la unión a los iones del centro dimetálico* o que interaccionan con el sustrato**. Además de las interacciones presentadas en esta figura, más adelante se presentan resultados obtenidos al analizar estos y otros modelos con el programa *VMD* (sección 1.2.5). **D y E:** Poses alternativas de la ADP-ribosa, en las que el sustrato se posiciona (D) con la orientación contraria que en ABC o (E) con la adenina por encima de la mitad pirofosfato y cerca de la ribosa-2, en una forma que recuerda lejanamente la estructura de cADPR y que condujo a la hipótesis de que éste compuesto podría encajar en el centro activo de la ADPRibasa-Mn (véase la Figura 5).

* Los iones metálicos aquí designados como Zn-1 y Zn-2 corresponden a los iones metálicos identificados en el PDB 2NXF de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* como Zn401 y Zn402, respectivamente. Zn-1 está coordinado con las cadenas laterales de Asp²⁵, Gln²⁷, Asp⁷⁴ e His²⁸⁰, y Zn-2 está coordinado con las cadenas laterales de Asp⁷⁴, Asn¹¹⁰, His²⁴¹ e His²⁷⁸, estando la cadena lateral de Asp⁷⁴ coordinada en puente con los dos metales por intermedio del mismo oxígeno carboxílico.

** Estos residuos fueron identificados [4] mediante el programa *LIGPLOT* [37]. Con este programa se detectaron puentes de hidrógeno del fosfato α (proximal respecto a la adenosina) con los aminoácidos Arg⁴³ e His¹¹¹, así como del oxígeno fosfoanhídrido con Asn¹¹⁰ e His¹¹¹. La interacción de His¹¹¹ por intermedio del hidrógeno H ϵ 2 simultáneamente con los oxígenos del fosfato α y fosfoanhídrido constituiría un ejemplo de un puente de hidrógeno bifurcado. El fosfato β (ligado a la ribosa-2) interacciona con los iones metálicos. También se detectaron contactos atómicos de los anillos de la ribosa-1 y de la ribosa-2 con Phe²¹⁰ y Cys²⁵³, respectivamente, y de la adenina con Leu¹⁹⁶. Todas estas interacciones fueron comprobadas al analizar el modelo estructural con el programa *VMD*. Con los criterios empleados al aplicar este programa no se pudo confirmar la formación del puente de hidrógeno del oxígeno fosfoanhídrido de la ADP-ribosa con His¹¹¹, ni tampoco los puentes de hidrógeno del fosfato β (distal respecto al grupo adenina) de la ADP-ribosa con los aminoácidos Gln²⁷, His²⁷⁸ y His²⁸⁰, todos ellos inicialmente indicados por *LIGPLOT*.

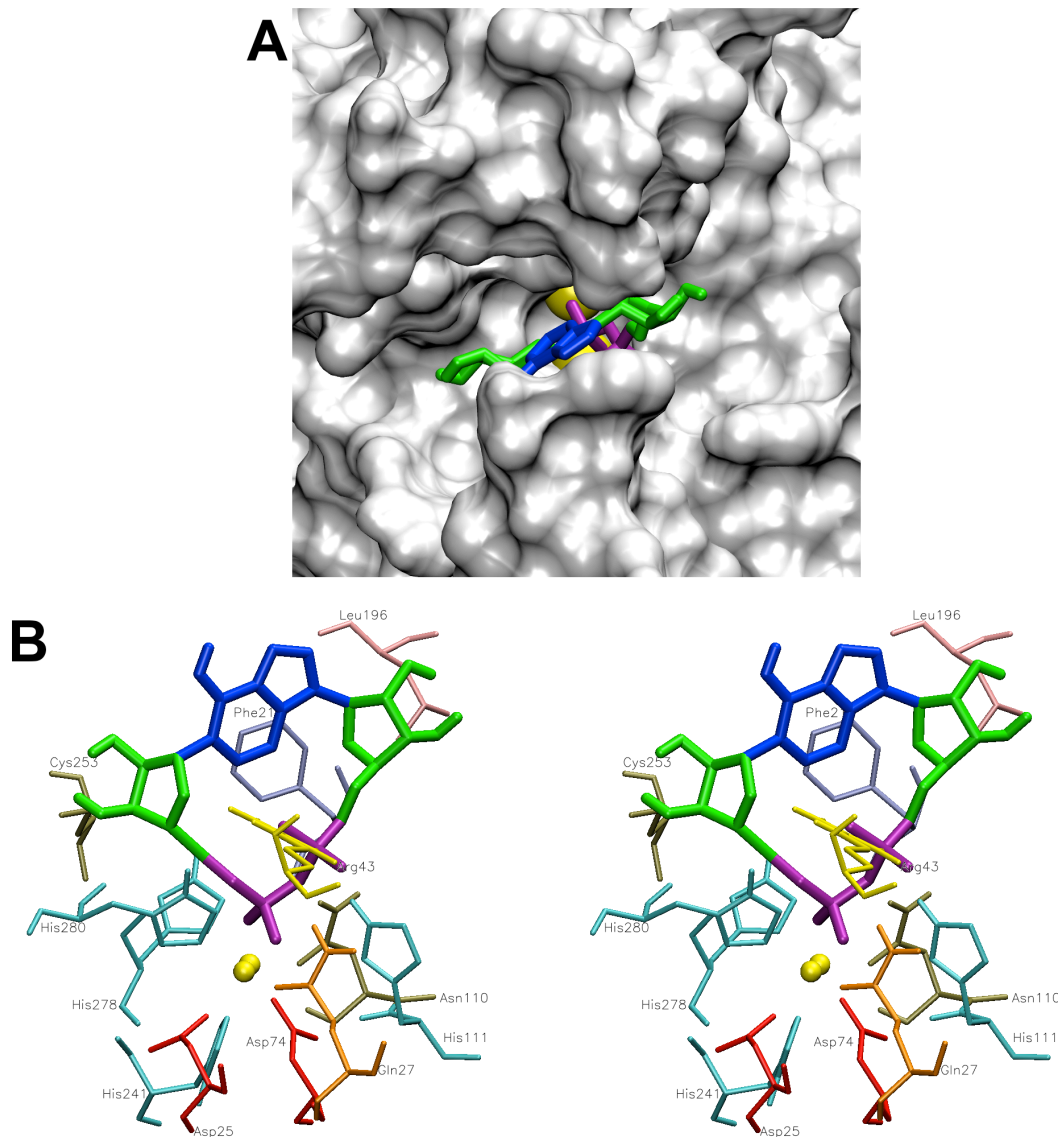


Figura 5: Modelo teórico del complejo ADPRibasa-Mn(rata):cADPR. El modelo se obtuvo por simulación de *docking* empleando el programa *AutoDock*. Los dos iones del centro dimetálico se muestran como esferas amarillas y la cADPR se muestra en varillas gruesas de color azul (adenina), verde (ribosa-1 y ribosa-2, enlazadas al grupo adenina por los nitrógenos N9 y N1, respectivamente) y magenta (pirofosfato). **A:** Vista parcial de la superficie molecular de la proteína (con el mismo punto de vista que la Figura 4.B). **B:** Vista estereoscópica de la mejor pose de cADPR obtenida por *docking*, con representación de los residuos que participan en la unión a los iones del centro dimetálico* o que interactúan con el sustrato**. Además de las interacciones presentadas en esta figura, más adelante se presentan resultados obtenidos al analizar estos y otros modelos con el programa *VMD* (sección 1.2.5).

* Véase la misma nota de la Figura 4.

** Estos residuos fueron identificados mediante el programa *LIGPLOT* [37]. El átomo de oxígeno fosfoanhídrido forma un puente de hidrógeno con el residuo Asn¹¹⁰. El fosfato α (ligado a la ribosa-1) establece puentes de hidrógeno con la cadena lateral de Arg⁴³. El fosfato β (ligado a la ribosa-2) interactúa con los iones metálicos. El anillo de la ribosa-1 mantiene contactos atómicos con los residuos Leu¹⁹⁶ y Phe²¹⁰, la adenina con Phe²¹⁰, mientras que la ribosa-2 está en contacto con la cadena lateral de Cys²⁵³. Además, aunque no se muestran en la figura, la adenina también establece contacto con Phe³⁷, y la ribosa-2 con Val²⁵². Por otra parte, *LIGPLOT* no detecta puentes de hidrógeno con His¹¹¹ ni contactos con Thr²⁷⁹, pero sí lo hace el programa *VMD*. Sin embargo, con este último programa no se pudo confirmar la formación de puentes de hidrógeno de cADPR con los aminoácidos His²⁷⁸ y His²⁸⁰, puentes que inicialmente habían sido indicados por *LIGPLOT*.

1.2.2 Identificación de cADPR como un ligando del centro activo de la ADPRibasa-Mn de rata

Entre las 100 poses generadas por *AutoDock* para la ADP-ribosa, se observó una, que tenía un nivel energético similar a las anteriores (-10,10 kcal/mol), y que resultó interesante porque nos hizo pensar en la posibilidad, hasta entonces no considerada, de que cADPR pudiera encajar en el centro activo de la ADPRibasa-Mn. Se trata de la pose mostrada en la Figura 4.E, en la que la ADP-ribosa aparece en una conformación casi circular, con la ribosa-2 de ADP-ribosa muy cerca de la adenina, de manera que recordaba la estructura de cADPR. Eso nos llevó a probar directamente el *docking* (sección 3.9) de cADPR frente a la ADPRibasa-Mn de rata (modelos preparados como se describe en las secciones 3.8.1 y 3.12), y a encontrar que efectivamente la molécula encajaba en el centro activo con el grupo pirofosfato cerca del centro dimetálico (Figura 5). De hecho, los grupos pirofosfato de la ADP-ribosa y de cADPR ocuparon posiciones muy similares. Al igual que en la pose óptima de la ADP-ribosa, el fosfato β de cADPR quedó coordinado con los dos metales en puente bidentado a distancias cortas (1,63 y 1,67 Å para Zn-1 y Zn-2, respectivamente). Mientras que las mitades adenosina y ribosa de la pose óptima de la ADP-ribosa se extienden hacia el exterior del bolsillo de unión en direcciones opuestas (Figura 4.BC), en la cADPR la adenina queda por encima del grupo pirofosfato, con los metales por debajo (Figura 5). La pose obtenida por *docking* sugirió inmediatamente que la cADPR unida a la ADPRibasa-Mn de rata podía representar un complejo enzima-sustrato. La identificación de residuos aminoacídicos que en el modelo de *docking* pueden interactuar con cADPR se llevó a cabo analizando la estructura con los programas *LIGPLOT* y *VMD*. Esta cuestión se trata con detalle en la sección 1.2.5.

1.2.3 Hidrólisis de la unión fosfoanhídrido de cADPR por la ADPRibasa-Mn de rata formando N^1 -(5-fosforribosil)-adenosina-5'-monofosfato o pRib-AMP como producto

Los resultados de las simulaciones de *docking* descritos en el apartado anterior nos llevaron directamente a investigar si cADPR era sustrato de la ADPRibasa-Mn. Para ello, analizamos por HPLC muestras de cADPR incubadas con ADPRibasa-Mn de rata en presencia de Mn^{2+} , encontrando que se formaba un compuesto distinto de cADPR, ADP-ribosa y AMP a juzgar por su tiempo de retención (Figura 6). Estos cromatogramas de HPLC se registraron simultáneamente a 260 nm y a 310 nm con una fase móvil ajustada a pH 8,5. A este valor de pH, la adenina absorbe fuertemente a 260 nm, pero prácticamente no absorbe a 310 nm, mientras que la adenina ribosilada en N^1 absorbe a las dos longitudes de onda [39,40,41]. El pico detectado a los 9 min en los cromatogramas presentaba las características espectroscópicas de la adenina ribosilada en N^1 , con un cociente A_{310}/A_{260} igual a 0,15, similar al de cADPR (Figura 7). Parecía por lo tanto que la ADPRibasa-Mn hidrolizaba la unión fosfoanhídrido de cADPR produciendo pRib-AMP (Figura 8). La identificación de este compuesto se hizo de la siguiente forma.

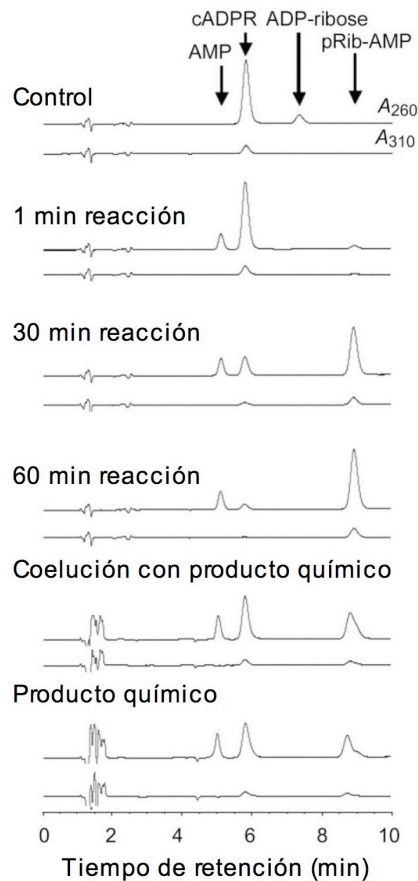


Figura 6: Conversión de cADPR en pRib-AMP por la ADPRibasa-Mn de rata. Una mezcla de reacción de ADPRibasa-Mn (10 µg/ml) con cADPR comercial 100 µM, que contenía un 18% de contaminación de ADP-ribose ("Control"), se incubó en las condiciones estándar de valoración (sección 3.7.1). Tras los tiempos de incubación señalados se tomaron muestras de 20 µl que se analizaron por HPLC (sección 3.6, método 4). Para identificar el producto formado como pRib-AMP (pico a los 8,8 min), otra muestra igual, que había incubado durante 75 min, se co-cromatografió en proporción 1:3 con cADPR hidrolizado químicamente por tratamiento con *tert*-butóxido en dimetilsulfóxido [41] para generar pRib-AMP (sección 3.1.4).

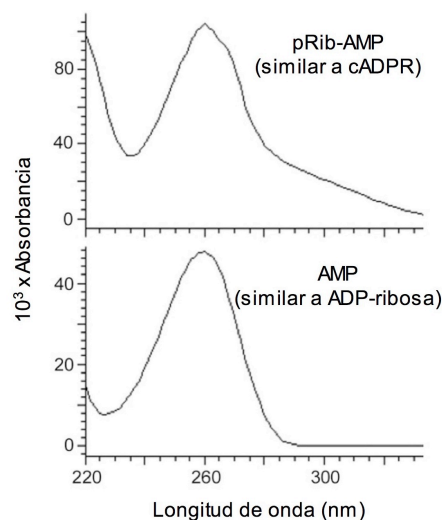


Figura 7: Espectro ultravioleta de pRib-AMP producido por la ADPRibasa-Mn. Los espectros de pRib-AMP, cADPR, AMP y ADP-ribose se registraron a pH 8,5, a partir de los picos correspondientes en la Figura 6, empleando un detector de diodos.

Es conocido que el pRib-AMP puede generarse químicamente a partir de cADPR por tratamiento con *tert*-butóxido en dimetilsulfóxido [41]. El pRib-AMP obtenido por este procedimiento coeluyó con el pico de tiempo de retención 9 min formado por la ADPRibasa-Mn (Figura 6).

cADPR es resistente a fosfatasa alcalina porque carece de fosfatos terminales, mientras que pRib-AMP contiene dos fosfatos teóricamente sensibles a la fosfomonoesterasa. La presencia de estos fosfatos terminales fue confirmada por medidas de P_i hechas después de tratar el supuesto producto enzimático pRib-AMP con fosfatasa alcalina: se detectaron $1,91 \pm 0,03$ mol ($n = 3$) de P_i por mol de cADPR hidrolizado por la ADPRibasa-Mn (al omitir el tratamiento con fosfatasa se detectaron sólo $0,13 \pm 0,04$ mol).

Es también conocido que la unión entre el grupo ribosilo y la posición N^1 de la adenina es termolábil y, en el caso de cADPR, se hidroliza a la temperatura de ebullición, formando ADP-ribosa [42]. Por lo tanto, era de esperar que el mismo tratamiento convirtiera pRib-AMP en una mezcla equimolar de ribosa-5-fosfato y AMP. Para demostrarlo, el producto enzimático se incubó 15 min en un baño en ebullición y la cantidad de ribosa-5-fosfato y AMP formados se midieron enzimáticamente, encontrando $1,00 \pm 0,04$ mol de D-ribosa-5-fosfato y $0,97 \pm 0,08$ mol de AMP ($n = 3$) por mol de cADPR hidrolizado por la ADPRibasa-Mn y después calentado.

Este conjunto de evidencias demuestra sin lugar a dudas que la ADPRibasa-Mn hidroliza la unión fosfoanhídrido de cADPR. Para comparar cuantitativamente esta actividad con la que la enzima tiene sobre otros sustratos, se estudió la cinética de saturación de la enzima por cADPR (0-1500 μ M) (Figura 9), midiendo para ello la velocidad inicial de acumulación del producto pRib-AMP por HPLC. Este experimento dio un valor de k_{cat} $0,87 \pm 0,04$ s^{-1} y un valor de K_M 170 μ M. La eficacia catalítica o constante de especificidad resultante (k_{cat}/K_M) fue por tanto alrededor de 5100 $M^{-1}s^{-1}$, 65 veces menor que la correspondiente a la hidrólisis de ADP-ribosa [4]. Para ver los detalles de esta comparación, puede consultarse más adelante la Tabla 1.

1.2.4 Exploración del comportamiento del centro activo de la ADPRibasa-Mn de rata por simulaciones de la dinámica de la proteína y sus complejos con ADP-ribosa y cADPR

Estas simulaciones dinámicas se hicieron como complemento de las simulaciones de *docking* que habían conducido a los modelos mostrados en la Figura 4 y Figura 5. En los cálculos de *docking* hechos con *AutoDock*, las proteínas son tratadas como moléculas rígidas y sólo se permite flexibilidad en la molécula de ligando. En las simulaciones dinámicas, tanto la proteína como el ligando son tratados como estructuras flexibles, no rígidas. Obviamente, las proteínas en disolución tienen un importante grado de flexibilidad que puede dar lugar a fenómenos como el clásico ajuste inducido que puede producirse en las proteínas enzimáticas al unirse al sustrato. Los modelos de la Figura 4.B y Figura 5.A presentan imágenes de los complejos ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa y ADPRibasa-Mn:cADPR en los que el sustrato aparece incluido en una forma proteica cerrada que parece poco probable que corresponda a la conformación en la que se encuentra el centro activo inmediatamente antes de la entrada del sustrato. Hay que tener en cuenta que la estructura teórica de la ADPRibasa-Mn de rata está modelada a partir de la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn de pez cebra. Nada obliga a

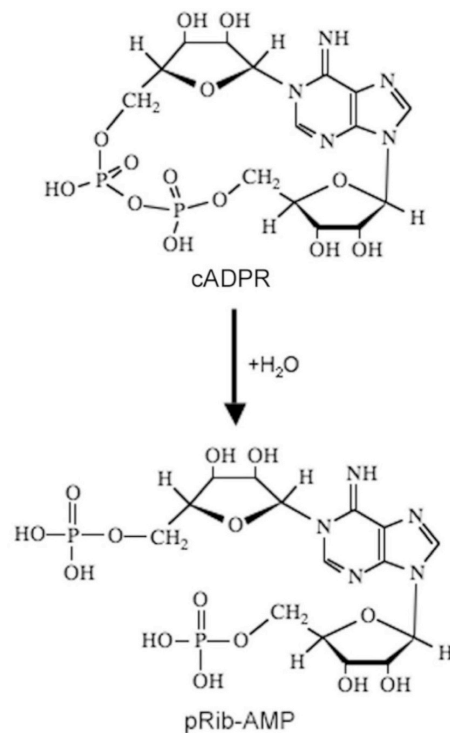


Figura 8: Hidrólisis de la unión fosfoanhídrido de cADPR por la ADPRibasa-Mn para generar pRib-AMP. Este patrón fosfohidrolítico de reacción y la identificación del producto como pRib-AMP está apoyado por la demostración de que (i) el producto generado por la enzima contenía dos grupos fosfato liberables por fosfatasa alcalina, frente a ninguno del sustrato cADPR, (ii) el espectro ultravioleta del producto a pH 8,5 era igual que el de cADPR, incluyendo un hombro a 300 nm, típico de la unión N^1 -glicosídica con la base adenina, (iii) la incubación del producto en un baño de agua hirviendo durante 15 min lo convirtió en AMP y D-ribosa-5-fosfato (valorados enzimáticamente; sección 3.7.4).

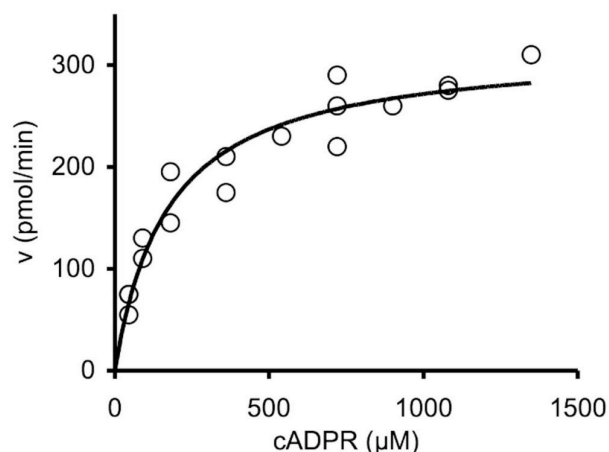


Figura 9: Cinética de saturación de la actividad cADPR fosfohidrolasa de la ADPRibasa-Mn de rata. Se prepararon y analizaron mezclas de reacción que contenían $MnCl_2$ 100 μM , concentraciones variables de cADPR y una cantidad de ADPRibasa-Mn apropiada para obtener velocidades de hidrólisis de cADPR lineales respecto a la cantidad de enzima y al tiempo de incubación. Los análisis se hicieron por HPLC, midiendo la formación del producto pRib-AMP (sección 3.7.1). Las velocidades iniciales de reacción se dan en términos de sustrato hidrolizado. La ecuación de Michaelis-Menten se ajustó a los puntos experimentales por regresión no lineal. Los resultados representados son la combinación de dos experimentos independientes ajustados conjuntamente.

pensar que la proteína hubiera cristalizado con el centro activo en su forma abierta, particularmente teniendo en cuenta que en dichos cristales el centro activo tiene unida una molécula de fosfato que posiblemente imita, de manera parcial, la unión de sustrato. Los modelos de la Figuras 4.B y 5.A pueden ser conformaciones cerradas, y una simulación dinámica podría dar alguna luz teórica sobre conformaciones alternativas del centro activo.

Por otra parte, los cálculos de *docking* permiten explorar amplios espacios conformacionales a costa de emplear un modelo muy simplificado de las interacciones proteína-ligando. En estas circunstancias, a veces, pueden originarse complejos que en realidad son inestables. Esto puede dar lugar a trayectorias de dinámica en las que se produce la disociación del complejo [43]. En los complejos de las Figuras 4 y 5, la interacción electrostática entre los iones metálicos y el grupo pirofosfato de los sustratos probados es muy favorable y no parecía probable que se diera la disociación del complejo, pero en cualquier caso las simulaciones dinámicas servían también para poner a prueba esta posibilidad.

Teniendo en cuenta las razones anteriores, se hicieron simulaciones de 25 ns de dinámica molecular en solvente explícito (sección 3.10.1), partiendo de los mejores complejos ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa (Figura 4.ABC) y ADPRibasa-Mn:cADPR (Figura 5). También se hizo como control una simulación dinámica partiendo de la ADPRibasa-Mn de rata sin ligando (Figura 3.B). Todos los modelos fueron preparados como se describe en la sección 3.10.1. En el suplemento CD-ROM se presentan completas las tres simulaciones dinámicas: sin ligando (Vídeo 1), con ADP-ribosa (Vídeo 2) y con cADPR (Vídeo 3).

En la Figura 10 se presentan diversos análisis de las trayectorias dinámicas obtenidas. En la Figura 10.A se resumen visualmente las fluctuaciones de la proteína, mediante la superposición de fotogramas a intervalos de 1 ns. En la Figura 10.B se cuantifican, en forma de RMSFs, las fluctuaciones experimentadas por cada $C\alpha$ de la proteína respecto a su posición media durante la correspondiente simulación tras eliminar los movimientos de traslación e rotación³. Al hacer estas representaciones se observó que, en las tres simulaciones, el núcleo central de la proteína se mantenía relativamente estable a lo largo del tiempo simulado (Figura 10.A), y que las partes proteicas con mayores fluctuaciones eran, con alguna excepción, regiones sin estructura secundaria, correspondientes a lazos intermedios entre hélices α o láminas β (Figura 10.B). Respecto a la distribución de las fluctuaciones por regiones de la proteína, en ausencia de ligando se observaron cinco regiones de mayor movilidad (coloreadas en rojo): dos zonas que flanquean la boca del centro activo (aa 34-41 y 201-205) y otras tres que se encuentran en la parte opuesta de la proteína (aa 1-15, 62-66 y 336-337). Las regiones aa 34-41, 62-66 y 201-205 presentaron una movilidad disminuida en presencia de sustrato, mientras que la región aa 1-15 presentó en tales condiciones mayor movilidad. A este respecto, debe tenerse en cuenta que el segmento aa 1-15 estaba ausente en el modelo de la ADPRibasa-Mn de rata construido por homología y fue añadido con el programa *Modeller* [44] (sección 3.10.1). Su comportamiento en la simulación dinámica debe pues considerarse con especial precaución.

³ Para eliminar los efectos de los movimientos de traslación y rotación de la molécula, antes de calcular el RMSF (*root mean square fluctuation*) las conformaciones obtenidas durante la trayectoria son alineadas con la conformación inicial, utilizando como referencia los $C\alpha$ peptídicos. La RMSF mide entonces las fluctuaciones de la posición (v) de cada átomo en torno a sus posiciones medias (\bar{v}) a lo largo del tiempo T y se calcula

$$\text{mediante la expresión } RMSF = \frac{1}{T} \sqrt{\sum_{t=1}^T (v_t - \bar{v})^2} .$$

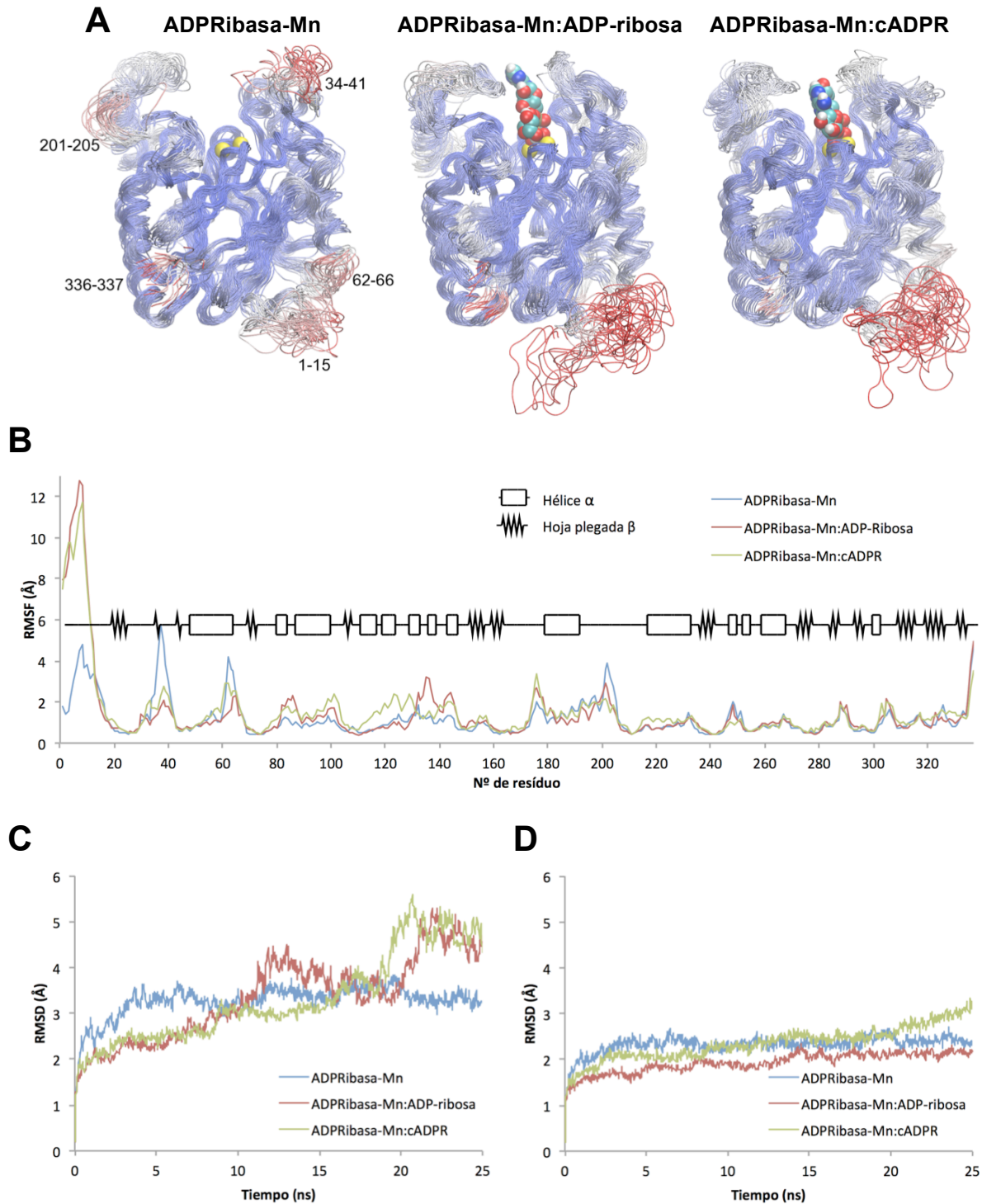


Figura 10: Dinámica molecular de ADPRibasa-Mn de rata y sus complejos ADPRibasa-Mn:ADP-ribose y ADPRibasa-Mn:cADPR. Las simulaciones se hicieron como se explica en la sección 3.10.1. Se presentan en forma animada en los Vídeos 1-3 (CD-ROM suplementario) y en las Figuras 10-18 se analizan distintos aspectos. **A:** Resumen estático de las trayectorias dinámicas por superposición de 26 fotogramas a intervalos de 1 ns. El esqueleto proteico se representa como un fino tubo, coloreado según las fluctuaciones de los $C\alpha$, de azul (0 Å) a rojo (5 Å). Los números señalan las regiones aminoacídicas más móviles de la proteína. Los modelos atómicos esféricos muestran los metales y los ligandos en su estado inicial (los movimientos de los ligandos se resumen en la Figura 11). **B:** Fluctuación de los $C\alpha$ en torno a su posiciones medias, expresada en forma de RMSF*. **C:** Divergencia de los $C\alpha$ respecto a su posición inicial, expresada en forma de RMSD* frente al tiempo, calculado con todos los $C\alpha$. **D:** Como en C, pero excluyendo los trozos de mayor movilidad identificados en A.

*Ver definiciones en las notas 3 y 4 al pie de las páginas 17 y 19.

Otro aspecto general de los cambios sufridos por las estructuras proteicas durante las simulaciones es su divergencia respecto a la estructura de partida. Esto se cuantificó midiendo la variación de RMSD⁴ durante las trayectorias dinámicas, teniendo en cuenta todos los C α y tomando como referencia sus posiciones iniciales (Figura 10.C). En los tres sistemas simulados, las gráficas parten de un RMSD de cerca de 0,20 Å, que corresponde a la diferencia entre la estructura utilizada como referencia, obtenida en la minimización de energía, y la estructura de partida de la simulación, obtenida al terminar la fase de equilibrado (sección 3.10.1). En las tres simulaciones, hubo un aumento rápido de la RMSD en los primeros 0,2 ns, hasta 1,6-1,7 Å, que es el resultado de suprimir las restricciones en las posiciones de los átomos de la proteína. Después de este tiempo, la ADPRibasa-Mn desprovista de ligando, experimentó una divergencia más rápida en los primeros 4 ns que los sistemas con sustrato, para mantener un valor de RMSD relativamente estable durante el resto de la trayectoria (~3,4 Å en el periodo 5-25 ns). Los dos otros sistemas alcanzaron, de manera progresiva, valores más altos de RMSD: en la ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa, la RMSD subió hasta 5,30 Å a los 22,2 ns de tiempo simulado y en la ADPRibasa-Mn:cADPR hasta 5,61 Å a los 20,7 ns. (Figura 10.C). Estos aumentos de la RMSD en los complejos enzima-sustrato no se deben a cambios generalizados de la estructura, sino a regiones particulares de la proteína. Al excluir del análisis las zonas más móviles (Figura 10.D), los tres sistemas convergieron hacia una meseta con valores de RMSD similares: los promedios de la RMSD en el periodo 5-25 ns fueron 2,7, 2,2 y 2,6 Å para ADPRibasa-Mn, ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa y ADPRibasa-Mn:cADPR, respectivamente.

En las simulaciones con ligandos, estos permanecieron en el sitio activo durante toda la simulación, aunque presentaron alguna movilidad (Figura 11). En el caso de la ADP-ribosa (Figura 11.A), el grupo pirofosfato ocupó aproximadamente la misma posición a lo largo de toda la simulación. Las ribosas presentaron mayor movilidad, pero los movimientos más significativos correspondieron a la adenina, que durante la simulación exploró amplias regiones del espacio, llegando incluso a girar 180° alrededor del enlace glicosídico. Al final de la simulación dinámica, la ADP-ribosa se encontraba en una conformación más extendida que la original. En ningún momento, la ADP-ribosa se acercó a posiciones próximas a las dos poses alternativas mostradas en la Figura 4.DE. En la simulación con cADPR (Figura 11.B), el fosfato β permaneció ligado a los metales en la misma posición durante todo el tiempo, y en general este ligando exploró un espacio más restringido que la ADP-ribosa. No obstante, la cADPR sufrió diversos cambios de conformación a lo largo de la simulación. Alrededor de los 12,5 ns, se produjo una torsión de cerca de 60° sobre el fosfato β . Este cambio conformacional del ligando fue acompañado por movimientos de la proteína, en los que participaron esencialmente aminoácidos de los lazos 34-41 y 195-198, que dieron lugar a una apertura del sitio activo (Figura 12.B). Esta apertura fue mucho más limitada en la simulación con ADP-ribosa (Figura 12.C), pero se produjo también claramente en la simulación realizada sin ligando (Figura 12.A), y podría corresponder a la transición del centro activo a una conformación abierta, que permitiría la entrada del sustrato.

⁴ Para eliminar los efectos de los movimientos de traslación y rotación de la molécula, antes de calcular el RMSD (*root mean square deviation*), las conformaciones obtenidas durante la trayectoria (v) son alineadas con la conformación inicial (w), utilizando como referencia los C α peptídicos. La RMSD cuantifica la desviación entre las dos estructuras v y w , calculada para N átomos de la estructura v y los N átomos correspondientes a la

$$\text{estructura } w \text{ mediante la expresión } RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \|v_i - w_i\|^2}{N}} .$$

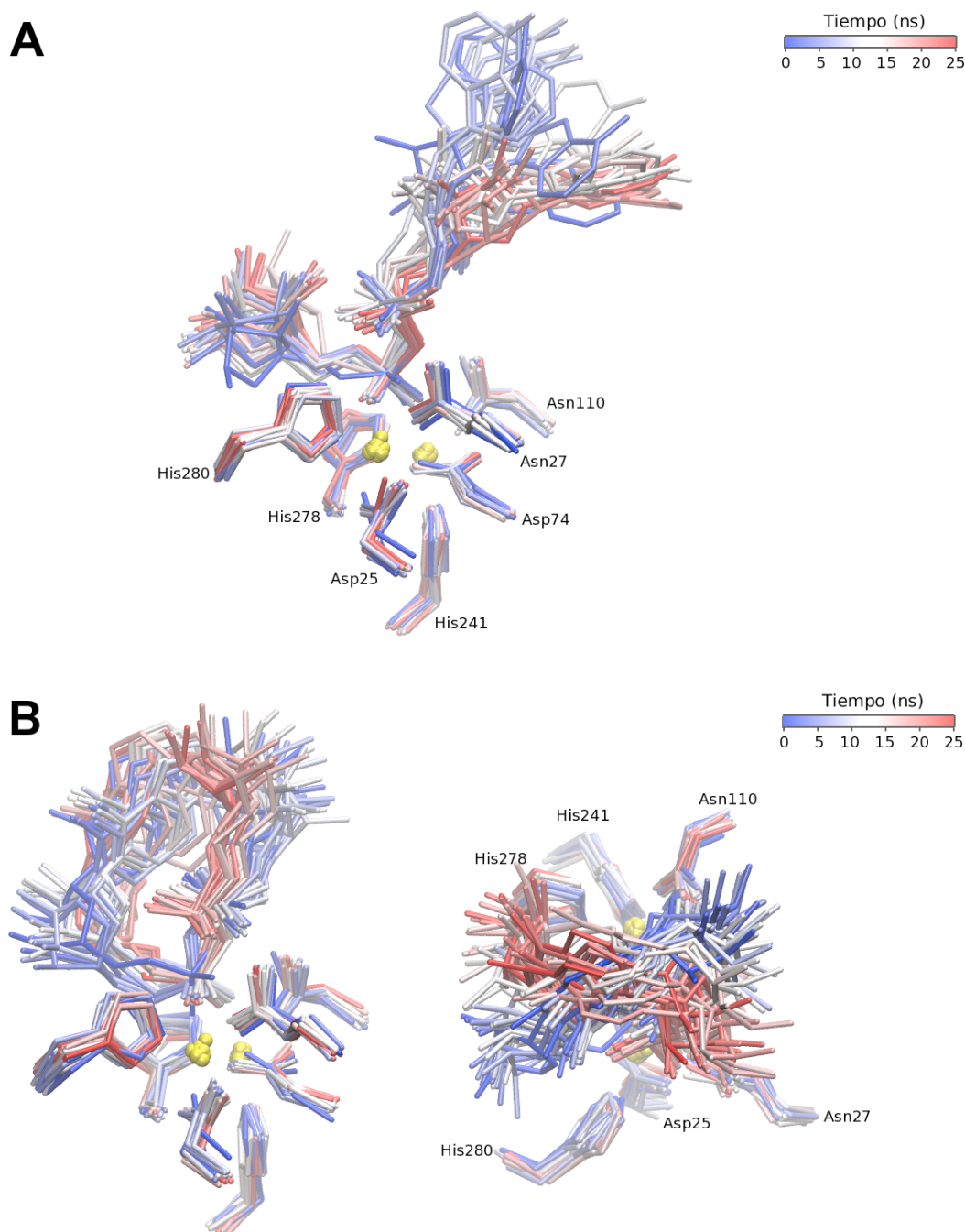


Figura 11: Dinámica molecular de los ligandos ADP-ribosa y cADPR en sus complejos con ADPRibasa-Mn de rata. Los datos corresponden a las mismas simulaciones de la Figura 10 y resumen de forma estática las trayectorias dinámicas de los complejos con **A:** ADP-ribosa o **B:** cADPR (este último representado desde dos puntos de vista diferentes). Además del ligando, se representan los iones del centro dimetálico (amarillo) y los aminoácidos que se unen a ellos. Estos aminoácidos y los ligandos ADP-ribosa y cADPR están coloreados de azul a rojo en función del tiempo de simulación transcurrido. Esto permite observar, en la parte derecha del panel B, la torsión de 60° que experimenta cADPR dentro del centro activo, a partir de los 12,5 ns de simulación.

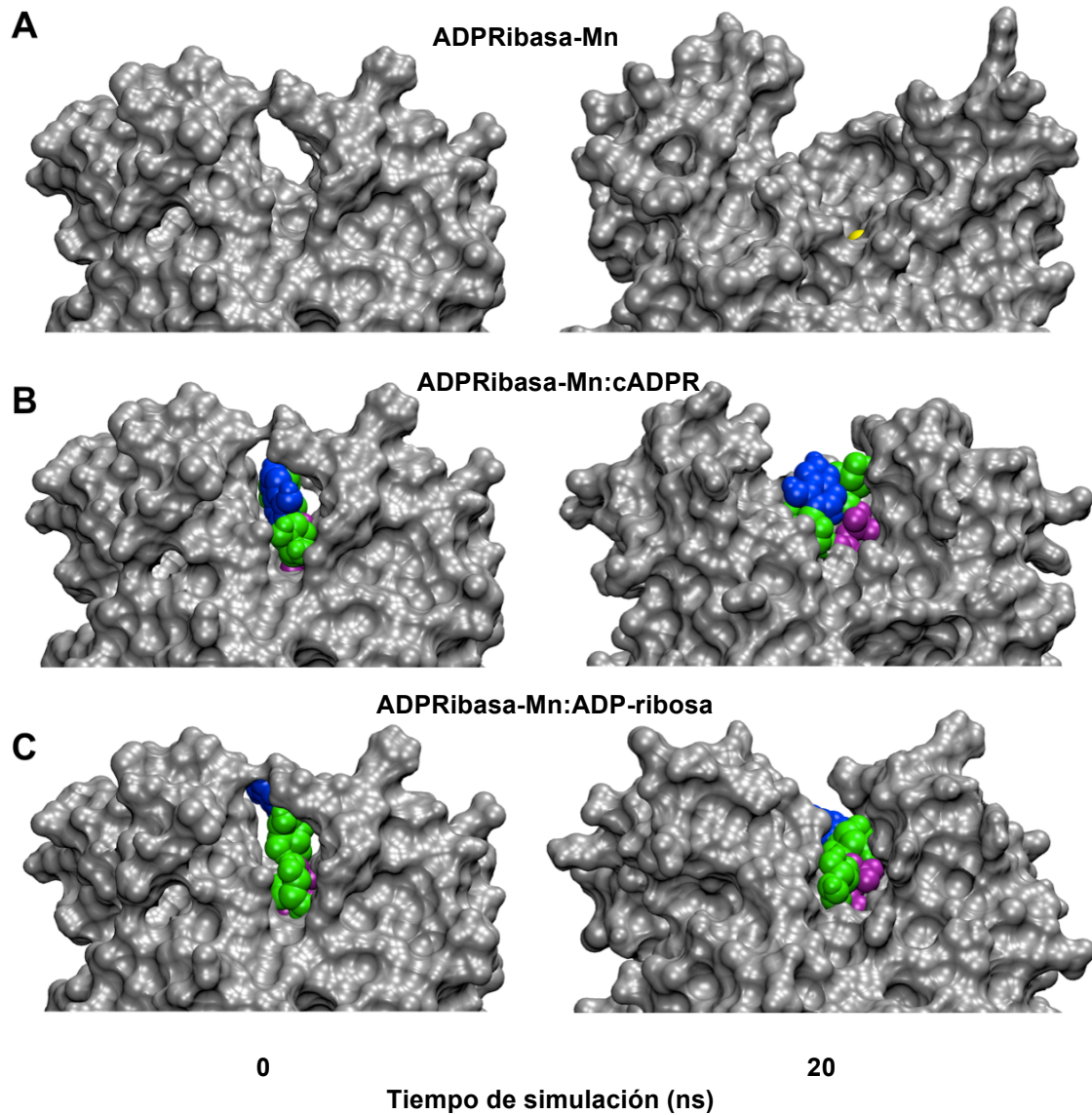


Figura 12: Observación de una transición del centro activo de la ADPRibasa-Mn de rata de una forma cerrada a una forma abierta en la proteína libre o en complejo con cADPR, pero no en complejo con ADP-ribosa. Las imágenes están tomadas de las mismas simulaciones analizadas en la Figura 10 y, en el caso de los complejos con ligando, también en la Figura 11. Para cada una de las tres formas proteicas analizadas dinámicamente, se muestran las estructuras existentes al comienzo y a los 20 ns de simulación, antes y después de que la transición hubiera tenido lugar.

1.2.5 Interacciones observadas en las simulaciones de *docking* y de dinámica molecular entre los sustratos ADP-ribosa o cADPR y aminoácidos de la proteína ADPRibasa-Mn de rata

Mediante las simulaciones de *docking* antes descritas, se obtuvieron modelos de ADP-ribosa y cADPR unidos al centro activo de la ADPRibasa-Mn de rata (Figuras 4-5). El análisis inicial de estos modelos con el programa *LIGPLOT* dio información sobre posibles interacciones de los sustratos con algunos residuos aminoacídicos. Como ya se ha explicado en los textos de las Figuras 4 y 5, la mayor parte de aquellas interacciones, pero no todas, fueron confirmadas por análisis posteriores con el programa *VMD*, hechos al mismo tiempo que se analizaban los resultados obtenidos por simulaciones de la dinámica molecular de los mismos complejos (Figuras 10-18; sección 1.2.4; Vídeos 2-3 en el suplemento CD-ROM). Como era de esperar, las simulaciones dinámicas produjeron cambios respecto a las interacciones proteína-ligando detectadas en los modelos de *docking*. Para valorar las diferencias observadas, debe tenerse en cuenta que los dos tipos de simulación responden a situaciones diferentes, y cada una de ellas tiene distintas limitaciones: el *docking* se lleva a cabo con una estructura proteica rígida que no admite adaptaciones; la dinámica molecular permite flexibilidad en la proteína pero puede producir alteraciones no realistas en las esferas de coordinación de los iones metálicos del centro dinuclear. Así pues, estos dos enfoques deben considerarse complementarios, y no tomarse como concluyentes, sino como punto de partida para establecer hipótesis que podrán ponerse a prueba mediante mutagénesis dirigida. Las interacciones encontradas con el programa *VMD* entre la proteína y la ADP-ribosa se resumen en las Figuras 13 y 14, y aquellas establecidas con cADPR en la Figuras 15 y 16.

Los posibles puentes de hidrógeno de tipo donador-H...aceptor (d-H...a) (Figuras 13.A y 15.A) se identificaron sistemáticamente, aplicando el criterio de que cualquier grupo "d-H" o átomo "a" del sustrato debía localizarse respecto a su respectivo "a" o "d-H" proteico de manera que la distancia d-a fuese $\leq 3,5 \text{ \AA}$ y el ángulo d-H-a fuese $\geq 140^\circ$. Para ello, como posibles átomos "d" y "a" se consideraron todos los átomos polares del sustrato y la proteína. En las Figuras 13.C y 15.C se representan los puentes de hidrógeno encontrados en el modelo de *docking* y/o aquellos que aparecían en $\geq 5\%$ de los 25000 fotogramas obtenidos durante las simulaciones dinámicas.

Por otra parte, se identificaron todas las posibilidades de contacto atómico (Figuras 14.A y 16.A) buscando de forma sistemática, con el programa *VMD*, distancias $\leq 4,2 \text{ \AA}$ entre átomos de la proteína y del sustrato (excluyendo para ello los átomos de hidrógeno). Entre estos posibles contactos estaban incluidos, por supuesto, los anteriores puentes de hidrógeno. En las Figuras 14.B y 16.B se representan los contactos encontrados en el modelo de *docking* y/o aquellos que aparecían en $\geq 30\%$ de los 25000 fotogramas tomados durante las simulaciones dinámicas sin que pudieran justificarse por la existencia de algún puente de hidrógeno. Hay que destacar que varias de las posibilidades de contacto encontradas siguiendo estos criterios corresponden a aminoácidos que están unidos a los iones del centro dimetálico y por ello quedan a una distancia $\leq 4,2 \text{ \AA}$ de algún átomo del sustrato. Hemos preferido no conceder importancia a estos posibles contactos, salvo en los casos en que la interacción que se detecta es un puente de hidrógeno. Por ello, en el párrafo siguiente no se mencionan los aminoácidos Asp²⁵, Asp⁷⁴, His²⁴¹, His²⁷⁸ e His²⁸⁰, a pesar de su proximidad al sustrato.

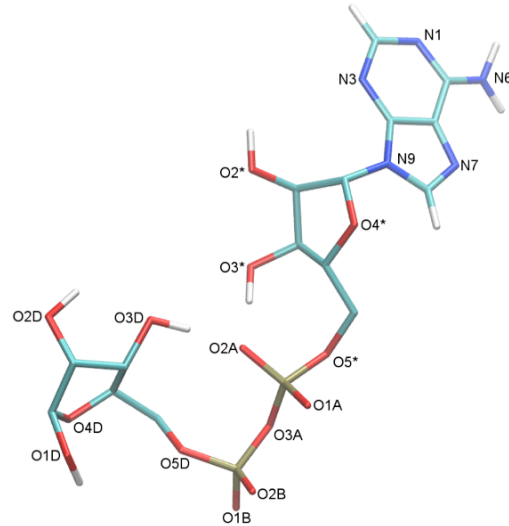
Conforme a los criterios mencionados, en el complejo obtenido por *docking* de ADP-ribosa a la ADPRibasa-Mn de rata se detectaron puentes de hidrógeno potenciales, entre la enzima y el sustrato, con los aminoácidos Arg⁴³, Asn¹¹⁰ e His¹¹¹ (Figuras 4.C y 13.C). Además, se detectaron otros tipos de interacciones de la ADP-ribosa con diversos aminoácidos (Figuras 4.C y 14.B), incluyendo una interacción electrostática favorable del grupo pirofosfato con Arg⁴³, y contactos de van der Waals de la ribosa-1 con Leu¹⁹⁶ y Phe²¹⁰, la adenina con Leu¹⁹⁶, y la ribosa-2 con Cys²⁵³. Algunas de estas interacciones, como los puentes de hidrógeno de Asn¹¹⁰ e His¹¹¹, se mantuvieron de forma más o menos constante durante la simulación dinámica, aunque mostraron cambios entre distintos átomos aceptores en la molécula de sustrato. En cambio, el puente de hidrógeno de Arg⁴³ desapareció casi por completo durante la primera mitad de la trayectoria dinámica, para volver a detectar en la segunda, aunque con un átomo aceptor diferente (Figura 13.C). También se mantuvieron bastante estables, durante la simulación dinámica, la interacción electrostática de Arg⁴³ y los contactos establecidos por Leu¹⁹⁶, Phe²¹⁰ y Cys²⁵³ (Figura 14.B). Por otra parte, durante la simulación dinámica surgieron algunas interacciones no detectadas al analizar el modelo de *docking*. Por ejemplo, puentes de hidrógeno con los residuos Gln²⁷, Gln³⁸, Tyr⁷⁹, Tyr¹¹⁴, Glu¹⁹⁵, Leu¹⁹⁶, Gln²⁰⁹, Asp²⁵⁰ y Thr²⁷⁹ (Figura 13.C), así como algunos contactos de otro tipo, entre los que destacan interacciones de tipo hidrofóbico con los aminoácidos aromáticos Phe³⁷, Tyr⁷⁹ y Tyr¹¹⁴ (Figura 14.B). En distintos momentos de la trayectoria dinámica, estos aminoácidos aromáticos formaron apilamientos con los anillos de adenina de la ADP-ribosa. En la Figura 17 se presenta una selección de imágenes, correspondientes a distintos momentos de dicha trayectoria, que ilustran algunas de tales interacciones.

Respecto al complejo obtenido por *docking* de cADPR a la ADPRibasa-Mn de rata, se detectaron puentes de hidrógeno con los mismos aminoácidos observados en el complejo con ADP-ribosa: Arg⁴³, Asn¹¹⁰ e His¹¹¹ (Figuras 5 y 15.C). Además se detectaron interacciones de otros tipos, de cADPR con diversos aminoácidos (Figuras 5 y 16.B), incluyendo la interacción electrostática del grupo pirofosfato con Arg⁴³, y contactos de van der Waals de la ribosa-1 con Leu¹⁹⁶ y Phe²¹⁰, la adenina con Phe³⁷ y Phe²¹⁰ y ribosa-2 con Val²⁵² y Cys²⁵³. Algunas de estas interacciones, como los puentes de hidrógeno de Arg⁴³, Asn¹¹⁰ e His¹¹¹, se mantuvieron de forma más o menos constante durante la simulación dinámica, aunque mostraron cambios entre distintos átomos aceptores en la molécula de sustrato (Figura 15.C). También se mantuvieron bastante estables, durante la simulación dinámica, la interacción electrostática de Arg⁴³ y los contactos establecidos por Phe²¹⁰ y Cys²⁵³, y en menor grado Leu¹⁹⁶ (Figura 16.B). Por otra parte, al igual que ocurrió con el complejo de ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa, durante la simulación surgieron algunas interacciones entre cADPR y aminoácidos, que no se detectaban en el complejo de *docking* (Figura 18). Esto incluye un puente de hidrógeno de Gln²⁷ con un oxígeno del fosfato α , que se mantuvo durante toda la simulación; diversos puentes de hidrógeno establecidos por Gln³⁸ como donador o aceptor, y de Asp²⁵⁰ como aceptor de un grupo OH de la ribosa-2, que se mantuvieron parcialmente durante la simulación; así como un contacto de Phe³⁷ con la adenina (Figura 15.C). También es de destacar que, en algunos momentos de la simulación dinámica, el contacto de Phe²¹⁰ con la adenina llegó a convertirse en un claro apilamiento hidrofóbico de ambos sistemas de anillos (Figura 18.F).

A

| Donador | Aceptor | Ocupación (%) | Donador | Aceptor | Ocupación (%) |
|--|------------------|---------------|---|------------------|---------------|
| <i>Grupo: adenina (Ade)</i> | | | <i>Grupo: pirofosfato</i> | | |
| Ade-N6 | Gln38-OE | 0,01 | Gln27-NE2 | pp-O5* | 0,04 |
| Ade-N6 | Gly78-O | 2,51 | Arg43-NH | pp-O5* | 1,46 |
| Ade-N6 | Tyr79-N | 0,01 | His111-NE2 | pp-O5* | 15,60 |
| Ade-N6 | Tyr79-OH | 11,35 | Tyr114-OH | pp-O5* | 0,97 |
| Ade-N6 | Gln82-NE2 | 0,05 | Gln27-NE2 | pp-O1A | 64,99 |
| Ade-N6 | Gln82-OE | 6,32 | Arg43-NH | pp-O1A | 0,83 |
| Ade-N6 | Glu195-OE | 14,95 | Arg43-NE | pp-O1A | 0,00 |
| Ade-N6 | Gln209-NE2 | 0,01 | His111-NE2 | pp-O1A | 54,53 |
| Gln38-NE2 | Ade-N1 | 0,16 | Arg43-NH | pp-O2A | 1,94 |
| Tyr79-OH | Ade-N1 | 0,04 | Gln27-NE2 | pp-O2A | 9,77 |
| Gln82-NE2 | Ade-N1 | 0,52 | Gln27-NE2 | pp-O3A | 0,10 |
| Gln38-NE2 | Ade-N3 | 1,74 | Asn110-ND2 | pp-O3A | 9,54 |
| Tyr79-OH | Ade-N3 | 0,01 | His111-NE2 | pp-O3A | 19,33 |
| Asn197-ND2 | Ade-N3 | 1,70 | Asn110-ND2 | pp-O1B | 26,23 |
| Gln38-NE2 | Ade-N6 | 0,06 | His111-NE2 | pp-O2B | 0,10 |
| Gln82-NE2 | Ade-N6 | 0,14 | | | |
| Gln38-NE2 | Ade-N7 | 0,74 | | | |
| Tyr79-OH | Ade-N7 | 20,57 | | | |
| Gln82-NE2 | Ade-N7 | 0,27 | | | |
| Asn197-ND2 | Ade-N7 | 0,00 | | | |
| Gln209-NE2 | Ade-N7 | 30,34 | | | |
| Gln38-NE2 | Ade-N9 | 0,02 | | | |
| <i>Grupo: ribosa unida a N9 (Rib1)</i> | | | <i>Grupo: ribosa no unida a N9 (Rib2)</i> | | |
| Rib1-O2* | Gln38-NE2 | 0,06 | Rib2-O1D | Asp250-OD | 42,56 |
| Rib1-O2* | Gln38-OE | 10,65 | Rib2-O1D | Val252-O | 2,25 |
| Rib1-O2* | Tyr79-OH | 0,07 | Rib2-O1D | Cys253-N | 0,00 |
| Rib1-O2* | Tyr114-OH | 1,50 | Rib2-O1D | His278-O | 0,00 |
| Rib1-O2* | Leu196-O | 18,34 | Rib2-O1D | Thr279-OG1 | 0,29 |
| Rib1-O2* | Asn197-ND2 | 0,04 | Rib2-O1D | Asp281-OD | 0,04 |
| Rib1-O2* | Asn197-OD | 3,22 | Rib2-O1D | Glu301-OE | 0,00 |
| Rib1-O3* | Gln38-NE2 | 0,06 | Rib2-O2D | Ser198-OG | 0,37 |
| Rib1-O3* | Gln38-OE | 0,71 | Rib2-O2D | Asp250-OD | 0,07 |
| Rib1-O3* | His111-ND1 | 0,00 | Rib2-O2D | Val252-O | 0,05 |
| Rib1-O3* | His111-NE2 | 0,00 | Rib2-O3D | Val252-O | 0,03 |
| Rib1-O3* | Tyr114-OH | 0,12 | Rib2-O2D | Glu301-OE | 0,01 |
| Rib1-O3* | Leu196-O | 0,32 | Arg41-NH | Rib2-O1D | 0,04 |
| Rib1-O3* | Asn197-OD | 0,06 | Cys253-N | Rib2-O1D | 0,00 |
| Asn36-ND2 | Rib1-O2* | 0,03 | Cys253-SG | Rib2-O1D | 2,64 |
| Gln38-NE2 | Rib1-O2* | 1,76 | Thr279-OG1 | Rib2-O1D | 25,29 |
| Arg43-NH | Rib1-O2* | 0,25 | His280-N | Rib2-O1D | 2,26 |
| Tyr79-OH | Rib1-O2* | 0,14 | Arg41-NE | Rib2-O2D | 0,00 |
| Tyr114-OH | Rib1-O2* | 0,68 | Arg41-NH | Rib2-O2D | 0,17 |
| Asn197-ND2 | Rib1-O2* | 0,05 | Arg43-NH | Rib2-O2D | 0,06 |
| Asn36-ND2 | Rib1-O3* | 0,78 | Cys253-SG | Rib2-O2D | 0,01 |
| Gln38-NE2 | Rib1-O3* | 0,05 | Ser198-OG | Rib2-O2D | 0,02 |
| Ser40-OG | Rib1-O3* | 0,01 | Arg41-NH | Rib2-O3D | 0,03 |
| Arg43-NH | Rib1-O3* | 26,15 | Arg43-NH | Rib2-O3D | 0,66 |
| Asn110-ND2 | Rib1-O3* | 0,02 | Cys253-SG | Rib2-O4D | 5,23 |
| His111-NE2 | Rib1-O3* | 0,01 | Thr279-OG1 | Rib2-O4D | 2,58 |
| Tyr114-OH | Rib1-O3* | 38,03 | His280-N | Rib2-O4D | 0,02 |
| Asn197-ND2 | Rib1-O3* | 0,00 | | | |
| Gln38-NE2 | Rib1-O4* | 0,10 | | | |
| Tyr114-OH | Rib1-O4* | 12,48 | | | |

B



C

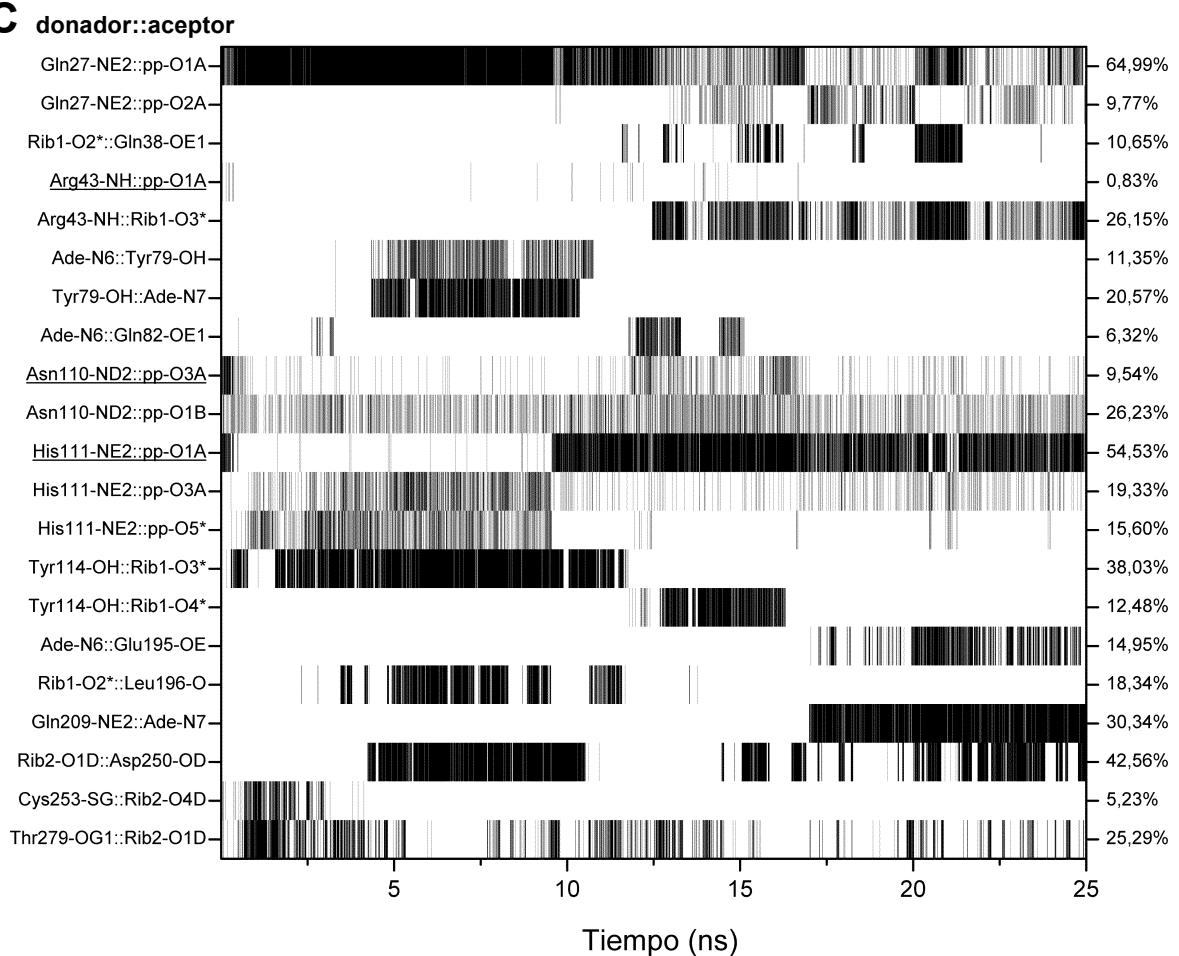


Figura 13: Puentes de hidrógeno entre ADPRibasa-Mn(rata) y ADP-ribose detectados durante la simulación de dinámica del complejo proteína:ligando. A: Puentes de hidrógeno detectados (donador-H::aceptor; d-H::a). La ocupación es el porcentaje de los 25000 fotogramas recogidos en la simulación de dinámica en que dicho enlace estaba presente. En los grupos con dos átomos d o a equivalentes en la cadena lateral, la ocupación indicada es la suma de los dos puentes posibles (p.ej., en esta figura, Arg⁴³ tiene dos grupos equivalentes, NH1 y NH2, que pueden actuar como d, y que se identifican conjuntamente como "átomo" NH). El criterio seguido para definir un puente de hidrógeno d-H::a fue una distancia d-a $\leq 3,5$ Å y un ángulo d-H-a $\geq 140^\circ$. **B:** Identificación de los átomos de la ADP-ribose que pueden formar puentes de hidrógeno (nomenclatura usada en los paneles A y C). **C:** Evolución temporal de los puentes de hidrógeno destacados en negrita en A, con ocupaciones $\geq 5\%$ y/o presentes en la Figura 4.C en el modelo de *docking*, identificados con el programa *VMD* (subrayados a la izquierda).

A

| | Contactos totales | Puentes de H | Diferencia |
|--|----------------------|-----------------|--------------|
| | Ocupación (%) | | |
| <i>Grupo: adenina (Ade)</i> | | | |
| Phe37 | 54,23 | 0,00 | 54,23 |
| Gln38 | 43,83 | 2,71 | 41,12 |
| Tyr45 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| Asp77 | 12,93 | 0,00 | 12,93 |
| Gly78 | 58,34 | 2,51 | 55,83 |
| Tyr79 | 85,51 | 23,05 | 62,46 |
| Ala81 | 0,84 | 0,00 | 0,84 |
| Gln82 | 15,84 | 7,02 | 8,82 |
| Tyr83 | 0,44 | 0,00 | 0,44 |
| His111 | 8,03 | 0,00 | 8,03 |
| Tyr114 | 61,04 | 0,00 | 61,04 |
| Glu195 | 20,13 | 14,95 | 5,18 |
| Leu196 | 81,36 | 0,00 | 81,36 |
| Asn197 | 24,74 | 1,71 | 23,03 |
| Gln209 | 32,74 | 30,34 | 2,40 |
| Phe210 | 0,26 | 0,00 | 0,26 |
| <i>Grupo: ribosa unida a N9 (Rib1)</i> | | | |
| Gln27 | 0,41 | 0,00 | 0,41 |
| Asn36 | 15,49 | 0,81 | 14,68 |
| Phe37 | 3,88 | 0,00 | 3,88 |
| Gln38 | 39,94 | 13,26 | 26,68 |
| Ser40 | 1,62 | 0,01 | 1,61 |
| Arg41 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| Arg43 | 94,78 | 26,22 | 68,56 |
| Asp77 | 2,79 | 0,00 | 2,79 |
| Gly78 | 0,08 | 0,00 | 0,08 |
| Tyr79 | 17,86 | 0,22 | 17,64 |
| Asn110 | 44,52 | 0,02 | 44,50 |
| His111 | 91,44 | 0,02 | 91,42 |
| Tyr114 | 98,88 | 52,10 | 46,78 |
| Leu196 | 68,64 | 18,65 | 49,99 |
| Asn197 | 6,74 | 3,36 | 3,38 |
| Gln209 | 0,54 | 0,00 | 0,54 |
| Phe210 | 62,47 | 0,00 | 62,47 |

| | Contactos totales | Puentes de H | Diferencia |
|---|----------------------|-----------------|---------------|
| | Ocupación (%) | | |
| <i>Grupo: pirofosfato</i> | | | |
| Asp25 | 94,82 | 0,00 | 94,82 |
| Gln27 | 100,00 | 74,67 | 25,33 |
| Gln38 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| Ser40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Arg41 | 0,10 | 0,00 | 0,10 |
| Arg43 | 99,94 | 3,78 | 96,16 |
| Asp74 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| Asp77 | 1,04 | 0,00 | 1,04 |
| Asn110 | 100,00 | 33,49 | 66,51 |
| His111 | 100,00 | 82,51 | 17,49 |
| Tyr114 | 2,00 | 0,97 | 1,03 |
| Phe210 | 16,46 | 0,00 | 16,46 |
| His241 | 40,95 | 0,00 | 40,95 |
| His278 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| Thr279 | 1,57 | 0,00 | 1,57 |
| His280 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| Glu301 | 0,11 | 0,00 | 0,11 |
| <i>Grupo: ribosa no unida a N9 (Rib2)</i> | | | |
| Ser40 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Arg41 | 5,90 | 0,24 | 5,66 |
| Arg43 | 18,17 | 0,72 | 17,45 |
| Asn110 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| Leu196 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Ser198 | 8,93 | 0,39 | 8,54 |
| Val208 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Phe210 | 89,12 | 0,00 | 89,12 |
| Asn211 | 0,82 | 0,00 | 0,82 |
| Ser249 | 0,50 | 0,00 | 0,50 |
| Asp250 | 57,43 | 42,59 | 14,84 |
| Val252 | 74,48 | 2,33 | 72,15 |
| Cys253 | 93,38 | 7,80 | 85,58 |
| His278 | 99,94 | 0,00 | 99,94 |
| Thr279 | 89,14 | 26,91 | 62,23 |
| His280 | 11,45 | 2,27 | 9,18 |
| Asp281 | 3,84 | 0,04 | 3,80 |
| Glu301 | 3,38 | 0,02 | 3,36 |

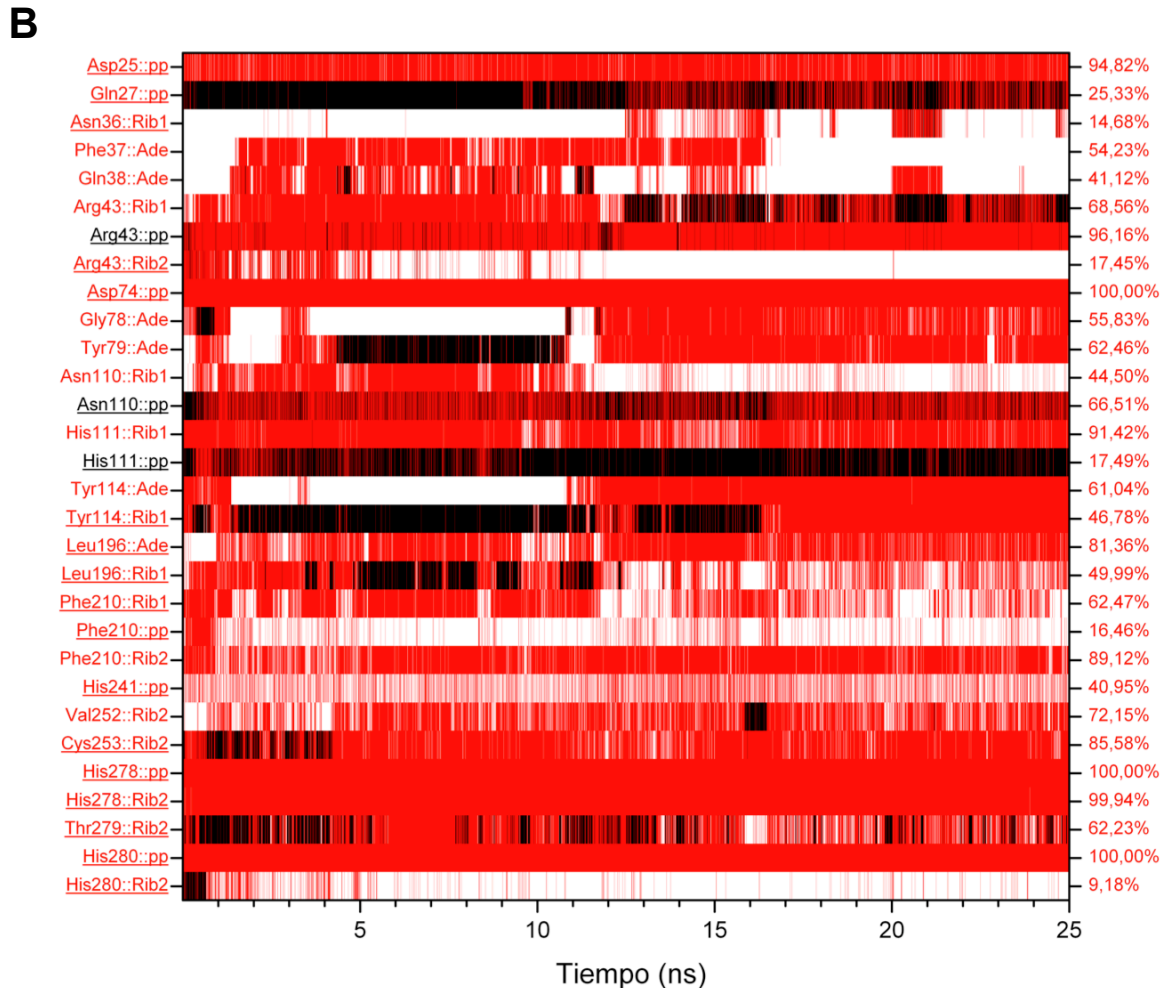
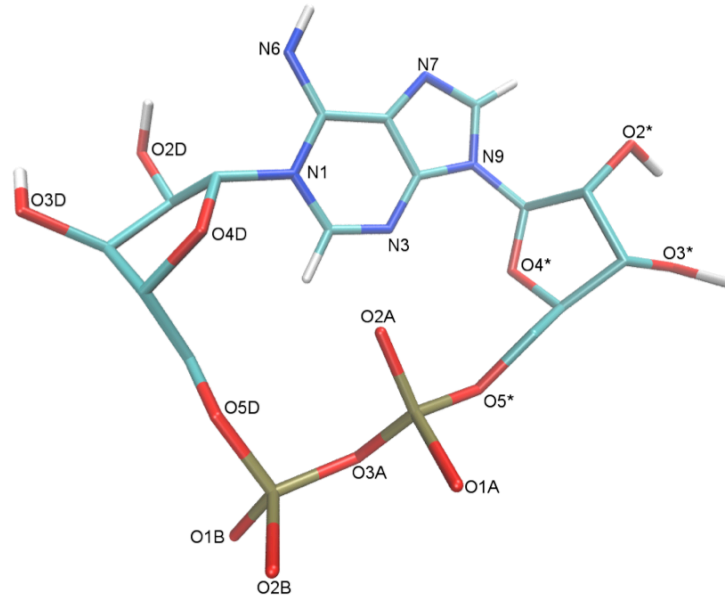


Figura 14: Contactos entre ADPRibasa-Mn(rata) y ADP-ribosa detectados durante la simulación de dinámica molecular del complejo proteína:ligando. El criterio empleado para identificar posibilidades de contacto atómico fue simplemente que el programa *VMD* midiera una distancia $\leq 4,2$ Å entre átomos del aminoácido y de la parte del sustrato indicados (excluyendo los átomos de hidrógeno). **A:** Contactos detectados. La ocupación es el porcentaje de los 25000 fotogramas recogidos en la simulación dinámica en que los contactos estaban presentes. En negrita se destacan los contactos que aparecen en la simulación dinámica en que los contactos estaban presentes. En **negrita** se destacan los contactos que aparecen en la simulación dinámica. Se representan aquellos contactos que estaban presentes en el modelo de *docking* (subrayados a la izquierda) y/o los que se detectaron en $\geq 30\%$ de los 25000 fotogramas sin que se detectara ningún puente de hidrógeno que pudiera corresponder al contacto en el mismo fotograma. El color rojo corresponde siempre a este tipo de contactos no explicables por puentes de hidrógeno; el color negro señala a los contactos detectados que pueden corresponder a puentes de hidrógeno. Algunos de los contactos detectados por *VMD* en el modelo de *docking* (Asn³⁶::Rib1; Tyr¹¹⁴::Rib1; Thr²⁷⁹::Rib2), no fueron detectados por *LIGPLOT* (Figura 4) porque los criterios identificativos aplicados con este programa (opciones de *LIGPLOT* por defecto) fueron más restrictivos que con *VMD*.

A

| Donador | Aceptor | Ocupación (%) | Donador | Aceptor | Ocupación (%) |
|--|------------------|---------------|---|---------------------------------|---------------|
| <i>Grupo: adenina (Ade)</i> | | | <i>Grupo: pirofosfato</i> | | |
| Ade-N6 | Gln38-NE2 | 6,19 | Arg43-NH | P α -O5* | 2,62 |
| Ade-N6 | Gln38-OE | 30,09 | Asn110-ND2 | P α -O5* | 2,24 |
| Ade-N6 | Ser198-OG | 0,04 | His111-NE2 | P α -O5* | 1,00 |
| Ade-N6 | Gln200-OE | 0,01 | Gln27-NE2 | Pα-O1A | 95,85 |
| Ade-N6 | Gln209-OE | 0,01 | Arg43-NH | Pα-O1A | 25,43 |
| Gln38-NE2 | Ade-N3 | 0,03 | His111-NE2 | Pα-O1A | 94,38 |
| Gln38-NE2 | Ade-N6 | 0,98 | Gln38-NE2 | P α -O2A | 0,03 |
| Arg43-NH | Ade-N6 | 0,16 | Arg43-NH | Pα-O2A | 66,18 |
| Ser198-OG | Ade-N6 | 0,10 | Asn110-ND2 | Opp-O3A | 18,85 |
| Gln38-NE2 | Ade-N7 | 31,61 | His111-NE2 | Opp-O3A | 0,71 |
| Gln209-NE2 | Ade-N7 | 0,07 | Asn110-ND2 | Pβ-O1B | 27,15 |
| <i>Grupo: ribosa unida a N9 (Rib1)</i> | | | His111-NE2 | P β -O1B | 0,01 |
| Rib1-O2* | Gln38-NE2 | 0,27 | Gln27-NE2 | P β -O2B | 0,00 |
| Rib1-O2* | Gln38-OE | 18,49 | His111-NE2 | P β -O2B | 0,13 |
| Rib1-O2* | Gln82-OE | 0,01 | Cys253-SG | P β -O5D | 0,09 |
| Rib1-O2* | Tyr114-OH | 0,66 | <i>Grupo: ribosa no unida a N9 (Rib2)</i> | | |
| Rib1-O2* | Gln209-OE | 1,24 | Rib2-O2D | Gln38-OE | 0,06 |
| Rib1-O3* | Gln38-OE | 0,03 | Rib2-O2D | Gln209-OE | 0,01 |
| Rib1-O3* | Asp77-OD | 0,14 | Rib2-O2D | Asn211-OD | 0,09 |
| Rib1-O3* | Gln82-OE | 0,16 | Rib2-O2D | Asp250-OD | 31,91 |
| Rib1-O3* | Tyr114-OH | 0,64 | Rib2-O2D | Val252-O | 2,22 |
| Rib1-O3* | Gln209-OE | 0,49 | Rib2-O2D | Cys253-SG | 1,04 |
| Asn36-ND2 | Rib1-O2* | 0,23 | Rib2-O3D | Gln38-OE | 0,03 |
| Phe37-N | Rib1-O2* | 0,01 | Rib2-O3D | Asn211-ND2 | 0,00 |
| Gln38-N | Rib1-O2* | 0,02 | Rib2-O3D | Asn211-OD | 0,38 |
| Gln38-NE2 | Rib1-O2* | 7,84 | Rib2-O3D | Asp250-OD | 15,95 |
| Gln82-NE2 | Rib1-O2* | 0,18 | Rib2-O3D | Val252-O | 6,55 |
| Gln209-NE2 | Rib1-O2* | 0,29 | Rib2-O3D | Cys253-SG | 0,04 |
| Phe37-N | Rib1-O3* | 0,43 | Rib2-O3D | Thr279-OG1 | 0,20 |
| Gln38-NE2 | Rib1-O3* | 0,03 | Gln38-NE2 | Rib2-O2D | 0,42 |
| Arg43-NH | Rib1-O3* | 0,04 | Arg41-NH | Rib2-O2D | 0,02 |
| Gln82-NE2 | Rib1-O3* | 0,15 | His278-NE2 | Rib2-O3D | 0,01 |
| Tyr114-OH | Rib1-O3* | 0,06 | Thr279-OG1 | Rib2-O3D | 1,22 |
| Gln209-NE2 | Rib1-O3* | 0,08 | His280-N | Rib2-O3D | 0,20 |
| Tyr114-OH | Rib1-O4* | 0,02 | Asp281-N | Rib2-O3D | 0,00 |
| Gln209-NE2 | Rib1-O4* | 0,12 | Arg43-NH | Rib2-O4D | 3,09 |

B**C**

donador::aceptor

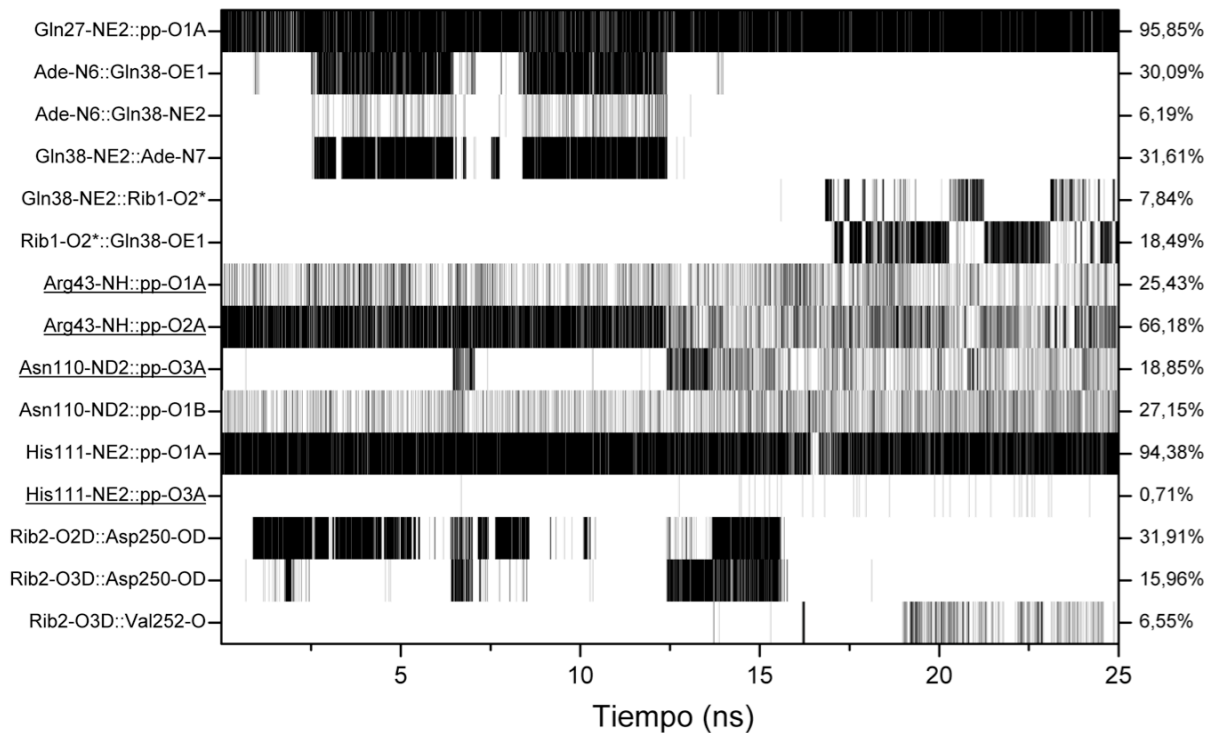


Figura 15: Puentes de hidrógeno entre ADPRibasa-Mn(rata) y cADPR detectados durante la simulación de dinámica del complejo proteína:ligando. A: Puentes de hidrógeno detectados (donador-H::aceptor; d-H::a). La ocupación es el porcentaje de los 25000 fotogramas recogidos en la simulación dinámica en que dicho enlace estaba presente. En los grupos con dos átomos d o a equivalentes en la cadena lateral, la ocupación indicada es la suma de los dos puentes posibles (p.ej., en esta figura, Arg⁴³ tiene dos grupos equivalentes, NH1 y NH2, que pueden actuar como d, y que se identifican conjuntamente como "átomo" NH). El criterio seguido para definir un puente de hidrógeno d-H::a fue una distancia d-a $\leq 3,5$ Å y un ángulo d-H-a $\geq 140^\circ$. **B:** Identificación de los átomos de cADPR que pueden formar puentes de hidrógeno (con la nomenclatura usada en los paneles A y C). **C:** Evolución temporal de los puentes de hidrógeno destacados en negrita en A, con ocupaciones $\geq 5\%$ y/o presentes en la Figura 5 en el modelo de *docking* (subrayados a la izquierda).

A

| | Contactos totales | Puentes de H | Diferencia |
|--|----------------------|-----------------|--------------|
| | Ocupación (%) | | |
| <i>Grupo: adenina (Ade)</i> | | | |
| Asn36 | 0,30 | 0,00 | 0,30 |
| Phe37 | 50,10 | 0,00 | 50,10 |
| Gln38 | 43,71 | 35,21 | 8,50 |
| Arg41 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Arg43 | 10,79 | 0,16 | 10,63 |
| Gln82 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Asn110 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| His111 | 0,12 | 0,00 | 0,12 |
| Leu196 | 35,23 | 0,00 | 35,23 |
| Asn197 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Ser198 | 1,33 | 0,14 | 1,19 |
| Gln200 | 0,53 | 0,01 | 0,52 |
| Val208 | 0,27 | 0,00 | 0,27 |
| Gln209 | 0,63 | 0,08 | 0,55 |
| Phe210 | 95,84 | 0,00 | 95,84 |
| Val252 | 7,25 | 0,00 | 7,25 |
| Cys253 | 7,26 | 0,00 | 7,26 |
| <i>Grupo: ribosa unida a N9 (Rib1)</i> | | | |
| Gln27 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| Asn36 | 1,32 | 0,23 | 1,09 |
| Phe37 | 73,24 | 0,44 | 72,80 |
| Gln38 | 33,07 | 26,24 | 6,83 |
| Arg43 | 17,43 | 0,04 | 17,39 |
| Tyr45 | 0,17 | 0,00 | 0,17 |
| Asp77 | 0,72 | 0,14 | 0,58 |
| Gly78 | 0,90 | 0,00 | 0,90 |
| Tyr79 | 0,34 | 0,00 | 0,34 |
| Gln82 | 5,00 | 0,42 | 4,58 |
| Asn110 | 34,63 | 0,00 | 34,63 |
| His111 | 86,47 | 0,00 | 86,47 |
| Tyr114 | 7,57 | 1,38 | 6,19 |
| Leu171 | 0,30 | 0,00 | 0,30 |
| Leu196 | 36,54 | 0,00 | 36,54 |
| Gln209 | 13,77 | 2,09 | 11,68 |
| Phe210 | 68,61 | 0,00 | 68,61 |

| | Contactos totales | Puentes de H | Diferencia |
|---|----------------------|-----------------|---------------|
| | Ocupación (%) | | |
| <i>Grupo: pirofosfato</i> | | | |
| Asp25 | 85,99 | 0,00 | 85,99 |
| Gln27 | 100,00 | 95,85 | 4,15 |
| Gln38 | 0,12 | 0,03 | 0,09 |
| Arg43 | 99,83 | 76,66 | 23,17 |
| Tyr45 | 0,06 | 0,00 | 0,06 |
| Asp74 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| Asp77 | 32,23 | 0,00 | 32,23 |
| Asn110 | 100,00 | 42,94 | 57,06 |
| His111 | 100,00 | 95,33 | 4,67 |
| Tyr114 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Phe210 | 4,22 | 0,00 | 4,22 |
| His241 | 38,12 | 0,00 | 38,12 |
| Cys253 | 1,27 | 0,09 | 1,18 |
| His278 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| Thr279 | 58,32 | 0,00 | 58,32 |
| His280 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| <i>Grupo: ribosa no unida a N9 (Rib2)</i> | | | |
| Gln38 | 3,87 | 0,50 | 3,37 |
| Arg41 | 2,66 | 0,02 | 2,64 |
| Arg43 | 48,00 | 3,09 | 44,91 |
| Asn110 | 0,36 | 0,00 | 0,36 |
| Leu196 | 0,53 | 0,00 | 0,53 |
| Ser198 | 0,30 | 0,00 | 0,30 |
| Gln200 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| Val208 | 21,15 | 0,00 | 21,15 |
| Gln209 | 0,98 | 0,01 | 0,97 |
| Phe210 | 58,21 | 0,00 | 58,21 |
| Asn211 | 20,04 | 0,47 | 19,57 |
| Asp250 | 46,58 | 37,24 | 9,34 |
| Val252 | 65,12 | 8,77 | 56,35 |
| Cys253 | 97,70 | 1,07 | 96,63 |
| His278 | 99,52 | 0,01 | 99,51 |
| Thr279 | 66,15 | 1,42 | 64,73 |
| His280 | 35,88 | 0,20 | 35,68 |
| Asp281 | 1,27 | 0,00 | 1,27 |
| Glu301 | 3,35 | 0,00 | 3,35 |

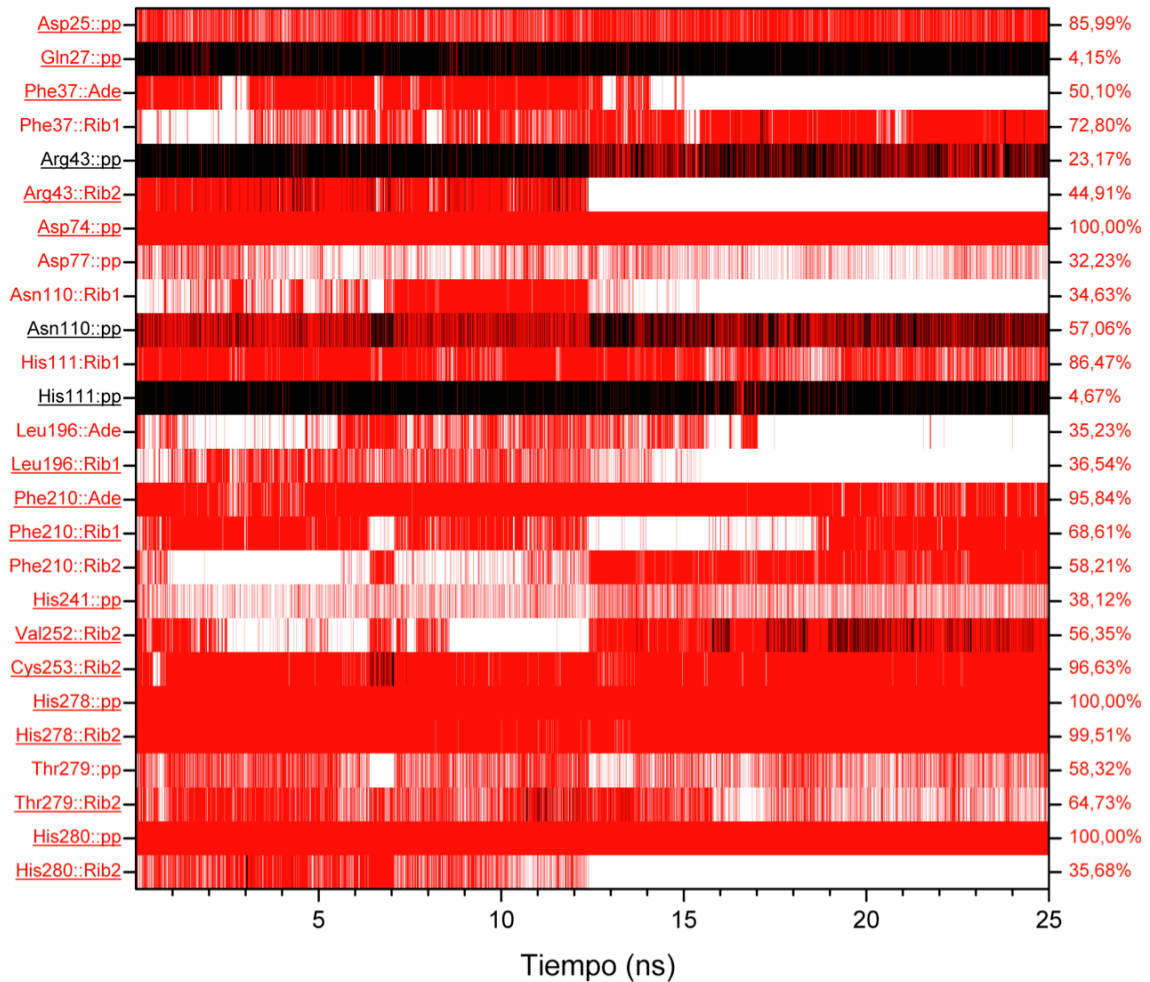
B

Figura 16: Contactos entre ADPRibasa-Mn(rata) y cADPR detectados durante la simulación de dinámica del complejo proteína:ligando. A: Contactos detectados. La ocupación es el porcentaje de los 25000 fotogramas recogidos en la simulación dinámica en que los contactos estaban presentes. El criterio seguido para definir un contacto fue una distancia $\leq 4,2$ Å entre átomos del aminoácido y de la parte del sustrato indicados (excluyendo los átomos de hidrógeno). En negrita se destacan los contactos que aparecen en B. **B:** Evolución temporal de los contactos durante la simulación dinámica. Se representan aquellos contactos que estaban presentes en el modelo de *docking* (subrayados a la izquierda) y/o los que se detectaron en $\geq 30\%$ de los 25000 fotogramas sin que se detectara ningún puente de hidrógeno que pudiera corresponder al contacto en el mismo fotograma. El color rojo corresponde siempre a este tipo de contactos no explicables por puentes de hidrógeno; el color negro señala a los contactos detectados que pueden corresponder a puentes de hidrógeno.

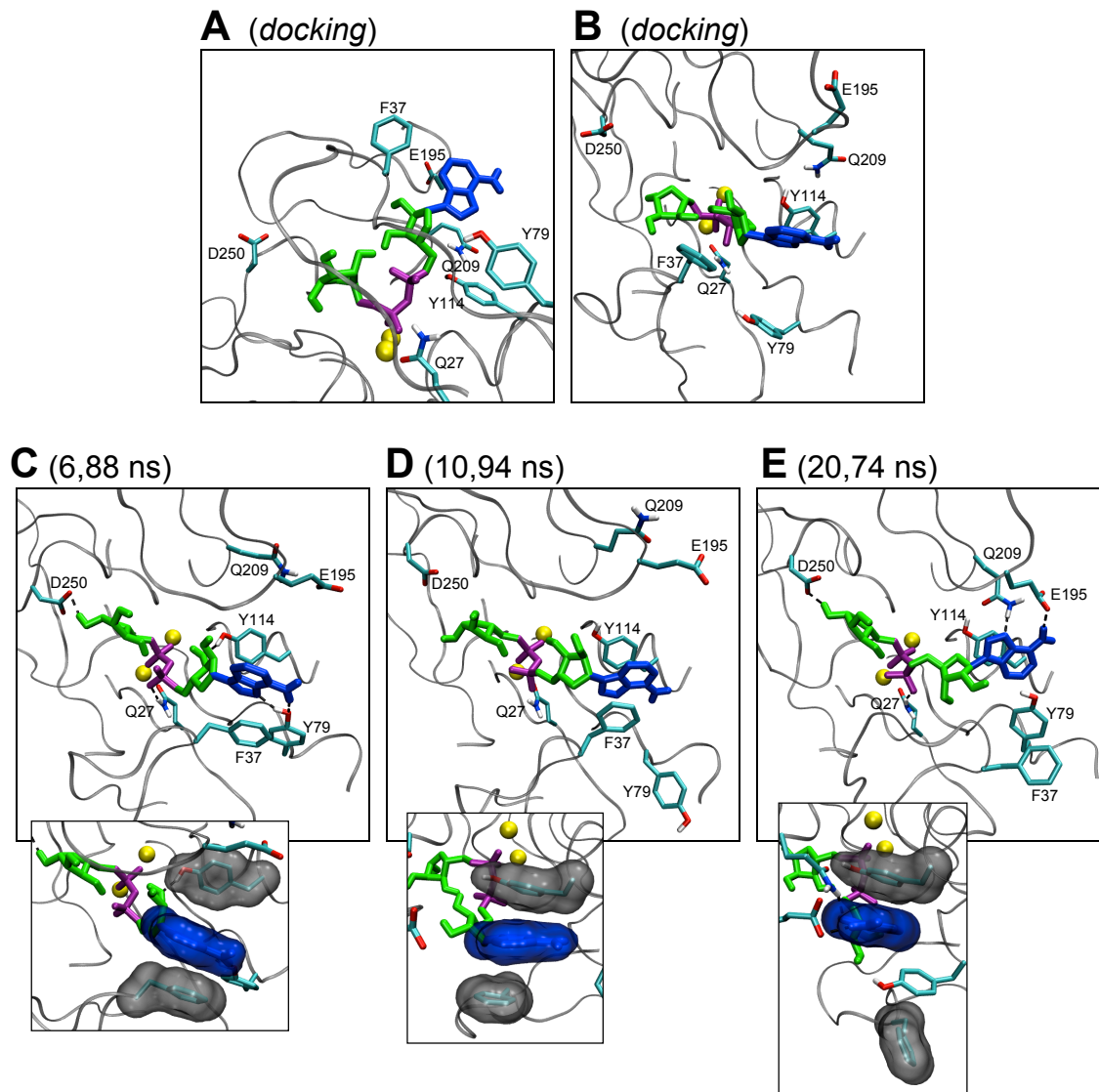


Figura 17: Interacciones enzima-sustrato que aparecen durante la trayectoria de dinámica molecular del complejo ADPRibasa-Mn(rata):ADP-ribosa. El sustrato se muestra en forma de varillas gruesas de color azul oscuro, verde y magenta, los metales como esferas amarillas, la cadena principal de la proteína en gris, y una selección de residuos aminoacídicos coloreados por átomo (los mismo residuos en todas las vistas). En la figura se muestran sólo algunas interacciones que están ausentes en el modelo de *docking* y se manifiestan durante la trayectoria dinámica (sección 1.2.5). **A, B:** Modelo de ADP-ribosa unida a la ADPRibasa-Mn por simulación de *docking*, en el que se muestra que los siete aminoácidos destacados en la figura no llegan a interactuar con el sustrato; (A) mismo punto de vista que la Figura 4.B, (B) mismo punto de vista que las siguientes partes de esta figura. **C, D, E:** Imágenes tomadas de la trayectoria dinámica del complejo, que muestran la formación de: (C) un apilamiento de la adenina con Phe³⁷ y puentes de hidrógeno con Tyr⁷⁹ y Asp²⁵⁰; (D) un doble apilamiento o *sandwich* de la adenina entre Phe³⁷ y Tyr¹¹⁴, en ausencia de los dos puentes de hidrógeno anteriores; (E) un apilamiento de la adenina con Tyr¹¹⁴, sendos puentes de hidrógeno con Glu¹⁹⁵ y Gln²⁰⁹, y nuevamente el puente de hidrógeno con Asp²⁵⁰. Los pequeños recuadros debajo de C, D y E representan en detalle, y con sus volúmenes de van der Waals, las posiciones relativas de los anillos de Tyr¹¹⁴, adenina y Phe³⁷ (de arriba hacia abajo), orientados de la forma más conveniente para apreciar los apilamientos arriba mencionados.

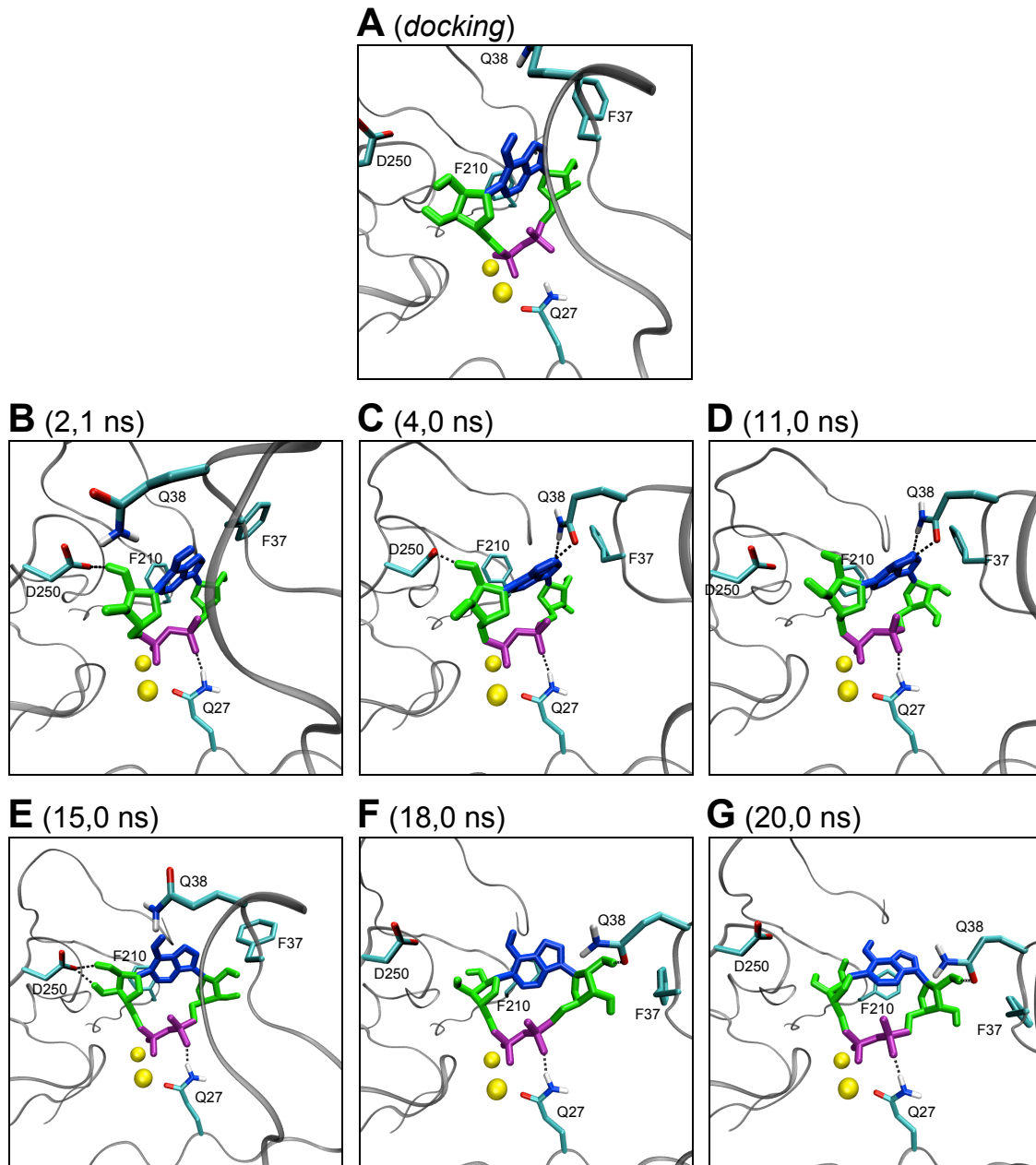


Figura 18: Interacciones enzima-sustrato que aparecen durante la trayectoria de dinámica molecular del complejo ADPRibasa-Mn(rata):cADPR. El sustrato se muestra en forma de varillas gruesas de color azul oscuro, verde y magenta, los metales como esferas amarillas, la cadena principal de la proteína en gris, y una selección de residuos aminoácidos coloreados por átomo (los mismo residuos en todas las vistas). En la figura se muestran la interacción de Phe²¹⁰ con adenina y algunas interacciones que están ausentes en el modelo de *docking* y se manifiestan durante la trayectoria dinámica (sección 1.2.5). **A:** Modelo de cADPR unida a la ADPRibasa-Mn por simulación de *docking* (Figura 5), en el que se muestra que de los cinco aminoácidos destacados en esta figura, solo la Phe²¹⁰ interactúa con el sustrato. **B-G:** Imágenes tomadas de la trayectoria dinámica del complejo a los tiempos indicados. En estos paneles se muestra la formación permanente de un puente de hidrógeno de Gln²⁷ con el fosfato α (B-E); puentes de hidrógeno formados alternativa o simultáneamente por Gln³⁸ con adenina (C, D) o con ribosa-1 (F, G), y por Asp²⁵⁰ con la ribosa-2 (B, C, E); así como la proximidad de Phe³⁷ y Phe²¹⁰ a la adenina, dando lugar a veces a interacciones por apilamiento con el segundo de estos residuos (F). Es de destacar que la torsión de 60°, de cADPR sobre el fosfato β , se produjo alrededor de los 12,5 ns de la simulación (sección 1.2.4; Video 3, suplemento CD-ROM).

1.3 Resultados: ADPRibasa-Mn de pez cebra

1.3.1 Caracterización enzimática de la ADPRibasa-Mn de *Danio rerio* como ADP-ribosa/CDP-alcohol difosfatasa dependiente de Mn^{2+} : falta de actividad sobre cADPR y nueva actividad sobre 2',3'-cAMP

Para estudiar las preferencias de sustrato de la ADPRibasa-Mn del pez cebra *Danio rerio*, se escogieron los sustratos conocidos de la ADPRibasa-Mn de la enzima de rata (ADP-ribosa, CDP-alcoholes, ADP y cADPR), junto a una selección de compuestos que no son sustratos de dicha enzima. Una novedad en este estudio de especificidad respecto a lo hecho antes con la enzima de rata [4,7], es que se probó si la enzima de pez cebra presentaba actividad fosfohidrolítica sobre los fosfodiésteres cíclicos 2',3'-cAMP y 3',5'-cAMP. Esta decisión se tomó por dos razones. Por una parte, el parecido estructural existente entre las proteínas ADPRibasa-Mn y la fosfodiesterasa Rv0805 de nucleótidos cíclicos de *Mycobacterium tuberculosis* [33]. Por otra, la idea preexistente de que la histidina del motivo GNH[D/E], que forma parte de la firma aminoacídica dispersa típica de las metalofosfatasa, es un determinante de actividad fosfodiesterasa sobre nucleótidos 2',3'-cíclicos [45] y está presente en la ADPRibasa-Mn de pez cebra (His⁹⁷).

En primer lugar se hicieron ensayos enzimáticos a una concentración fija de sustrato 500 μ M, empleando Mn^{2+} 5 mM como metal activador. La enzima hidrolizó las uniones fosfoanhídrido de ADP-ribosa, CDP-glicerol, CDP-colina, CDP-etanolamina y ADP a velocidades significativas. En todos los casos uno de los productos de hidrólisis formados era AMP o CMP, que fueron detectados por HPLC (resultados no mostrados). La unión fosfodiéster del 2',3'-cAMP fue también hidrolizada, formándose como producto un 95% de 3'-AMP y un 5% de 2'-AMP (Figura 19). A concentraciones 500 μ M, no fueron sustratos apreciables de la ADPRibasa-Mn de pez cebra: ADP-glucosa, UDP-glucosa, CDP-glucosa, CDP, CMP, AMP y 3',5'-cAMP. De forma inesperada, la actividad hidrolítica sobre cADPR, aunque detectable por HPLC en incubaciones con elevadas concentraciones de enzima, fue mucho menor que la que presenta la ADPRibasa-Mn de rata (sección 1.2.3). Debe decirse que la actividad sobre cADPR se valoró a una concentración 60 μ M (cADPR purificada), más baja que la empleada con los otros sustratos. En cualquier caso, en las mismas condiciones, la actividad de la ADPRibasa-Mn de rata es mucho mayor.

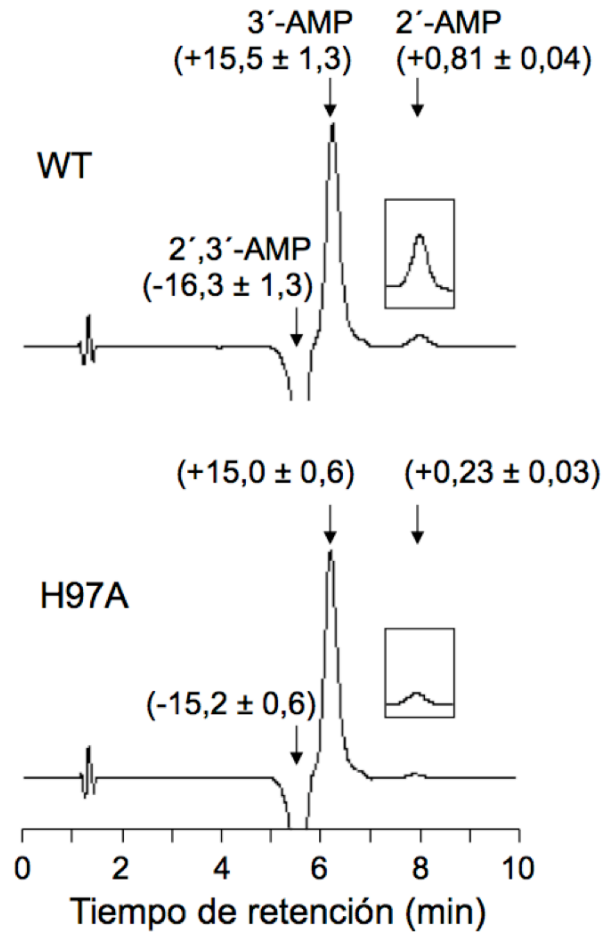


Figura 19: Hidrólisis de 2',3'-cAMP por la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* y su mutante H97A formando mayoritariamente 3'-AMP. Mezclas de reacción con 2',3'-cAMP 500 μ M y MnCl₂ 5 mM se incubaron durante 50 min con ADPRibasa-Mn de tipo salvaje (WT), su mutante H97A o en ausencia de enzima. Para facilitar la comparación, las cantidades de enzima se ajustaron para que las mezclas de reacción tuvieran la misma actividad. Las mezclas de reacción y sus controles sin enzima se analizaron por HPLC (sección 3.6, método 1) al final de las respectivas incubaciones. Los registros que se presentan son cromatogramas diferenciales que muestran la diferencia entre el cromatograma obtenido con enzima y su control sin enzima. Las flechas señalan los tiempos de retención de estándares comerciales de los compuestos indicados. Los dos recuadros insertados son ampliaciones (5x) de los picos correspondientes a 2'-AMP. Los números entre paréntesis son los porcentajes de consumo de 2',3'-cAMP o de formación de 3'-AMP o 2'-AMP (medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes).

Tomando como referencia los resultados obtenidos en las valoraciones de actividad hechas a una concentración fija de sustrato, se decidió investigar la cinética de saturación de la ADPRibasa-Mn de pez cebra por los sustratos ADP-ribosa, CDP-glicerol, CDP-colina, CDP-etanolamina, ADP y 2',3'-cAMP (Figura 20), determinar las constantes cinéticas k_{cat} y K_M , y calcular la constante de especificidad k_{cat}/K_M para cada sustrato (Tabla 1). Esta última constante permite comparar sustratos entre sí, midiendo la mayor o menor eficacia con que son transformados enzimáticamente. Los mejores sustratos serán aquellos que tengan altos valores de k_{cat} y bajos valores de K_M . Según este principio, el mejor sustrato de la ADPRibasa-Mn de pez cebra resultó ser la ADP-ribosa, seguida, en este orden, por CDP-glicerol, CDP-etanolamina, 2',3'-cAMP, CDP-colina y ADP. La alta eficacia relativa de la hidrólisis de ADP-ribosa depende de su bajo valor de K_M (15-240 veces menor que las de los otros sustratos), ya que el valor de k_{cat} para la reacción con ADP-ribosa no es especialmente favorable, siendo menor que con los tres CDP-alcoholes, e igual que con 2',3'-cAMP (Tabla 1).

La cinética de saturación de la hidrólisis de cADPR no se estudió directamente, debido a la pequeña magnitud de la actividad. Sin embargo, teniendo en cuenta que las simulaciones de unión de ligandos (*docking*) a la ADPRibasa-Mn de pez cebra predecían la unión de cADPR en el sitio activo en una pose poco favorable a la hidrólisis (ver sección 1.3.7 y Figura 27.C), se estimó que cADPR podría actuar como inhibidor competitivo de las otras reacciones de la ADPRibasa-Mn. Por lo tanto, se probó el efecto de cADPR sobre la hidrólisis de ADP-ribosa por una cantidad de enzima que no daba lugar a hidrólisis detectable de cADPR. Los resultados mostraron que cADPR 160 μM inhibía la velocidad inicial de hidrólisis de ADP-ribosa 80 μM en un $25\pm 2\%$ ($n = 3$). Suponiendo que la inhibición fuese competitiva, como predecían las simulaciones de *docking*, y teniendo en cuenta un valor de K_M 53 μM para ADP-ribosa (Tabla 1), se calculó que la K_i de cADPR como inhibidor era 190 μM , lo que es igual a su K_M como sustrato, como predice la teoría de sustratos competitivos. Utilizando este valor de K_M , y haciendo medidas repetidas de actividad sobre cADPR 30-60 μM , se pudo estimar que la eficacia catalítica de la hidrólisis de cADPR era $28 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y se concluyó que la k_{cat} de esta reacción debía ser extremadamente baja, alrededor de $0,005 \text{ s}^{-1}$ (Tabla 1).

1.3.2 Respuesta compleja de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* a los cambios de concentración de Mn^{2+}

Las actividades enzimáticas de la ADPRibasa-Mn de rata son fuertemente dependientes de Mn^{2+} , que es eficaz a concentraciones micromolares bajas. La cinética de activación por Mn^{2+} sigue un patrón hiperbólico de aparente saturación de la enzima por el metal. Esta aparente saturación enzimática se alcanza a concentraciones muy inferiores a las del sustrato, por lo que parece claro que el efecto activador está mediado por la unión del metal a la enzima. Esto se ha explorado con más detalle con ADP-ribosa como sustrato de la ADPRibasa-Mn de rata, que llega a la saturación de metal con una concentración 20 μM de Mn^{2+} y prácticamente no es afectada por concentraciones más altas, hasta 5 mM [4,7].

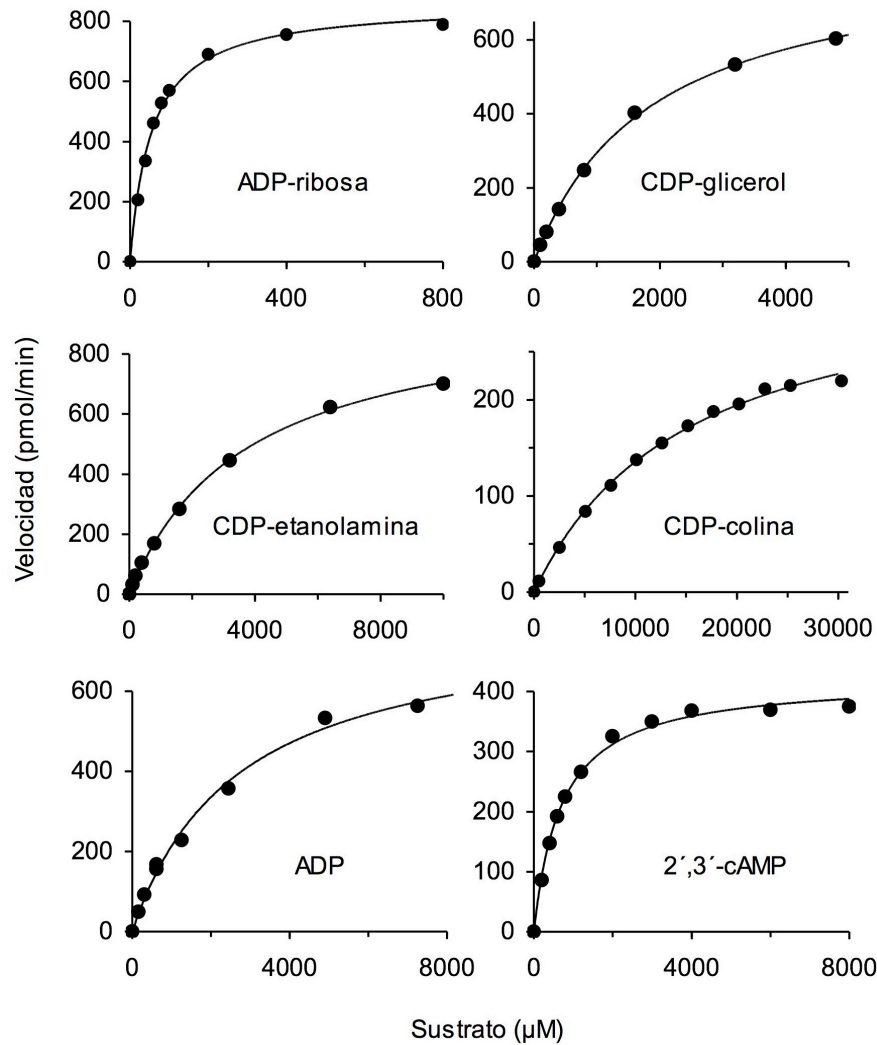


Figura 20: Curvas de saturación de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* por sustratos. Se prepararon y analizaron mezclas de reacción que contenían MnCl_2 5 mM, concentraciones variables de uno de los sustratos indicados, fosfatasa alcalina como enzima auxiliar (excepto en las mezclas de reacción con ADP) y una cantidad de ADPRibasa-Mn apropiada para cada sustrato. Las incubaciones se hicieron en condiciones de linealidad respecto a la cantidad de enzima y al tiempo de incubación, y se detuvieron con el reactivo de determinación de Pi descrito en la sección 3.7.1. Las velocidades iniciales de reacción se dan en términos de sustrato hidrolizado. La ecuación de Michaelis-Menten se ajustó a los puntos experimentales por regresión no lineal. Los resultados mostrados son representativos de 3-5 experimentos independientes en cada caso.

Tabla 1: Especificidad de sustrato de enzimas ADPRibasa-Mn^a

| Sustrato | ADPRibasa-Mn salvaje de pez cebra | | | H97A-ADPRibasa-Mn de pez cebra | | | ADPRibasa-Mn de rata |
|-------------------------|--|--|-----------------------|--|--|-----------------------|----------------------------------|
| | $K_M \pm S.D.$ ($n = 3-5$) μM | $k_{cat}/K_M \pm S.D.$ ($n = 3-6$) $M^{-1} s^{-1}$ | k_{cat} s^{-1} | $K_M \pm S.D.$ ($n = 3$) μM | $k_{cat}/K_M \pm S.D.$ ($n = 3$) $M^{-1} s^{-1}$ | k_{cat} s^{-1} | k_{cat}/K_M $M^{-1} s^{-1}$ |
| ADP-ribosa | 53 ± 11 | 340300 ± 840 | 18,0 | 71 ± 8 | 5900 ± 500 | 0,4 | 328200 ^b |
| CDP-glicerol | 2000 ± 1400 | 47800 ± 700 | 95,6 | 6300 ± 900 | 120 ± 30 | 0,8 | 92400 ^b |
| CDP-etanolamina | 3900 ± 1300 | 32100 ± 290 | 125,2 | 31000 ± 800 | 70 ± 20 | 2,1 | 29000 ^b |
| CDP-colina | 12000 ± 3000 | 5600 ± 750 | 67,2 | 43000 ± 8000 | 20 ± 5 | 0,8 | 95000 ^b |
| ADP | 2650 ± 1300 | 660 ± 70 | 1,8 | 19000 ± 700 | 11 ± 5 | 0,2 | 21400 ^b |
| 2',3'-cAMP ^c | 760 ± 50 | 22200 ± 2700 | 16,9 | 1700 ± 240 | 17500 ± 1200 | 29,7 | nd |
| cADPR | 190 ± 25 ^d | 28 ± 3 | 0,005 | nd | nd | nd | 5100 |

nd, no determinado.

^a Ni la enzima de pez cebra ni la de rata presentan actividad significativa sobre ADP-glucosa, UDP-glucosa, CDP-glucosa, CDP, CMP, AMP o 3',5'-cAMP.

^b Datos tomados de [4].

^c Los parámetros cinéticos de la hidrólisis de 2',3'-cAMP corresponden a la actividad total, incluyendo la hidrólisis de las uniones P-O2' y P-O3' que dan lugar, respectivamente, a 3'-AMP y 2'-AMP. No obstante, teniendo en cuenta el predominio de la hidrólisis de la unión P-O2', los parámetros pueden ser razonables aproximaciones de la cinética de esta reacción.

^d Estimado a partir de la potencia de inhibición (competitiva) de la hidrólisis de ADP-ribosa por cADPR.

Contrastando con la respuesta simple de la ADPRibasa-Mn de rata frente a concentraciones crecientes de Mn^{2+} , la enzima de pez cebra presentó un comportamiento más complejo. Con ADP-ribosa o CDP-glicerol como sustrato, la curva de saturación aparente por el metal, estudiada hasta 6 mM, resultó ser bifásica (Figura 21). En un análisis preliminar de estos datos cinéticos, los resultados se ajustaron bien por regresión no lineal a la suma de dos ecuaciones de Michaelis-Menten con valores de K_M aparentes de 1 μM y 2,5 mM. Sin embargo, con CDP-colina, CDP-etanolamina o 2',3'-cAMP como sustratos, sólo se observó respuesta activadora con el valor bajo de K_M . Después de alcanzarse una "meseta" de actividad entre 10 μM y 1 mM de Mn^{2+} , concentraciones más altas dieron lugar a inhibiciones, aunque con 2',3'-cAMP como sustrato dicha inhibición fue muy débil, pudiendo tomarse la curva de saturación resultante como casi hiperbólica (Figura 21).

Esta respuesta compleja de la ADPRibasa-Mn de pez cebra frente a la elevación de la concentración de Mn^{2+} no puede explicarse simplemente por la acción combinada de dos formas enzimáticas independientes, una con alta y otra con baja afinidad por el metal. En su lugar, los resultados se pueden explicar por la presencia de dos sitios de unión de metal que afectan de forma diferente a la acción enzimática sobre distintos sustratos. La ocupación de un sitio de alta afinidad se requeriría para la actividad sobre cualquiera de los sustratos, mientras que un sitio de baja afinidad tendría efectos activadores sobre la hidrólisis de ADP-ribosa y CDP-glicerol, inhibidores sobre CDP-colina y CDP-etanolamina, y casi no tendría efecto sobre 2',3'-cAMP.

Todo ello puede describirse, por ejemplo, por el esquema de reacción que se presenta en la Figura 22 y que fue inspirado por las ideas generales de otros autores acerca del análisis de la cinética enzimática en presencia de un modificador (activador o inhibidor) que puede ser un metal [46,47]. El esquema propuesto incluye la unión independiente del metal (X) a dos sitios enzimáticos diferentes, uno con alta y otro con baja afinidad. Estas uniones dan lugar a complejos EX y XE, respectivamente. EX puede unirse al sustrato para formar el complejo EXS, que da lugar a productos con una constante de velocidad k . En cambio, XE no se puede unir directamente al sustrato, pero sí puede hacerlo el complejo XEX, que resulta de la unión de un segundo metal, para dar un complejo XEXS, también capaz de generar productos con una constante de velocidad k' . Según este esquema, las diferentes respuestas a la elevación de Mn^{2+} con los distintos sustratos se deben a las magnitudes relativas de k y k' : con ADP-ribosa y CDP-glicerol, $k' > k$; con CDP-colina y CDP-etanolamina, $k' < k$; y con 2',3'-cAMP, $k' \approx k$. Para poder poner a prueba el ajuste de los resultados experimentales a este modelo, se derivó para él una ecuación cinética siguiendo las reglas generales de Segel para escribir ecuaciones de velocidad de sistemas en equilibrio rápido [48]. La ecuación resultante fue:

$$v = \frac{\frac{SX}{K_A K_S} V + \frac{SX^2}{K_A K_B K'_S} V'}{1 + \frac{X}{K_A} + \frac{SX}{K_A K_S} + \frac{X}{K_B} + \frac{X^2}{K_A K_B} + \frac{SX^2}{K_A K_B K'_S}} \quad (I)$$

en donde S y X son las concentraciones totales de sustrato y metal, $V = k E$, $V' = k' E$ (siendo E la concentración total de enzima), y las constantes son como se definen en la Figura 22.

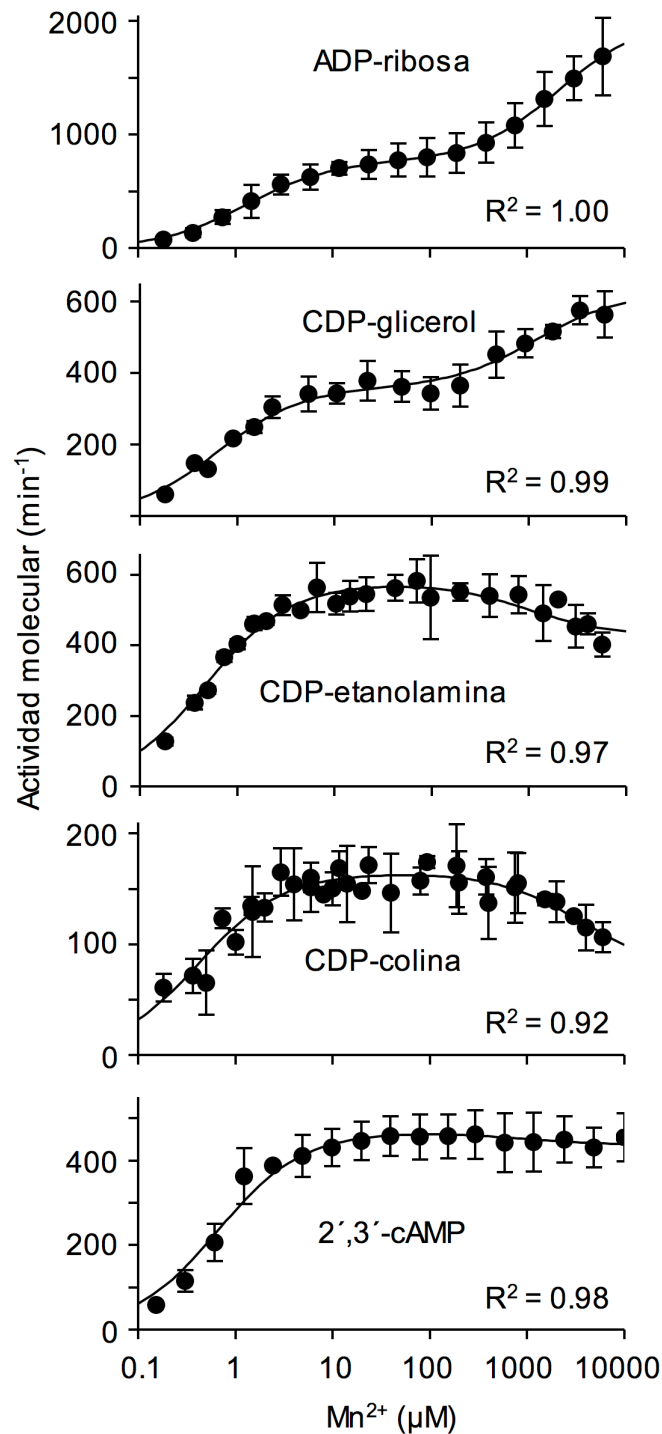


Figura 21: Respuestas cinéticas de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* a los cambios de concentración Mn²⁺ con distintos sustratos. Las velocidades iniciales de hidrólisis de sustrato se midieron con sustrato 500 μM en condiciones estándar, excepto por las concentraciones variables de Mn²⁺. Con distintos sustratos se emplearon distintas concentraciones de enzima. Los resultados corresponden a medias ± desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. La ecuación I se ajustó a los puntos experimentales como se explica en la sección 1.3.2. La bondad de los ajustes se evaluó calculando los coeficientes de determinación $R^2 = 1 - [\sum(y_i - f_i)^2 / \sum(y_i - y_m)^2]$ (forma modificada de la definición dada en [49]), donde y_i son los valores observados, f_i los teóricos, e y_m es la media de y_i .

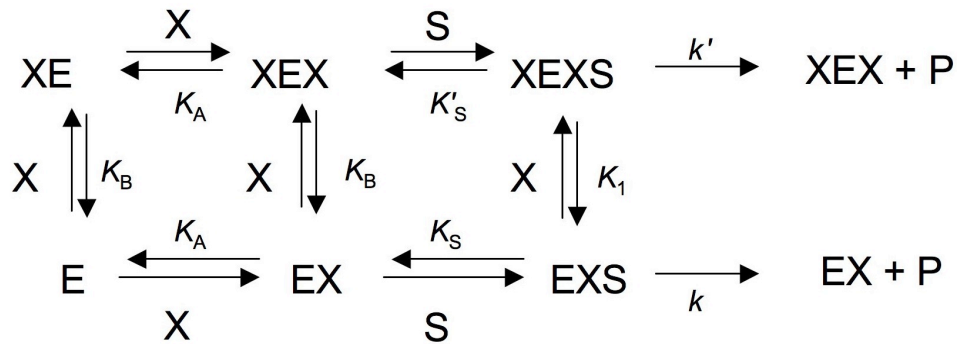


Figura 22: Esquema de reacción de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* incluyendo dos sitios de unión de metal que afectan a la cinética. Las suposiciones del modelo relativas a la unión de metal (X) son las siguientes. (i) X puede unirse a la enzima (E) en dos sitios independientes con constantes de disociación K_A (sitio A) y K_B (sitio B) para dar los complejos EX y XE, respectivamente; la unión del metal a cualquiera de estos sitios no afecta a su unión al otro. (ii) En el sitio A, X actúa como un activador esencial, necesario para la unión del sustrato. (iii) En el sitio B, X se comporta como un modificador general que puede aumentar o disminuir la velocidad de reacción dependiendo de otras condiciones, por ejemplo el tipo de sustrato, modificando K_S a K'_S y/o k a k' (es decir, V a V'). (iv) La unión de X al sustrato libre es despreciable.

La ecuación I se ajustó a los resultados experimentales, obtenidos con concentraciones crecientes de Mn^{2+} y distintos sustratos. Estos ajustes se hicieron empleando la herramienta *Solver* (*Microsoft Excel 2004* para Macintosh), obteniéndose en todos los casos curvas satisfactorias (Figura 21). Los ajustes se hicieron por separado para los experimentos hechos con cada sustrato, dejándose fluctuar libremente seis variables (V , V' , K_S , K'_S , K_A y K_B). A la vista del esquema de reacción de la Figura 22, podría esperarse que los valores de K_A y K_B obtenidos de dichos ajustes fuesen independientes del sustrato empleado. No obstante, los errores en las estimaciones de dichas constantes fueron grandes, por el elevado número de grados de libertad del ajuste (que hace que se puedan obtener ajustes similares con diferentes conjuntos de valores), por la falta de datos a concentraciones de Mn^{2+} superiores a 10 mM (que dificulta la estimación de V) y por la posibilidad de que las concentraciones bajas de Mn^{2+} difieran significativamente de los niveles de ion libre (que dificulta la estimación de K_A). A pesar de estas limitaciones, merece la pena decir que, en los ajustes con distintos sustratos, la constante K_A adoptó valores de orden micromolar (0,4-1,2 μM , excepto 16 μM con ADP-ribosa), mientras que la constante K_B los adoptó de orden milimolar (1,0-3,6 mM). Por ello, a grandes rasgos, los resultados cinéticos obtenidos variando la concentración de Mn^{2+} están de acuerdo con el esquema de la Figura 22.

1.3.3 Activación parcial de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* por Mg^{2+}

Además del Mn^{2+} , como posibles activadores de la ADPRibasa-Mn se probaron Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Mg^{2+} . De éstos, sólo el Mg^{2+} dio resultados positivos, aunque más débiles que el Mn^{2+} (Figura 23). Por otra parte, cuando Zn^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} se probaron sobre la ADPRibasa-Mn activada por Mn^{2+} , los tres se comportaron como inhibidores (Figura 24).

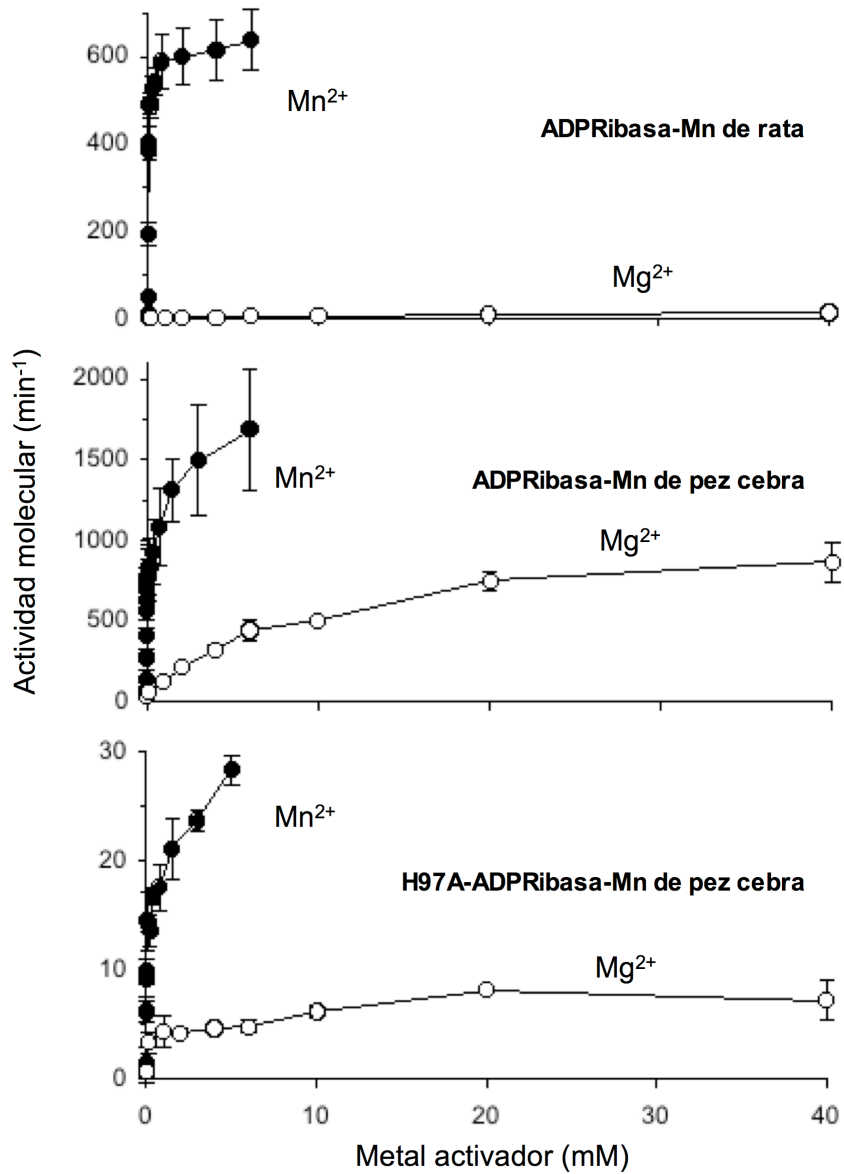


Figura 23: Activación parcial de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* por Mg²⁺. Las velocidades iniciales de hidrólisis de ADP-ribosa 500 μM se valoraron en condiciones estándar excepto que se emplearon concentraciones variables de Mn²⁺ o que el Mn²⁺ se sustituyó por Mg²⁺. Los resultados corresponden a medias ± desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.

Muchas enzimas activadas por Mn^{2+} responden también al Mg^{2+} , pero éste no es el caso de la ADPRibasa-Mn de rata, que es esencialmente inactiva en presencia de Mg^{2+} [4,7]. Sin embargo, cuando se probó el efecto del Mg^{2+} sobre la enzima de pez cebra, se observó una ligera pero clara activación. Puesto que ésta es una de las diferencias encontradas entre las enzimas de rata y de pez cebra, se decidió comprobar cuidadosamente que se trataba de una diferencia genuina, descartando, por ejemplo, que la actividad dependiente de Mg^{2+} pudiera deberse a una enzima bacteriana accidentalmente contaminante de la proteína recombinante al final del proceso de expresión heteróloga en *E. coli*. Para ello, reexaminamos los efectos de Mn^{2+} y Mg^{2+} sobre la enzima de rata, confirmando su conocida ([4,7]) dependencia estricta de Mn^{2+} (Figura 23) y examinamos también el comportamiento de un mutante puntual (H97A) de la ADPRibasa-Mn de pez cebra (véase más adelante; sección 1.3.5).

1.3.4 Dependencia de las actividades de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* respecto del pH

En la Figura 25 se presentan los perfiles de pH-actividad de la ADPRibasa-Mn de pez cebra con tres de los sustratos estudiados: ADP-ribosa, CDP-colina y 2',3'-cAMP. El perfil obtenido con ADP-ribosa tenía una forma de campana casi simétrica, con un óptimo de actividad a pH 8,5 y actividades semi-máximas alrededor de pH 7,6 y 9,2. Por encima de pH 8,5, los perfiles obtenidos con CDP-colina y 2',3'-cAMP fueron similares al obtenido con ADP-ribosa, pero no así por debajo de pH 8,5. Entre pH 6 y 8,5 las actividades hidrolíticas sobre CDP-colina y 2',3'-cAMP fueron casi constantes, mientras la actividad sobre ADP-ribosa disminuía desde pH 8,5 hacia valores más bajos de pH, hasta ser prácticamente indetectable a pH 6.

1.3.5 Caracterización del mutante H97A-ADPRibasa-Mn de *D. rerio*

La observación de que la ADPRibasa-Mn de pez cebra preparada como proteína recombinante expresada en *E. coli* era parcialmente activada por Mg^{2+} , mientras que la de ADPRibasa-Mn de rata no lo es, nos llevó a preguntarnos si la actividad dependiente de Mg^{2+} podría deberse a una contaminación por alguna ADP-ribosa hidrolasa procedente de las células bacterianas empleadas para la expresión heteróloga. Teniendo en cuenta que la proteína recombinante se había obtenido después de la adsorción de la proteína fusión GST/ADPRibasa-Mn sobre GSH-Sepharose y de su proteólisis específica por la proteasa PreScission, tal posibilidad no parecía muy probable. Sin embargo, puesto que en *E. coli* hay al menos una ADP-ribosa pirofosfatasa dependiente de Mg^{2+} [50,51], consideramos que no debíamos descartarla *a priori*. Una de las vías para poner esta hipótesis a prueba era la preparación de un mutante puntual de la ADPRibasa-Mn de pez cebra que presentase una pérdida clara de la actividad dependiente de Mn^{2+} respecto a la proteína salvaje. Si la actividad dependiente de Mg^{2+} perteneciese a una enzima contaminante, no debería ser afectada por dicha mutación, pero si las actividades dependientes de Mn^{2+} y de Mg^{2+} fuesen afectadas de forma similar por la mutación, podría concluirse que corresponden a la misma enzima.

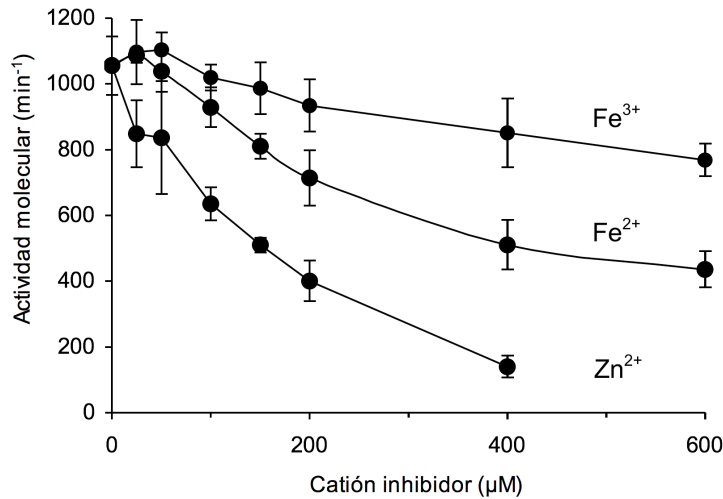


Figura 24: Inhibición de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* por Zn²⁺, Fe²⁺ y Fe³⁺. Las velocidades iniciales de hidrólisis de ADP-ribosa 500 μM se valoraron en condiciones estándar excepto que la concentración de Mn²⁺ fue 30 μM, y que se añadieron las concentraciones indicadas de cationes inhibidores en forma de cloruros. Los valores corresponden a medias ± desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.

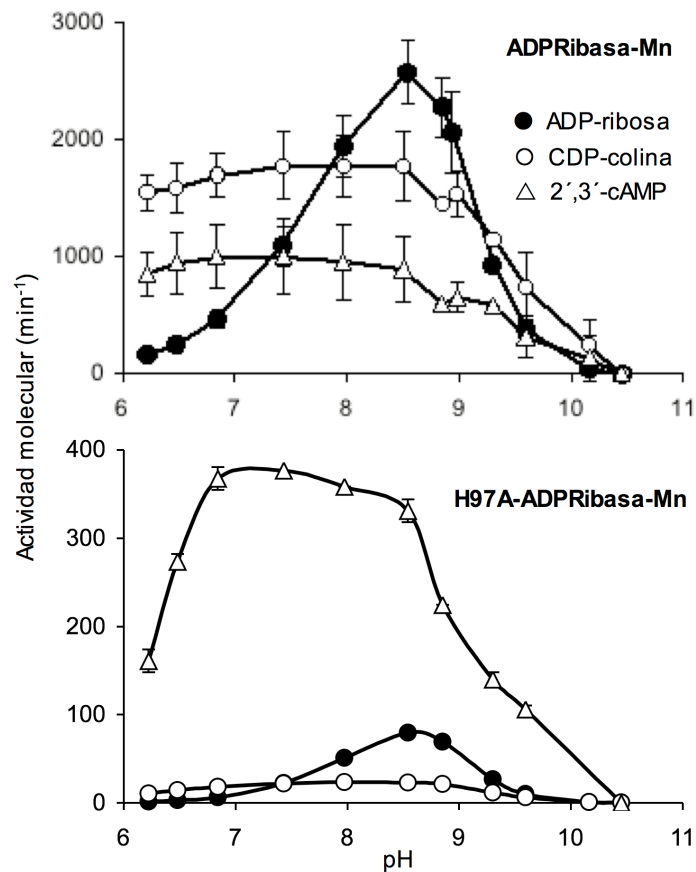


Figura 25: Respuesta de las actividades de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* y su mutante H97A a los cambios de pH. Las velocidades iniciales de hidrólisis de sustrato 500 μM, en presencia de Mn²⁺ 5 mM, se valoraron en condiciones estándar excepto que las mezclas de reacción se ajustaron a los valores de pH indicados empleando tampones de Tris/acetato (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 7,5-9,5) o glicina/NaOH (pH 9,8-10,8). Los valores de pH mostrados en las gráficas se midieron en las mezclas de reacción. Los resultados corresponden a medias ± desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.

Como se describe en el siguiente apartado de esta sección, al construir modelos teóricos de unión de diversos sustratos a la estructura tridimensional de la ADPRibasa-Mn de pez cebra, un aspecto común a todos ellos fue la participación del aminoácido His⁹⁷ en los complejos resultantes (véase la Figura 27). Este aminoácido aparecía a distancia de formación de un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del enlace P-O que la enzima hidroliza y parecía probable que la supresión de dicha interacción por un cambio de aminoácido afectara a la actividad. Basándonos en ello decidimos construir la proteína mutante H97A-ADPRibasa-Mn. La construcción de un plásmido codificador de esta proteína se hizo siguiendo el procedimiento de mutagénesis denominado *QuikChange*, a partir del plásmido pVP16-2NXF que codifica la proteína salvaje (sección 3.2.1) y la expresión y purificación de la proteína mutante se llevó a cabo de manera similar a la de la proteína salvaje (secciones 3.3 y 3.4.2).

En la Tabla 1, junto a los parámetros cinéticos ya comentados de la ADPRibasa-Mn salvaje, se presentan los obtenidos al estudiar la cinética de saturación de la proteína H97A-ADPRibasa-Mn. Se seleccionaron tres sustratos de diferente tipo: la ADP-ribosa, CDP-colina y 2',3'-cAMP. Los efectos de la mutación sobre los valores de k_{cat} y K_M de ADP-ribosa y CDP-colina fueron similares a grandes rasgos: fuertes descensos de k_{cat} (40-80 veces) y aumentos de menor magnitud de K_M (1,3-3,6 veces), de manera que ambos sustratos vieron fuertemente disminuidas sus respectivas eficacias catalíticas (60-280 veces). De manera inesperada, los parámetros catalíticos de la reacción con 2',3'-cAMP fueron mucho menos afectados: el valor de k_{cat} , en lugar de disminuir, aumentó 1,8 veces y el de K_M experimentó un aumento similar (2,2 veces), de manera que la eficacia catalítica prácticamente no cambió con este sustrato (de 22200 M⁻¹s⁻¹ pasó a 17500 M⁻¹s⁻¹).

El escaso efecto de la mutación H97A sobre la hidrólisis de 2',3'-cAMP podría considerarse un indicio de que esta actividad procedía de una enzima diferente de la ADPRibasa-Mn. No obstante, creemos que puede descartarse esta posibilidad porque la ADP-ribosa a concentraciones 72 μM y 144 μM, produjo la inhibición de la hidrólisis de 2',3'-cAMP 1680 μM por la H97A-ADPRibasa-Mn en un 30% y un 47%, respectivamente. Bajo la hipótesis de que ambos sustratos son hidrolizados por el mismo centro activo, la hidrólisis de 2',3'-cAMP debería ser inhibida competitivamente por la ADP-ribosa con un valor de K_i igual a su valor de K_M . Con los parámetros cinéticos de la H97A-ADPRibasa-Mn (Tabla 1), los porcentajes esperados de inhibición serían 34% y 51%, en muy buena concordancia con lo observado experimentalmente.

No obstante es necesario tener en cuenta que la falta de efecto significativo de la mutación H97A sobre la hidrólisis de 2',3'-cAMP se refiere a la actividad total, que de forma muy mayoritaria corresponde a la reacción de formación de 3'-AMP. Debe decirse que si bien la mutación no fue en detrimento de la actividad total sobre 2',3'-cAMP, sí lo fue al considerar exclusivamente la formación de 2'-AMP. Mientras que los productos formados por la enzima de tipo salvaje fueron 95% 3'-AMP y 5% 2'-AMP, el mutante H97A produjo un 98,5% y un 1,5%, respectivamente (Figura 19). Así pues, la mutación afectó muy poco a la mayoritaria actividad hidrolítica del P-O2' (y a la actividad total), pero redujo considerablemente la minoritaria actividad sobre el enlace P-O3'.

En la Figura 23 se representan los resultados obtenidos al explorar los efectos de la mutación H97A sobre la respuesta de la ADPRibasa-Mn al Mn²⁺ y al Mg²⁺. Por una parte, la curva de saturación por concentraciones crecientes de Mn²⁺, con ADP-ribosa como sustrato,

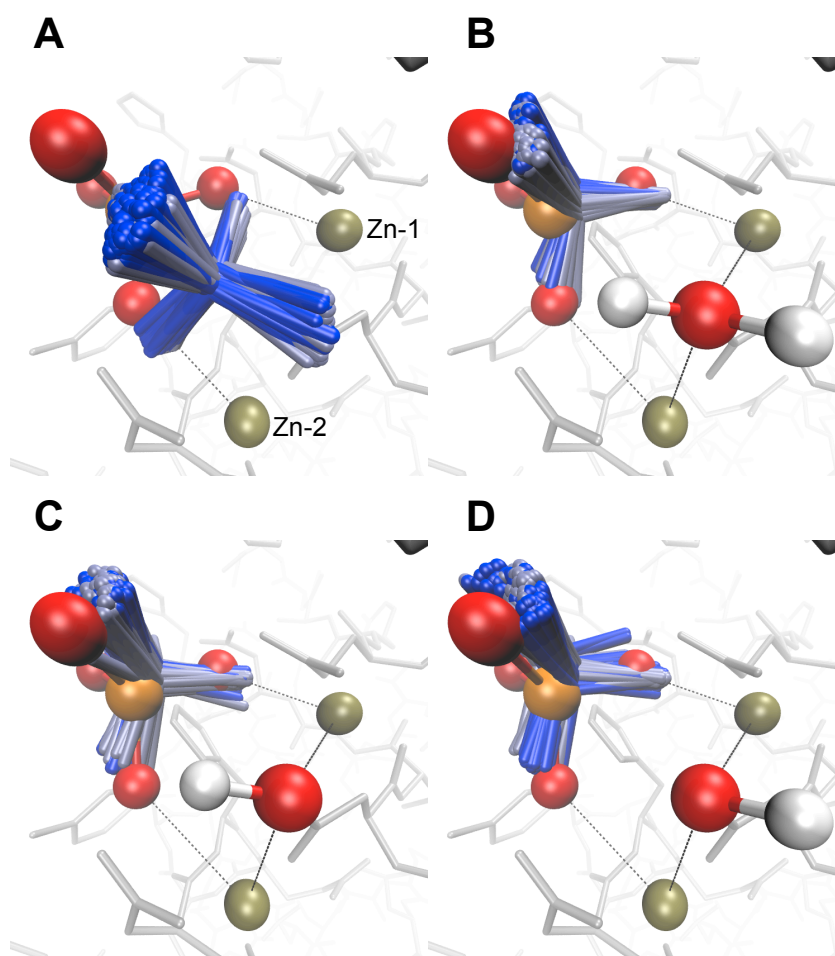
reflejó un comportamiento bifásico similar al de la enzima salvaje. Al ajustar estos datos a la ecuación I, las constantes de disociación K_A y K_B adoptaron valores de 130 μM y 1 mM, respectivamente (ajuste no mostrado), siendo K_A un orden de magnitud mayor y K_B de similar magnitud que los correspondientes valores obtenidos con la ADPRibasa-Mn de tipo salvaje y el mismo sustrato. Por otra parte, la enzima mutante mostró una actividad dependiente de Mg^{2+} reducida respecto a la salvaje en la misma proporción que la actividad dependiente de Mn^{2+} .

Por último, en la Figura 25 se presentan los resultados obtenidos al determinar los perfiles de pH-actividad de la enzima mutante. Estos perfiles fueron esencialmente iguales en su forma a los obtenidos con la enzima salvaje, aunque mostraron la fuerte pérdida de actividad sobre los sustratos ADP-ribosa y CDP-colina (mucho menos sobre 2',3'-cAMP), como ya se puso de manifiesto al considerar los parámetros cinéticos de las enzimas salvaje y mutante sobre dichos sustratos (Tabla 1).

1.3.6 Evaluación del papel del agua cristalográfica unida al centro dimetálico de la proteína de *D. rerio*

En la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* están presentes una molécula de agua que forma un puente con los dos iones del centro dimetálico (agua #844) y una molécula de fosfato también unida a ambos iones en forma bidentada (Figura 3.C; [35]). Las posiciones relativas de ambos elementos, agua y fosfato, indican que el primero de ellos podría servir como nucleófilo atacante del átomo de fósforo en las reacciones de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, suponiendo que la ocupación del centro activo por una molécula de sustrato posiciona uno de sus grupos fosfato de manera similar al fosfato presente en la estructura cristalina.

Para poner a prueba el efecto que puede tener el agua #844 en el posicionamiento del fosfato, se prepararon cuatro modelos de la ADPRibasa-Mn de pez cebra: sin ninguna molécula de agua explícita, con la molécula de agua #844 en su posición cristalográfica o con la molécula de agua en forma de ion hidróxido (dos formas posibles). Sobre estos cuatro modelos, desprovistos de la molécula de fosfato, se realizaron simulaciones de *docking* de fosfato para comprobar en qué grado se reproducía la posición que dicho ligando ocupa en la estructura de la proteína. Como la estructura de rayos X no permite identificar el estado de protonación del fosfato, se probaron dos hipótesis, PO_4^{3-} y HPO_4^{2-} , con las cuatro configuraciones del modelo proteico, generándose en cada simulación 200 poses. Dentro de cada modelo proteico, PO_4^{3-} y HPO_4^{2-} convergieron rápidamente hacia posiciones muy similares entre sí (Figura 26.ABCD), aunque en todos los casos las energías de unión de HPO_4^{2-} fueron más altas que las de PO_4^{3-} , lo que es consistente con una interacción electrostática menos fuerte en el primer caso (Figura 26.E). En la estructura de rayos X, el fosfato cristalográfico está coordinado a los dos iones zinc por dos oxígenos, con el átomo de fósforo a 3,33 y 3,71 Å de los iones del centro dimetálico. Comparando entre sí los resultados obtenidos con distintos modelos, lo más destacable es que, en ausencia de agua, el fosfato se posicionaba mucho más cerca de los metales que el fosfato cristalográfico, formando además un complejo inusual, con 3 átomos de O unidos a los dos metales (Figura 26.A). La presencia de agua (Figura 26.B) o de cualquiera de las dos formas de ion hidróxido (Figura 26.CD),



| E | Modelo de ADPRibasa-Mn | Sin agua (A) | Con H ₂ O (B) | Con OH ⁻ (C) | Con OH ⁻ (D) | Cristal ID 2NXF |
|----------|---|---|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | <i>Resultado de la unión de PO₄³⁻ (varillas azul claro)</i> | | | | <i>PO_{4x}</i> |
| | Distancia P–Zn-1 (Å) | 2,23 ± 0,05 | 2,97 ± 0,03 | 3,09 ± 0,06 | 3,12 ± 0,10 | 3,33 |
| | Distancia P–Zn-2 (Å) | 2,27 ± 0,09 | 3,69 ± 0,09 | 3,96 ± 0,07 | 4,00 ± 0,08 | 3,71 |
| | RMSD PO ₄ ³⁻ :PO _{4x} (Å) | 2,13 ± 0,09 | 0,50 ± 0,06 | 0,70 ± 0,07 | 0,72 ± 0,06 | 0 |
| | Energía (kcal/mol) | -18,09 ± 0,11 | -12,10 ± 0,06 | -8,60 ± 0,15 | -8,24 ± 0,17 | |
| | | <i>Resultado de la unión de HPO₄²⁻ (varillas azul oscuro)</i> | | | | |
| | Distancia P–Zn-1 (Å) | 2,29 ± 0,05 | 3,00 ± 0,03 | 3,16 ± 0,11 | 3,18 ± 0,13 | |
| | Distancia P–Zn-2 (Å) | 2,29 ± 0,07 | 3,72 ± 0,09 | 3,98 ± 0,05 | 3,95 ± 0,11 | |
| | RMSD HPO ₄ ²⁻ :PO _{4x} (Å) | 2,12 ± 0,07 | 0,49 ± 0,07 | 0,63 ± 0,12 | 0,58 ± 0,09 | |
| | Energía (kcal/mol) | -13,18 ± 0,11 | -8,73 ± 0,06 | -6,51 ± 0,12 | -6,49 ± 0,13 | |

Figura 26: Efecto de la presencia de una molécula de agua cristalográfica en la unión de fosfato al centro dimetálico de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*. A partir del modelo cristalográfico de la ADPRibasa-Mn (PDB ID 2NXF; [35]; Figura 3.A), se prepararon modelos de la proteína desprovistos de fosfato, que contenían los dos iones del centro dimetálico, sin agua (A), con agua en forma de H₂O (B), o con ion hidróxido por sustracción de un protón del agua (C y D). En todos los paneles gráficos se presenta como referencia el fosfato cristalográfico (P, naranja; O, rojo) en la posición que ocupa en el modelo 2NXF. Se realizaron simulaciones de unión de PO₄³⁻ (azul claro) y HPO₄²⁻ (azul oscuro; átomo de hidrógeno omitido) a los cuatro modelos A-D. (E) Datos sobre las posiciones ocupadas por PO₄³⁻ y HPO₄²⁻ después de las simulaciones de unión a los cuatro modelos de ADPRibasa-Mn y sus energías de unión calculadas por *AutoDock*; los valores de RMSD están calculados comparando las posiciones de los átomos P y O de PO₄³⁻/HPO₄²⁻ con las del fosfato cristalográfico PO_{4x}; los resultados son medias ± desviaciones estándar de las 200 poses obtenidas en cada simulación. Las distancias dadas en la columna de la derecha se tomaron directamente de la estructura cristalográfica [35].

produjo un impedimento estérico que no permitía que el ligando se acercase tanto a los metales y condujo a complejos de tipo bidentado en posiciones muy parecidas a las del fosfato cristalográfico. En todos los casos, en las simulaciones con PO_4^{3-} se observó una mayor proximidad al fosfato cristalográfico que en las simulaciones con HPO_4^{2-} (Figura 26.E). En resumen, las simulaciones de unión de fosfato a la ADPRibasa-Mn indican que el agua cristalográfica #844, sea en la forma de H_2O o de OH^- , pero preferentemente en la primera, debe estar presente para reproducir el posicionamiento del fosfato cristalográfico.

1.3.7 Simulación de la unión de sustratos a la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn: orientación respecto a la His⁹⁷ y a la molécula de agua coordinada con el centro dimetálico

Basándonos en la disponibilidad de la estructura tridimensional de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, en los resultados de su caracterización enzimática, y como una extensión de lo realizado con ADP-ribosa y cADPR sobre la ADPRibasa-Mn de rata (sección 1.2), se llevaron a cabo simulaciones de la unión de ADP-ribosa, cADPR, CDP-glicerol, CDP-etanolamina, CDP-colina y 2',3'-cAMP al centro activo de un modelo de la proteína de *D. rerio*. Los aspectos metodológicos se describen en las secciones 3.8.2, 3.9 y 3.12. En el caso de la ADP-ribosa se hicieron simulaciones de unión a los cuatro modelos proteicos considerados en relación con la unión de fosfato en la Figura 26, llegándose a conclusiones similares: en ausencia de la molécula de agua bidentada, las poses más favorables de ADP-ribosa mostraban el posicionamiento de uno de sus fosfatos más próximo al centro dimetálico que el fosfato cristalográfico, mientras que en presencia de agua el grupo fosfato unido a los metales quedaba en posición muy parecida a la del fosfato cristalográfico, y algo menos cuando el agua aparecía en forma de ion hidróxido. Por ello, para hacer simulaciones de la unión de sustratos a la ADPRibasa-Mn, se empleó el modelo que contiene una molécula de H_2O .

En la Figura 27 se presenta una selección de las mejores poses obtenidas para los sustratos arriba indicados. Debe entenderse que estas poses representan únicamente aproximaciones indicativas de formas de unión que pueden darse en el centro activo. Las uniones reales no serán estáticas ni tienen que ser únicas. En primer lugar debemos destacar que en todos los casos, uno de los átomos de P del sustrato puede quedar muy próximo (0,2–0,7 Å; excepto cADPR, a 1,2 Å) al átomo de P del Pi que está incluido en la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn. Todos los sustratos presentaron el correspondiente grupo fosfato en una posición razonable para llegar a formar, como el Pi, un complejo bidentado con el centro dimetálico. En la Figura 27 se destacan además las posiciones de los sustratos en relación con dos elementos que consideramos esenciales en la catálisis enzimática.

Por una parte, se destaca una molécula de agua que en la estructura cristalina aparece coordinada, formando un puente, con los dos iones del centro dimetálico. Esta molécula de agua quedó, en todas las poses presentadas en la Figura 27, a una distancia de 2,6–3,0 Å del átomo de P, adecuada para actuar como nucleófilo atacante en la reacción hidrolítica. En relación con dicho ataque, su dirección forma, con el enlace P-O escindible, un ángulo muy próximo al óptimo de 180° (ataque en línea) en todos los casos (168,2°–174,8°) excepto con cADPR (129,5°).

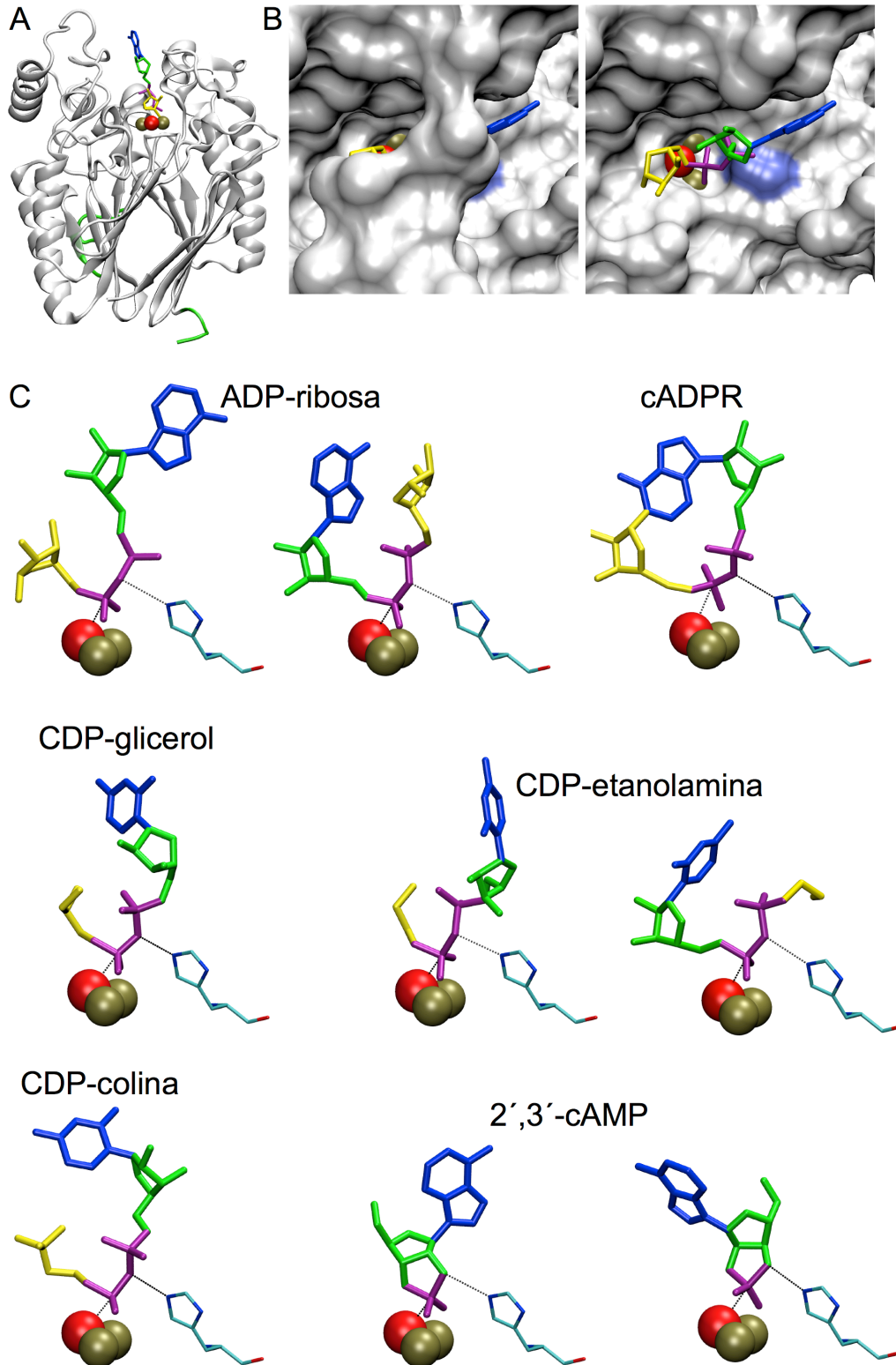


Figura 27: Sustratos unidos al centro activo de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*. A: Vista general con la ADP-ribose unida al sitio activo igual que en la primera pose individual mostrada en la parte C. B: Vista superior de A mostrando (izquierda) la superficie proteica completa y (derecha) la misma vista con una parte de la proteína retirada para permitir la visualización de la ADP-ribose unida. C: Poses encontradas para distintos sustratos; para ADP-ribose, CDP-etanolamina y 2',3'-cAMP se presentan dos poses con distintas orientaciones. En todos los casos se presenta el residuo His⁹⁷, que corresponde al motivo GNH[D/E]. Esferas doradas, iones metálicos del centro dinuclear; esfera roja, molécula de agua que forma un puente con los iones metálicos y que supuestamente actúa como nucleófilo en las reacciones de la ADPRibasa-Mn. Este ataque es muy probable que deba hacerse con el agua en forma de ion hidróxido (sección 1.4.4).

Por otra parte, se destaca la cadena lateral del aminoácido His⁹⁷, perteneciente al motivo GNH[D/E] incluido en la firma dispersa típica de la superfamilia metalofosfoesterasas. Uno de los átomos de N del anillo de imidazol de este residuo está a distancia de puente de hidrógeno del átomo de O del enlace P-O escindible. El posicionamiento de los sustratos respecto a este residuo, sugiere que His⁹⁷ puede actuar como catalizador ácido/base general y/o, más probablemente (ver la Discusión), como catalizador por orientación del sustrato hacia una posición productiva.

Al modelar la unión de ADP-ribosa, CDP-etanolamina y 2',3'-cAMP se encontraron, para cada uno de ellos, dos poses aproximadamente igual de favorables que ofrecían distintas orientaciones de los sustratos (Figura 27). Con los dos primeros, la doble orientación conduciría a que, en un caso, el enlace escindible fuera AMPO-PORibosa (CMPO-POetanolamina) con AMP (CMP) como grupo saliente, y en el otro caso, el enlace escindible fuera AMP-OPORibosa (CMP-OPOetanolamina) con fosforribosa (fosfoetanolamina) como grupo saliente. Los productos de la reacción de hidrólisis serían en cualquier caso los mismos: AMP y fosforribosa a partir de ADP-ribosa, o CMP y fosfoetanolamina a partir de CDP-etanolamina. En cambio, con el sustrato 2',3'-cAMP, las dos orientaciones conducirían a que el enlace escindible fuese P-O2' o P-O3', y los respectivos productos formados serían diferentes: 3'-AMP o 2'-AMP. La observación de que la ADPRibasa-Mn hidrolizó 2',3'-cAMP dando lugar a un 95% de 3'-AMP y un 5% de 2'-AMP como productos alternativos indica que este sustrato puede efectivamente unirse a la enzima en dos orientaciones diferentes. Por el contrario, no se dispone de evidencia para dilucidar si el doble posicionamiento virtual de ADP-ribosa y CDP-etanolamina refleja o no el comportamiento real de la enzima. Puede decirse que un resultado similar se había obtenido con la ADPRibasa-Mn de rata y la ADP-ribosa (Figura 4.CD).

1.4 Discusión: ADPRibasa-Mn

1.4.1 Caracterización de la familia de metalofosfatasas similares a la ADPRibasa-Mn o *ADPRibase-Mn-like*

El principal aspecto del trabajo descrito en esta parte de la Tesis Doctoral es que ha servido para definir una nueva familia de metalofosfatasas que ha recibido en SCOP (edición 1.75, Junio 2009), dentro de dicha superfamilia, la denominación de familia "Similar a la ADPRibasa-Mn" (*ADPRibase-Mn-like*). Como ya se ha dicho en la sección 1.1 de esta Memoria, la creación de esta familia fue posible por la determinación de la estructura tridimensional de una proteína del pez cebra *D. rerio* en el *Center of Eukaryotic Structural Genomics* [35] y por la clonación molecular y caracterización funcional en nuestro laboratorio de la ADPRibasa-Mn de rata [4,5] que, en buena parte, corresponde a lo descrito en la sección 1.2 de esta Tesis. Esto significa que la definición actual de la familia *ADPRibase-Mn-like* está basada en prototipos estructural y funcional diferentes. La caracterización funcional de la ADPRibasa-Mn de pez cebra, descrita en la sección 1.3, ha servido para unificar el conocimiento sobre estructura y función de esta familia en una misma proteína. Al mismo tiempo, la comparación entre la ADPRibasa-Mn de rata y la de pez cebra ha puesto de manifiesto qué aspectos funcionales pueden estar conservados dentro de la familia y cuáles pueden diferir de un miembro a otro.

Respecto a las características estructurales de la familia *ADPRibase-Mn-like* debe destacarse que en nuestro laboratorio, recientemente, nos hemos preguntado cuáles podrían ser los elementos estructurales únicos que la distinguen de las restantes familias pertenecientes a la superfamilia de las metalofosfatasas. Mediante alineamientos estructurales, João M. Ribeiro ha identificado tres elementos de la ADPRibasa-Mn de pez cebra como específicos de la familia *ADPRibase-Mn-like* [6]. Son tres regiones que no tienen contrapartida en las estructuras conocidas representativas de las otras familias de metalofosfatasas: están formadas por los aminoácidos 20-35, 65-70 y 150-195 de la ADPRibasa-Mn de pez cebra. Tales regiones están conservadas en los modelos estructurales teóricos que se encuentran registrados en la base de datos *SWISS-MODEL Repository* [52] para proteínas ADPRibasa-Mn de otros organismos, entre ellos el modelo teórico de la ADPRibasa-Mn de rata empleado para desarrollar la sección 1.2 de esta Memoria. La

identificación de dichos elementos únicos no es parte formal de esta Tesis, pero el artículo en que se describe [6] se reproduce en el Suplemento CD-ROM (Artículo 3) porque contiene otros resultados que sí lo son. Algunos de los resultados de la caracterización funcional de la ADPRibasa-Mn de pez cebra o de rata pueden relacionarse con estos elementos estructurales únicos (ver más abajo).

1.4.2 Especificidad de sustrato de las enzimas ADPRibasa-Mn: preferencia por ADP-ribosa/CDP-alcoholes y significado de las actividades sobre 2',3'-cAMP y cADPR

Por lo que se refiere a la especificidad global de la ADPRibasa-Mn, el estudio de la enzima de *D. rerio* llega como una confirmación de la preferencia combinada, un tanto inesperada, por ADP-ribosa y CDP-alcoholes, anteriormente sólo descrita para la enzima de rata [7]. En las condiciones investigadas, ninguna de las dos enzimas hidroliza, por ejemplo, ADP-glucosa, UDP-glucosa, CDP-glucosa, CDP, CMP, AMP o 3',5'-cAMP. Al considerar sus constantes de especificidad (k_{cat}/K_M) con los sustratos significativos, las enzimas de rata y de pez cebra son similares en sus altas eficacias como hidrolasas de ADP-ribosa ($\approx 3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), su mejor sustrato, y también son similares en su eficacia 10 veces menor con CDP-etanolamina ($\approx 3.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Con los restantes sustratos, ambas enzimas presentaron diferencias cuantitativas: la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* fue 2 veces (CDP-glicerol), 17 veces (CDP-colina), 34 veces (ADP) y 150 veces (cADPR) menos eficaz que la de rata (Tabla 1). Por lo tanto puede decirse que la especificidad de la enzima de *D. rerio* por ADP-ribosa respecto a otros sustratos es más estricta que la de la enzima de rata. La gran diferencia registrada en las respectivas actividades sobre cADPR se discute más abajo.

En el curso del estudio de la ADPRibasa-Mn de pez cebra se encontró que tiene actividad fosfodiesterasa sobre 2',3'-cAMP, que da 3'-AMP como principal producto. La posible actividad de la ADPRibasa-Mn de rata sobre este sustrato no se había estudiado anteriormente [4,7]. Por ello, es importante señalar aquí que en el laboratorio se ha comprobado *a posteriori* que esta actividad la presentan también la ADPRibasa-Mn de rata y la ADPRibasa-Mn humana [53], que ha sido recientemente clonada, y se está caracterizando en el laboratorio como enzima recombinante. Acerca de la actividad 2',3'-fosfodiesterasa de las enzimas ADPRibasa-Mn, debe tenerse en cuenta que, de acuerdo con lo recientemente publicado, se trata de un rasgo común a muchas fosfodiesterasas, pertenecientes o no a la superfamilia de las metalofosfatasa [54]. Puesto que esta actividad puede relacionarse con la baja energía de activación de la hidrólisis del enlace P-O2' comparado con la del P-O3', se ha especulado que el centro activo de aquellas enzimas que forman preferentemente 2'-AMP debe estar específicamente diseñado para impedir que el 2',3'-cAMP adopte la orientación necesaria para hidrolizar el enlace P-O2'. Claramente, éste no es el caso de la ADPRibasa-Mn, puesto que, en las simulaciones de unión de 2',3'-cAMP al centro activo, este sustrato pudo adoptar dos orientaciones, una adecuada para la hidrólisis de P-O2' y otra para P-O3', pero la reacción de formación de 3'-AMP fue la predominante. Por lo tanto, se puede decir que la hidrólisis de 2',3'-cAMP por la ADPRibasa-Mn es otra manifestación de esta actividad "inespecífica" de fosfodiesterasas que, por otra parte, pueden tener especificidades de sustrato amplias o restringidas [54]. Más abajo se discute el papel que, en relación con esta actividad, se ha atribuido por otros autores [45] a la histidina de la región GNH[D/E] comprendida en el motivo secuencial de las metalofosfatasa (sección 1.1), que en la ADPRibasa-Mn de pez cebra corresponde al residuo His⁹⁷ mutado a Ala dentro de esta Tesis.

Otra importante novedad aquí descrita es la actividad de la ADPRibasa-Mn sobre cADPR. Este nucleótido es un regulador universal del Ca^{2+} que, entre otras cosas, como la ADP-ribosa, afecta a los canales TRPM2 y al Ca^{2+} citosólico en células inmunitarias [55,56,57]. La cADPR es producida por enzimas de la familia ADP-ribosil ciclasa [58] incluyendo la ciclasa soluble de *Aplysia* [59], las NADAsas CD38 de mamíferos, ligadas a membranas [42,60,61,62,63,64,65], BST-1/CD157 [66,67], y la NADasa mitocondrial [68]. La síntesis de cADPR implica la formación de un enlace glicosídico inusual entre el átomo N1 de la adenina y el C1 de la ribosa distal en el NAD, convirtiendo este compuesto en cADPR y nicotinamida. En el caso de CD38, la ADP-ribosil ciclasa más estudiada en mamíferos, ésta es una actividad relativamente pequeña comparada con la hidrólisis de NAD a ADP-ribosa por su actividad NADasa. Sin embargo hay indicaciones de que la ciclasa es favorecida sobre la hidrolasa a pH ácido, y de que ciclasas localizadas en el interior de vesículas ácidas de huevos de erizo de mar pueden ser responsables de la formación de cADPR, después enviado al citoplasma por transportadores de membrana [69]. También se ha indicado recientemente que CD38 puede presentar en parte una orientación de su centro activo hacia el citoplasma, pudiendo generar directamente cADPR intracelular [70]. Todas las ADP-ribosil ciclasas probadas catalizan también la conversión de cADPR en ADP-ribosa por hidrólisis de la unión N^1 -glicosídica. Durante largos años ésta ha sido la única vía enzimática conocida para el recambio de cADPR. Para este compuesto, la estrategia de recambio fosfohidrolítico parecía ser inoperante, pues no se conocía ninguna enzima con actividad de cADPR fosfohidrolasa, incluidas fosfodiesterasas o nucleótido pirofosfatasa de amplia especificidad [41,42,71,72,73]. Así pues, el hallazgo de la actividad cADPR fosfohidrolasa de la ADPRibasa-Mn de rata constituye una importante novedad en este campo. La formación de pRib-AMP por la ADPRibasa-Mn de rata podría representar una nueva vía de recambio de cADPR, que podría ser operativa en el citoplasma. Aunque la eficacia catalítica de esta reacción frente a la hidrólisis de ADP-ribosa es sólo de 1:65, es de notar que esta proporción es aproximadamente igual que el cociente de la formación de cADPR/ADP-ribosa a partir de NAD por CD38 [42,62,74,75]. El producto de fosfohidrólisis de cADPR por la ADPRibasa-Mn, pRib-AMP, es conocido como un intermediario de la biosíntesis de histidina, formado por hidrólisis de pRib-ATP en procariontas, eucariotas inferiores y plantas [39,76,77]. Además, muy recientemente, se ha descrito la presencia de pRib-AMP y de cADPR en eritrocitos humanos, con un marcado incremento en los niveles de ambos compuestos en relación con la invasión por el agente de la malaria *Plasmodium falciparum* [78] y con un posible papel de la liberación de Ca^{2+} mediada por cADPR en dicho proceso de invasión [79]. Esta situación tiene connotaciones muy interesantes, y se ha propuesto que los componentes de la vía de señalización de cADPR y los mecanismos para su recambio metabólico, incluyendo su posible conversión en pRib-AMP, son de interés farmacológico potencial en relación con la malaria [78]. Sin embargo hay numerosos interrogantes que permanecen sin aclarar, y nos gustaría mencionar aquí algunos de ellos, como la falta de información sobre la presencia o no de ADPRibasa-Mn funcional en eritrocitos humanos, y la ausencia de ortólogos de ADPRibasa-Mn y de ADP-ribosil ciclasas en el genoma de *P. falciparum* (resultados de comparaciones *BLAST*, no mostrados).

Como ya se ha comentado más arriba, la diferencia más notable entre las actividades de las ADPRibasa-Mn de rata y de *D. rerio* se pone de manifiesto precisamente al considerar la actividad fosfohidrolítica sobre cADPR. La ADPRibasa-Mn de rata hidroliza cADPR con una constante de especificidad de $4160 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pero la actividad cADPR fosfohidrolasa de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, si bien es detectable mediante la valoración del producto pRib-AMP por HPLC, presenta una eficacia catalítica de sólo $28 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, comparativamente insignificante. Hay que destacar que esta diferencia entre ambas enzimas parece una

diferencia genuina entre enzimas de mamífero y de pez, pues la ADPRibasa-Mn humana hidroliza cADPR con una eficacia similar a la de rata ($\approx 4000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [53]. Para reforzar la significación de la escasa actividad de la ADPRibasa-Mn de pez cebra sobre cADPR, se analizó el genoma de *D. rerio* en busca de homólogos potenciales de las cADPR sintetasas/glicohidrolasas humanas CD38 o BST-1. Las búsquedas *BLAST* realizadas dieron resultado negativo, indicando que no sólo la ADPRibasa-Mn de pez cebra es ineficaz como fosfohidrolasa de cADPR, sino que las vías más conocidas de síntesis y degradación de este regulador parecen ser inexistentes en *D. rerio*. Si esto refleja una situación filogenética general, sería un argumento indirecto a favor de la importancia de la ADPRibasa-Mn en la señalización por cADPR.

1.4.3 El centro activo de la ADPRibasa-Mn

La estructura tridimensional de la ADPRibasa-Mn de pez cebra ([35] y Figura 3) y el modelo teórico de la ADPRibasa-Mn de rata (Figura 4) contienen una hendidura en cuyo fondo se encuentra el centro dimetálico típico de la superfamilia metalofosfatasa, así como una molécula de fosfato en los cristales de la enzima de *D. rerio*. Todo indica que dicha hendidura contiene el centro activo de la ADPRibasa-Mn.

Por una parte, las simulaciones de *docking* a ambas proteínas confirmaron que los sustratos encajan favorablemente en dicha hendidura. Además, en los resultados del *docking* de ADP-ribosa, CDP-alcoholes y 2',3'-cAMP a la ADPRibasa-Mn de pez cebra, se constató la disposición de tres grupos de manera que podrían participar en la hidrólisis de la unión fosfodiéster o fosfoanhídrido catalizada por la enzima. Estos tres grupos son: (a) una molécula de agua presente en los cristales enzimáticos con un alto grado de ocupación, unida al centro dimetálico formando un puente con los dos metales, y colocada respecto al átomo de fósforo del enlace P-O escindible en buena orientación para actuar como nucleófilo; (b) el aminoácido His⁹⁷, que es parte del motivo GNH[D/E] de la firma dispersa de las metalofosfoesterasas, y que se dispone de manera que un átomo de nitrógeno del anillo de imidazolio forma un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del mencionado enlace P-O; (c) el aminoácido Arg³¹, cuyas cargas positivas quedan próximas y establecen una interacción favorable con las cargas negativas de los fosfato(s) del sustrato. El papel de estos grupos se discute con mayor detalle en apartados posteriores.

Por otra parte, las tres regiones estructurales recientemente identificadas cómo específicas de la familia *ADPRibase-Mn-like* se localizan alrededor de la mencionada hendidura [6]. Una de tales regiones, formada por los aminoácidos 20-35 de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, incluye el residuo Arg³¹ arriba citado, mientras que el resto de dicha región y las regiones formadas por los aminoácidos 65-70 y 150-195 quedan demasiado alejadas para participar en la catálisis. Su localización hace pensar que puedan tener algún papel en la unión de grupos funcionales del sustrato relativamente separados del grupo o grupos fosfato: tal vez la mitad X de sustratos NDP-X (ribosa, alcohol) y sobre todo el nucleósido (adenosina, citidina). De hecho, Arg³¹ es el único aminoácido componente de las tres regiones 20-35, 65-70 y 150-195 que en las simulaciones de *docking* se dispone próximo al grupo pirofosfato de la ADP-ribosa, por ejemplo, mientras que algunos de los restantes aminoácidos quedan próximos a la adenosina o la ribosa. Lo mismo puede decirse de las regiones de la ADPRibasa-Mn de rata equivalentes a las anteriores: son las formadas por los aminoácidos

32-47, 79-84 y 166-208. La primera contiene el aminoácido Arg⁴³, que ocupa una posición equivalente a la Arg³¹ de la enzima de pez cebra.

Los complejos de la ADPRibasa-Mn con sustratos unidos por simulación de *docking* muestran el centro activo en una conformación predominantemente cerrada, de forma que no está claro que en esas condiciones una molécula de sustrato pudiera acceder directamente al centro activo. Esta es una de las razones por las que se decidió hacer simulaciones de dinámica molecular de la proteína y de sus complejos. Estas simulaciones se hicieron en su momento empleando el modelo teórico de la ADPRibasa-Mn de rata. Es indudable que tendría interés hacerlas también con la estructura experimental de la proteína de pez cebra, pero, por razones de temporalidad, esto todavía no se ha hecho. En cualquier caso, las simulaciones hechas con la ADPRibasa-Mn de rata revelan algunas características de la hendidura potencialmente relevantes en relación con su papel como contenedor del centro activo. En primer lugar, la dinámica molecular de la hendidura pone de manifiesto su conversión a conformaciones mucho más abiertas, tanto en ausencia de sustrato unido, como en presencia de cADPR. En este último caso, la apertura del centro activo se produce acompañada de una torsión de 60° por parte del ligando. La tendencia a pasar a una conformación abierta del centro activo es mucho menos apreciable en el complejo de la ADPRibasa-Mn con ADP-ribosa, el sustrato más favorable. Las conformaciones abiertas del centro activo permitirían la entrada del sustrato y ello podría provocar un ajuste inducido conducente a complejos enzima-sustrato catalíticamente activos. En segundo lugar, las simulaciones de dinámica molecular revelaron un efecto de la ADP-ribosa, unida al centro activo, sobre el lazo formado por los aminoácidos 34-41 de la ADPRibasa-Mn de rata. Este lazo es parte de la región única 32-47 y se presenta muy desordenado en ausencia de ligando, mientras que su movilidad disminuye en presencia de ADP-ribosa o de cADPR (Figura 10.AB). Dentro de este lazo, durante la simulación dinámica, se produce un contacto hidrofóbico por apilamiento entre la base adenina y el anillo de Phe³⁷ (Figura 17.CD), así como la formación de un puente de hidrógeno entre la ribosa-1 y la cadena lateral de Gln³⁸ (Figura 13.AC). En la simulación con cADPR, el apilamiento con Phe³⁷ no se observó, aunque se produjeron algunos contactos atómicos entre la cadena lateral de este aminoácido y el ligando (Figura 16), pero sí que se establecieron puentes de hidrógeno de la cadena lateral de Gln³⁸ con la adenina en la primera parte de la simulación, o con la ribosa-1 en una parte más avanzada (Figura 15.AC), después de la torsión de 60° de la cADPR antes mencionada. Por lo tanto, la disminución del desorden en el lazo 34-41 parece deberse a interacciones con los ligandos. La importancia de la interacción entre la ADP-ribosa y el residuo de Phe³⁷ se ha corroborado recientemente en un estudio de la ADPRibasa-Mn humana, en la que se ha visto que la mutación del aminoácido equivalente (también Phe³⁷) a alanina produce una elevación de la K_M para ADP-ribosa, con poco efecto sobre k_{cat} [53].

1.4.4 Mecanismo de reacción de la ADPRibasa-Mn: papel de la molécula de agua bidentada con el centro dimetálico

En general se acepta que las metalofosfoesterasas hidrolizan sus sustratos mediante un ataque nucleofílico directo por una molécula de agua activada por coordinación con el centro dimetálico dinuclear, sin que se formen intermediarios covalentes enzima-producto [80]. Sin embargo, tanto la naturaleza precisa del nucleófilo como la forma de unión del sustrato han sido objeto de controversias. Resumidamente, hay dos propuestas diferentes: (i) unión

terminal del nucleófilo a uno de los iones metálicos, M1, que es Fe^{3+} en las fosfatasa ácida púrpura [30] y Mn^{2+} en la fosfatasa λPP [81]; (ii) unión bidentada del nucleófilo formando un puente entre ambos metales [82,83]. En el primer caso, el sustrato se uniría terminalmente al metal no unido al nucleófilo; en el segundo, la unión del sustrato sería bidentada como la del nucleófilo, formando un puente de fosfato. En la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* hay una molécula de agua formando un puente entre ambos iones y una molécula de Pi unida en forma bidentada. Con pequeñas desviaciones, los sustratos de la ADPRibasa-Mn unidos virtualmente a la proteína de pez cebra con la molécula de agua, adoptan poses en las que uno de los grupos fosforilo queda orientado también en forma (casi) bidentada. Además, en dichas poses, todos los sustratos, excepto cADPR, aparecen en una posición adecuada para un ataque nucleofílico en línea, formando un ángulo con el enlace P-O escindible no muy alejado del ideal de 180° ($168,2^\circ$ - $174,8^\circ$). No es así, sin embargo, en el caso de cADPR que, aunque puede unirse al centro activo, no adopta una pose adecuada para un ataque en línea, pues el ángulo presentado para este posible ataque es de $129,5^\circ$. Esto está de acuerdo con el valor de K_M para cADPR poco mayor que el de la ADP-ribosa, pero una k_{cat} extremadamente pequeña, como se encontró experimentalmente (Tabla 1). No es posible comparar la posición de cADPR respecto al agua en la proteína de pez cebra con lo que sucede en la proteína de rata, porque en este caso no se hicieron simulaciones de *docking* incluyendo una molécula de agua bidentada. Sin embargo, como ya se ha dicho, recientemente se ha comprobado que la ADPRibasa-Mn humana tiene actividad de cADPR fosfohidrolasa de igual magnitud que la enzima de rata. En el caso de la ADPRibasa-Mn humana se han hecho simulaciones de *docking* incluyendo una molécula de agua bidentada y se ha comprobado que cADPR puede unirse al centro activo en posiciones adecuadas para un ataque en línea, presentando un ángulo de ataque de 170° [53].

La correlación entre el grado de actividad cADPR hidrolasa de las enzimas de pez cebra y humana, y la adopción de poses que presentan ángulos inadecuados o adecuados para dicho ataque, corroboran la intervención del agua unida al centro dimetálico en forma bidentada como nucleófilo en las reacciones de la ADPRibasa-Mn. En cualquier caso, la forma de agua que actuaría como nucleófilo no sería H_2O , sino probablemente OH^- , como se ha propuesto en general para otras metalofosfatasa bimetalicas [80,82,83], y para compatibilizar la acción nucleofílica con la unión bidentada al centro dimetálico.

1.4.5 Mecanismo de reacción de la ADPRibasa-Mn: papel de la histidina del motivo GNH[D/E] como catalizador por orientación e independencia de la actividad 2',3'-cAMP fosfodiesterasa respecto a dicho aminoácido

En todos los complejos formados por los sustratos en el centro activo de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, un átomo de N del anillo de imidazolio del aminoácido His⁹⁷ (que es parte del motivo GNH[D/E] de la firma dispersa de las metalofosfatasa) forma un puente de hidrógeno con el átomo de O del enlace P-O escindible. Los efectos de la sustitución de His⁹⁷ por alanina sobre los parámetros cinéticos de la enzima indican que este residuo tiene un papel en la catálisis (Tabla 1). En otros miembros de la superfamilia, la histidina GNH[D/E] se requiere para la actividad enzimática, pero su papel concreto no está totalmente definido [80]. Se ha propuesto que puede actuar sobre el grupo saliente alcohol, bien como un catalizador ácido/base general o contribuyendo a la neutralización de su carga negativa en el estado de transición [84]. En la ADPRibasa-Mn, en tanto ésta actúa como

pirofosfohidrolasa, esa intervención parecería perder importancia, puesto que el grupo saliente es un fosfato esterificado, como AMP o fosforribosa en el caso de la hidrólisis de ADP-ribosa. Solamente en la reacción de hidrólisis de 2',3'-cAMP aparece un grupo saliente alcohol, pero precisamente en este caso la mutación H97A tiene poco efecto sobre el valor de k_{cat} (Tabla 1). Una interesante posibilidad alternativa para interpretar la importancia de His⁹⁷ en la catálisis por la ADPRibasa-Mn de pez cebra es que, como en el caso de la familia de las fosfatasas ácidas púrpura [85], el papel de la histidina de GNH[D/E] se base en el posicionamiento del sustrato en la orientación correcta respecto al nucleófilo (catálisis por orientación). La fuerte disminución de k_{cat} propiciada por la mutación H97A en las reacciones de hidrólisis de fosfoanhídridos se explicaría por la menor probabilidad de que, en ausencia del efecto orientador de His⁹⁷, el sustrato alcance a colocarse en la orientación en línea. En este contexto, la marcada independencia de la hidrólisis de 2',3'-cAMP respecto a His⁹⁷ debe interpretarse como una indicación de que este compuesto adopta fácilmente la orientación correcta en el centro activo. Ello puede relacionarse con la relativa rigidez de este sustrato comparado con los otros y, por lo tanto, con su menor grado de libertad dentro del centro activo. De hecho, esto puede deducirse del análisis cuidadoso de los resultados de las simulaciones de unión, como se explica a continuación.

Las poses encontradas en las simulaciones de unión de ligandos no son únicas, sino que en realidad se pueden clasificar en *clusters* o agrupaciones. Por lo tanto, las poses seleccionadas en la Figura 27 se pueden considerar representativas escogidas dentro de un grupo formado por miembros que ocupan posiciones parecidas entre sí. Las simulaciones de unión se prolongaron hasta conseguir un número de 100-200 poses dentro del centro activo. Estos conjuntos fueron analizados mediante el algoritmo de Jarvis-Patrick para determinar el número de *clusters* en cada caso [86]. En este análisis se encontró que con ADP-ribosa y con los CDP-alcoholes podían definirse 80-145 *clusters* diferentes, con cADPR 18, y con 2',3'-cAMP solamente 4, a pesar de que con este ligando se obtuvo el mayor número total de poses dentro del activo. Esto, sin duda, puede interpretarse como un indicador cuantitativo de la menor diversidad de posiciones que 2',3'-cAMP puede adoptar, comparado con los otros sustratos. Esta diferencia puede explicar el efecto diferencial de la mutación H97A sobre las actividades de la ADPRibasa-Mn: con sustratos que pueden adoptar muchas poses diferentes, el efecto orientador de la histidina es decisivo, pero la muy restringida diversidad de posicionamiento de 2',3'-cAMP hace que, una vez que el sustrato está en el centro activo, His⁹⁷ resulta poco importante, por no decir innecesario, puesto que existen pocas posiciones alternativas a la productiva.

En un estudio publicado acerca de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos 2',3'-cíclicos se ha investigado el papel de la histidina del motivo GNH[D/E] en dicha actividad mediante la comparación de formas de tipo salvaje y mutante de tres fosfohidrolasas dinucleares [45]. (i) La polinucleótido quinasa/fosfatasa *CthPnkp* de *Clostridium thermocellum* es una fosfatasa/fosfodiesterasa que, entre otras cosas, hidroliza 2',3'-cAMP produciendo exclusivamente 2'-AMP. La sustitución de la histidina GNH[D/E] (His²⁸⁴ en este caso) por Ala, Asn o Gln produce una enzima con mucha menos actividad sobre 2',3'-cAMP, pero mayor actividad sobre bis-*p*-nitrofenilfosfato [87]. (ii) La proteína Rv0805 de *Mycobacterium tuberculosis* es una enzima inicialmente descrita como fosfodiesterasa de nucleótidos 3',5'-cíclicos [88], pero que después se demostró que es mucho más activa sobre 2',3'-cAMP, dando 3'-AMP como producto mayoritario acompañado de una pequeña proporción de 2'-AMP. La sustitución de la histidina GNH[D/E] (His⁹⁸ en este caso) por Ala o Asn suprimió la fosfodiesterasa 2',3' sin afectar a la actividad sobre bis-*p*-nitrofenilfosfato [45]. (iii) La proteína YfcE de *E. coli* hidroliza fosfodiésteres artificiales, pero no, o sólo muy

lentamente, 2',3'-cNMP [89]. En esta enzima, el residuo de histidina equivalente a los anteriores está sustituido por Cys⁷⁴. Cuando esta cisteína se sustituye por histidina, la proteína YfcE mutada adquiere una vigorosa actividad de 2',3'-cNMP fosfodiesterasa que da 3'-AMP como único producto [45]. Basándose en estos resultados se ha concluido que la histidina GNH[D/E] es un determinante de la actividad 2',3'-cNMP fosfodiesterasa [45]. Sin embargo, el hecho de que la proteína mutante H97A-ADPRibasa-Mn sea completamente activa sobre 2',3'-cAMP (Tabla 1) no encaja en esta generalización, indicando que las cosas son más complicadas y que la actividad fosfodiesterasa 2',3' de las metalofosfatasa no se puede atribuir sólo a la presencia de la histidina GNH[D/E], sino que probablemente se relaciona con factores adicionales que actúan positiva o negativamente.

El papel de la histidina del motivo GNH[D/E] en la catálisis de las enzimas ADPRibasa-Mn, incluyendo su menor importancia en la hidrólisis de 2',3'-cAMP, ha sido confirmado recientemente por experimentos de mutagénesis puntual de la enzima humana, en los que el residuo correspondiente (His¹¹¹ en esta proteína) ha sido sustituido por alanina [53].

1.4.6 Mecanismo de reacción de la ADPRibasa-Mn: papel de una arginina que interacciona electrostáticamente de forma favorable con los fosfatos del sustrato

En los cristales de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, que contienen un fosfato ligado al centro dimetálico, el grupo guanidino del aminoácido Arg³¹ queda orientado hacia él. Se ha sugerido que esta disposición indica que la arginina puede estar implicada en la neutralización de la carga del sustrato o de una especie de transición [90]. Esta orientación se repite en los complejos con sustratos obtenidos por *docking* a la estructura de la proteína de pez cebra o al modelo teórico de la ADPRibasa-Mn de rata (en este caso, el aminoácido equivalente es Arg⁴³). La importancia de este residuo se ha confirmado también recientemente por experimentos de mutagénesis de la enzima humana, en los que el residuo correspondiente (Arg⁴³ en esta proteína) ha sido sustituido por alanina lo que conduce a una pérdida masiva de actividad [53]. Es de destacar que, como ya se ha comentado, este residuo de arginina forma parte de una de las tres regiones aminoácidas específicas de la familia *ADPRibase-Mn-like* [6]. La intervención de un residuo de estas características en la catálisis puede relacionarse con la actuación de la ADPRibasa-Mn sobre sustratos difosforilados.

1.4.7 Sitios de unión de Mn²⁺ y efectos sobre las actividades de las enzimas ADPRibasa-Mn

Los miembros de la superfamilia de las metalofosfatasa contienen un centro dimetálico con diferentes pares o combinaciones de iones, frecuentemente de identidad desconocida en las enzimas nativas [80]. En las metalofosfatasa mejor estudiadas, las fosfatasa ácida púrpura, se trata de un centro heterovalente Fe(III)-M(II), en el que M es Fe en mamíferos y Zn o Mn en plantas. En el grupo de las proteína-fosfatasa Ser/Thr de mamíferos, el estado de oxidación del Fe ha sido objeto de controversias, pero actualmente se cree que contienen un centro homovalente Fe(II)-M(II). En general se acepta que, en

diferentes miembros de la superfamilia, el sitio 1 está ocupado por Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} o Zn^{2+} , y el sitio 2 por Fe^{2+} , Zn^{2+} o Mn^{2+} [80]. La estructura resuelta de la proteína de *E. coli* YcfE contiene dos iones de Zn^{2+} en el sitio activo, pero se supone que en realidad estos iones se unieron a la proteína durante su purificación y que reflejan un sitio activo di- Mn^{2+} [89,91]. La ADPRibasa-Mn de *D. rerio* fue modelada también con dos iones de Zn^{2+} en el centro dinuclear, sin embargo, al igual que la ADPRibasa-Mn de rata y que la proteína YcfE de *E. coli*, su actividad es dependiente de Mn^{2+} exógeno. Análisis de metales de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, hechos antes de su cristalización, dieron como resultado la presencia de 1,3 mol de Fe y 0,23 mol de Mn por mol de proteína [90]. Asimismo, la inhibición de la ADPRibasa-Mn de rata por agentes quelantes indica la presencia de un ion fuertemente unido distinto de Mn, posiblemente Fe o Zn [4]. En conjunto, estos resultados indican que la ADPRibasa-Mn contiene un centro heteronuclear Fe/Mn.

El requisito de metales exógenos (principalmente Mn^{2+} , Zn^{2+} o Ni^{2+}) que presentan muchas metalofosfoesterasas se atribuye generalmente a la pérdida de uno o ambos metales nativos durante la purificación. No obstante, en algún caso se ha propuesto una explicación alternativa, suponiendo que en el estado de reposo sólo un ion metálico está ligado al centro dinuclear, que permanece así inactivo; el segundo metal entraría en el centro activo unido o al mismo tiempo que el sustrato [81]. Como ya hemos dicho, la ADPRibasa-Mn requiere la adición de Mn^{2+} exógeno para ser activa. A este respecto, la enzima de rata presenta una dependencia hiperbólica del Mn^{2+} . Puesto que la aparente saturación de la enzima por el metal se produce a concentraciones muy inferiores a las de sustrato, se concluye que el Mn^{2+} actúa uniéndose a la enzima [4,7]. La ADPRibasa-Mn de pez cebra, actuando sobre ADP-ribosa, presentó una respuesta más complicada al Mn^{2+} , con una curva de saturación bifásica que puede explicarse por un mecanismo que incluye sitios de unión de metal independientes, uno con alta y otro con baja afinidad. La activación correspondiente a una unión de Mn^{2+} a un sitio de alta afinidad fue independiente del sustrato, y presentó una meseta de actividad en el intervalo de Mn^{2+} 5-100 μM a una concentración de sustrato 500 μM . Esto es similar a lo observado con la enzima de rata y es probable que refleje la ocupación completa de los sitios metálicos del centro dinuclear. La adición de Mn^{2+} a concentraciones superiores a 1 mM, que da lugar a la ocupación de un sitio de unión de baja afinidad por el metal, tuvo efectos dependientes del sustrato: activadores con ADP-ribosa y CDP-glicerol, inhibidores con CDP-etanolamina y CDP-colina, neutros con 2',3'-cAMP (Figura 21). La sustitución de la His⁹⁷ por Ala produjo un aumento de la constante de disociación K_A , correspondiente al sitio de unión de alta afinidad, sin afectar a K_B , correspondiente al sitio de baja afinidad. El aminoácido His⁹⁷ no está implicado directamente en la coordinación con los iones metálicos del centro dinuclear, pero su aminoácido vecino Asp⁹⁶ sí lo está. Por todo ello, es tentador especular que el sitio de unión A es una de las posiciones del centro dinuclear (podría corresponder a M1 como se ha propuesto para la proteína λPP [81]), mientras que el sitio de unión B podría estar localizado fuera del centro activo. Es de notar que la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* contiene dos iones metálicos en un sitio exterior próximo a un elemento helicoidal (Figura 3.A) que parece estar bien colocado para servir como elemento regulador del centro activo y que forma parte de una de las tres regiones estructurales específicas de la familia *ADPRibase-Mn-like* [6]. Las diferencias estructurales entre los sustratos podrían explicar los distintos tipos de respuesta resumidos en la Figura 21. Queda por investigar cuál puede ser la base estructural de los diferentes tipos de respuesta al Mn^{2+} presentados por las enzimas de rata y de pez cebra.

2. ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES Y CENTRO ACTIVO DE LA TRIOQUINASA/FMN CICLASA HUMANA ⁵

2.1 Antecedentes

La trioquinasa (EC 2.7.1.28) cataliza el tercer y último paso de la vía clásica de Hers para el metabolismo de fructosa: el grupo 1-OH del monosacárido es fosforilado por la fructoquinasa, el producto fructosa-1-fosfato es convertido por la aldolasa B a dihidroxiacetona-fosfato y D-gliceraldehído (GA), y por último éste es fosforilado a D-gliceraldehído-3-fosfato por la trioquinasa [95]. En la Figura 28 se representa la vía de Hers en el contexto de otros procesos metabólicos importantes. En la denominada encrucijada del gliceraldehído, la trioquinasa fosforila al D-gliceraldehído, predominando esta reacción sobre las acciones competidoras de las enzimas aldehído deshidrogenada, que forma D-glicerato, y alcohol deshidrogenada, que forma glicerol [96,97,98]. En la Figura 29 se representan las reacciones de fosforilación cuya catálisis se atribuye a la trioquinasa. (a) La actividad GA quinasa es la característica distintiva de la trioquinasa, mediante la cual participa en la vía de Hers. (b) La actividad dihidroxiacetona (DHA) quinasa es una actividad acompañante de la anterior que está presente en general en las preparaciones enzimáticas de trioquinasa [99], aunque no es exclusiva de esta enzima, pues la presentan también las denominaciones enzimáticas glicerona quinasa (EC 2.7.1.29 [100]) y glicerol quinasa (EC 2.7.1.30 [101]). Un posible papel de la trioquinasa en el metabolismo humano de DHA debe analizarse teniendo en cuenta que la cetotriosa no se forma de manera endógena en el organismo animal o humano. Teóricamente podría formarse por oxidación de glicerol catalizada por glicerol deshidrogenasa, o por desfosforilación de DHAP por una fosfomonoesterasa. En algunas levaduras y bacterias, el glicerol puede ser convertido a DHA por glicerol deshidrogenasa [102,103,104,105], pero no se conoce que esta conversión tenga lugar en organismos animales [106,107]. Tampoco hay constancia de ninguna enzima capaz de desfosforilar DHAP con alguna restricción favorable de especificidad, aunque esta reacción podría ocurrir mediante alguna fosfomonoesterasa de amplia especificidad. En todo caso, frente a la falta aparente de una fuente endógena de DHA, está claro que la DHA exógena administrada como suplemento nutritivo en dietas experimentales, como componente de cosméticos autobronceadores, o como aditivo en medios de cultivo celulares, puede ser metabolizada por

⁵ Los resultados de esta parte de la Tesis permanecen todavía inéditos, salvo por algunas comunicaciones a Congresos [92,93,94]. Al terminar la redacción de esta memoria, está en preparación un artículo para someter a publicación, en el que se incluyen resultados de esta parte de la Tesis y de la Tesis de Ana Couto [2].

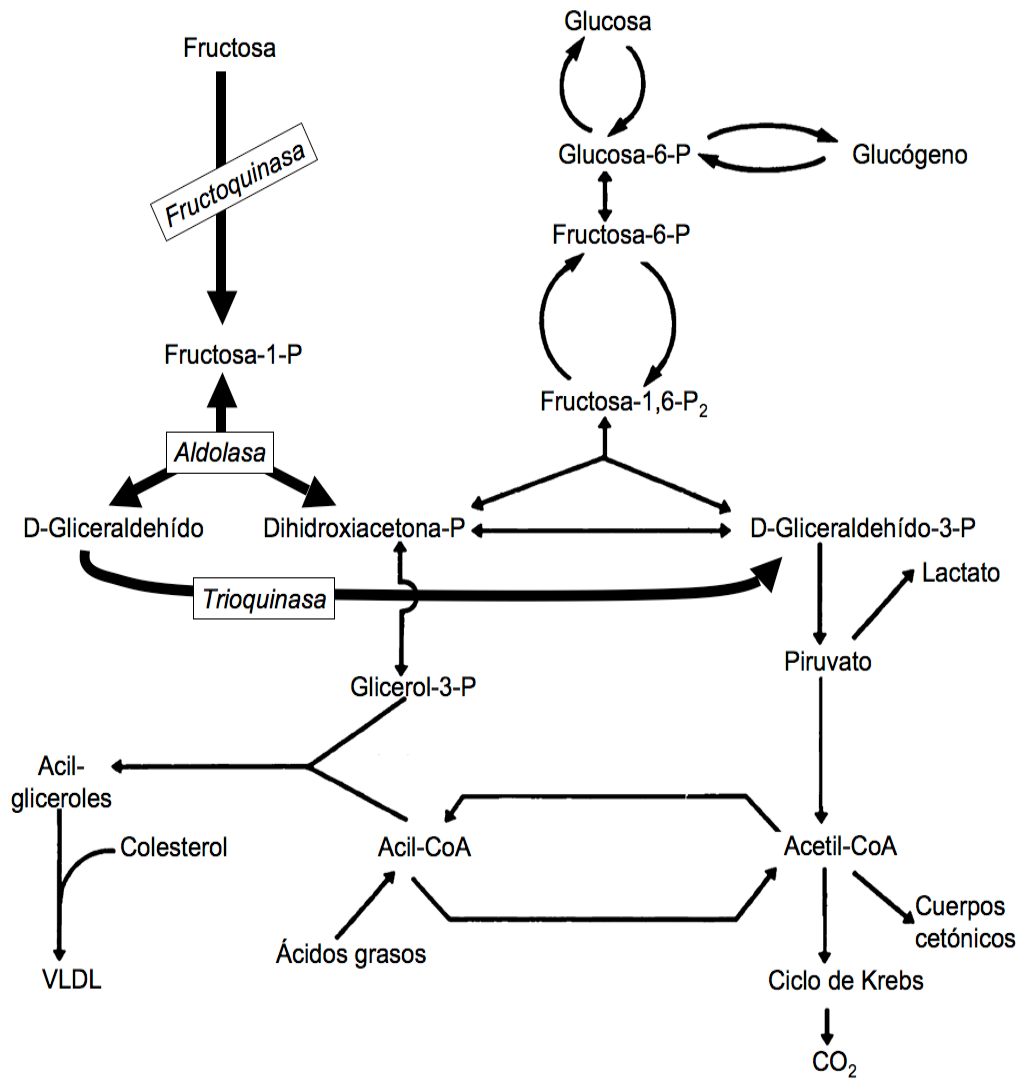


Figura 28: Vía de Hers para el metabolismo de la fructosa. La vía propuesta por Hers y Kusaka [95] está compuesta por las 3 reacciones destacadas por flechas gruesas, sobre las que se identifican los nombres de las enzimas que las catalizan. En la figura, la vía se presenta en relación con otros procesos metabólicos importantes. Esquema adaptado de Mayes [108] y tomado de la Tesis Doctoral de Ana Couto [2].

el organismo animal o humano mediante enzimas con actividad DHA quinasa [109,110,111,112,113,114,115]. (c) La actividad glicolaldehído quinasa ha sido observada solamente con la trioquinasa purificada de riñón porcino y presenta una eficacia catalítica baja [116]. En el caso de la trioquinasa humana, estudiada en este trabajo, la actividad glicolaldehído quinasa no se ha detectado [2].

A pesar de la relevancia que tiene la vía de Hers en hígado [95,96,108,117,118] y de las serias preocupaciones que despierta el consumo humano excesivo de fructosa [118,119,120,121,122,123,124,125], la identidad molecular de la trioquinasa de mamíferos en general, y de la trioquinasa humana en particular, como un producto del gen *DAK* que tiene también actividad FMN ciclasa, sólo se ha establecido recientemente, gracias a estudios de nuestro laboratorio [1,2,126] que tienen su continuación en esta parte de la Tesis Doctoral.

La actividad enzimática de FAD-AMP liasa (formadora de FMN cíclico) o FMN ciclasa (EC 4.6.1.15) fue descubierta en nuestro laboratorio en hígado de rata [127]. Se trata de una liasa de fósforo-oxígeno que cataliza reacciones intramoleculares de algunos compuestos de tipo ribonucleósido-difosfato-X (NDP-X), dando como productos un ribonucleósido-monofosfato (NMP) y un fosfodiéster cíclico de X con un anillo de 5 átomos. Al considerar las actividades sobre 11 sustratos diferentes, encontrados entre un total de 39 posibles sustratos analizados, FAD y ADP-glucosa son los que registran las eficacias catalíticas (k_{cat}/K_M) más elevadas con una gran diferencia respecto a los demás [128]. Puesto que la ADP-glucosa no es conocida como un compuesto natural en mamíferos, la enzima recibió su nombre por su actividad sobre FAD, que forma AMP y el fosfodiéster cíclico riboflavina-4',5'-fosfato (FMN cíclico o cFMN) (Figura 30). El papel biológico de este compuesto poco usual es desconocido, pero está presente en diversos materiales biológicos, incluyendo hígado de rata [129]. La huella de masas peptídicas de la FMN ciclasa purificada de hígado de rata coincidió con una proteína, entonces hipotética, codificada por el gen humano *DAK*. Dicha proteína, después de su clonación molecular y expresión heteróloga en *E. coli*, es dualmente activa como DHA quinasa y como FMN ciclasa. Además la FMN ciclasa purificada de hígado de rata también es activa como DHA quinasa [1]. Esta dualidad puede ser un rasgo general de las DHA quinastas, pues se ha confirmado que las enzimas de este tipo pertenecientes a *Citrobacter freundii* actúan también como FMN ciclasas, si bien con menor eficacia que las enzimas de mamífero [130].

A partir de la clonación molecular de la DHA quinasa/FMN ciclasa humana [1], en nuestro laboratorio se ha desarrollado un estudio extenso de dicha enzima, que ha dado lugar a una Tesis Doctoral ya defendida y al trabajo que se describe en este apartado 2 de la presente. En la Tesis Doctoral de Ana Couto [2] se llevó a cabo un estudio detallado de la especificidad de sustrato de las actividades quinasa y liasa ciclante de la enzima humana, destacando la demostración de que dicha proteína tiene actividad de trioquinasa pues fosforila GA y DHA, pero no actúa sobre glicerol en grado detectable. Además, se pudo establecer una relación estructural directa entre esta proteína humana y la trioquinasa de riñón de cerdo purificada a homogeneidad y caracterizada hace casi 20 años. Los autores de aquel estudio habían determinado la composición en aminoácidos de dicha enzima y la secuencia de 3 fragmentos peptídicos obtenidos por tratamiento con lisil-endopeptidasa [116]. La cortedad de las bases de datos proteómicas existentes por entonces no permitía utilizar esa información para la identificación molecular de la trioquinasa de cerdo. Sin embargo, gracias a las bases de datos disponibles actualmente, se ha comprobado que los datos estructurales de la trioquinasa porcina coinciden, con mínimas diferencias, con una proteína hipotética de cerdo que presenta un 92% de identidad respecto a la DHA quinasa/FMN ciclasa codificada

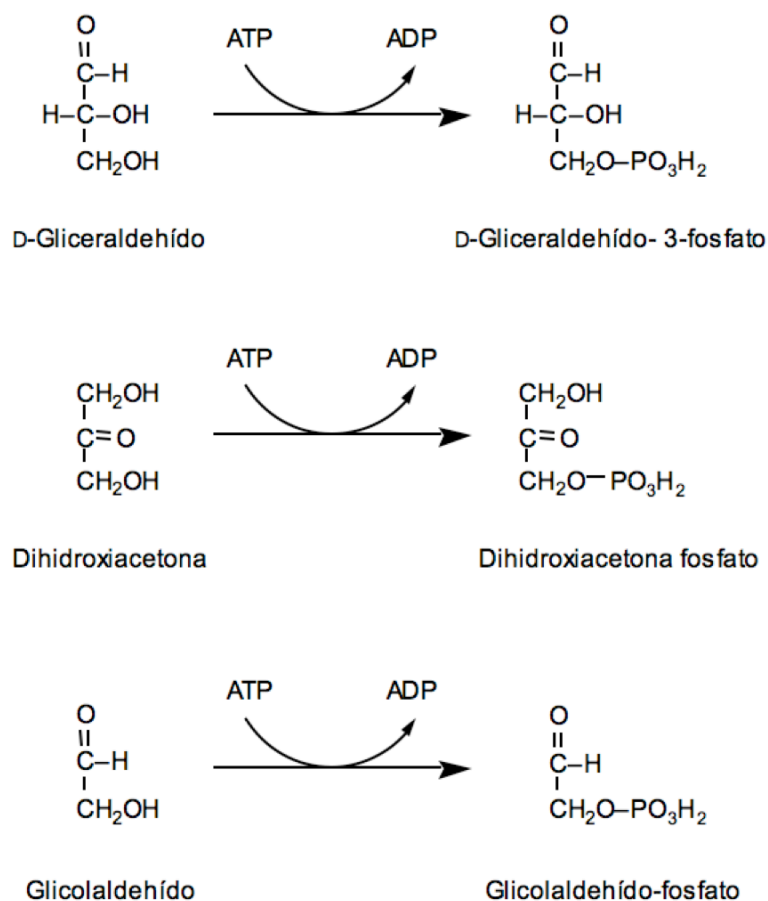


Figura 29: Reacciones catalizadas por la trioquinasa. De arriba a abajo: reacciones correspondientes a las actividades D-gliceraldehído quinasa (GA quinasa), dihidroxiacetona quinasa (DHA quinasa) y glicolaldehído quinasa. La primera es la actividad característica, tenida por fisiológica, de la trioquinasa. La segunda es una actividad conocida de la trioquinasa presentada también por otras quinasa. La tercera ha sido descrita solamente en una ocasión por Miwa *et al.* [116]. La enzima humana estudiada en esta Tesis (trioquinasa/FMN ciclasa) tiene las dos primeras actividades pero no tiene actividad sobre glicolaldehído ni sobre glicerol, al menos en grado detectable [2].

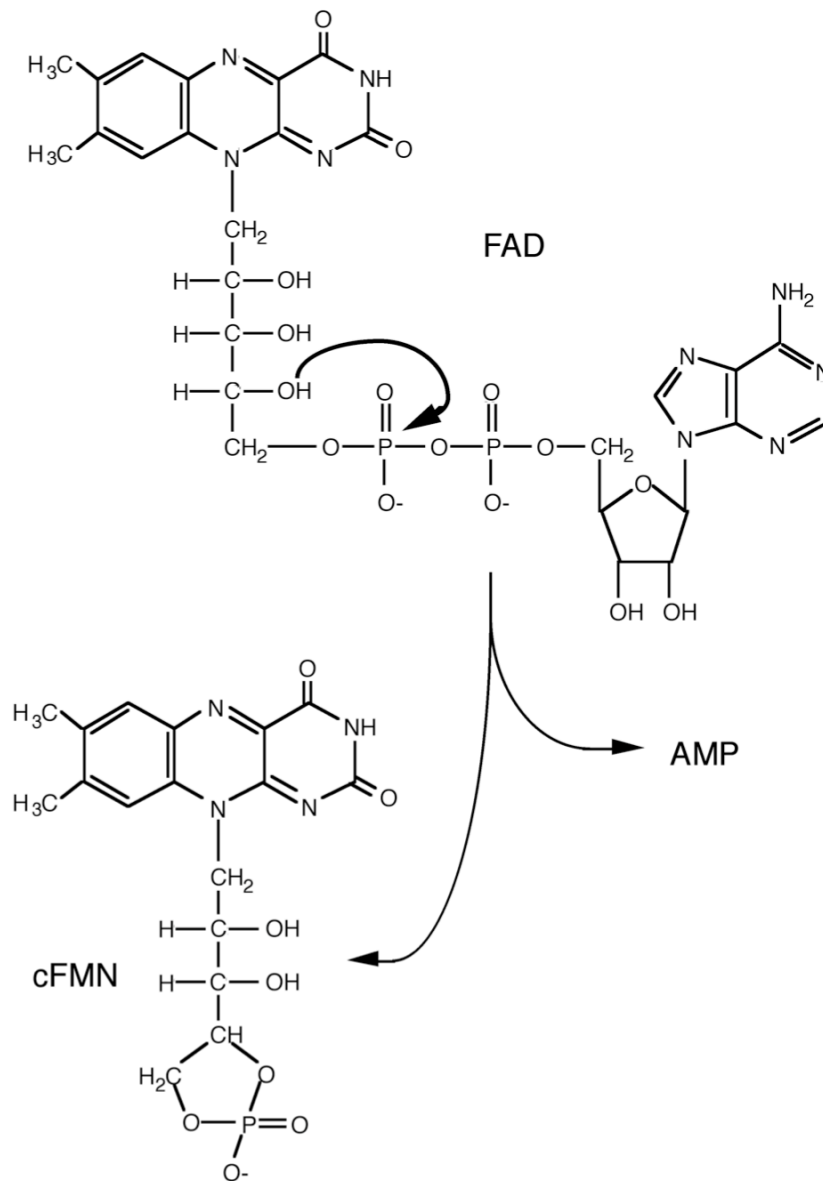


Figura 30: Reacción principal de la FMN ciclada. En la parte superior se representa la estructura del FAD y el ataque nucleofílico interno que el grupo 4-OH de la cadena de ribitilo realiza sobre el fósforo proximal. En la parte inferior izquierda se representa el producto flavínico característico de la FMN ciclada, el cFMN o riboflavina-4',5'-fosfato cíclico. El AMP es el grupo saliente del ataque interno. Obsérvese que en esta reacción no interviene agua: la FMN ciclada no es una hidrolasa, sino una liasa ciclante, que rompe un enlace P-O mediante un ataque interno. Esquema tomado de la Tesis de Alicia Cabezas [131].

por el gen humano *DAK* y, por consiguiente, debe ser su ortólogo porcino [2]. A partir de estos resultados, pasamos a denominar dicha proteína humana como trioquinasa/FMN ciclasa (hTKFC), denominación que se mantiene en uso en este trabajo.

Un aspecto que merece especial atención entre los antecedentes de la proteína hTKFC y del gen *DAK*, es la posibilidad de que además de su función metabólica en la vía de Hers para la asimilación de fructosa, tengan alguna otra función biológica. Respecto a ello pueden mencionarse varias circunstancias relevantes.

Una de ellas ha sido puesta de manifiesto en investigaciones experimentales y bioinformáticas del perfil de expresión tisular del gen *DAK* humano llevadas a cabo en nuestro laboratorio [2]. Si la función del gen *DAK* se relacionase sólo con el metabolismo de la fructosa, cabría esperar que su perfil de expresión fuese predominantemente hepático. Sin embargo, los datos obtenidos proporcionan un panorama más complejo, pues el tipo de perfil observado depende de la metodología empleada para obtenerlo. (a) El perfil de expresión del gen *DAK* en unos 80 tejidos humanos, obtenido mediante análisis con micromatrices de oligonucleótidos [132] (datos accesibles a través del portal BioGPS; Gene Atlas; <http://biogps.org/>), así como el obtenido por análisis de *northern* en un panel de 12 tejidos [2], son fuertemente hepáticos, con niveles de expresión mucho más altos en hígado que en los restantes tejidos, presentando niveles también destacados, aunque no tan altos, el intestino delgado, el riñón y las glándulas suprarrenales. Es de destacar que, dentro de Gene Atlas, se observa una excelente correlación entre los perfiles de expresión de *KHK*, *ALDOB* y *DAK*, los genes codificadores de las tres enzimas participantes en la vía de Hers: fructoquinasa, aldolasa B y trioquinasa. (b) El perfil de expresión del gen *DAK* en unos 45 tejidos humanos, obtenido por recuento de ESTs en la base de datos UniGene [133], no tiene sin embargo carácter hepático, sino que se desvía mucho de dicha situación, pues el hígado es superado por otros 5 tejidos en nivel de expresión de *DAK*, y en otros 23 tejidos el nivel de expresión es similar o ligeramente inferior al hepático. Dentro de UniGene, los perfiles de expresión de *KHK* y *ALDOB* son por el contrario claramente hepáticos y, en esta base de datos, no se correlacionan bien con el perfil de *DAK* [2]. La discrepancia entre los perfiles de expresión de *DAK* en Gene Atlas y en UniGene puede explicarse porque los datos recogidos en ambas bases de datos corresponden a distintas regiones del gen. Los datos de Gene Atlas, así como los del análisis de *northern* mencionado más arriba, fueron obtenidos empleando como sondas oligonucleótidos que deben hibridar con regiones de los transcritos relativamente próximas al extremo 3' de la secuencia codificadora de hTKFC (exones 13-18 y 17-18, respectivamente, de un total de 18 exones). Por el contrario, los datos de UniGene representan mayoritariamente ESTs de la región 5' de la secuencia codificadora. En conjunto, los perfiles de expresión de *DAK* indican que los transcritos largos de dicho gen, como los que conducen a la síntesis de la proteína hTKFC completa, pueden relacionarse con el metabolismo de fructosa de manera predominante, pero transcritos más cortos podrían relacionarse con otra función biológica diferente.

En relación con la posibilidad de que transcritos cortos de *DAK* puedan tener una función biológica independiente de su actividad catalítica, debe mencionarse que el dominio N-terminal de hTKFC interacciona con la RNA helicasa MDA5 e impide la señalización antivírica mediada por esta proteína para la activación del promotor del interferón β . La proteína hTKFC completa presenta esta interacción, pero el dominio C-terminal es insuficiente para ello [134,135]. Así pues, cabe pensar que la expresión de mRNAs cortos del gen *DAK* sea responsable del perfil no hepático observado en la base de datos UniGene y, por otra parte, que dicho perfil se relacione con la regulación de la señalización antivírica

mediada por interferón. A este respecto, llama la atención que la linfa sea la localización tisular en la que la expresión del gen *DAK* humano es más intensa cuando se la estima por recuento de ESTs en UniGene [2].

Además de su papel metabólico en la asimilación de fructosa, hTKFC también puede ser un factor de desintoxicación de compuestos que tienen una elevada capacidad de glicación no enzimática, como son sus dos sustratos GA y DHA [136,137,138,139,140,141,142]. Al respecto, es interesante constatar que la DHA es muy tóxica para células de *Saccharomyces cerevisiae* desprovistas de DHA quinasa por delección génica [141,143], o para células de *Trypanosoma brucei* naturalmente desprovistas de DHA quinasa [144,145].

La proteína hTKFC presenta alrededor de un 40% de identidad con la DHA quinasa de *C. braaki*⁶ (CbDK), cuya estructura tridimensional ya está determinada por cristalografía de rayos X, incluyendo la estructura de un complejo con DHA y el análogo de ATP adenililimidodifosfonato (AMPPNP) [146,147] (Figura 31). Esta DHA quinasa bacteriana es un homodímero, cuyo monómero tiene dos dominios, N-terminal o "K" y C-terminal o "L", unidos entre sí por un largo puente peptídico. El dominio K está constituido por dos plegamientos o subdominios alfa/beta, mientras que el dominio L es un barril de 8 hélices alfa que contiene en su interior un fosfolípido, que puede eliminarse con escaso efecto sobre la actividad catalítica. En el dímero, los dos monómeros se entrecruzan en orientaciones invertidas formando un encadenamiento de dominios L1-K2-K1-L2 que tiene una forma alargada. En la estructura del complejo con los sustratos de la actividad quinasa, la DHA aparece unida covalentemente en forma de hemiaminal al residuo His²²⁰, que es parte del dominio K. La unión se establece entre el C carbonílico de DHA y un N imidazólico de His²²⁰. El GA puede formar también un hemiaminal, pero no el glicerol, por ejemplo. Por otra parte, el AMPPNP aparece unido al dominio L, encima del barril, ocupando la boca de acceso al bolsillo de unión del fosfolípido, y con la base adenina empaquetada entre Leu⁴³⁵, Thr⁴⁷⁶ y Met⁴⁷⁷, además de establecer posibles contactos con otros aminoácidos [146]. En esta estructura se constata la existencia de dos centros activos que exigen la forma dimérica de la proteína pues se forman en la cavidad constituida entre el dominio K de una subunidad y el dominio L de la otra, es decir L1K2 y K1L2. No obstante, en cada uno de estos centros activos, la distancia desde el fosfato γ del donador hasta el OH aceptor es demasiado grande y no es compatible con una transferencia directa del fosfato (Figura 31). A este respecto, como no hay evidencia de una transferencia mediada por algún residuo intermedio, se ha invocado la posible flexibilidad de la estructura como una posible explicación de la reacción de transferencia de fosfato [148].

La proteína hTKFC tiene conservados, respecto a la DHA quinasa de *C. braaki*, muchos aminoácidos importantes (Figura 32). Entre ellos el residuo de histidina al que se une DHA en la enzima bacteriana: en hTKFC este residuo es His²²¹. En nuestro laboratorio se ha preparado el mutante H221A-hTKFC que, de acuerdo con su papel en la unión de DHA (y posiblemente GA), es prácticamente inactivo como trioquinasa, pero mantiene la mayor parte de la actividad FMN ciclasa [2]. Este resultado está de acuerdo con la observación de que ATP y FAD son inhibidores completos de la actividad FMN ciclasa y DHA quinasa,

⁶ La DHA quinasa estudiada es propia de la cepa DSM No. 30040, antes clasificada en la colección del DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) como *C. freundii*. Sin embargo, ahora se ha reclassificado como *C. braaki* (<http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-30040.html>).

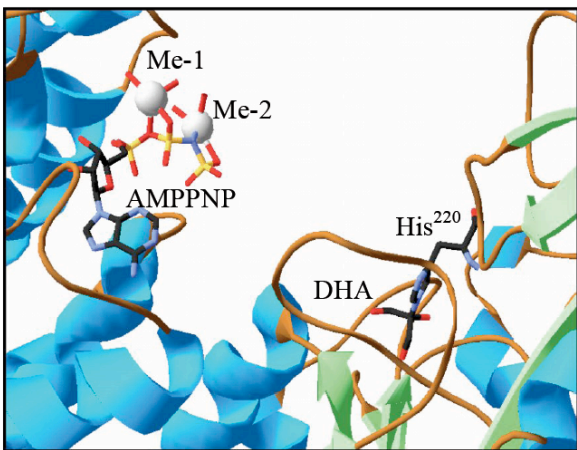
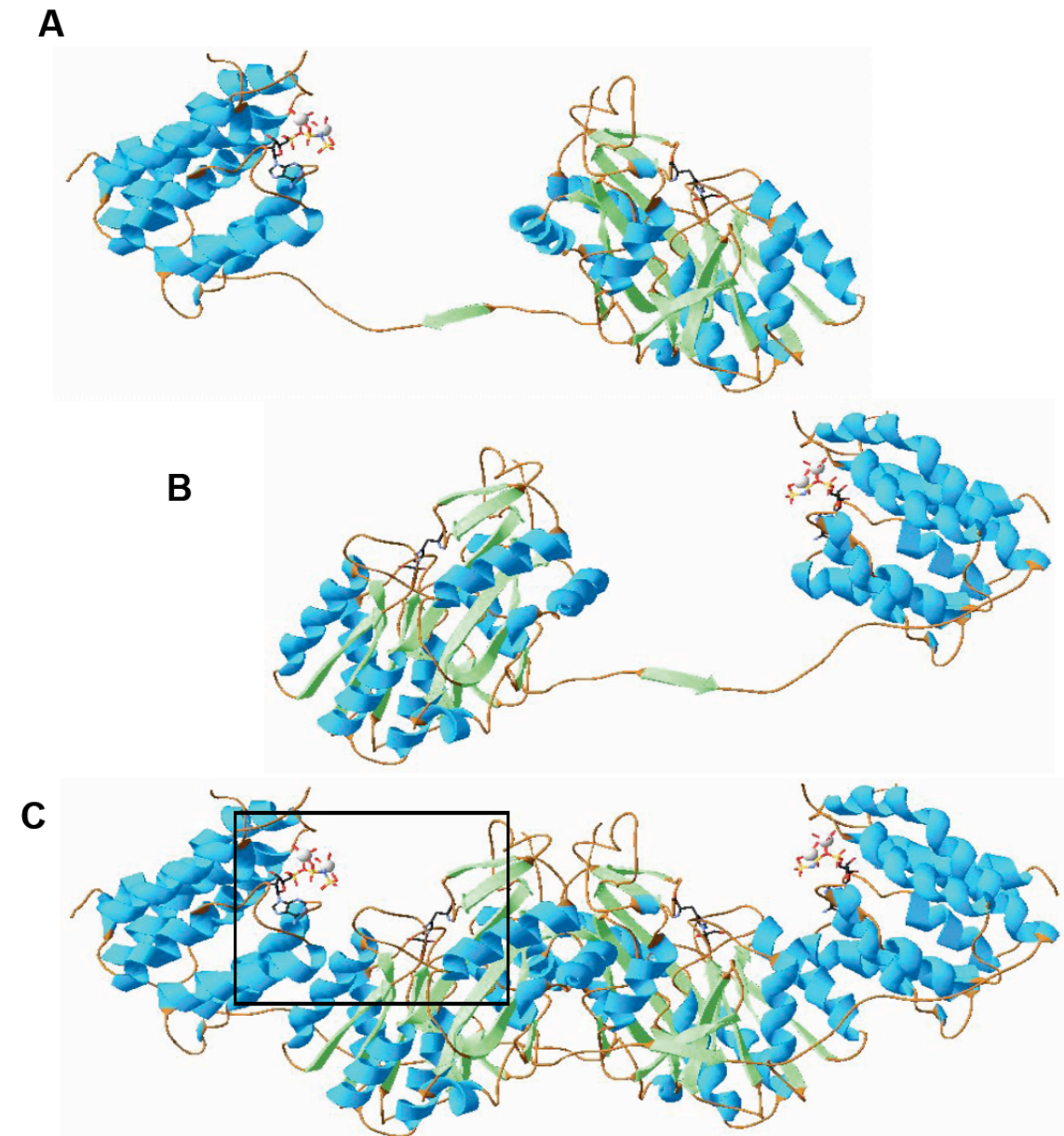


Figura 31: Estructura de la DHA quinasa de *Citrobacter braaki* por difracción de rayos X. Esta estructura (PDB, código de acceso 1UN9), determinada por otros autores [146], es el molde empleado para derivar el modelo de hTKFC por homología. **A:** Subunidad 1. **B:** Subunidad 2. **C:** Dímero. La ampliación de la izquierda muestra el centro activo de la enzima con (izquierda) una molécula del análogo de ATP AMPPNP unido a dos iones metálicos, Me-1 y Me-2, en este caso de Mg^{2+} , y (derecha) una molécula de DHA unida covalentemente al residuo His²²⁰.

respectivamente, mientras que el DHA sólo inhibe parcialmente a la actividad FMN ciclasa [1]. Es probable que el FAD se una al sitio de unión de ATP en el dominio L, de manera que la unión de DHA unido al residuo His²²¹ en el dominio K no impide la unión de FAD y afecta sólo ligeramente a la actividad FMN ciclasa.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, nos propusimos (a) construir un modelo estructural de la hTKFC dimérica, investigar la forma de unión de FAD por simulación de *docking* y la posible flexibilidad de la proteína por métodos de simulación de dinámica molecular; así como (b) investigar el funcionamiento del centro activo por mutagénesis dirigida.

2.2 Resultados y discusión: estudios de modelado molecular

2.2.1 Construcción de un modelo molecular de la trioquinasa/FMN ciclasa dimérica formando complejo con dihidroxiacetona, ATP y dos iones de Mg^{2+}

El 40% de identidad de hTKFC con CbDK (Figura 32), cuya estructura tridimensional es conocida [146] (Figura 31), era suficiente para intentar construir un modelo de la enzima humana por homología [149]. De hecho, en la base de datos *ModBase* [150] está disponible un modelo del monómero de hTKFC obtenido por modelado sobre la estructura de la forma apo de CbDK (código PDB: 1UN8). Sin embargo, para este trabajo, nos propusimos obtener un modelo del dímero de hTKFC, que es la unidad biológica funcional, tanto de CbDK [146] como de hTKFC [2]. Para ello decidimos utilizar como moldes las dos estructuras diméricas experimentales disponibles para CbDK, obtenidas una en ausencia y otra en presencia de los sustratos (códigos PDB: 1UN8 y 1UN9, respectivamente). Las dos estructuras son muy semejantes, salvo porque el fichero de la estructura 1UN8, además de la proteína, contiene moléculas de agua de cristalización y dos moléculas de ácido 2-miristoil-3-palmitoil-fosfatídico, cada una de ellas insertada en el barril de hélices α de uno de los dominios L, mientras que en el fichero de la estructura 1UN9 faltan las aguas de cristalización y los lípidos, pero las dos His²²⁰ en los dominios K tienen ligado covalentemente DHA (en realidad, un radical trihidroxiprop-2-ilo), y en cada uno de los dominios L, se une una molécula de AMPPNP que forma un complejo con dos iones Mg^{2+} , también coordinados con los grupos carboxilo de Asp³⁸⁰ (Mg-1), Asp³⁸⁵ y Asp³⁸⁷ (Mg-1 y Mg-2) en el dominio L [146].

Como las estructuras de los ficheros 1UN8 y 1UN9 presentaban algunos problemas debidos a la pobre definición de algunos segmentos peptídicos y aminoácidos individuales, en lugar de emplearlos directamente como moldes para modelar hTKFC, se decidió resolver antes tales problemas de manera teórica. En el Suplemento CD-ROM se incluyen los ficheros 1UN8-c y 1UN9-c, que corresponden a las estructuras 1UN8 y 1UN9 completadas como se describe en la sección 3.8.3, sustituyendo además AMPPNP por ATP. Las estructuras de los ficheros 1UN8-c y 1UN9-c siguen siendo muy parecidas entre sí, diferenciándose en que 1UN9-c carece de fosfolípidos y contiene Mg^{2+} , ATP y DHA en el centro activo, mientras que 1UN8-c contiene fosfolípidos pero no los ligandos del centro activo.

Para construir el modelo teórico de hTKFC, se empleó el programa *Modeller* partiendo del alineamiento de la Figura 32, preparado con el mismo programa, y de las estructuras de los ficheros 1UN8-c y 1UN9-c (Suplemento CD-ROM y Figura 33). Se probaron varias alternativas. Al valorar la calidad de las estructuras originales con programas informáticos tales como *PROCHECK* [151] o *WHAT_CHECK* [152], se había observado que la estructura de 1UN9 era de peor calidad que la de 1UN8 (Tabla 2). Puesto que se deseaba modelar hTKFC con los sustratos unidos, era necesario emplear como molde la estructura

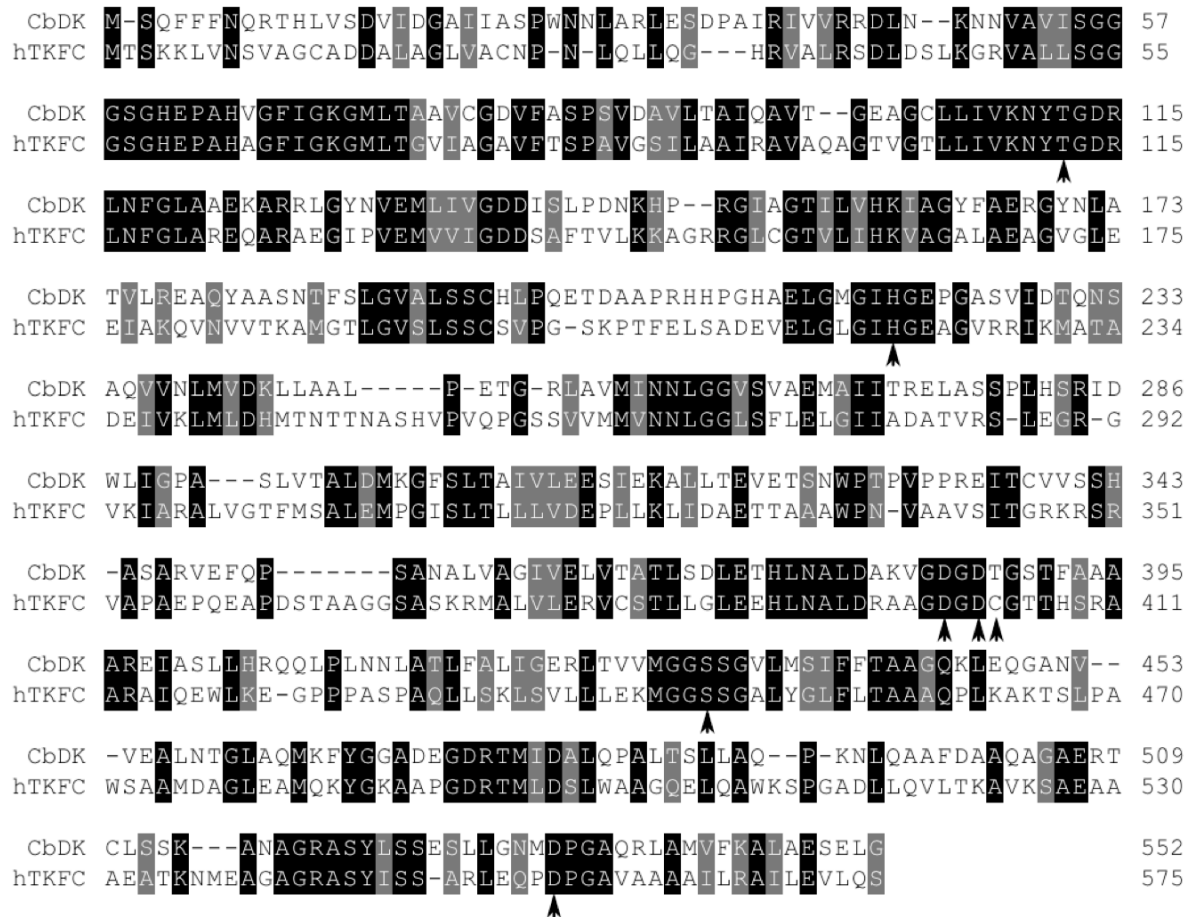


Figura 32: Alineamiento entre la DHA quinasa de *C. braaki* (CbDK) y la hTKFC. El alineamiento fue obtenido con el programa *Modeller*. Los aminoácidos idénticos en ambas secuencias se destacan sobre fondo negro, y los similares sobre fondo gris. Las puntas de flecha señalan los 7 aminoácidos de hTKFC que han sido mutados puntualmente (ver la Figura 54 y las secciones 2.3.2 y 2.3.3). CbDK es la DHA quinasa de *C. braaki*. Esta última proteína es propia de la cepa DSM No. 30040, antes clasificada en la colección del DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) como *C. freundii*, sin embargo, ahora se encuentra re-clasificada como *C. braaki* (<http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-30040.html>).

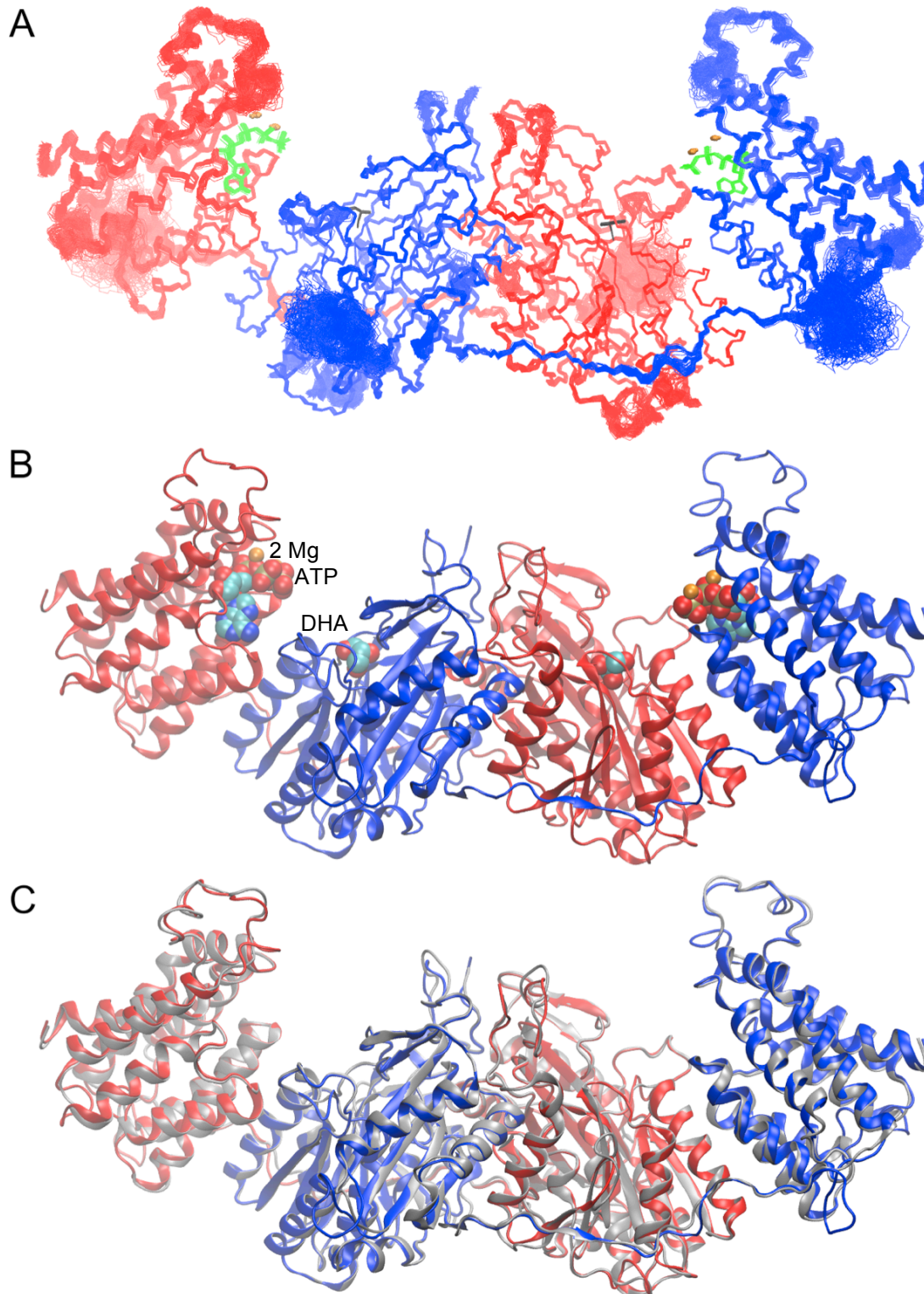


Figura 33: Modelado comparativo de hTKFC. El modelo se preparó con *Modeller* como se explica en las secciones 2.2.1 y 3.8.4. **A:** Familia de 200 modelos de hTKFC creados por *Modeller*. Los modelos se construyeron empleando 1UN8-c y 1UN9-c como moldes, con imposición de simetría en los C α y C β en las subunidades resultantes, e ignorando los fosfolípidos de 1UN8-c, pero manteniendo los ligandos ATP, DHA y Mg²⁺ de 1UN9-c. Los esqueletos de las dos cadenas del dímero están representados en azul y rojo, ATP, DHA y Mg²⁺ están representados en verde, negro y naranja. **B:** Modelo de hTKFC. Se presenta el mejor modelo obtenido, según los criterios de evaluación de *Modeller*, entre los 200 presentados en A; ATP, DHA y Mg²⁺ están representados mediante esferas coloreadas por elemento: C, azul claro; N, azul oscuro; O, rojo; P, marrón y Mg, naranja. **C:** Alineamiento estructural del modelo de hTKFC con el modelo 1UN9-c de CbDK (en gris).

1UN9-c, de peor calidad, pero la única que contiene los ligandos ATP, Mg²⁺ y DHA. Para ver si se podía mejorar la calidad del modelo de hTKFC resultante, se decidió comparar inicialmente los modelos obtenidos al emplear como molde sólo 1UN9-c, o al acompañarlo de 1UN8-c. En ambos casos se impuso como condición que durante el modelado se mantuviera la simetría entre los carbonos α de las dos cadenas del dímero de hTKFC. Además, entre las dos opciones de considerar a los ligandos como cuerpos rígidos, o de permitir cierta flexibilidad en su modelado, se optó por esta última. Por lo tanto, era necesario emplear descripciones de los ligandos en términos topológicos acompañados de parámetros específicos relativos al tipo de átomo y a las longitudes de enlaces y ángulos. En el caso de DHA (radical trihidroxiprop-2-ilo), esta descripción tuvo que ser preparada (sección 3.14.1) porque no estaba incluida en la base de datos estándar de *Modeller*. Por otra parte, al construir estos modelos iniciales de hTKFC se omitió la inclusión del fosfolípido en los dominios L. Con cada conjunto de condiciones, se pidió a *Modeller* que construyese 200 modelos de hTKFC. Los resultados indicaron que, con el uso del doble molde (1UN8-c y 1UN9-c), se conseguía una mejoría generalizada en el promedio de calidad de los modelos de hTKFC obtenidos, según la valoración de diversos parámetros calculados por los programas *PROCHECK* y *WHAT_CHECK*, especialmente en lo que se refiere al buen ajuste de los ángulos diedros ϕ y ψ a las zonas favorables de la gráfica de Ramachandran (Tabla 2). Después de la construcción de estos modelos iniciales se decidió comprobar qué efecto tendría la imposición de simetría en los carbonos α y β , así como la inclusión de los fosfolípidos como moléculas rígidas dentro de los dominios L. Los promedios de calidad de los 200 modelos resultantes en cada caso, construidos siempre a partir del doble molde 1UN8-c y 1UN9-c, se indican en la Tabla 2. Respecto al modelo inicial de hTKFC, la calidad no se vio apenas afectada por la imposición de simetría en los carbonos α y β , mientras que la inclusión de los fosfolípidos dio lugar a pérdidas de calidad en todos los parámetros analizados. En la Tabla 2 se resumen los datos de los mejores modelos individuales de cada tipo, elegidos según su valoración por el programa *Modeller*. Teniendo en cuenta estos resultados, la falta de evidencias a favor o en contra de la presencia o ausencia de estos fosfolípidos en la proteína humana, y el hecho de que su eliminación en la proteína CbDK modifica escasamente a la actividad catalítica [146], se optó por usar en los estudios posteriores el mejor modelo individual obtenido sin lípidos, incluyendo la doble imposición de simetría en los carbonos α y β (Tabla 2 y Figura 33.B).

El modelo dimérico teórico de hTKFC es muy similar a CbDK (Figura 33): cada subunidad presenta dos dominios unidos por un enlazador, análogos a los dominios K y L de CbDK, con la disposición L1-K2-K1-L2. Esto da lugar asimismo a dos posibles sitios activos: K1L2 y K2L1, con sitios de unión de DHA en K1 y K2, y de ATP en L1 y L2. Al igual que CbDK, los dominios K (N-terminales) de hTKFC consisten en dos plegamientos α/β y los dominios L (C-terminales) en barriles α de ocho hélices. Los dos sitios de unión de DHA a hTKFC son similares entre sí (Figura 34.B) y muy parecidos a los de CbDK (Figura 34.A). La DHA enlazada a His²²¹ (en forma de radical trihidroxiprop-2-ilo) interacciona mediante puentes de hidrógeno con el Asp¹¹⁴, Gly⁵⁶ y His⁵⁹ de la hTKFC (Figura 34.B). Respecto a los dos sitios de unión del nucleótido, tanto en CbDK (estructura 1UN9) como en el modelo de hTKFC, la adenina se une de manera diferente en L1 y L2 (Figura 35.AB). La diferencia reside en el ángulo de torsión del enlace glicosídico entre los anillos de ribosa y adenina del ligando, de tal manera que el nucleótido aparece en un sitio (L1) con la conformación *syn* y en el otro (L2) con la conformación *anti*. En adelante, cuando convenga distinguir los dos sitios de unión de nucleótido por la distinta conformación de la adenina, nos referiremos a ellos como L1-*syn* y L2-*anti*.

Tabla 2: Evaluación de los modelos de hTKFC obtenidos por homología. Los modelos obtenidos en distintas condiciones se analizaron con el programa *WHAT_CHECK* que compara parámetros estructurales de los modelos con su distribución en una población de estructuras cristalográficas proteicas consideradas de excelente calidad [152]. Se resumen los valores de *Z-score* proporcionados por *WHAT_CHECK*, que miden la desviación del modelo respecto a lo esperado en la población de referencia. En la parte inferior se presentan las evaluaciones de los mejores modelos individuales de cada tipo, elegidos según su valoración por el programa *Modeller*. Se consideran “pobres” los *Z-scores* inferiores a -3 ó superiores a +3, y “malos” los inferiores a -4 ó superiores a +4. Con fines comparativos, se incluyen también los resultados de evaluar las estructuras cristalográficas de CbDK. En negrita se destacan los parámetros del modelo de hTKFC elegido para estudios posteriores (Figura 33.B). Con el programa *PROCHECK* se obtuvieron resultados equivalentes a estos.

| Condiciones de modelado: | Modelos de hTKFC por homología con: | | | | Estructuras cristalográficas de CbDK: | |
|---|---|-----------------|---------------|--------|---------------------------------------|--------|
| | 1UN9-c | 1UN9-c y 1UN8-c | | | 1UN8 | 1UN9 |
| Simetría carbonos α | si | si | si | si | | |
| Simetría carbonos β | no | no | si | si | | |
| Presencia de fosfolípidos | no | no | no | si | | |
| Parámetros evaluados: | <i>Z-score</i> (promedios de 200 modelos) | | | | | |
| <i>1st generation packing quality</i> | -1,320 | -1,072 | -1,063 | -1,042 | | |
| <i>2nd generation packing quality</i> | -2,535 | -2,297 | -2,298 | -2,634 | | |
| <i>Ramachandran plot appearance</i> | -1,105 | -0,203 | -0,203 | -0,397 | | |
| <i>χ_1/χ_2 rotamer normality</i> | -2,435 | -2,100 | -2,342 | -3,197 | | |
| <i>Backbone conformation</i> | -3,366 | -3,312 | -3,255 | -3,540 | 1UN8 | 1UN9 |
| | <i>Z-score</i> (valores de los mejores modelos individuales de cada clase según <i>Modeller</i>) | | | | | |
| <i>1st generation packing quality</i> | -1,352 | -1,122 | -1,116 | -1,202 | -0,241 | -0,867 |
| <i>2nd generation packing quality</i> | -2,459 | -2,270 | -2,182 | -2,622 | -1,006 | -1,275 |
| <i>Ramachandran plot appearance</i> | -1,202 | -0,344 | -0,278 | -0,451 | -2,060 | -5,013 |
| <i>χ_1/χ_2 rotamer normality</i> | -2,665 | -1,784 | -1,985 | -3,249 | -1,697 | -3,649 |
| <i>Backbone conformation</i> | -3,241 | -3,263 | -2,993 | -3,034 | -0,301 | -0,558 |

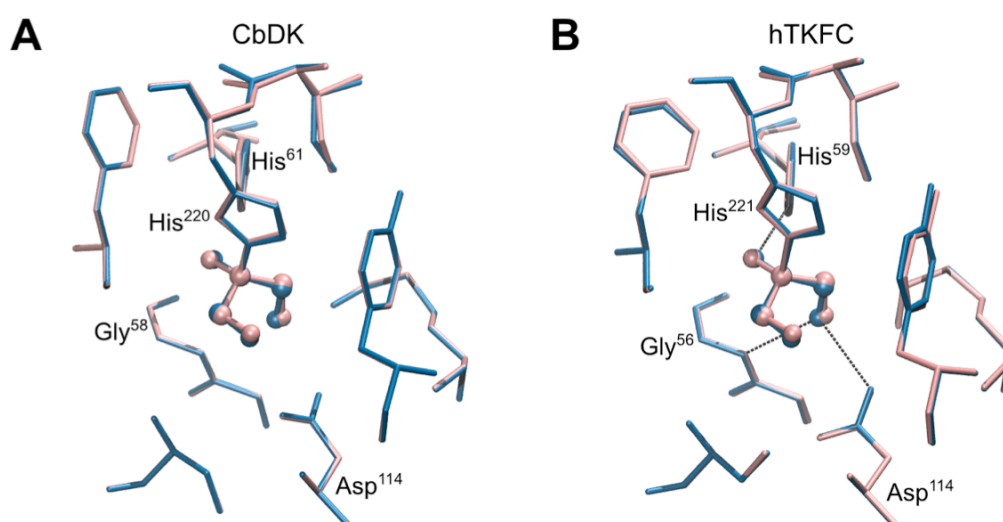


Figura 34: Sitios de unión de DHA a CbDK y hTKFC. A, B: Unión covalente de DHA a (A) la His²²⁰ de CbDK y a (B) la His²²¹ de hTKFC; en ambos casos se presentan solapados los sitios de unión de las dos subunidades del dímero. El radical trihidroxiprop-2-ilo, que resulta de la unión covalente de DHA a la cadena lateral de histidina, se representa en forma de modelo de pequeñas esferas. Se indican algunos aminoácidos que interaccionan con el radical y, en B, algunos puentes de hidrógeno.

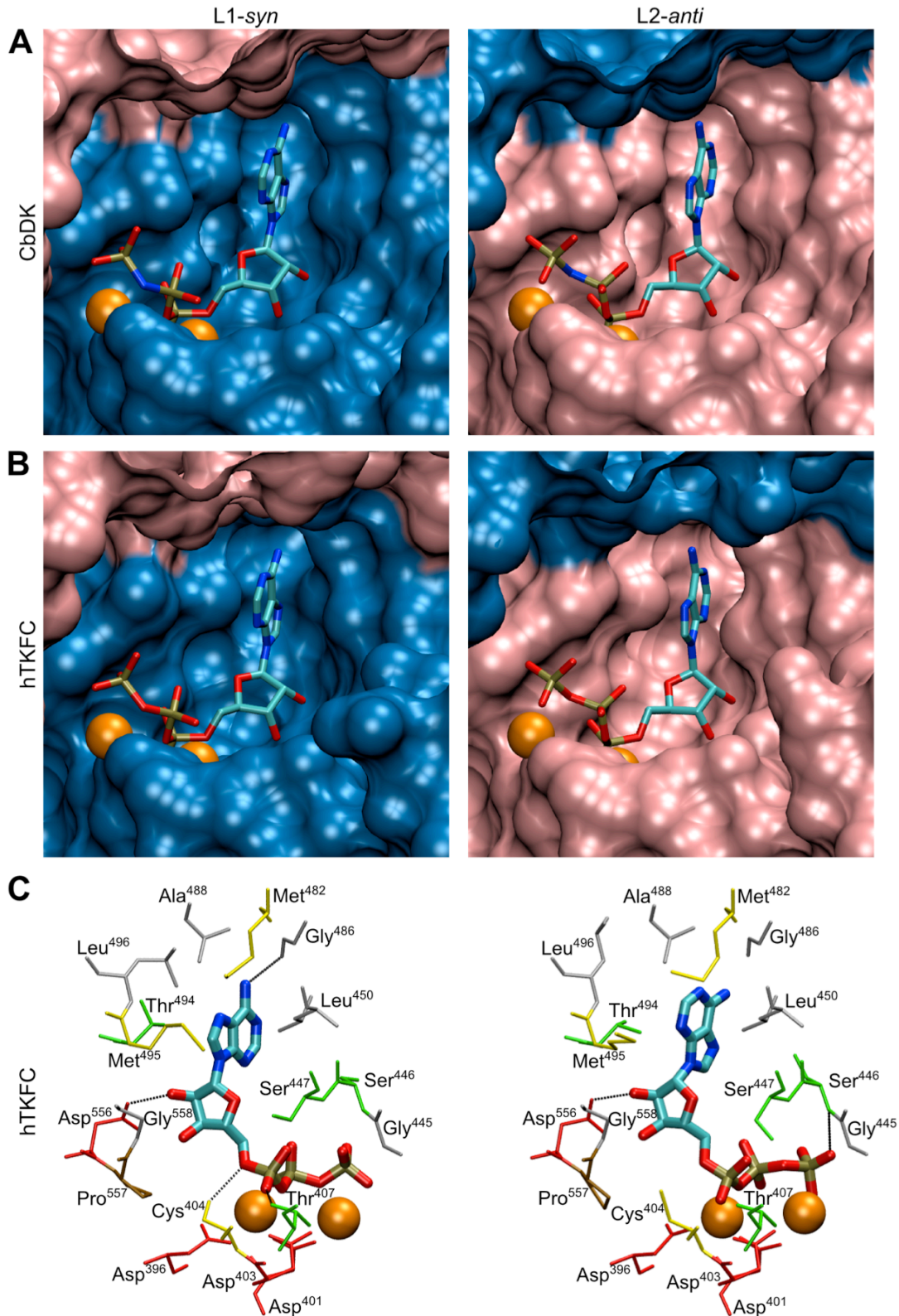


Figura 35: Sitios de unión de ATP a CbDK y hTKFC. Se presentan separados los dos sitios de unión L1-*syn* y L2-*anti* que contienen la mitad adenosina del ligando en diferentes conformaciones. **A:** Unión del análogo de ATP, AMPPNP, a CbDK [146,147]. **B y C:** Unión de ATP a la estructura de hTKFC obtenida con *Modeller* (Figura 33.B). Los paneles A y B muestran las dos subunidades del dímero en distinto color: K1L1, azul; K2L2, rosa. Los paneles B y C muestran vistas diferentes de las mismas poses. AMPPNP y ATP están coloreados por elemento: C, azul claro; N, azul oscuro; O, rojo; P, marrón. Los iones Mg²⁺ están representados como esferas anaranjadas. Los átomos de hidrógeno están omitidos.

En la Figura 35.C se presentan las principales interacciones del ATP con aminoácidos de hTKFC. El grupo adenina de ATP se dispone de manera similar al AMPPNP en los sitios de unión de CbDK, estableciendo contactos con los residuos Leu⁴⁵⁰, Met⁴⁸², Gly⁴⁸⁶, Ala⁴⁸⁸, Thr⁴⁹⁴, Met⁴⁹⁵ y Leu⁴⁹⁶ de la proteína hTKFC. Sin embargo debido a la distinta conformación (*syn* o *anti*) de la base en los dos sitios de unión, las interacciones son distintas. Así, mientras que en el sitio L2-*anti* las interacciones observadas son todas de van der Waals, en el sitio L1-*syn* se puede observar un puente de hidrógeno entre el O carbonílico de la Gly⁴⁸⁶ y el N⁶H₂ de la adenina. Esto coincide parcialmente con los sitios estándar de reconocimiento de adenina [153]. La ribosa está cerca de los residuos Thr⁴⁹⁴, Met⁴⁹⁵, Pro⁵⁵⁷ y Gly⁵⁵⁸. Además, el grupo 2'-OH de la ribosa puede formar un puente de hidrógeno con la cadena lateral de Asp⁵⁵⁶. El grupo trifosfato de ATP forma un complejo con dos iones Mg²⁺ y está próximo a los residuos Asp³⁹⁶, Asp⁴⁰¹, Asp⁴⁰³, Cys⁴⁰⁴, Thr⁴⁰⁷, Gly⁴⁴⁵, Ser⁴⁴⁶ y Ser⁴⁴⁷. Los tres primeros se unen a los iones Mg²⁺. En el sitio L2-*anti* el N amida de la cadena principal de la Ser⁴⁴⁶ forma un puente de hidrógeno con el fosfato γ del ATP. En el sitio L1-*syn* dicho puente no se observa, pero sí existe un puente entre la cadena lateral de Thr⁴⁰⁷ y el fosfato β . En ambos sitios L, con minúsculos cambios de conformación, la Cys⁴⁰⁴ podría formar un puente de hidrógeno con el fosfato α .

2.2.2 Unión de FAD al centro activo de la trioquinasa/FMN ciclasa

La forma de unión de FAD al centro activo se investigó mediante cálculos de *docking* de este sustrato al modelo dimérico de hTKFC (Figura 33) después de eliminar de dicho modelo los ligandos DHA y ATP, pero conservando los dos iones de Mg²⁺. Los cálculos de *docking* se hicieron con el programa *AutoDock*, (sección 3.9.2) y se obtuvieron 600 poses de FAD en cada uno de los centros de unión de ATP, L1-*syn* y L2-*anti*. El FAD es una molécula compleja, que fue modelada con 18 torsiones, por lo que la búsqueda conformacional de la forma de unión a la proteína es una tarea formidable, y las poses encontradas fueron muy diversas. Para analizarlas, además del factor energético evaluado por *AutoDock*, tuvimos en cuenta especialmente otros dos aspectos: (a) el posicionamiento de la mitad adenínica (ADP-) de forma similar a como se posiciona el ATP en la estructura moldeada a partir de CbDK, con la base adenina introducida en un bolsillo en el que establece contactos con aminoácidos hidrofóbicos, la ribosa unida por un puente de hidrógeno a Asp⁵⁵⁶ y los fosfatos interaccionando con los dos iones metálicos (Figura 35); (b) la orientación adecuada del grupo 4'-OH de la cadena de ribitilo para llevar a cabo el ataque nucleofílico sobre el P proximal que da lugar a la ciclación característica del producto FMN cíclico y a la salida de AMP. La conformación óptima para este ataque tendría el 4'-O del ribitilo próximo al P proximal, orientado en línea respecto al enlace P-O de la unión fosfoanhídrido y, posiblemente, próximo a uno de los iones metálicos del centro activo lo que facilitaría la pérdida del protón unido al 4'-O. Teniendo en cuenta estos criterios, se obtuvieron resultados satisfactorios en el sitio L1-*syn*, pero no en el sitio L2-*anti*. En este último no se consiguieron resultados que cumplieran los requisitos de unión de la base adenina a su correspondiente bolsillo y de establecimiento de un puente de hidrógeno de la ribosa con el Asp⁵⁵⁶. Comparando los dos sitios, L1-*syn* y L2-*anti*, con ATP ligado (Figura 35C), la diferencia más significativa parece estar en la cadena lateral de la Thr⁴⁹⁴: en L2-*anti*, el metilo γ de este aminoácido está orientado hacia la adenina, ocupando parte del hueco, mientras que en L1-*syn*, el grupo metilo γ se orienta paralelamente a la adenina, dejando un espacio mayor.

Tal vez esta diferencia en la posición de la Thr⁴⁹⁴, aunque no impide la unión de ATP en L2-*anti*, pueda explicar la dificultad de acomodar una molécula de FAD en dicho sitio por el procedimiento de *docking*.

Como ya se ha dicho, los resultados que se obtuvieron haciendo *docking* al sitio L1-*syn* fueron satisfactorios. Las seis mejores poses, según la evaluación hecha por el programa *AutoDock*, tenían niveles energéticos similares (Figura 36), pero al considerar los criterios a y b, arriba explicados, como requisitos, ninguna de las 4 poses de FAD energéticamente más favorables (Figura 36.A-D) parecían corresponder a un complejo enzima-sustrato productivo. Sin embargo, las poses quinta y sexta resultantes de la evaluación por *AutoDock* (Figura 36.EG y 36.FH) sí podrían ser buenas aproximaciones a un complejo productivo óptimo.

En estas dos poses (Figura 36.EG y 36.FH) la mitad ADP del FAD se posiciona como el ATP, incluyendo diversos aspectos. (a) La adenina penetra en el bolsillo arriba mencionado, donde queda rodeada por un conjunto de residuos mayoritariamente hidrofóbicos. No obstante, la adenina se posiciona en este bolsillo en conformación *anti*, distinta del ATP. Probablemente por ello, la Gly⁴⁸⁶, ubicada en el fondo de dicho bolsillo, no está a distancia de formar un puente de hidrógeno con la adenina de FAD, al contrario de lo que sucede con el ATP. (b) Se forma un puente de hidrógeno entre un OH de la ribosa (bien el 3' o, con pequeños cambios de conformación, el 2') y la cadena lateral de Asp⁵⁵⁶. (c) Los fosfatos interactúan con los metales. En las dos posturas, el grupo fosfato α se une al metal Me-2 de forma bidentada (dos O del fosfato unidos al metal). En la postura de la Figura 36.EG, el fosfato β se une al otro metal Me-1 de forma monodentada, mientras que en la postura de la Figura 36.FH, el fosfato β se une de forma bidentada. La pose representada en la Figura 36.EG presenta una orientación del 4'-O del ribitol favorable al ataque nucleofílico interno (distancia al P de 3,28 Å y ángulo de ataque 164°), aunque la distancia del 4'-O al metal más próximo es tal vez un poco grande (4,16 Å). La pose de la Figura 36.FH presenta características similares, aunque el ángulo de ataque del 4'-O es menos favorable (150°), pero la distancia al metal es más adecuada (3,50 Å). Finalmente, las mayores diferencias entre las dos poses de las Figuras 36.EG y 36.FH se encontraron en las regiones ribitol e isoaloxazina.

En la Figura 36.EG, en la mitad ribitol, el grupo 4'-OH es donador en un puente de hidrógeno intramolecular con el fosfato β y es aceptor en un puente de hidrógeno con el NH peptídico de la Ser⁴⁴⁶ (aminoácido que interactúa también con el fosfato γ del ATP). Esta situación del grupo 4'-OH es potencialmente favorable para la realización del ataque nucleofílico que debe tener lugar sobre el fósforo β del FAD para dar lugar a FMN cíclico. Respecto al grupo isoaloxazina, a pesar de su gran tamaño, se observaron relativamente pocas interacciones: la Asn¹¹⁷ (en el dominio K2) forma un puente de hidrógeno con el CO-4; la Gly⁴⁴⁵ (en el dominio L1) está muy cerca del CO-2, aunque el ángulo N-H::O no permita la formación de puente de hidrógeno; en el otro extremo, tres residuos del dominio K2 (Thr⁸², Ser⁸³ y Gly¹¹³) están en las cercanías del anillo hidrofóbico de isoaloxazina.

En la Figura 36.FH, el puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo hidroxilo O4' del ribitol y el fosfato β también se observa. Aunque la mitad ribitol esté en contacto con la Ser⁴⁴⁶, no se observa ningún puente de hidrógeno con este residuo. La región polar del grupo isoaloxazina se encuentra muy cerca del grupo adenina y de residuos de proteína, parcialmente emparedada entre las cadenas laterales de Thr¹¹² y Ser⁴⁴⁶, formando un puente de hidrógeno con esta última. La región apolar del grupo isoaloxazina no interactúa con residuos de la proteína, estando orientada hacia el solvente.

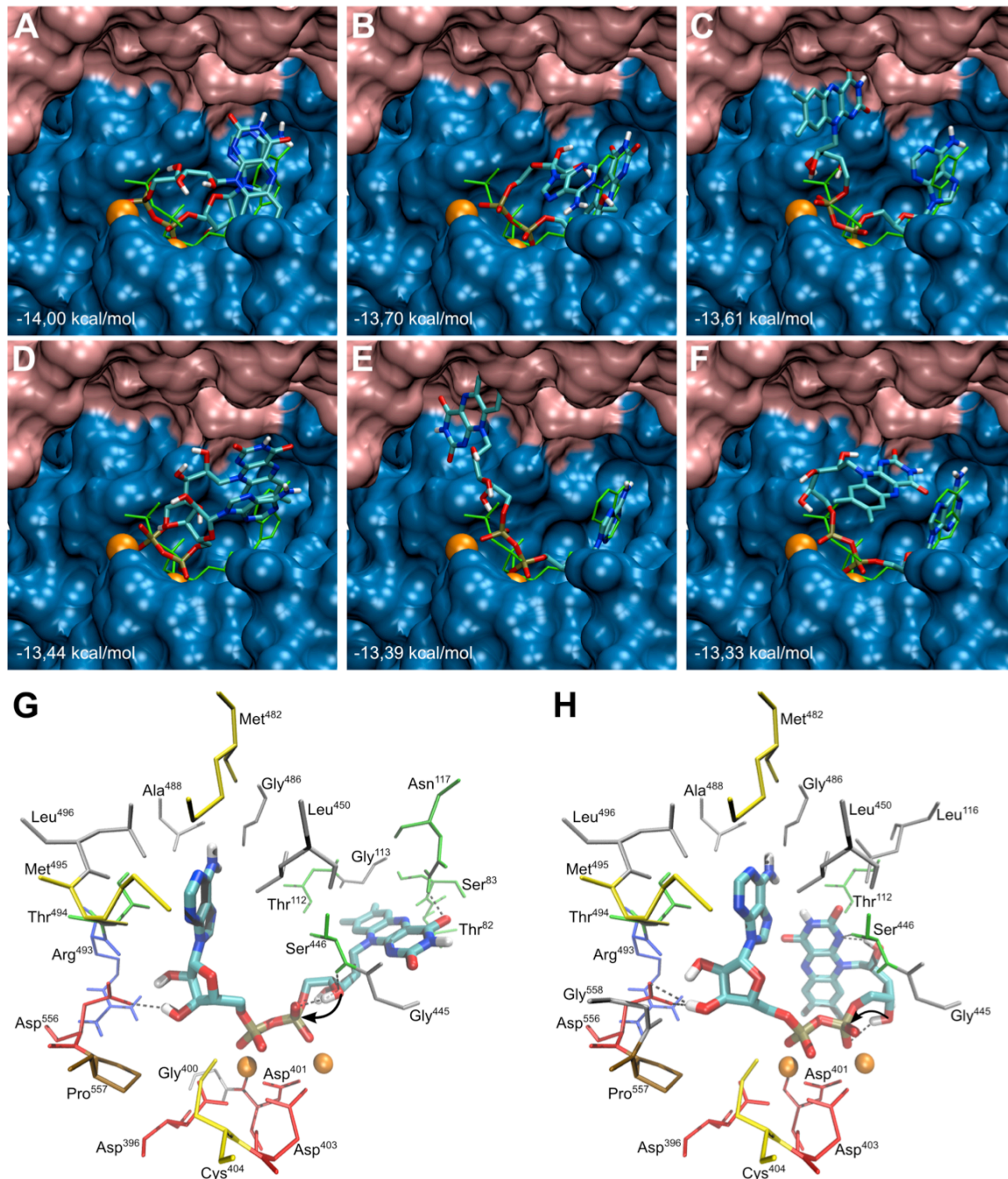


Figura 36: Modelos teóricos del complejo hTKFC:FAD, con FAD unido al sitio K2L1 de hTKFC. Los modelos se obtuvieron por cálculos de *docking* empleando el programa *AutoDock*. **A-F:** Las seis mejores posturas usando la puntuación de *AutoDock*. La superficie de la enzima se muestra con las dos subunidades del dímero en distintos colores (K1L1, azul; K2L2, rosa). Los dos iones del centro dimetálico se muestran como esferas naranjas, el FAD se muestra en varillas gruesas coloreadas según el elemento químico y la conformación del ATP de la Figura 35.C (panel izquierdo) se muestra en varillas finas verdes para comparación con la postura de FAD. Para cada postura se indica la energía libre de unión estimada por *AutoDock*. **G-H:** Las posturas de FAD mostradas en E y F, respectivamente, en otra vista, mostrando los residuos vecinos que tienen al menos un átomo a menos de 4,1 Å de un átomo de FAD, excluyendo átomos de hidrógeno. La mayor parte de los residuos pertenece a la cadena K1L1, excepto los residuos Thr⁸², Ser⁸³, Thr¹¹², Gly¹¹³ y Asn¹¹⁷ que pertenecen a la cadena K2L2. En línea discontinua se muestran los puentes de hidrógeno en que interviene FAD. Las flechas negras indican la posibilidad de un ataque interno del 4'-OH sobre el fósforo proximal. Por las razones explicadas en el texto de la sección 2.2.2, el modelo EG fue el tomado como referencia en el resto del trabajo.

Además del análisis de las poses siguiendo los criterios de *AutoDock*, se realizaron también evaluaciones utilizando dos funciones alternativas: *X-Score* [154] y *DrugScore*^{PDB} [155]. En estas evaluaciones, la pose 5 de *AutoDock* (Figura 36.EG) ocupó posiciones muy favorables y, al considerarlas todas ellas en conjunto, mediante una puntuación de consenso [156,157] basada en las tres funciones de puntuación (*AutoDock*, *X-Score* y *DrugScore*^{PDB})⁷, resultó ser la mejor evaluada de entre las 600 obtenidas. Por ello, y por lo arriba comentado sobre la disposición favorable del FAD para la reacción de tipo liasa ciclante, esta pose es la que se tomó como punto de partida para los estudios de dinámica molecular del complejo hTKFC-FAD y como referencia para los estudios de mutagénesis puntual.

2.2.3 Dinámica molecular de la trioquinasa/FMN ciclasa y sus complejos con sustratos de las actividades quinasa y liasa ciclante

Sistemas estudiados

Se hicieron simulaciones de dinámica molecular de la hTKFC en presencia y ausencia de sus sustratos, con las finalidades de estudiar la estabilidad del modelo de la proteína obtenido por homología, de entender mejor el modo de unión de los sustratos a la enzima y de identificar posibles efectos de la unión de los distintos sustratos sobre la dinámica de la proteína.

Como puntos de partida para las simulaciones se emplearon tres sistemas, cuya composición se resume en la Tabla 3: hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD. El sistema hTKFC corresponde a la proteína dimérica sin sustratos unidos y se obtuvo a partir de la estructura proteica preparada con *Modeller* (Figura 33.B), eliminando las moléculas de DHA y ATP, y manteniendo los cuatro iones Mg²⁺. El sistema hTKFC:2DHA:2ATP corresponde a la proteína con los sustratos de la actividad DHA quinasa unidos y se obtuvo empleando íntegra la estructura preparada con *Modeller* (Figura 33.B), conservando los sustratos y los iones Mg²⁺ que dicha estructura contiene. El sistema hTKFC:FAD corresponde también a la proteína dimérica con FAD unido en el sitio L1-*syn*, con el sitio L2-*anti* sin ligando y con dos iones Mg²⁺ en cada sitio. Este sistema se obtuvo a partir del complejo obtenido por *docking* (Figura 36.EG). Los tres sistemas se sometieron a simulación dinámica con el campo de fuerzas AMBER03 [158] en cuya biblioteca de residuos definidos no había descripciones de los ligandos FAD, ATP y DHA. Los modelos de los dos primeros (sección 3.13) fueron proporcionados por F. Y. Dupradeau (Université de Picardie-Jules Verne, Amiens, France). El modelo de DHA covalentemente unido a la His²²¹ de hTKFC, es decir N^ε-(1,2,3-trihidroxiprop-2-il)-L-histidina, fue parametrizado por nosotros (sección 3.14.2).

⁷ Las conformaciones se ordenaron según cada una de las tres funciones, en orden de puntuación de más a menos favorable. A cada conformación se le asignó un número entero creciente (*ranking*) en cada clasificación. La puntuación "consenso" de cada conformación (*rank-sum*) fue la suma de sus tres valores de *ranking*. Por ejemplo, a una conformación clasificada en 2º, 12º y 4º puestos en las tres funciones, se le dio un valor *rank-sum* igual a 2+12+4 = 18. En la clasificación de "consenso", la conformación más favorable es la que presenta un *rank-sum* más bajo.

Tabla 3: Composición de los sistemas empleados para las simulaciones de dinámica molecular y para el análisis de modos normales

| Sistemas: | hTKFC | hTKFC:2DHA:2ATP | hTKFC:FAD | hTKFC:2FAD |
|--|---------|-----------------|-----------|------------|
| <i>Común para dinámica molecular y análisis de modos normales:</i> | | | | |
| Cadenas hTKFC | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Mg ²⁺ | 4 | 4 | 4 | 4 |
| DHA | 0 | 2 | 0 | 0 |
| ATP | 0 | 2 | 0 | 0 |
| FAD | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Átomos | 16 814 | 16 924 | 16 898 | 16 982 |
| <i>Sólo para dinámica molecular:</i> | | | | |
| Na ⁺ | 84 | 84 | 84 | — |
| Cl ⁻ | 94 | 86 | 92 | — |
| H ₂ O | 87 364 | 87 570 | 87 333 | — |
| Átomos (totales) | 279 084 | 279 804 | 279 073 | — |

Dinámica de las cadenas peptídicas

Las simulaciones se hicieron como se describe en la sección 3.10.2, recogiendo trayectorias de 42 ns. Los resultados se presentan de forma animada en los Vídeos 4, 5 y 8 (suplemento CD-ROM). Los videos 6 y 7 contienen una selección de aspectos importantes del video 5. En la Figura 37.A se presentan resúmenes estáticos obtenidos por superposición de imágenes a intervalos de 1 ns. La estructura dimérica de la proteína, la organización de cada subunidad en sus dominios K y L, y la disposición alargada del conjunto de los cuatro dominios L1-K2-K1-L2, se mantuvieron constantes, aunque con fluctuaciones significativas. La parte central de la proteína, formada por los dominios K1 y K2, mantuvo en general una conformación más estable, con menos fluctuaciones que los dominios L1 y L2, en los que además se observó mayor movilidad en las regiones con menor estructura secundaria (Figura 37.A). Por otra parte, en general, los elementos de estructura secundaria se mantuvieron casi constantes en los tres sistemas a lo largo del tiempo simulado.

Para medir la divergencia de cada sistema respecto a la estructura inicial, se calcularon los valores de RMSD⁸ a lo largo del tiempo (Figura 37.B). En los tres sistemas, la divergencia global convergió hacia una meseta, alcanzando promedios de RMSD muy similares, 5,0 Å, 5,2 Å y 5,0 Å en los últimos 5 ns de las simulaciones con hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD, respectivamente. Al calcular los valores de RMSD por separado para cada dominio, K1, K2, L1 y L2 (Figura 37.C), se encontró que sus divergencias internas respecto al estado inicial eran menores que la divergencia global de la proteína. Esto indica la existencia de movimientos de unos dominios respecto a otros, lo que produciría divergencia global de la proteína sin afectar a la divergencia interna de los dominios. Los dominios K presentaron mayor estabilidad conformacional interna que los dominios L, con la excepción de un aumento súbito de RMSD en el dominio K2 del sistema hTKFC a los 18 ns.

Aunque al comparar entre sí las divergencias de los tres sistemas respecto a su estado inicial, no se observaron efectos claros de la presencia de los ligandos DHA y ATP o FAD, debe tenerse en cuenta que los valores de RMSD miden la divergencia cuantitativa pero no dan información sobre los aspectos vectoriales de los movimientos. Como veremos más adelante, si no la magnitud de los movimientos, sus principales componentes sí que fueron afectados por la presencia y la naturaleza de los ligandos. Otro aspecto de la movilidad de los sistemas dinámicos que no se pone de manifiesto en las gráficas de RMSD es la distribución de la movilidad entre distintas regiones proteicas, y aquí sí que se observaron diferencias dependientes de los ligandos unidos. En la Figura 38 se presentan, en los tres sistemas estudiados, las fluctuaciones de los carbonos α de la proteína respecto a sus posiciones medias (valores de RMSF), tras eliminar los efectos de los movimientos de traslación y rotación⁹.

En los dominios K de las dos subunidades se observaron tres regiones de gran movilidad, localizadas en la superficie del dominio y correspondientes a lazos entre segmentos con estructura secundaria de hélice α y/o lámina plegada β (Figura 38.C): los lazos 144-150, situados en las caras de los dominios K orientadas hacia los dominios L; los lazos 198-211, situados en la parte superior de los dominios K, muy próximos a la interfaz K1-K2, de manera que los dos lazos iguales pueden interactuar entre sí; y los lazos 248-259, ubicados en la parte inferior de los dominios K, y lejos de cualquier otro dominio. Se puede destacar la notable disminución de movilidad de los primeros aminoácidos del lazo 198-211 en el dominio K2, como consecuencia de la presencia de ligandos unidos (Figura 38.B).

⁸ Ver nota 4 en la página 19.

⁹ Ver nota 3 en la página 17.

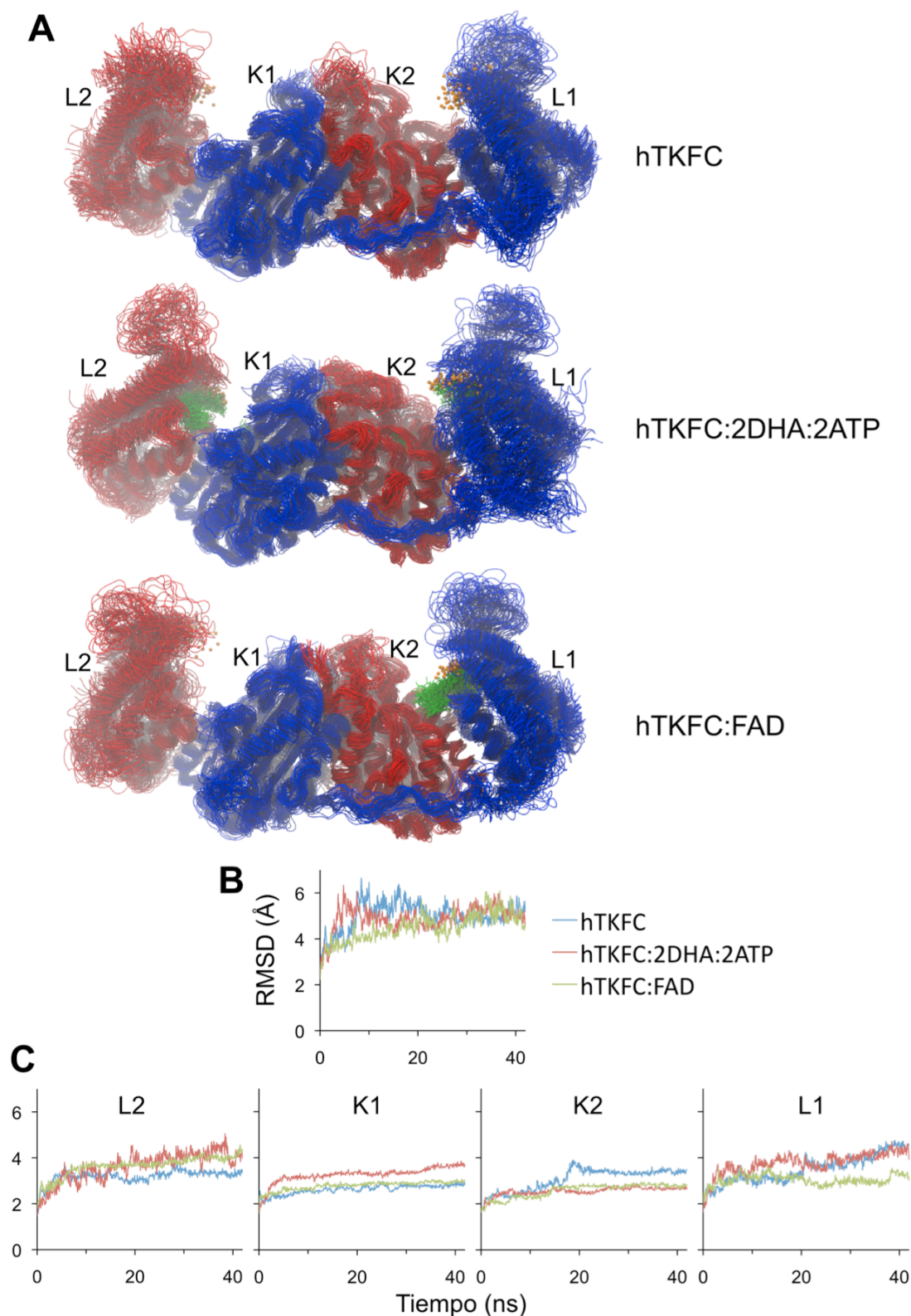


Figura 37: Dinámica molecular de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD. Las trayectorias de 42 ns se presentan en forma animada en los Vídeos 4, 5 y 8 (Suplemento CD-ROM). **A:** Superposición de conformaciones extraídas de las trayectorias a intervalos regulares de 1 ns, alineadas con la conformación inicial. Las subunidades se presentan una en azul (K1L1) y otra en rojo (K2L2). Los iones Mg^{2+} se representan por pequeñas esferas anaranjadas y los sustratos como modelos de varillas verdes (ATP en los dominios L; DHA covalentemente ligado a las His²²¹ de los dominios K; FAD en el dominio L1). **B:** Evolución temporal de la RMSD global calculada con todos los carbonos α del dímero. **C:** Evolución de la RMSD calculada independientemente para cada dominio: dominios K, aa 3-330; dominios L, aa 372-573.

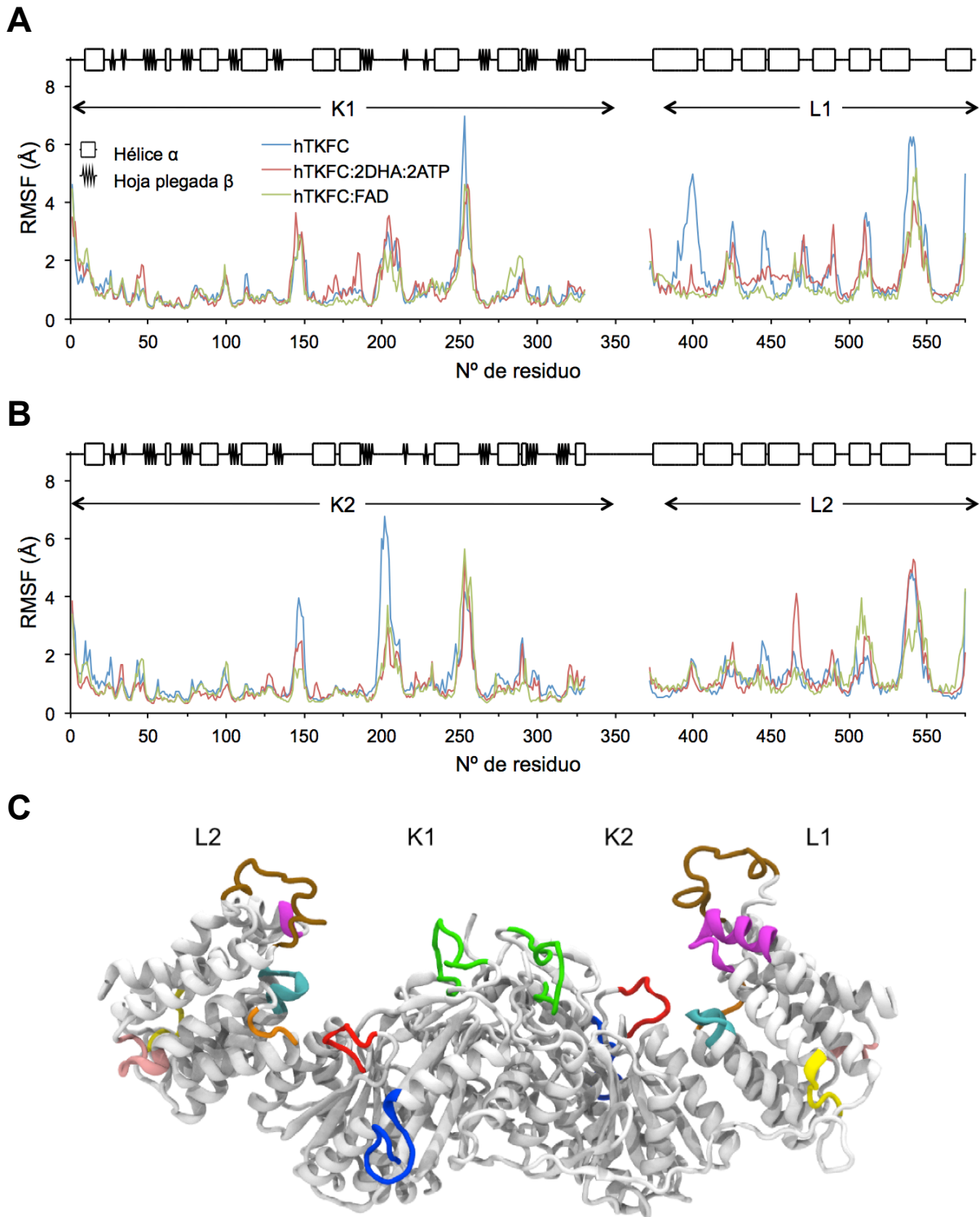


Figura 38: Fluctuación de los C α durante las simulaciones de dinámica molecular de los tres sistemas estudiados. La fluctuación de cada carbono α , respecto a sus posiciones medias, se calculó en forma de RMSF dentro de cada dominio. Por lo tanto, los valores de RMSF no incluyen los movimientos relativos de unos dominios respecto a otros. **A, B:** RMSF calculada para los dominios de la subunidad K1L1 o K2L2, respectivamente. En la parte superior de ambos paneles se muestra la estructura secundaria de las cadenas. **C:** Distribución de las regiones más móviles de cada dominio representadas en color sobre la estructura proteica inicial de las tres simulaciones. Color rojo, 144-150; verde, 198-211; azul, 248-259; rosa, 390-404 en L1 y 398-400 en L2; amarillo, 421-426; cian, 443-449; naranja, 488-491; salmón, 507-514; marrón, 535-550.

En los dominios L, en consonancia con su mayor movilidad general respecto a los dominios K, todas las regiones ubicadas entre hélices α presentaron una elevada movilidad relativa en alguno de los dos dominios (Figura 38.C). Un hecho a destacar es la gran movilidad del segmento 390-404 del dominio L1 en el sistema hTKFC (proteína sin ningún sustrato unido), que no tuvo reflejo en la dinámica del dominio L2 en el mismo sistema, ni en la dinámica de dominios L en los sistemas con sustratos unidos (hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD). Este segmento incluye algunos aminoácidos de la primera y segunda hélices del barril de 8 hélices α , así como los aminoácidos que se coordinan con los iones metálicos. Un comportamiento similar, pero menos marcado, lo presentó el lazo 443-449, ubicado entre las hélices tercera y cuarta del barril. Este lazo está a corta distancia del segmento 390-404, y los dos están cercanos al sitio de unión de los grupos fosfato de ATP o FAD. La presencia de un ligando, como ATP o FAD, podría por tanto disminuir la flexibilidad de esta región. Las fluctuaciones observadas en esta región del dominio L1, que involucran a algunos residuos de la primera y segunda hélice no conllevan pérdida de estructura secundaria, pero sí un enderezamiento del codo que presenta la primera hélice y cambios en la coordinación de los metales (véase la siguiente sección).

Dinámica de los ligandos y sus entornos inmediatos en los centros de unión

Otra cuestión que se consideró también en las tres simulaciones dinámicas es lo que sucede con cada uno de los ligandos Mg^{2+} , DHA, ATP y FAD. A este respecto, la primera generalización que debe hacerse es que la unión de dichos ligandos a la proteína persistió a lo largo de todas las trayectorias, aunque los detalles concretos de sus conformaciones y sus interacciones no covalentes mostraron algunos cambios de interés que se destacan a continuación.

Respecto a los iones Mg^{2+} , se mantuvieron en general, durante las simulaciones, la coordinación de Mg-1 con Asp³⁹⁶, Asp⁴⁰¹ y Asp⁴⁰³, y la de Mg-2 con Asp⁴⁰¹ y Asp⁴⁰³. La única excepción significativa se observó en el sitio L1-*syn* del sistema hTKFC:2DHA:2ATP, donde el Mg-1, manteniéndose coordinado a los tres aspartatos, a partir de los 36 ns lo hizo de forma bidentada con Asp³⁹⁶, mientras que el Mg-2 dejó de estar coordinado con Asp⁴⁰³. La importancia de los aminoácidos a los que se coordinan los iones de Mg^{2+} para la actividad enzimática se puso de manifiesto por los efectos de sus mutaciones sobre las actividades enzimáticas (véase más adelante).

Respecto a las moléculas de ATP, en la Figura 39.A se resumen con detalle, de forma estática, sus trayectorias dinámicas y las de sus entornos aminoacídicos en los dos sitios de unión, L1-*syn* y L2-*anti*, del sistema hTKFC:2DHA:2ATP. El cambio más importante en la conformación de ATP se produjo en el sitio L1-*syn*, en el que la base adenina se encontraba inicialmente en la conformación *syn*, como ya se ha dicho anteriormente (Figura 35.C). Una vez transcurridos 1,2 ns de simulación, el ángulo de torsión del enlace glicosídico entre los anillos de ribosa y adenina sufrió un giro que convirtió esta molécula de ATP a su conformación *anti*, permaneciendo así hasta el final (Figura 39.B). La otra molécula de ATP, ligada en el sitio L2-*anti*, permaneció en la conformación *anti* durante todo el tiempo de la simulación. La conformación del grupo trifosfato del ATP ubicado en el sitio L2-*anti* es un poco más extendida que la del grupo homólogo del sitio L1-*syn*, y los respectivos ángulos de torsión fueron en general más estables, experimentando menos cambios. Las dos mitades

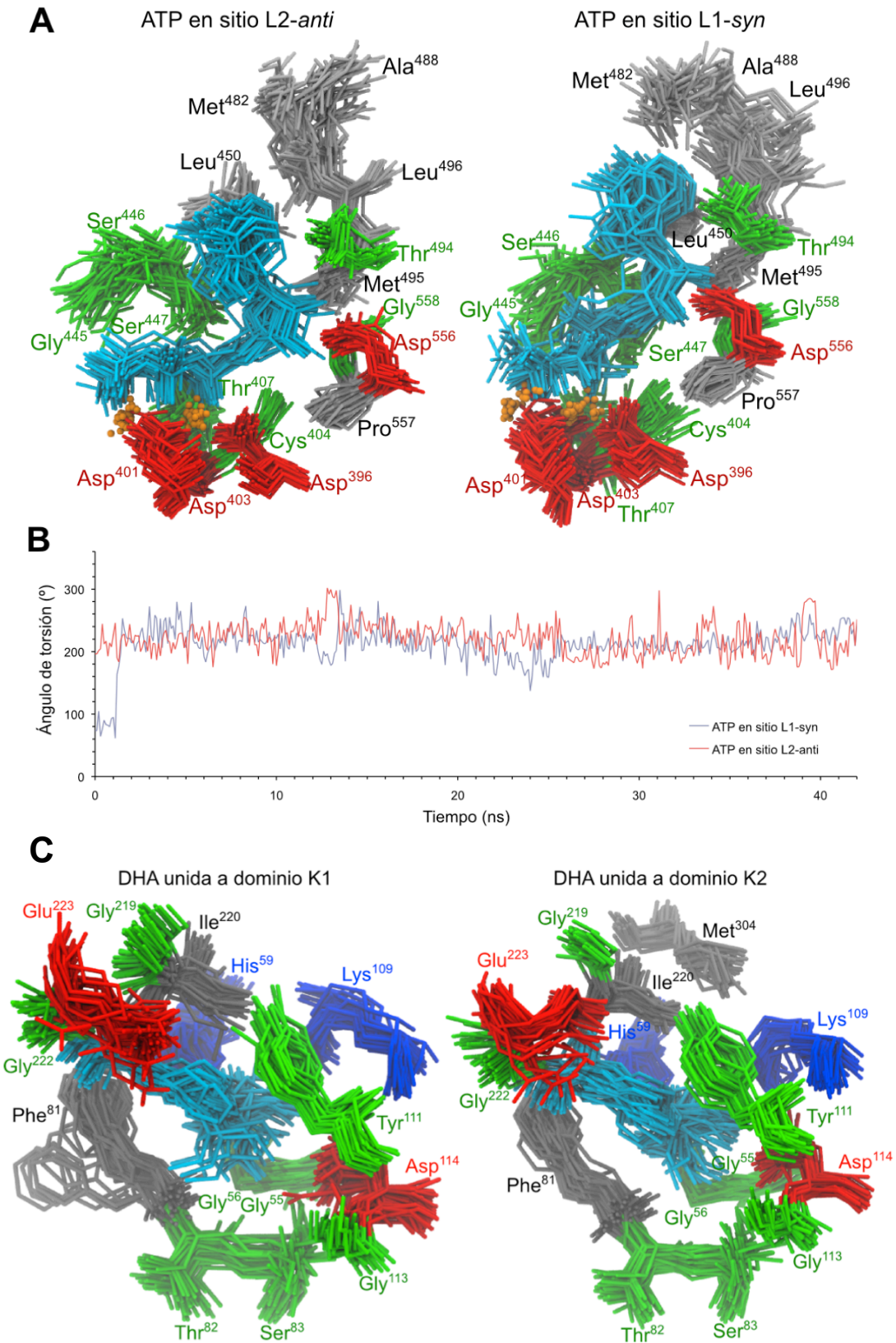


Figura 39: Dinámica del ATP y DHA en el sistema hTKFC:2DHA:2ATP. La trayectoria se presenta en forma animada en el Vídeo 5 (Suplemento CD-ROM). **A, C:** Superposición de conformaciones extraídas de las trayectorias a intervalos regulares de 1 ns, alineadas con la conformación inicial. Los ligandos se representan como varillas de color azul claro. Los aminoácidos próximos se presentan en color según su naturaleza general: gris, no polares; verde, polares; azul oscuro, básicos; rojo, ácidos. **B:** Evolución temporal del ángulo de torsión del enlace glicosídico del ATP entre los átomos O4' y C1' de la ribosa y N9 y C4 de la adenina. La molécula de ATP en el sitio L1-*syn* cambió su conformación de *syn* para *anti* transcurridos 1,2 ns de tiempo simulado.

trihidroxi-prop-2-ilo (DHA unido covalentemente a His²²¹) no presentaron cambios conformacionales de interés (Figura 39.C). En este mismo sistema (hTKFC:2DHA:2ATP) se observó también como evolucionaban los puentes de hidrógeno y otros contactos entre los ligandos y los residuos aminoacídicos (Figuras 40 y 41).

Los puentes de hidrógeno establecidos inicialmente por la DHA (trihidroxi-prop-2-ilo) con los aminoácidos Gly⁵⁶, His⁵⁹ y Asp¹¹⁴ (Figura 34.B) continuaron existiendo durante la simulación de dinámica molecular, aunque no de manera permanente, sino en diferentes fracciones temporales y con cambios de aceptor o donador según los casos (Figura 40). El puente que mostró mayor prevalencia (>60% o >80% del tiempo de simulación en uno u otro de los sitios) fue el formado por Asp¹¹⁴ con el O3 o el O1 de la DHA; los formados por His⁵⁹ tuvieron prevalencias algo menores y los formados por Gly⁵⁶ estuvieron presentes menos del 10% del tiempo de simulación. Durante la trayectoria, se observó además la formación de puentes de Lys¹⁰⁹ con el O3 del trihidroxi-prop-2-ilo, inicialmente inexistentes, y que se mantuvieron un 5%-10% del tiempo de simulación. Para la DHA, no se consideraron las posibles interacciones no covalentes distintas de los puentes de hidrógeno, teniendo en cuenta su unión covalente a His²²¹ en forma de trihidroxi-prop-2-ilo.

Respecto a los puentes de hidrógeno formados inicialmente por una o dos de las moléculas de ATP con los aminoácidos Cys⁴⁰⁴, Ser⁴⁴⁶, Gly⁴⁸⁶ y Asp⁵⁵⁶ (Figura 35.C), sólo este último tuvo una presencia constante, actuando como donador durante toda la simulación, en ambos sitios L1 y L2, con el O2' y/o el O3' de la ribosa como aceptor. Los puentes con Cys⁴⁰⁴ y Ser⁴⁴⁶ estaban presentes al comienzo en los sitios L1-*syn* y L2-*anti*, respectivamente (Figura 35.C), pero desaparecieron inmediatamente (Figura 40). Durante la simulación dinámica se formaron cada uno de ellos en el sitio contrario, manteniéndose en el tiempo de forma parcial, en mayor proporción los formados por la cadena lateral o la cadena principal de Ser⁴⁴⁶ con el fosfato α de ATP. El puente de Gly⁴⁸⁶ con la adenina desapareció también desde el comienzo de la simulación y no volvió a formarse. En su lugar, durante la simulación se formaron puentes de la adenina con Thr¹¹², Lys⁴⁸⁷ y Ala⁴⁸⁹, aunque mantuvieron una presencia poco constante (Figura 40). Es destacable la persistencia en los dos sitios de unión de ATP de los puentes de hidrógeno de los átomos O2' y/o O3' de la ribosa con el ya mencionado residuo Asp⁵⁵⁶ y con las cadenas principales de Met⁴⁹⁵ y Gly⁵⁵⁸, lo que concuerda con su papel en la especificidad enzimática, a juzgar por la potencia relativa de ribo- y desoxirribonucleótidos como inhibidores de la actividad FMN ciclasa de hTKFC [2] y por los efectos de la mutación D556A sobre los parámetros cinéticos de sus actividades quinasa y ciclasa (véase más adelante). Más abajo nos referiremos a la aparición transitoria, en el sitio L2-*anti*, de un puente de hidrógeno, entre el O de la cadena lateral de Thr¹¹² (como donador) y el N-6 de la adenina (como aceptor), u otros entre dicho aminoácido y el N-1 o N-6 de la adenina, puentes que pueden ser importantes en la actividad quinasa y pueden explicar los efectos de la mutación T112A.

Respecto a las interacciones distintas de puentes de hidrógeno establecidas por las moléculas de ATP, durante toda la simulación dinámica se mantuvieron esencialmente constantes los contactos de la adenina con Ser⁴⁴⁶, Ala⁴⁸⁸, Thr⁴⁹⁴, al menos en uno de los dos sitios de unión (L1-*syn* o L2-*anti*). Es de destacar que en los modelos de ATP unido a hTKFC, obtenidos por homología (Figura 35.C), el anillo de adenina se introducía profundamente en el bolsillo de unión, mientras que durante las simulaciones dinámicas la adenina, sin abandonar por completo este bolsillo, mostraba menor grado de penetración en él. Esto se pone de manifiesto, por ejemplo, en la desaparición de los contactos entre la

adenina y los aminoácidos Met⁴⁸² y Gly⁴⁸⁶, ubicados en el fondo del bolsillo (Figura 41.B). Este movimiento ligero hacia el exterior del bolsillo, puede relacionarse con la formación del puente de hidrógeno con Thr¹¹² arriba mencionado. Durante toda la simulación dinámica, también se conservó en ambos sitios de unión la coordinación de los grupos trifosfato con los iones de Mg²⁺ (Figura 39.A) así como sus distancias respecto a los aminoácidos ligados al metal (Asp³⁹⁶, Asp⁴⁰¹ y Asp⁴⁰³) (Figura 41.B).

En la Figura 42 se resume con detalle, de forma estática, la trayectoria dinámica de la molécula de FAD y su entorno aminoacídico en el único sitio ocupado en el sistema hTKFC:FAD. La conformación inicial del FAD (Figura 36.EG) permaneció relativamente constante a lo largo del tiempo simulado, observándose las fluctuaciones más marcadas en la dimetilisoaloxazina. La base adenina de FAD mantuvo todo el tiempo su conformación *anti*, así como, de manera intermitente, las interacciones hidrofóbicas observadas en la estructura de partida con Leu⁴⁵⁰, Ala⁴⁸⁸, Met⁴⁹⁵ y Leu⁴⁹⁶. En la Figura 43 se analiza la dinámica de los puentes de hidrógeno observados entre la proteína y el ligando. Inicialmente, en el complejo hTKFC:FAD obtenido por *docking* se habían detectado puentes de hidrógeno de Asn¹¹⁷ con la dimetilisoaloxazina, Ser⁴⁴⁶ con el O4' del ribitol y Asp⁵⁵⁶ con el O3' de la ribosa (Figura 36.G). El primero de ellos se mantuvo durante un 66% de la simulación, el segundo durante un 92% y el tercero, junto con otro puente formado con el O2' de la misma ribosa, durante la totalidad de la trayectoria. La persistencia de los puentes de hidrógeno formados por Asp⁵⁵⁶, que coincide con lo observado en los complejos con ATP (ver arriba), confirma la importancia de este residuo en la especificidad de sustrato de hTKFC. El puente de hidrógeno formado por Ser⁴⁴⁶ con el O4' del ribitol (el átomo que debe realizar el ataque nucleofílico interno sobre el fósforo proximal, en la reacción FMN ciclasa) puede tener un papel importante en el mecanismo facilitando la disociación del 4'-OH y por lo tanto dicho ataque. La importancia de Ser⁴⁴⁶ a este respecto se puso de manifiesto también por los efectos de la mutación S446A sobre los parámetros cinéticos de sus actividades quinasa y ciclasa (véase más adelante). Además de los anteriores puentes de hidrógeno, presentes desde el comienzo de la simulación, durante la misma se observó también la formación de puentes de hidrógeno con las cadenas principales de Met⁴⁹⁵ y Gly⁵⁵⁸. Los grupos fosfatos α y β permanecieron coordinados a los Mg-1 y Mg-2, respectivamente, pero la existencia de puentes de hidrógeno con la proteína fue casi nula. En todo el tiempo simulado no se observaron interacciones hidrofóbicas con la región apolar de la dimetilisoaloxazina. Ésta mantuvo una cara en contacto con residuos mayoritariamente polares de la proteína, mientras que la otra cara estuvo siempre orientada hacia el solvente (Figura 44).

A

| Donador | Aceptor | Ocupación (%) | Donador | Aceptor | Ocupación (%) |
|---|------------------|---------------|--|------------------|---------------|
| <i>Grupo: trihidroxiprop-2-ilo en el sitio L1-syn</i> | | | <i>Grupo: trihidroxiprop-2-ilo en el sitio L2-anti</i> | | |
| Dha-O2 | Gly56-O | 2,78 | Dha-O1 | Gly56-O | 0,36 |
| Dha-O3 | Gly56-O | 0,55 | Dha-O2 | Gly56-O | 0,19 |
| Dha-O2 | Gly56-N | 0,95 | Dha-O3 | Gly56-O | 0,02 |
| Dha-O2 | His59-NE2 | 0,10 | Dha-O2 | Gly56-N | 1,05 |
| Dha-O1 | Phe81-O | 1,88 | Dha-O2 | His59-NE2 | 0,07 |
| Dha-O2 | Phe81-O | 1,71 | Dha-O1 | Phe81-O | 3,52 |
| Dha-O3 | Phe81-O | 0,17 | Dha-O2 | Phe81-O | 4,45 |
| Dha-O2 | Thr82-O | 0,31 | Dha-O1 | Ser83-OG | 1,26 |
| Dha-O1 | Ser83-OG | 0,79 | Dha-O3 | Asp114-OD | 87,08 |
| Dha-O2 | Lys109-NZ | 0,02 | Dha-O1 | Asp114-OD | 15,68 |
| Dha-O1 | Asp114-OD | 27,58 | Gly56-N | Dha-O1 | 8,95 |
| Dha-O3 | Asp114-OD | 63,52 | Gly56-N | Dha-O3 | 7,95 |
| Dha-O2 | Asp114-OD | 0,45 | His59-NE2 | Dha-O1 | 51,62 |
| Gly56-N | Dha-O1 | 6,95 | His59-NE2 | Dha-O2 | 22,56 |
| Gly56-N | Dha-O3 | 3,88 | His59-NE2 | Dha-O3 | 0,14 |
| His59-NE2 | Dha-O1 | 25,32 | Ser83-OG | Dha-O1 | 0,02 |
| His59-NE2 | Dha-O2 | 31,06 | Lys109-NZ | Dha-O2 | 0,12 |
| His59-NE2 | Dha-O3 | 0,40 | Lys109-NZ | Dha-O3 | 10,35 |
| Ser83-N | Dha-O1 | 0,02 | | | |
| Lys109-NZ | Dha-O2 | 0,10 | | | |
| Lys109-NZ | Dha-O3 | 5,47 | | | |

B

| Donador | Aceptor | Ocupación (%) | Donador | Aceptor | Ocupación (%) |
|---|------------------|---------------|--|-------------------|---------------|
| <i>Grupo: Adenina (Ade) en el sitio L1-syn</i> | | | <i>Grupo: Adenina (Ade) en el sitio L2-anti</i> | | |
| Ade-N6 | Gly486-O | 3,14 | Ade-N6 | Thr112-O | 4,40 |
| Ade-N6 | Lys487-O | 29,11 | Ade-N6 | Thr112-OG1 | 5,52 |
| Ade-N6 | Ala488-N | 0,05 | Ade-N6 | Gly113-N | 0,17 |
| Ade-N6 | Ala489-N | 0,33 | Ade-N6 | Ser446-OG | 1,26 |
| Thr112-OG1 | Ade-N6 | 0,07 | Ade-N6 | Gly486-O | 0,12 |
| Ser446-OG | Ade-N3 | 0,02 | Thr112-OG1 | Ade-N1 | 9,19 |
| Ser446-OG | Ade-N7 | 0,71 | Thr112-OG1 | Ade-N6 | 6,00 |
| Lys487-NZ | Ade-N1 | 0,31 | Thr112-OG1 | Ade-N7 | 0,07 |
| Lys487-NZ | Ade-N6 | 0,05 | Arg115-NH | Ade-N1 | 0,43 |
| Lys487-NZ | Ade-N7 | 0,17 | Arg115-NH | Ade-N6 | 0,10 |
| Ala488-N | Ade-N1 | 0,02 | Arg151-NH | Ade-N1 | 0,05 |
| Ala489-N | Ade-N1 | 14,04 | Arg151-NH | Ade-N6 | 0,10 |
| Ala489-N | Ade-N6 | 0,07 | Ser446-OG | Ade-N1 | 0,02 |
| Met495-N | Ade-N3 | 0,48 | Ser446-OG | Ade-N6 | 0,05 |
| Leu496-N | Ade-N3 | 0,07 | Ser446-OG | Ade-N7 | 0,21 |
| <i>Grupo: Ribosa (Rib) en el sitio L1-syn</i> | | | <i>Grupo: Ribosa (Rib) en el sitio L2-anti</i> | | |
| Rib-O2' | Asp556-OD | 92,38 | Rib-O2' | Asp556-OD | 93,00 |
| Rib-O3' | Asp556-OD | 72,18 | Rib-O3' | Asp556-OD | 93,62 |
| Cys404-SG | Rib-O3' | 0,05 | Rib-O3' | Gly558-N | 0,02 |
| Ser446-OG | Rib-O4' | 0,14 | Cys404-SG | Rib-O3' | 0,05 |
| Ser447-OG | Rib-O4' | 0,59 | Ser447-OG | Rib-O4' | 0,24 |
| Ser447-N | Rib-O4' | 0,02 | Ser447-OG | Tyr451-OH | 0,02 |
| Met495-N | Rib-O2' | 73,92 | Met495-N | Rib-O2' | 53,38 |
| Gly558-N | Rib-O3' | 59,83 | Gly558-N | Rib-O3' | 52,95 |
| <i>Grupo: Trifosfato (Ppp) en el sitio L1-syn</i> | | | <i>Grupo: Trifosfato (Ppp) en el sitio L2-anti</i> | | |
| Cys404-SG | Ppp-O5' | 2,05 | Lys204-NZ | Ppp-O1G | 0,45 |
| Cys404-SG | Ppp-O1A | 0,12 | Lys204-NZ | Ppp-O2B | 0,02 |
| Cys404-SG | Ppp-O1B | 0,05 | Lys204-NZ | Ppp-O3G | 0,05 |
| Cys404-SG | Ppp-O2B | 2,62 | Lys204-NZ | Ppp-O3B | 0,02 |
| Cys404-SG | Ppp-O3A | 3,52 | Cys404-SG | Ppp-O2A | 3,43 |
| Thr407-OG1 | Ppp-O1A | 0,45 | Cys404-SG | Ppp-O5' | 24,42 |
| Ser446-OG | Ppp-O5' | 0,45 | Cys404-SG | Ppp-O1A | 0,24 |
| Ser446-OG | Ppp-O1A | 0,33 | Thr407-OG1 | Ppp-O2A | 41,10 |
| Ser446-OG | Ppp-O2A | 56,52 | His408-NE2 | Ppp-O2A | 0,02 |
| Ser446-N | Ppp-O1A | 34,55 | Ser446-OG | Ppp-O2B | 0,05 |
| Ser446-N | Ppp-O2A | 66,25 | Ser446-OG | Ppp-O3B | 0,33 |
| Ser447-OG | Ppp-O5' | 7,02 | Ser446-OG | Ppp-O3G | 2,05 |
| Ser447-OG | Ppp-O1A | 63,40 | Ser446-N | Ppp-O3B | 0,12 |
| Ser447-OG | Ppp-O2B | 4,00 | Ser446-N | Ppp-O3G | 2,26 |
| Ser447-OG | Ppp-O3A | 6,16 | Ser447-OG | Ppp-O5' | 8,88 |
| Ser447-N | Ppp-O5' | 1,62 | Ser447-OG | Ppp-O2A | 28,70 |
| Ser447-N | Ppp-O1A | 81,27 | Ser447-OG | Ppp-O3A | 3,93 |
| Ser447-N | Ppp-O2A | 0,95 | Ser447-OG | Ppp-O2B | 1,02 |
| | | | Ser447-OG | Ppp-O3B | 1,26 |
| | | | Ser447-N | Ppp-O3B | 0,02 |

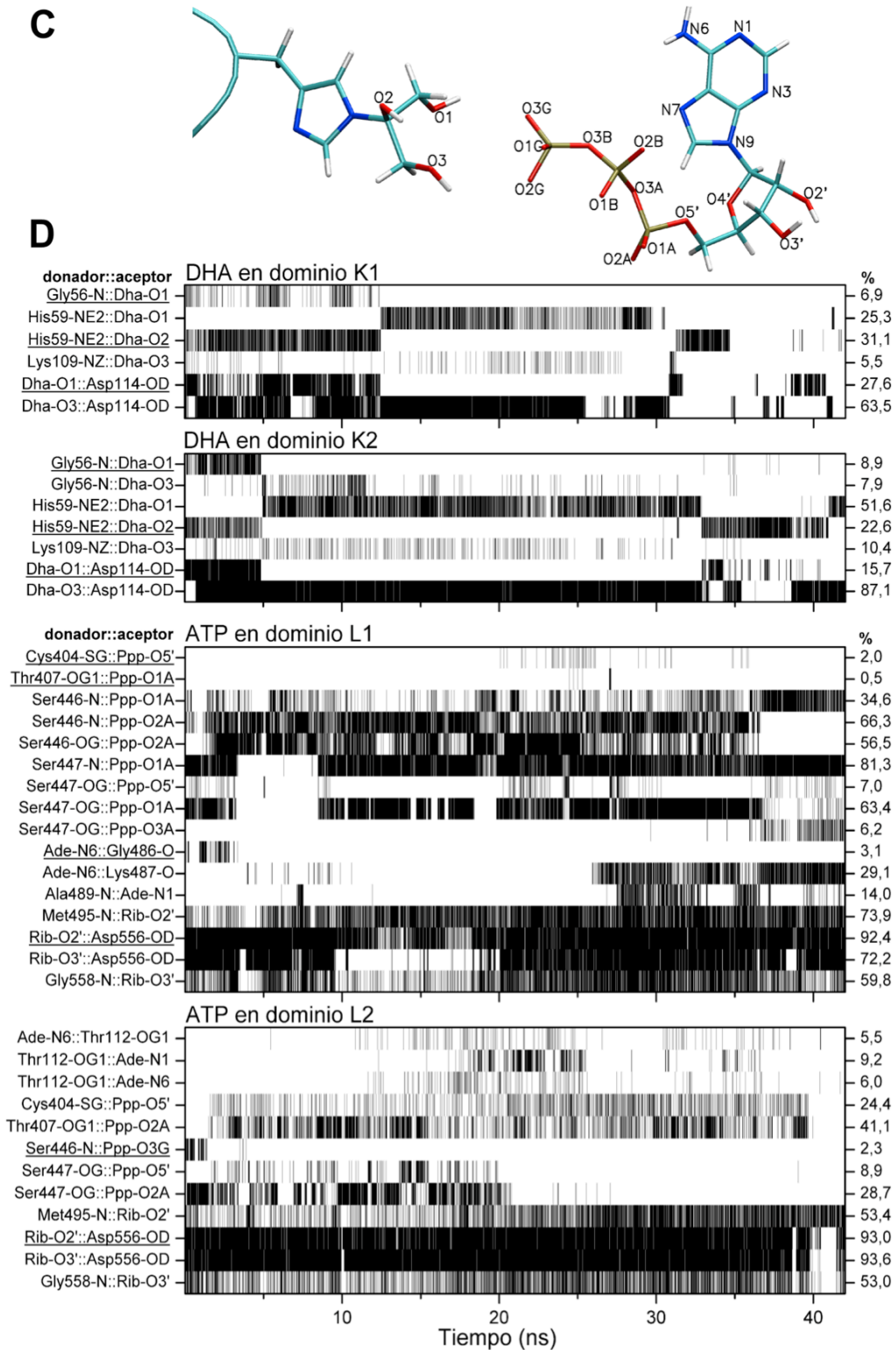
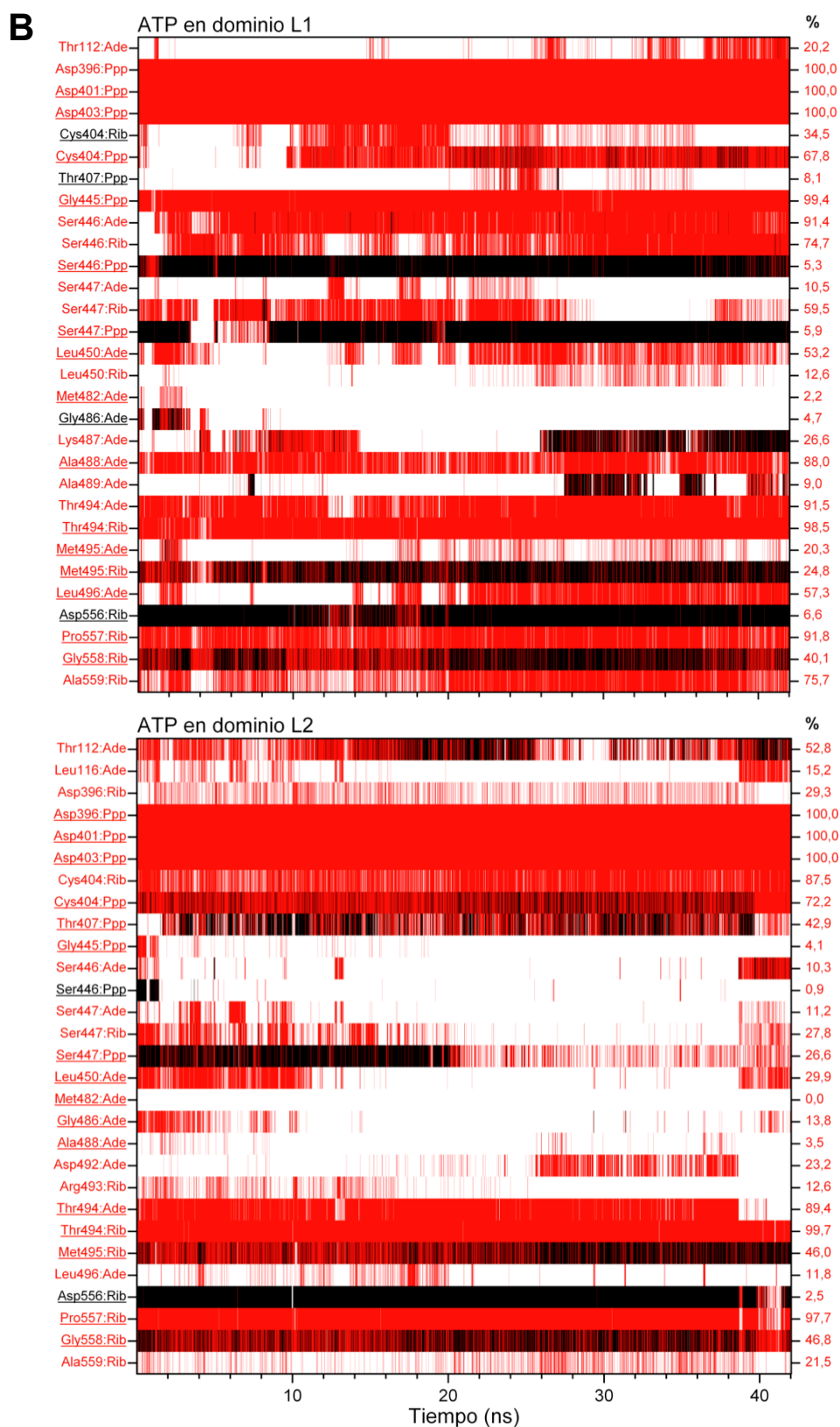


Figura 40: Puentes de hidrógeno entre hTKFC y los sustratos DHA y ATP detectados durante la simulación de dinámica molecular del sistema hTKFC:2DHA:2ATP. A,B: Puentes de hidrógeno (donador-H::aceptor; d-H::a). La ocupación es el porcentaje de 4200 fotogramas en que dicho enlace estaba presente. En los grupos con dos átomos d o a equivalentes en la cadena lateral, la ocupación indicada es la suma de los dos puentes posibles (p.ej., en esta figura, Asp⁵⁵⁶ tiene dos átomos equivalentes, OD1 y OD2, que pueden actuar como a, y que se identifican conjuntamente como "átomo" OD). El criterio para definir un puente de hidrógeno d-H::a fue una distancia d-a $\leq 3,5$ Å y un ángulo d-H-a $\geq 140^\circ$. **C:** Identificación de los átomos de DHA y ATP que pueden formar puentes de hidrógeno (nomenclatura usada en los paneles A y B). **D:** Evolución temporal de los puentes de hidrógeno destacados en negrita en A y B, con ocupaciones $\geq 5\%$ y/o presentes en el modelo obtenido con *Modeller* (subrayados a la izquierda; Figuras 34.B y 35).

| A | Contactos | Puentes | Diferencia | | Contactos | Puentes | Diferencia | |
|---|---------------|--------------|---------------|--|---------------|--------------|---------------|--|
| | totales | de H | | | totales | de H | | |
| | Ocupación (%) | | | | Ocupación (%) | | | |
| <i>Grupo: Adenina (Ade) en el sitio L1-syn</i> | | | | <i>Grupo: Adenina (Ade) en el sitio L2-anti</i> | | | | |
| Thr112 | 20,25 | 0,07 | 20,18 | Thr112 | 76,87 | 24,08 | 52,79 | |
| Leu116 | 0,40 | 0,00 | 0,40 | Gly113 | 7,62 | 0,17 | 7,45 | |
| Ser446 | 92,10 | 0,74 | 91,36 | Arg115 | 1,67 | 0,52 | 1,15 | |
| Ser447 | 10,52 | 0,00 | 10,52 | Leu116 | 15,16 | 0,00 | 15,16 | |
| Leu450 | 53,24 | 0,00 | 53,24 | Arg151 | 2,33 | 0,14 | 2,19 | |
| Met482 | 2,17 | 0,00 | 2,17 | Ser446 | 11,80 | 1,55 | 10,25 | |
| Gly486 | 7,88 | 3,14 | 4,74 | Ser447 | 11,16 | 0,00 | 11,16 | |
| Lys487 | 56,21 | 29,63 | 26,58 | Leu450 | 29,87 | 0,00 | 29,87 | |
| Ala488 | 88,08 | 0,07 | 88,01 | Met482 | 0,02 | 0,00 | 0,02 | |
| Ala489 | 23,25 | 14,21 | 9,04 | Gly486 | 13,87 | 0,12 | 13,75 | |
| Asp492 | 0,40 | 0,00 | 0,40 | Lys487 | 0,19 | 0,00 | 0,19 | |
| Arg493 | 0,07 | 0,00 | 0,07 | Ala488 | 3,50 | 0,00 | 3,50 | |
| Thr494 | 91,48 | 0,00 | 91,48 | Asp492 | 23,20 | 0,00 | 23,20 | |
| Met495 | 20,75 | 0,48 | 20,27 | Arg493 | 0,24 | 0,00 | 0,24 | |
| Leu496 | 57,40 | 0,07 | 57,33 | Thr494 | 89,36 | 0,00 | 89,36 | |
| Asp497 | 0,05 | 0,00 | 0,05 | Met495 | 0,93 | 0,00 | 0,93 | |
| Asp556 | 0,05 | 0,00 | 0,05 | Leu496 | 11,76 | 0,00 | 11,76 | |
| <i>Grupo: Ribosa (Rib) en el sitio L1-syn</i> | | | | <i>Grupo: Ribosa (Rib) en el sitio L2-anti</i> | | | | |
| Asp396 | 0,12 | 0,00 | 0,12 | Asp396 | 29,25 | 0,00 | 29,25 | |
| Cys404 | 34,55 | 0,05 | 34,50 | Ala399 | 0,02 | 0,00 | 0,02 | |
| Ser446 | 74,87 | 0,14 | 74,73 | Cys404 | 87,51 | 0,05 | 87,46 | |
| Ser447 | 60,16 | 0,62 | 59,54 | His408 | 0,45 | 0,00 | 0,45 | |
| Leu450 | 12,61 | 0,00 | 12,61 | Ser447 | 28,03 | 0,24 | 27,79 | |
| Arg493 | 1,59 | 0,00 | 1,59 | Leu450 | 1,14 | 0,00 | 1,14 | |
| Thr494 | 98,50 | 0,00 | 98,50 | Tyr451 | 0,33 | 0,02 | 0,31 | |
| Met495 | 98,74 | 73,92 | 24,82 | Arg493 | 12,64 | 0,00 | 12,64 | |
| Asp556 | 99,67 | 93,03 | 6,64 | Thr494 | 99,69 | 0,00 | 99,69 | |
| Pro557 | 91,77 | 0,00 | 91,77 | Met495 | 99,33 | 53,36 | 45,97 | |
| Gly558 | 99,93 | 59,83 | 40,10 | Leu496 | 0,02 | 0,00 | 0,02 | |
| Ala559 | 75,73 | 0,00 | 75,73 | Asp556 | 98,19 | 95,72 | 2,47 | |
| <i>Grupo: Trifosfato (Ppp) en el sitio L1-syn</i> | | | | <i>Grupo: Trifosfato (Ppp) en el sitio L2-anti</i> | | | | |
| Asp396 | 99,98 | 0,00 | 99,98 | Phe81 | 0,12 | 0,00 | 0,12 | |
| Ala399 | 0,07 | 0,00 | 0,07 | Thr82 | 0,19 | 0,00 | 0,19 | |
| Gly400 | 0,02 | 0,00 | 0,02 | Lys204 | 0,50 | 0,50 | 0,00 | |
| Asp401 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | Asp396 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | |
| Asp403 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | Asp401 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | |
| Cys404 | 75,87 | 8,12 | 67,75 | Asp403 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | |
| Thr407 | 8,59 | 0,48 | 8,11 | Cys404 | 99,98 | 27,82 | 72,16 | |
| His408 | 0,02 | 0,00 | 0,02 | Thr407 | 84,01 | 41,10 | 42,91 | |
| Gly444 | 8,71 | 0,00 | 8,71 | His408 | 0,19 | 0,02 | 0,17 | |
| Gly445 | 99,41 | 0,00 | 99,41 | Gly445 | 4,07 | 0,00 | 4,07 | |
| Ser446 | 100,00 | 94,74 | 5,26 | Ser446 | 3,83 | 2,95 | 0,88 | |
| Ser447 | 92,17 | 86,27 | 5,90 | Ser447 | 68,30 | 41,67 | 26,63 | |
| Gly448 | 1,36 | 0,00 | 1,36 | | | | | |
| Met495 | 0,02 | 0,00 | 0,02 | | | | | |
| Pro557 | 3,97 | 0,00 | 3,97 | | | | | |

Figura 41: Contactos entre hTKFC y ATP detectados durante la simulación de dinámica con el sistema hTKFC:2DHA:2ATP. El criterio empleado para identificar posibilidades de contacto atómico fue simplemente que el programa *VMD* midiera una distancia $\leq 4,2$ Å entre átomos del aminoácido y de la parte del sustrato indicados (excluyendo los átomos de hidrógeno). **A:** Contactos detectados. La ocupación es el promedio



de 4200 fotogramas recogidos en la simulación en que los contactos estaban presentes. En negrita se destacan los contactos que aparecen en B. **B**: Evolución temporal durante la simulación de los contactos presentes en el modelo obtenido con *Modeller* (subrayados a la izquierda; Figura 35) y/o los que se detectaron en $\geq 30\%$ de los fotogramas sin que se detectara ningún puente de hidrógeno que pudiera corresponder al contacto en el mismo fotograma. El color rojo corresponde siempre a este tipo de contactos no explicables por puentes de hidrógeno; el color negro señala a los contactos detectados que pueden corresponder a puentes de hidrógeno.

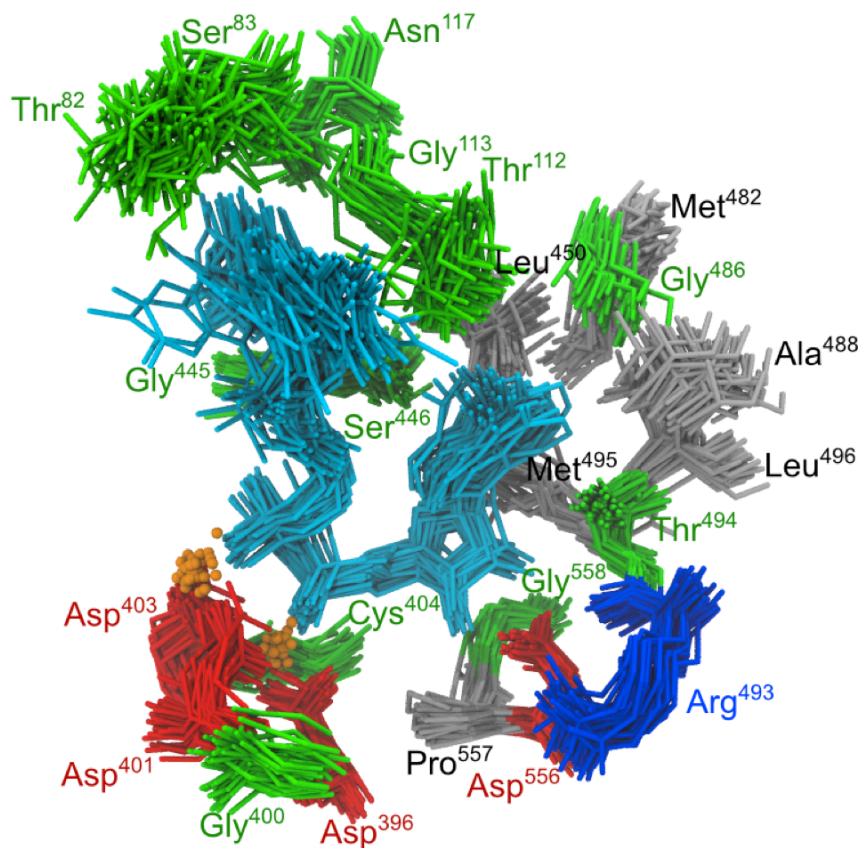


Figura 42: Dinámica de FAD en el sistema hTKFC:FAD. La trayectoria de 42 ns se presenta en forma animada en el Vídeo 8 (Suplemento CD-ROM). Aquí se presenta una superposición de conformaciones extraídas de la trayectoria a intervalos de 1 ns, alineadas con la conformación inicial. El FAD se representa como varillas de color azul claro, con el grupo dimetilisoaloxazina a la izquierda y el grupo adenina a la derecha. Los aminoácidos próximos se presentan en color según su naturaleza general: gris, no polares; verde, polares; azul oscuro, básicos; rojo, ácidos.

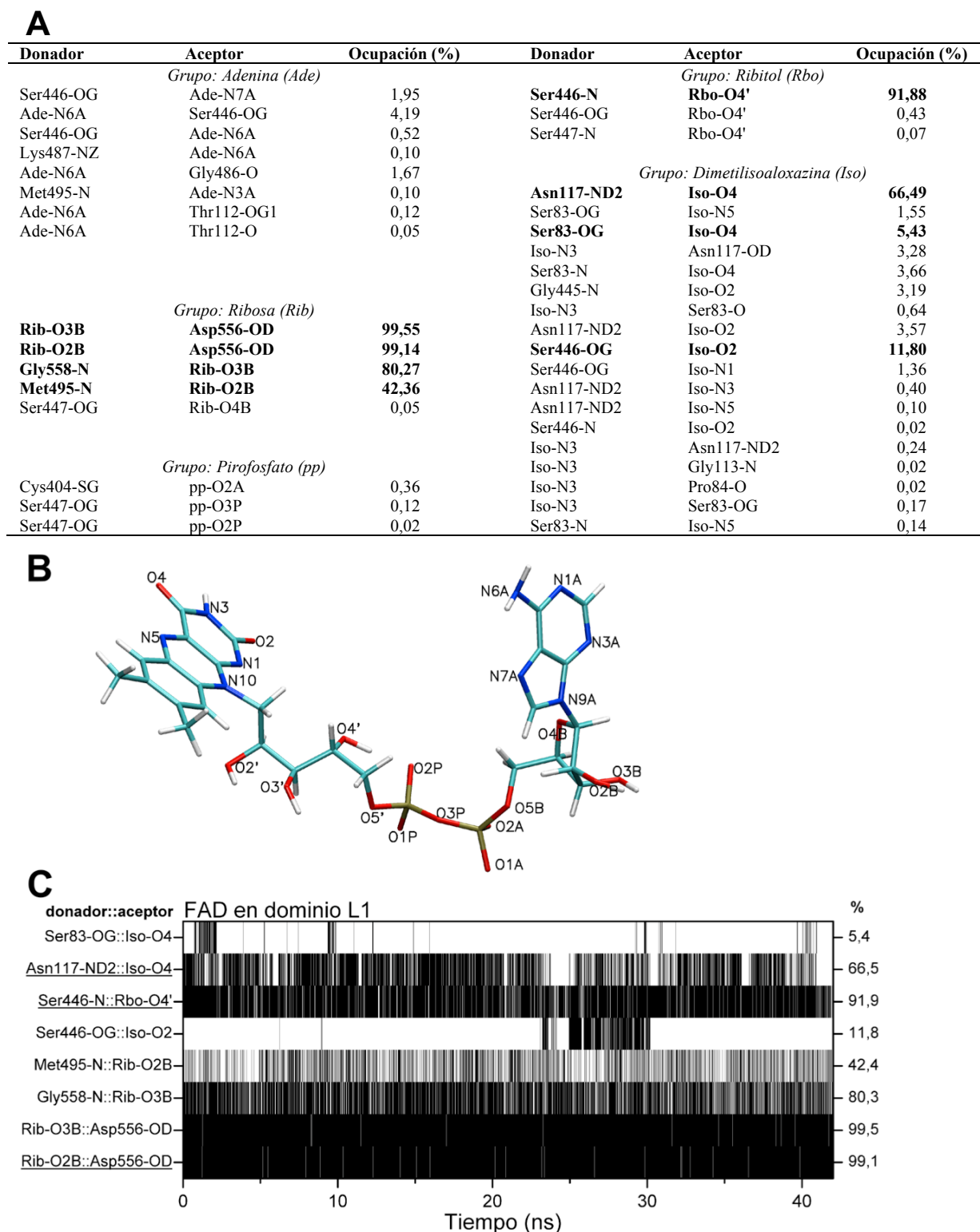


Figura 43: Puentes de hidrógeno entre hTKFC y el sustrato FAD detectados durante la simulación de dinámica molecular del sistema hTKFC:FAD. A: Puentes de hidrógeno (donador-H::aceptor; d-H::a). La ocupación es el porcentaje de 4200 fotogramas en que dicho enlace estaba presente. En los grupos con dos átomos d o a equivalentes en la cadena lateral, la ocupación indicada es la suma de los dos puentes posibles (p.ej., en esta figura, Asp⁵⁵⁶ tiene dos átomos equivalentes, OD1 y OD2, que pueden actuar como a, y que se identifican conjuntamente como "átomo" OD). El criterio para definir un puente de hidrógeno d-H::a fue una distancia d-a $\leq 3,5$ Å y un ángulo d-H-a $\geq 140^\circ$. **B:** Identificación de los átomos de FAD que pueden formar puentes de hidrógeno. **C:** Evolución temporal de los puentes de hidrógeno destacados en negrita en A, con ocupaciones $\geq 5\%$ y/o presentes en el modelo de *docking* (subrayados a la izquierda).

A

| | Contactos totales | Puentes de H | Diferencia |
|-----------------------------|----------------------|-----------------|--------------|
| | Ocupación (%) | | |
| <i>Grupo: Adenina (Ade)</i> | | | |
| Thr112 | 71,49 | 0,17 | 71,32 |
| Leu116 | 4,07 | 0,00 | 4,07 |
| Ser446 | 93,81 | 6,66 | 87,15 |
| Ser447 | 2,83 | 0,00 | 2,83 |
| Leu450 | 82,32 | 0,00 | 82,32 |
| Met482 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Gly486 | 65,80 | 1,67 | 64,13 |
| Lys487 | 3,97 | 0,10 | 3,87 |
| Ala488 | 28,30 | 0,00 | 28,30 |
| Asp492 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Thr494 | 92,55 | 0,00 | 92,55 |
| Met495 | 44,65 | 0,10 | 44,55 |
| Leu496 | 23,42 | 0,00 | 23,42 |
| <i>Grupo: Ribosa (Rib)</i> | | | |
| Asp396 | 1,88 | 0,00 | 1,88 |
| Cys404 | 57,40 | 0,00 | 57,40 |
| His408 | 13,21 | 0,00 | 13,21 |
| Ser446 | 4,40 | 0,00 | 4,40 |
| Ser447 | 89,81 | 0,05 | 89,76 |
| Leu450 | 0,71 | 0,00 | 0,71 |
| Arg493 | 0,88 | 0,00 | 0,88 |
| Thr494 | 99,88 | 0,00 | 99,88 |
| Met495 | 99,98 | 42,36 | 57,62 |
| Asp556 | 100,00 | 100,00 | 0,00 |
| Pro557 | 99,93 | 0,00 | 99,93 |
| Gly558 | 99,98 | 80,25 | 19,73 |
| Ala559 | 62,38 | 0,00 | 62,38 |

| | Contactos totales | Puentes de H | Diferencia |
|---|----------------------|-----------------|---------------|
| | Ocupación (%) | | |
| <i>Grupo: Pirofosfato (pp)</i> | | | |
| Asp396 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| Gly400 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Asp401 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| Asp403 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |
| Cys404 | 99,98 | 0,36 | 99,62 |
| His408 | 0,48 | 0,00 | 0,48 |
| Gly444 | 8,61 | 0,00 | 8,61 |
| Gly445 | 67,44 | 0,00 | 67,44 |
| Ser446 | 2,09 | 0,00 | 2,09 |
| Ser447 | 4,16 | 0,12 | 4,04 |
| <i>Grupo: Ribitol (Rbo)</i> | | | |
| Thr112 | 17,82 | 0,00 | 17,82 |
| Gly113 | 0,21 | 0,00 | 0,21 |
| Gly444 | 0,43 | 0,00 | 0,43 |
| Gly445 | 99,26 | 0,00 | 99,26 |
| Ser446 | 100,00 | 92,12 | 7,88 |
| Ser447 | 0,88 | 0,07 | 0,81 |
| <i>Grupo: Dimetilisoaloxazina (Iso)</i> | | | |
| Phe81 | 3,52 | 0,00 | 3,52 |
| Thr82 | 8,33 | 0,00 | 8,33 |
| Ser83 | 54,78 | 10,83 | 43,95 |
| Pro84 | 8,47 | 0,02 | 8,45 |
| Ala85 | 6,40 | 0,00 | 6,40 |
| Val86 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| Tyr111 | 0,93 | 0,00 | 0,93 |
| Thr112 | 83,37 | 0,00 | 83,37 |
| Gly113 | 94,41 | 0,02 | 94,39 |
| Asp114 | 0,98 | 0,00 | 0,98 |
| Leu116 | 14,56 | 0,00 | 14,56 |
| Asn117 | 94,86 | 71,35 | 23,51 |
| His221 | 0,19 | 0,00 | 0,19 |
| Gly444 | 7,21 | 0,00 | 7,21 |
| Gly445 | 93,72 | 3,19 | 90,53 |
| Ser446 | 63,83 | 12,35 | 51,48 |
| Ala449 | 6,33 | 0,00 | 6,33 |
| Lys487 | 0,14 | 0,00 | 0,14 |

B

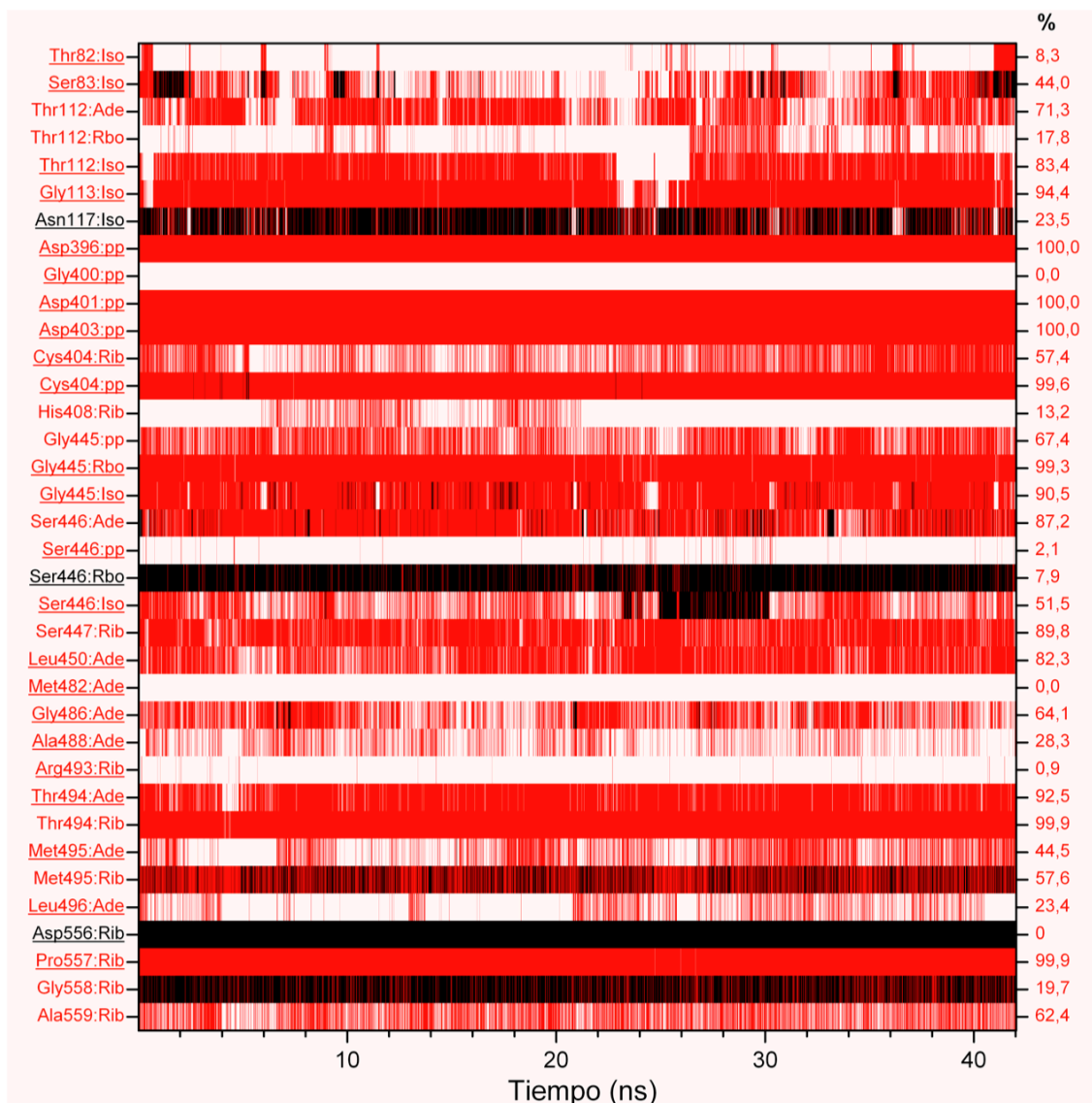


Figura 44: Contactos detectados entre hTKFC y FAD durante la simulación de dinámica con el sistema hTKFC:FAD. El criterio empleado para identificar posibilidades de contacto atómico fue simplemente que el programa *VMD* midiera una distancia $\leq 4,2$ Å entre átomos del aminoácido y de la parte del sustrato indicados (excluyendo los átomos de hidrógeno). **A:** Contactos detectados. La ocupación es el porcentaje de 4200 fotogramas recogidos en la simulación en que los contactos estaban presentes. En negrita se destacan los contactos que aparecen en B. **B:** Evolución temporal durante la simulación de los contactos presentes en el modelo obtenido por *docking* (subrayados a la izquierda; Figura 36) y/o los que se detectaron en $\geq 30\%$ de los fotogramas sin que se detectara ningún puente de hidrógeno que pudiera corresponder al contacto en el mismo fotograma. El color rojo corresponde siempre a este tipo de contactos no explicables por puentes de hidrógeno; el color negro señala a los contactos detectados que pueden corresponder a puentes de hidrógeno.

2.2.4 Aproximación de los sustratos ATP y DHA durante la dinámica molecular de hTKFC: un movimiento necesario para explicar la transferencia de fosfato

En la reacción catalizada por la actividad DHA quinasa, tiene lugar la transferencia del grupo fosfato γ del ATP hacia uno de los grupos hidroxilo de la DHA. En los modelos de los sitios activos obtenidos por homología con CbDK, al igual que en esta misma proteína bacteriana, la distancia entre los dos sustratos es de cerca de 14 Å, demasiado grande para permitir la transferencia de fosfato. En el curso de la simulación de dinámica molecular del sistema hTKFC:2DHA:2ATP, estas distancias variaron mucho, y lo hicieron de forma diferente en los dos centros activos L1K2 y L2K1, como se puede observar en la Figura 45.A. En el sitio L1K2 se produjo un rápido incremento inicial de la distancia entre ATP y DHA, seguido de una disminución gradual hasta valores similares a los de partida. En el sitio L2K1, la distancia se mantuvo en valores similares al inicial, pero alrededor de los 35 ns disminuyó hasta cerca de 5 Å, con un mínimo de 4,83 Å. En el Vídeo 6 se muestra la dinámica molecular de este sitio durante toda la simulación y en el Vídeo 7 se presenta el periodo 32-36 ns. La Figura 46 muestra la estructura completa de hTKFC:2DHA:2ATP en el momento de máxima cercanía ATP–DHA. La comparación entre los dominios L2 y L1 indica que la aproximación se debe al basculamiento de L2 hacia K1, lo que coincide en parte con lo que Erni *et al.* han supuesto que podría ocurrir con la proteína CbDK [148]. En una vista ampliada del centro L2K1 (Figura 46) se observa la posición casi correcta para el ataque del O1 del DHA sobre el P γ del ATP, que daría lugar a la transferencia de fosfato, y es posible que la distancia entre los dos átomos pueda acortarse con resultados óptimos. En el mismo fotograma, y en los inmediatamente anteriores y posteriores, se observó el establecimiento de puentes de hidrógeno entre los dominios L2 y K1: uno entre el átomo N6 de la adenina (ATP unido al dominio L2) y el OH de la cadena lateral de Thr¹¹² (dominio K1) y otro entre el grupo amino de la cadena lateral de Lys²⁰⁴ (dominio K1) y un grupo CO del esqueleto peptídico de Arg³⁹⁷ y Ala³⁹⁸ (dominio L2). Estas interacciones pueden favorecer conformaciones del complejo hTKFC:2DHA:2ATP compatibles con la transferencia de fosfato al sustrato DHA. La posible importancia del residuo Thr¹¹² en la actividad quinasa de hTKFC se puso de manifiesto en los efectos de la mutación T112A (sección 2.3.2), mientras que la del residuo Lys²⁰⁴ todavía no se ha puesto a prueba por mutagénesis.

Un movimiento de aproximación tan marcado como el que se produjo entre ATP y DHA en el centro L2K1, durante la trayectoria dinámica del sistema hTKFC:2DHA:2ATP, no se observó con los sistemas hTKFC y hTKFC:FAD. En estos dos últimos sistemas no se podía medir la distancia entre las mismas referencias que en el anterior, por lo que se hicieron medidas tomando como referencias el ion Mg-2 y el N ϵ 2 de la His²²¹, que son buenos marcadores de los puntos de anclaje de ATP y DHA (Figura 45.B). Entre estas referencias, en el sistema hTKFC:2DHA:2ATP se constató una distancia mínima de 9,98 Å en el sitio L2K1, mientras que las distancias más cortas registradas en los otros dos sistemas fueron de 14,07 Å, en el sitio L1K2 de hTKFC, y de 17,48 Å en el sitio L1K2 de hTKFC:FAD. Es de notar que éste es el único sitio ocupado por FAD en el sistema kTKFC:FAD. En resumen, puede hacerse la hipótesis de que el basculamiento del dominio L hacia el dominio K, que conlleva la aproximación de los sitios de unión de ATP y DHA, es específicamente favorecido por la presencia de estos ligandos en un centro activo, circunstancias en las que dicha aproximación sería necesaria para que se manifieste la actividad quinasa. La aproximación se observó sólo en uno de los dos centros ocupados por ATP y DHA en el sistema hTKFC:2DHA:2ATP, y es posible que no pueda darse simultáneamente en ambos centros, o que ello sea poco probable.

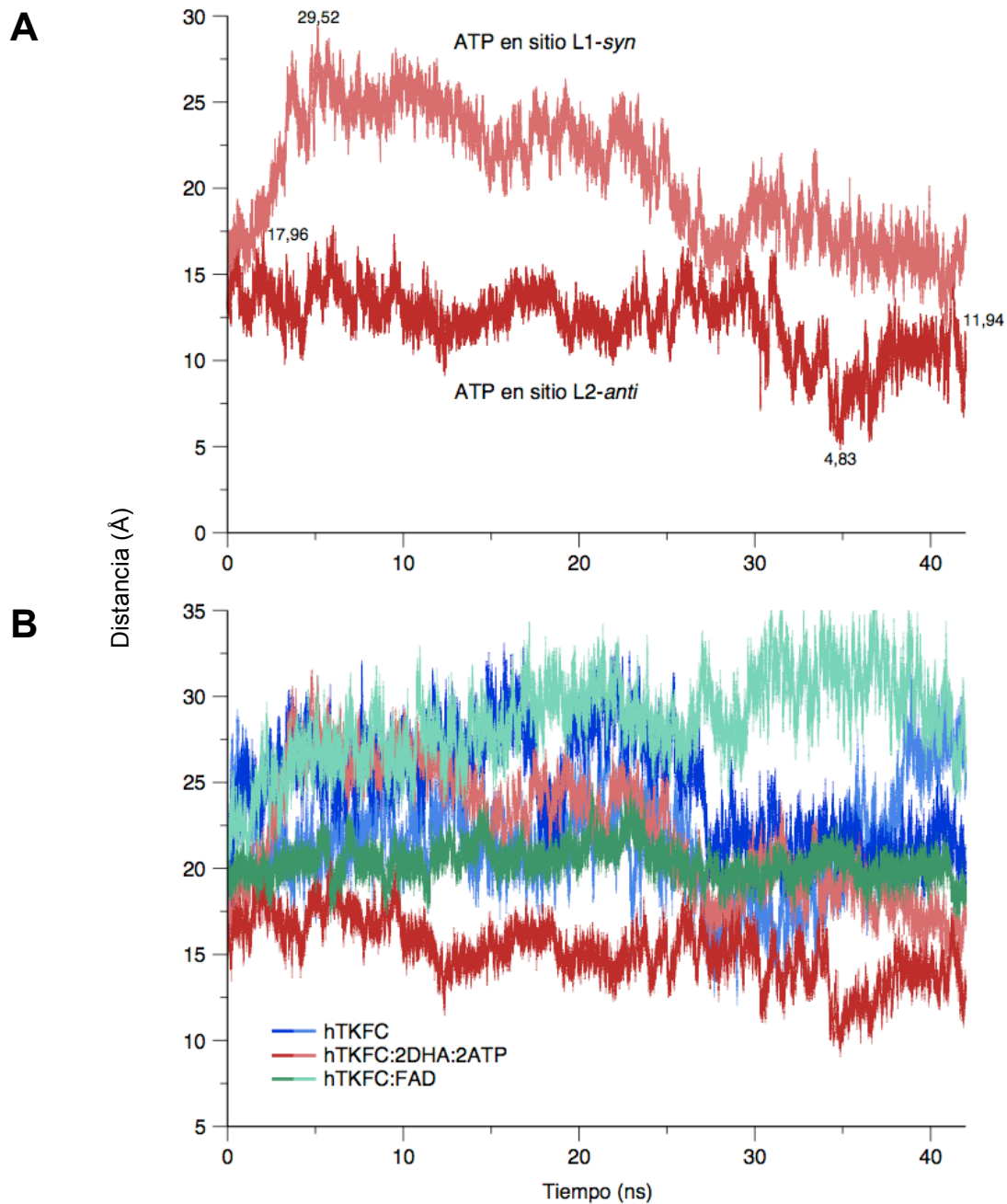


Figura 45: Evolución de la distancia entre DHA y ATP, o sus respectivos sitios de unión, durante las simulaciones de dinámica molecular. A: Distancias medidas en el sistema hTKFC:2DHA:2ATP entre el fósforo γ del ATP (en L1 o L2) y el oxígeno hidroxilo O1 de la DHA covalentemente ligada a la His²²¹ en el dominio K correspondiente al mismo sitio activo (K2 o K1, respectivamente). Las distancias en el modelo de partida, obtenido con *Modeller* (Figura 33.B), eran 14,21 y 14,30 Å para los sitios L1K2 (color más claro) y L2K1 (color más oscuro), respectivamente. En la gráfica se indican con números las distancias mínimas y máximas observadas a lo largo del tiempo simulado. La conformación que presentaba la mínima distancia entre ATP y DHA (4,83 Å) puede verse en la Figura 46. **B:** Distancias medidas en los tres sistemas indicados entre el Mg-2 (al que el fósforo γ del ATP se une cuando está presente) en el dominio L1 o L2, y el N ϵ 2 de His²²¹ (al que se une la DHA cuando está presente) en el dominio K2 o K1, respectivamente. Los colores más claros corresponden a las distancias medidas en los centros L1K2 y los más oscuros a las medidas en L2K1.

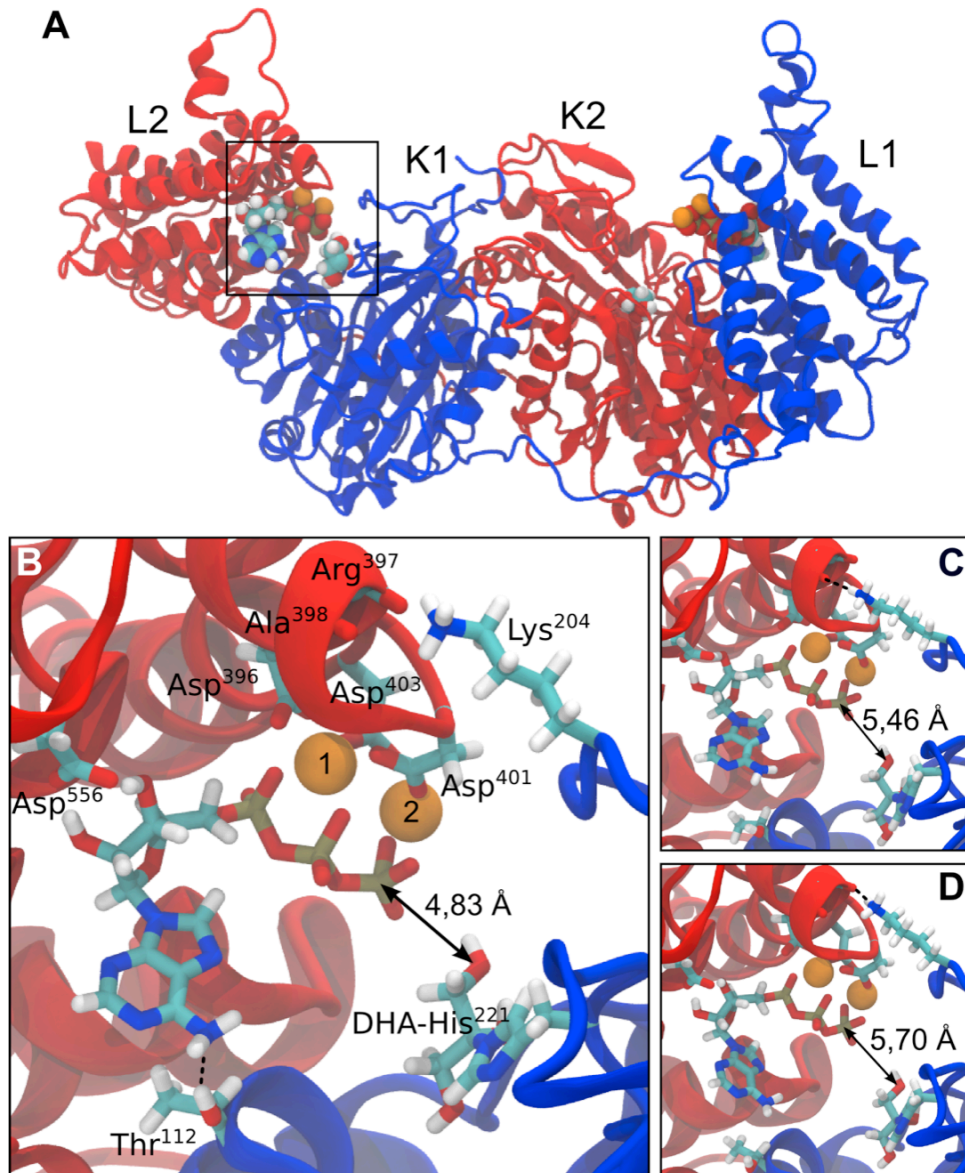


Figura 46: Conformación que corresponde a la mínima distancia medida entre ATP y DHA en la simulación dinámica del sistema de hTKFC:2DHA:2ATP. El aspecto más novedoso de esta conformación es el cerramiento del centro activo L2K1 (compárese esta imagen con la Figura 33.B) que conlleva el acercamiento del oxígeno de DHA al fósforo γ del ATP a una distancia de 4,83 Å, lo que sugiere la posibilidad del ataque nucleofílico necesario para que tenga lugar la transferencia de fosfato. A la estabilidad de esta conformación cerrada puede contribuir la formación de puentes de hidrógeno de los aminoácidos Thr¹¹² y Lys²⁰⁴, que aparecen durante la simulación de dinámica molecular. El puente con Thr¹¹² puede explicar los efectos diferentes de la mutación T112A sobre las actividades quinasa y liasa ciclante (ver texto de la sección 2.3.2). Todavía no se ha construido un mutante puntual del aminoácido Lys²⁰⁴ para poner a prueba la relevancia de un puente de hidrógeno de este residuo. (A) Vista completa de la conformación que mostró la mayor aproximación entre ATP y DHA (aproximadamente a los 34,86 ns de la trayectoria presentada en los Vídeos 6 y 7). (B) Ampliación del recuadro señalado en A. Se representan los dos iones Mg²⁺ (1 y 2) coordinados por tres residuos de aspartato (Asp³⁹⁶, Asp⁴⁰¹ y Asp⁴⁰³) y por el grupo trifosfato del ATP. Este sustrato está también unido a la proteína por puentes de hidrógeno de los grupo 2'-OH y 3'-OH de la ribosa con Asp⁵⁵⁶ y del N6 de la adenina con la cadena lateral de Thr¹¹². DHA está unida covalentemente a la cadena lateral de His²²¹, formando *N*^ε-(1,2,3-trihidroxiprop-2-il)-L-histidina (DHA-His²²¹). Se representan también la cadena lateral de Lys²⁰⁴ y los grupos CO del esqueleto peptídico de Ala³⁹⁸ o de Arg³⁹⁷. (C, D) Fotogramas correspondientes a 2 ps antes (C) y después (D) de la máxima aproximación ATP-DHA, en los cuales se observa un puente de hidrógeno de la cadena lateral de Lys²⁰⁴ con la cadena principal de Ala³⁹⁸ o Arg³⁹⁷, respectivamente.

Aunque resulta atractiva la hipótesis de un efecto específico del ATP sobre la conformación de la proteína, favorable al acercamiento al DHA, hay que tener en cuenta que las simulaciones dinámicas fueron limitadas en el tiempo, abarcando sólo 42 ns. Esto debe compararse con un valor de k_{cat} de 5 s^{-1} para la actividad DHA quinasa de la hTKFC de tipo salvaje, que implica una transformación molecular cada 200 ms. Por ello, la visión de que la aproximación entre los sitios de unión de ATP y DHA es mayor en un sistema que en los otros (Figura 45.B) podría cambiar si se explorasen trayectorias dinámicas de mayor duración. La simulación del orden de milisegundos está actualmente fuera del alcance computacional. En cualquier caso, tenemos planes para hacer futuras simulaciones en un supercomputador acercándonos lo más posible a 1 microsegundo. Mientras tanto puede destacarse que el comportamiento diferente de los tres sistemas, en el sentido indicado por las observaciones anteriores, fue corroborado por el análisis de dinámica esencial (siguiente epígrafe).

2.2.5 Análisis de las trayectorias de dinámica molecular según los principios de la dinámica esencial: diferencias entre los tres sistemas estudiados

Para identificar los principales movimientos colectivos producidos en las trayectorias dinámicas de la proteína hTKFC y sus complejos, se aplicaron los principios de la dinámica esencial (sección 3.10.3). En estos análisis se obtienen vectores propios, que corresponden a las direcciones de movimientos colectivos de átomos, y valores propios, que corresponden a las magnitudes de dichos movimientos. Para simplificar los cálculos, los análisis se hicieron solamente con los 4600 átomos de las cadenas principales, usando los 40000 fotogramas correspondientes a los últimos 40 ns de cada simulación. Para cada sistema (hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD) se obtuvo una matriz de covarianza de dimensiones 13800×13800 , de la cual se obtuvieron, por diagonalización, 13800 vectores propios y sus respectivos valores propios, en orden decreciente. La Figura 47 muestra los valores propios de los 25 primeros vectores propios de cada sistema. En todos los casos, los primeros 5-8 valores propios permitían explicar alrededor del 80% de la varianza total observada, mientras que el primer vector propio por sí solo permitía explicar el 45-60% de dicha varianza. Esta gama de valores es similar a la encontrada con otras proteínas [159,160,161,162]. Por supuesto, el hecho de que a los primeros vectores propios de los tres sistemas estaban asociadas varianzas muy similares, no significa que fuesen iguales en términos de dirección. Entre ellos se observaron diferencias suficientes para concluir que la dinámica esencial de la proteína era afectada de manera diferente por la unión de DHA y ATP o la de FAD. En la Figura 48 se comparan entre sí, de todas las formas posibles, las direcciones de los primeros 8 vectores de los 3 sistemas. Lo más destacable es que, siendo comparables los subespacios cubiertos por las tres simulaciones (valores de RMSIP 0,65-0,68), al comparar los vectores propios individualmente hubo pocas coincidencias importantes que se reflejaran tanto en la dirección como en la varianza. Por ejemplo, aunque en términos de dirección se observó un fuerte parecido entre el segundo componente principal de hTKFC:2DHA:2ATP y el primero de hTKFC:FAD (Figura 48), éste da cuenta de un 50% de la varianza total del sistema, comparado con sólo el 8% de aquel (Figura 47). Asimismo, los cuartos vectores propios de estos dos sistemas presentaron una clara similitud de dirección entre sí (Figura 48), pero cada uno de ellos representa sólo ~5% de la varianza total de su respectivo sistema (Figura 47). Por último, es de notar que, aunque el primer componente principal de ambos sistemas presentaba cambios de dirección de orden similar respecto al sistema sin sustrato (hTKFC), cuando se compararon directamente entre sí los primeros componentes principales de los sistemas

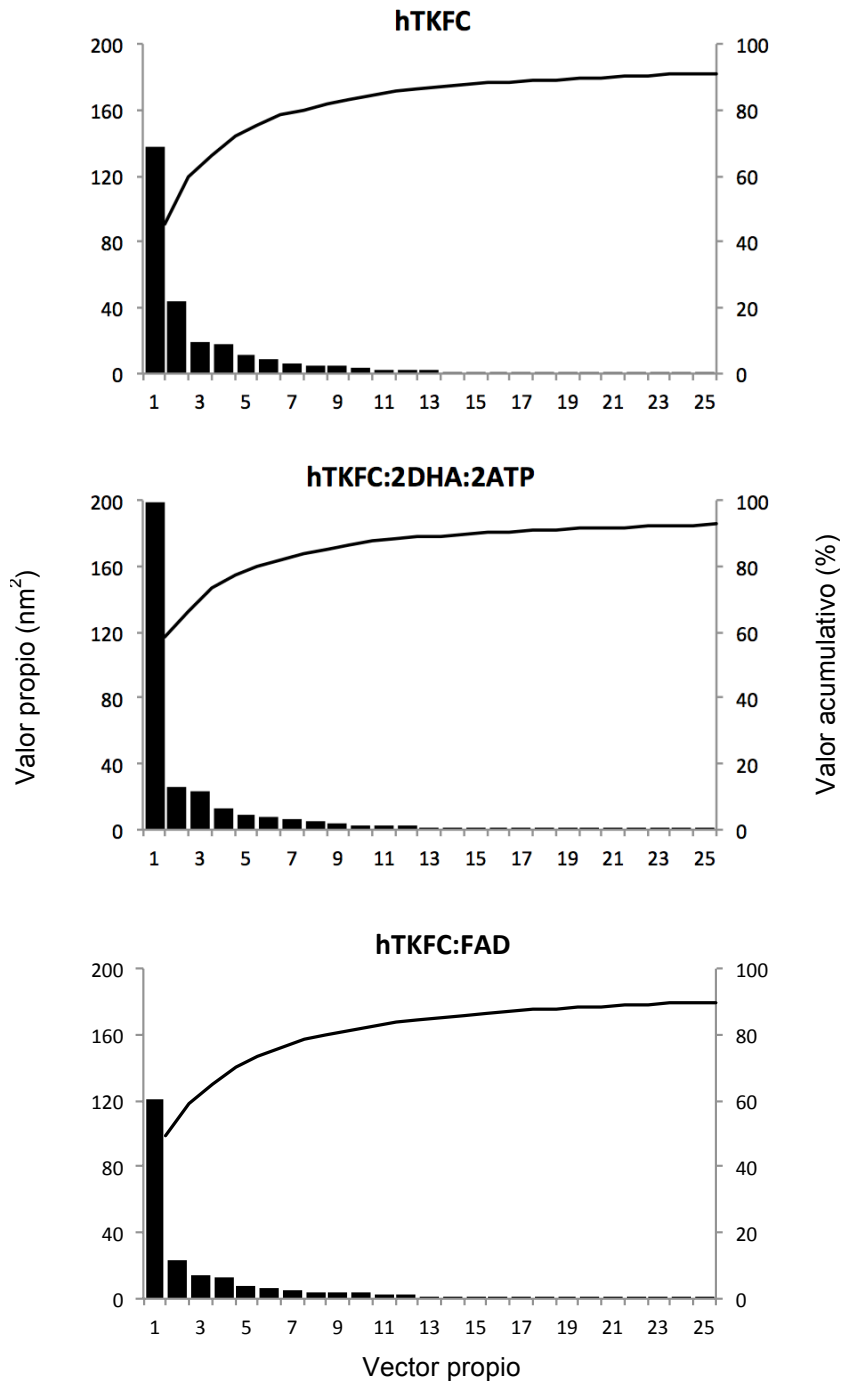
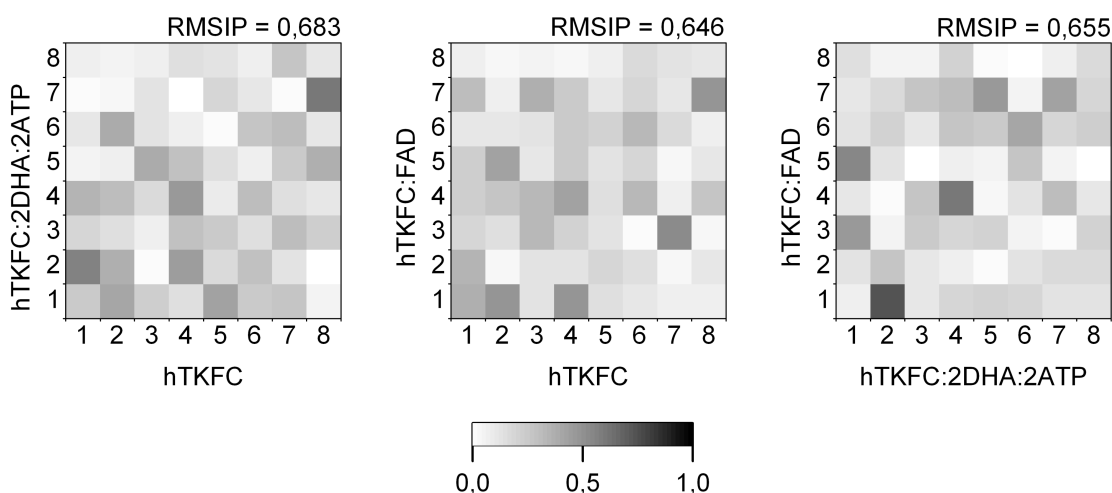


Figura 47: Análisis de la dinámica esencial de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD: primeros vectores propios o componentes principales en orden decreciente de valor propio. El análisis se realizó como se describe en la sección 3.10.3. El valor propio de cada vector es la varianza (media del cuadrado) de sus fluctuaciones, mide la magnitud del movimiento colectivo, y representa la motilidad total que se asocia con dicho componente. Las líneas corresponden al porcentaje acumulativo de los valores propios. En la Figura 48 se comparan los 8 primeros vectores de cada sistema. En la Figura 49 se representa gráficamente el primer vector propio o primer componente principal de cada sistema.



Producto interno de los vectores propios comparados

Figura 48: Comparación entre las direcciones de los primeros vectores propios o componentes principales encontrados en la dinámica esencial de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD. Se calcularon los productos internos de los 8 primeros vectores propios detectados en cada sistema (Figura 47). Un valor de 1,0 implica que los dos vectores son idénticos y un valor de 0,0 significa que son completamente ortogonales. Los valores de RMSIP (*root mean square inner product*) se calcularon para los 8 x 8 vectores comparados en cada caso. El valor de RMSIP mide el subespacio en el que las dos simulaciones comparadas se solapan. Un valor de 1,0 implicaría que las dos simulaciones cubren el mismo espacio durante sus trayectorias dinámicas, mientras que un valor de 0,0 significaría que los espacios cubiertos son completamente distintos.

hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD, resultaron ser casi ortogonales (Figuras 48 y 49), confirmando que los efectos inducidos por la unión de DHA:ATP y los inducidos por la unión de FAD eran diferentes.

Para simplificar en lo posible la presentación de estos movimientos, hemos optado por presentar visualmente sólo el primer vector propio de cada sistema, que, como ya se ha dicho, es el componente dominante, representando alrededor del 50% de la varianza (Figura 47). El movimiento debido a este primer componente de cada sistema se presenta de forma animada en el Vídeo 9 (Suplemento CD-ROM) y de forma estática en la Figura 49. En todos los casos, el primer componente principal puso de manifiesto cambios de conformación de los dominios L respecto a los dominios K, de tal forma que los dominios L bascularon en mayor o menor grado, bien en paralelo con el eje longitudinal del dímero, acercándose al (y alejándose del) dominio K proximal, bien en forma transversal a dicho eje. Estos movimientos de balanceo fueron acompañados en algunos casos por movimientos giratorios de los dominios L. Debe destacarse que los movimientos de los dos dominios L del mismo sistema no fueron iguales. Por ejemplo, en el sistema hTKFC, que tiene los dos centros de unión libres, el dominio L2 mostró un balanceo en la dirección del eje longitudinal de la proteína, mientras que el dominio L1 mostró un claro balanceo transversal. La presencia de ATP modificó ligeramente

la dirección del balanceo del dominio L2, como puede verse en la Figura 49, cambio que puede ser específicamente importante para explicar el acercamiento del ATP al DHA en la conformación mostrada en la Figura 46.

No debemos terminar la presentación de esta parte de nuestros resultados sin mencionar que los cambios dinámicos debidos a la presencia de ligandos deben considerarse con cierta precaución puesto que las trayectorias recogidas en las simulaciones fueron necesariamente bastante cortas. A este respecto, ya se mencionó en el apartado anterior (último párrafo) que las escalas temporales de las simulaciones y de los fenómenos asociados a la función de la enzima son muy diferentes. Un criterio para evaluar el muestreo hecho durante una simulación dinámica sería comprobar si se ha alcanzado la convergencia, entendida como la adquisición de puntos suficientes para muestrear el sistema dinámico de forma ergódica, de tal manera que el comportamiento del sistema promediado en el tiempo sea el mismo que el promedio de todos los estados del sistema en el espacio [163]. En la práctica, es imposible demostrar que un muestreo ha alcanzado la convergencia, pero el análisis de dinámica esencial proporciona indicadores para detectar que la convergencia no se ha alcanzado. A este respecto, Hess ha sugerido evaluar la similitud que tienen las proyecciones de una trayectoria en los primeros vectores propios (componentes principales) con la función coseno [164,165]: un “alto contenido de coseno” de los componentes principales significa que la simulación no ha convergido (aunque un bajo contenido de coseno no implica que lo haya hecho). Al aplicar este criterio a los 3 sistemas estudiados, se observó que el contenido de coseno del primer componente principal de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD era 0,89, 0,90 y 0,77, respectivamente. Este alto contenido de coseno indica que se trata de sistemas no totalmente equilibrados, como era de esperar para sistemas con los tamaños de los simulados y para los tiempos de simulación. No obstante, siendo conscientes de que el muestreo de los cambios conformacionales fue incompleto, podemos decir que los vectores propios de no-equilibrio dan información sobre los efectos iniciales inducidos por la unión de los sustratos, y como ya hemos discutido más arriba estos efectos son diferentes para los sistemas hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD, tomando como referencia hTKFC sin sustratos unidos.

Por último, teniendo en cuenta lo anterior, se decidió estudiar los cambios conformacionales de los tres sistemas por una técnica alternativa, el análisis de modos normales, que no adolece de las mismas limitaciones.

2.2.6 El análisis de los modos normales confirma la tendencia de los dominios K a aproximarse a los dominios L

Además de la dinámica esencial, considerada en el apartado anterior, el análisis de modos normales es uno de los principales métodos teóricos para estudiar movimientos colectivos en proteínas [166,167,168,169]. Los puntos de partida para estos análisis fueron los mismos sistemas que se usaron en las simulaciones de dinámica molecular (Tabla 3; hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP, hTKFC:FAD), pero sin añadir el solvente, es decir, en vacío, y además un cuarto sistema con dos moléculas de FAD (hTKFC:2FAD) (sección 3.11 y Tabla 3) también en ausencia de solvente. El análisis de modos normales se hizo con el paquete

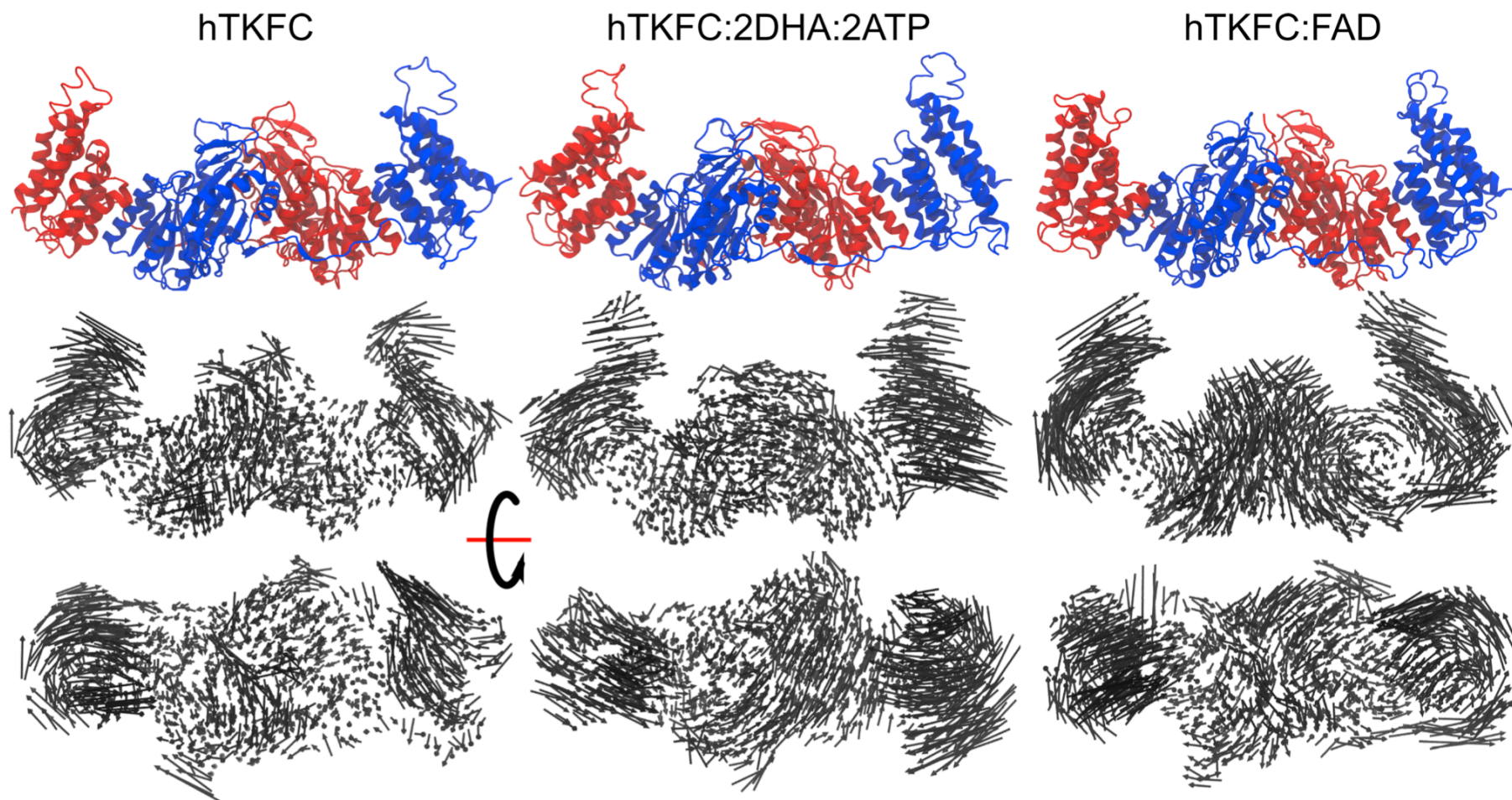


Figura 49: Representación estática del primer vector propio o componente principal encontrado por análisis de dinámica esencial en los sistemas estudiados. Arriba, conformación más abierta de los dos extremos entre los cuales varía el sistema según el primer componente principal (Figura 47). Centro, la misma conformación de arriba en forma de gráfica "puercospín", en la que se muestra en la posición de cada átomo una flecha que representa su movimiento individual. El movimiento colectivo representado por el conjunto de flechas corresponde al primer vector propio. Abajo, vista superior de la misma conformación. Los 3 sistemas se presentan con el dominio L2 a la izquierda. En el Vídeo 9 (Suplemento CD-ROM) se presentan de forma animada los resultados de esta figura.

GROMACS [170,171] como se describe en la sección 3.11. Debido a la intensa minimización requerida para el análisis de modos normales, las conformaciones minimizadas se alejaron de las iniciales: los valores de RMSD (ver nota de pie 4 en la página 19) calculados para los C- α entre el modelo inicial y el modelo minimizado fueron de 1,11, 1,50, 1,39 y 1,16 Å para hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP, hTKFC:FAD y hTKFC:2FAD, respectivamente. A partir de las estructuras minimizadas, se calcularon las respectivas matrices hessianas y a partir de estas, los vectores propios (modos normales) y los valores propios. En este tipo de análisis, los seis primeros modos normales se consideran triviales (comentado en la sección 3.11). Las estructuras minimizadas y los vectores propios no triviales de cada una de ellas permiten visualizar los movimientos vibratorios u oscilantes. Los tres primeros modos no triviales (NM7-NM9) se muestran en forma animada en los Vídeos 10-12 (Suplemento CD-ROM). En las Figuras 50 y 51 se resumen los mismos modos en forma estática.

La comparación de los modos normales puede hacerse visualmente o de forma cuantitativa. Una vez que los cuatro sistemas estudiados tienen diferente número de átomos, la comparación directa entre los vectores propios de cada sistema no es posible. Sin embargo, como se explica en la sección 3.11, puede definirse una medida basada en productos internos de vectores, que tendrán un valor de uno si los vectores son idénticos y de cero si son ortogonales. Los resultados de esta comparación entre los modos NM7, NM8 y NM9 de los cuatro sistemas se presentan en la Figura 52.

Los primeros modos normales no triviales (NM7) de los cuatro sistemas fueron muy semejantes entre sí. Los cuatro modos NM7 consistieron en el basculamiento de los dominios L hacia los dominios K en una dirección paralela al eje principal de la proteína (que pasa por los centros de masa de los dominios L1-K2-K1-L2) (Vídeo 10; Figuras 50 y 51). Este tipo de modo normal es parecido al definido como "flexión de bisagra" (*hinge-bending*) para las estructuras que contienen dos dominios globulares unidos por una bisagra flexible [172], aunque en hTKFC no hay una bisagra de unión directa entre los dominios L y K. El parecido entre los modos NM7 de los cuatro sistemas se confirmó porque los productos vectoriales internos fueron muy próximos a uno, comprendidos entre 0,926-0,978 (Figura 52). Este modo normal puede constituir o formar parte de un movimiento funcional, pues su prolongación en la dirección de los vectores propios produce un acercamiento entre los dominios L y K, como el que se necesita para aproximar ATP y DHA en el sistema hTKFC:2DHA:2ATP.

El segundo modo normal no trivial (NM8) de hTKFC y hTKFC:2DHA:2ATP (Vídeo 11) y el tercero (NM9) de hTKFC:FAD y hTKFC:2FAD (Vídeo 12) fueron semejantes entre sí. Este modo consistió principalmente en un giro parcial de los dominios L sobre su eje vertical, combinado con un pequeño basculamiento en dirección perpendicular al movimiento de NM7 (Vídeos 11 y 12; Figuras 50 y 51). Este tipo de modo normal es parecido en parte al definido como "giro" (*twisting*) para las estructuras que contienen dos dominios globulares unidos por una bisagra flexible [172]. La semejanza entre los segundos modos de los sistemas sin FAD y los terceros de los sistemas con FAD fue confirmada por sus productos internos en el intervalo 0,733-0,971 (Figura 52). En el sistema hTKFC:2DHA:2ATP, la prolongación de este modo (NM8 en este caso) conlleva un cierto acercamiento de los dominios L y K y también puede formar parte de un movimiento funcional como NM7.

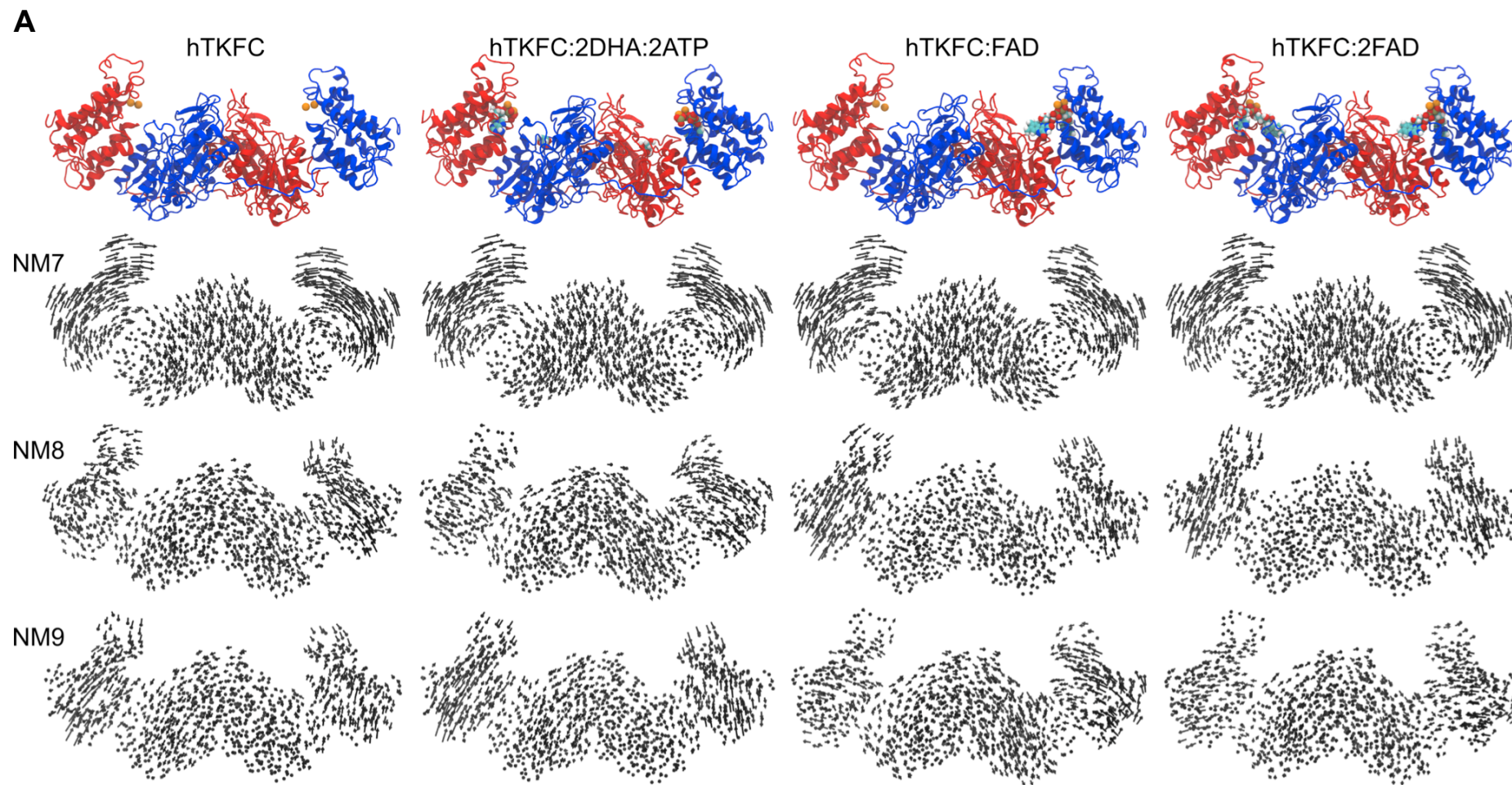
El tercer modo normal no trivial (NM9) de hTKFC y hTKFC:2DHA:2ATP (Vídeo 12) y el segundo (NM8) de hTKFC:FAD y hTKFC:2FAD (Vídeo 11) fueron también semejantes entre sí. Este movimiento consistió en el bamboleo de los dominios L, sobre un eje aproximadamente paralelo al eje principal del dímero. Este tipo de modo normal es semejante

al definido como "bamboleo" (*wobbling*) para las estructuras que contienen dos dominios globulares unidos por una bisagra flexible [172]. La semejanza entre los terceros modos de los sistemas sin FAD y los segundos de los sistemas con FAD se confirmó matemáticamente, por sus productos internos en el intervalo 0,796-0,953 (Figura 52). En hTKFC:2DHA:2ATP, este bamboleo no produce un acercamiento evidente de los dominios L y K. Por tanto no está claro que forme parte de un movimiento funcional, aunque no se puede descartar que participe en el acercamiento entre ATP y DHA en combinación con los otros modos.

Puede decirse que la presencia de ligandos no causó cambios drásticos en los modos normales respecto a la proteína sin ligandos. No se puede atribuir significado al cambio entre los modos normales 8° y 9° de los sistemas que contienen FAD respecto a los sistemas que no lo contienen (Figura 52), pues las frecuencias asociadas a estos modos fueron muy similares (NM8 entre 4,74-5,51 cm^{-1} ; NM9 entre 5,30-5,80 cm^{-1}). En presencia de ligandos se mantuvieron, sólo con pequeñas diferencias, los movimientos fundamentales de flexión de bisagra, giro y bamboleo observados en ausencia de ligandos. Las diferencias fueron un poco más visibles en el movimiento de giro. A pesar de ser simétrica la proteína dimérica, se vieron diferencias entre los movimientos de los dominios L. Mientras que el movimiento de giro de L2 fue similar en los cuatro sistemas estudiados, el movimiento de giro de L1 en hTKFC y hTKFC:2FAD presentaba un ligero bamboleo en dirección opuesta a hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD. Respecto a los movimientos de bamboleo, los movimientos de L1 fueron muy similares en hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD, mientras que presentaron un ligero movimiento de bisagra en hTKFC:2FAD. En L2, se pueden dividir los movimientos de bamboleo en dos grupos, hTKFC y hTKFC:2DHA:2ATP por un lado, y los dos sistemas con FAD, por otro, que se diferencian por el eje de dicho movimiento.

Diversos autores han mostrado que modos normales calculados en ausencia de ligandos a partir de la proteína en conformación abierta permiten obtener una conformación cerrada "teórica" muy similar a la conformación cerrada obtenida experimentalmente en presencia de ligandos [173,174,175,176]. Para la proteína hTKFC no se dispone de una conformación cerrada obtenida experimentalmente y hemos intentado encontrarla teóricamente calculando los modos normales a partir de conformaciones abiertas con y sin ligandos. En las 4 simulaciones, los movimientos resultaron similares y están asociados a movimientos de los dominios L, que muy probablemente representan movimientos funcionales.

En resumen, dos de los tres primeros modos normales no triviales, considerados por separado, revelaron la tendencia de los dominios L a acercarse a los dominios K en movimientos que pueden ser parte del paso de una conformación abierta a una conformación cerrada del centro activo. No obstante, ninguno de estos modos normales pudo prolongarse lo suficiente, sin graves distorsiones de la estructura, como para llegar a confirmar por este procedimiento que puede darse el suficiente acercamiento de ATP y DHA para que tenga lugar la reacción de transferencia de fosfato desde uno hasta el otro. Además, cabe pensar, como ya se ha mencionado un poco más arriba, que para observar este acercamiento en términos de modos normales sea necesaria la combinación de varios de ellos, por ejemplo, NM7, NM8 y NM9 en el sistema hTKFC:2DHA:2ATP. Encontrándonos ya en la parte final de nuestro trabajo, decidimos no explorar esta combinación, porque era de esperar que su coste temporal fuese elevado al tener que combinar los modos normales entre sí en distintas fases. Por otra parte, en este momento se dispone ya de una buena evidencia relativa al acercamiento entre ATP y DHA como consecuencia de las simulaciones de dinámica molecular (sección 2.2.4; Fig. 46).



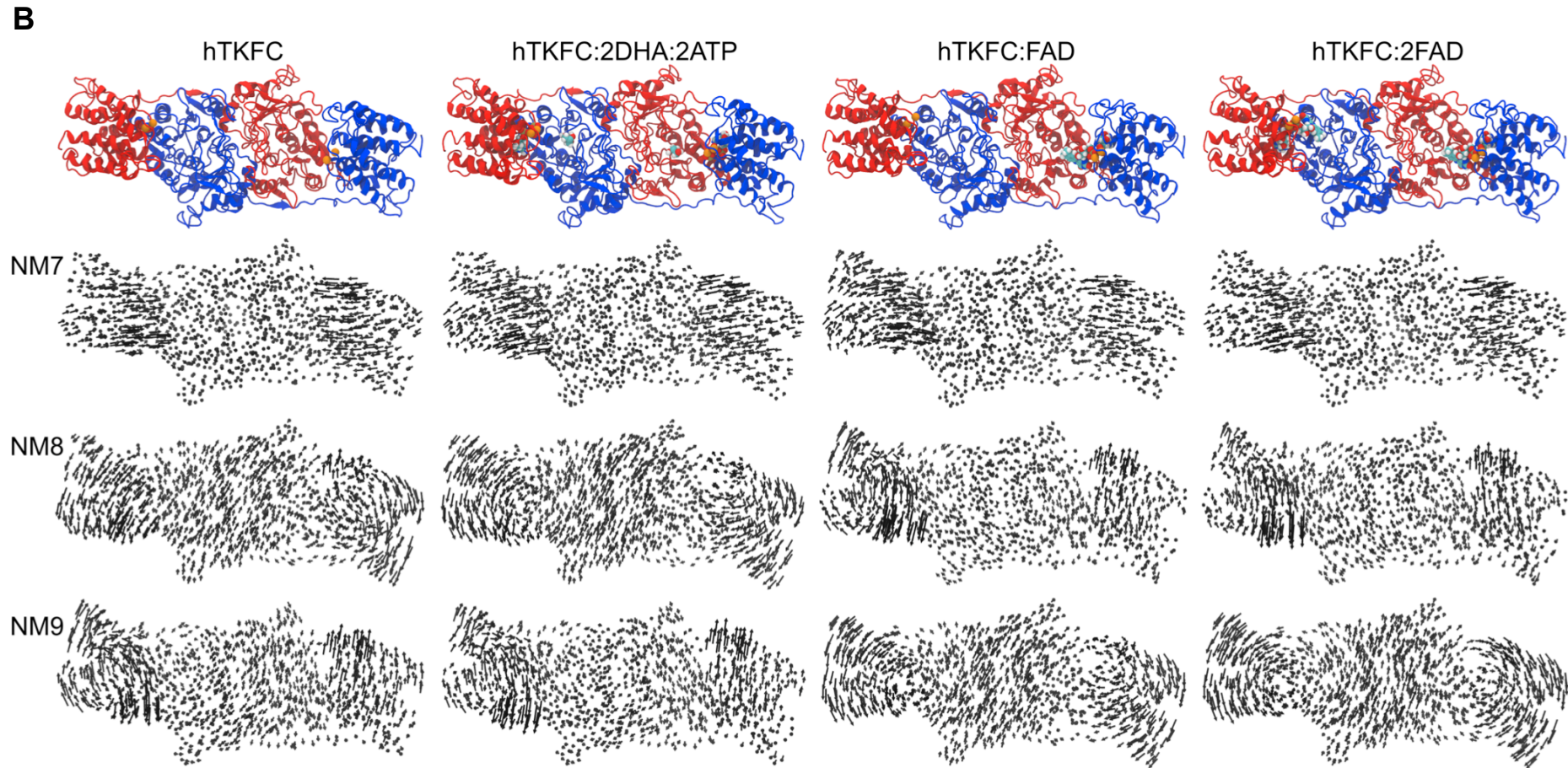


Figura 50: Representación estática de los tres primeros modos normales no triviales encontrados en los cuatro sistemas estudiados. A, B: La fila superior de cada una de las dos partes de la figura representa las conformaciones energéticamente minimizadas, preparadas para el análisis de modos normales. En las filas inferiores se representan en forma de gráficas "puercoespín" las direcciones de movimiento de cada uno de los primeros modos normales no triviales (NM7, NM8 y NM9). La parte B presenta las mismas imágenes de A observadas desde un punto de vista superior. En la Figura 51 se da una versión simplificada de estos modos normales.

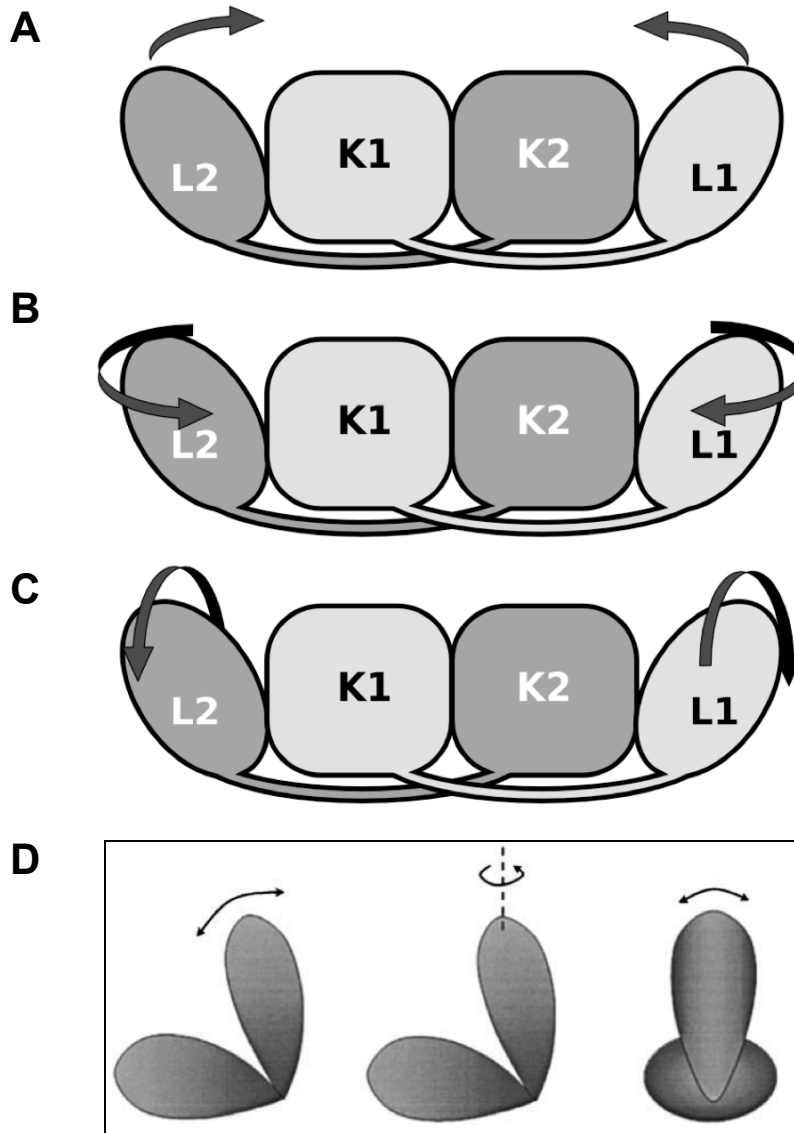


Figura 51: Representación simplificada de los primeros modos normales no triviales observados en los cuatro sistemas estudiados y su comparación con los modos universales de las estructuras que contienen dos dominios globulares unidos por una bisagra flexible. **A:** Primer modo (NM7) en los cuatro sistemas. **B:** Segundo modo (NM8) en los sistemas hTKFC y hTKFC:2DHA:2ATP, y tercer modo (NM9) en los sistemas hTKFC:FAD y hTKFC:2FAD. **C:** Tercer modo (NM9) en los sistemas hTKFC y hTKFC:2DHA:2ATP, y segundo modo (NM8) en los sistemas hTKFC:FAD y hTKFC:2FAD. En la Figura 50 se encuentra una representación detallada de estos modos en cada sistema. **D:** Modos universales de las estructuras que contienen dos dominios globulares unidos por una bisagra flexible, de izquierda a derecha: flexión de bisagra (*hinge-bending*), giro (*twisting*), bamboleo (*wobbling*) (reproducido de [172]).

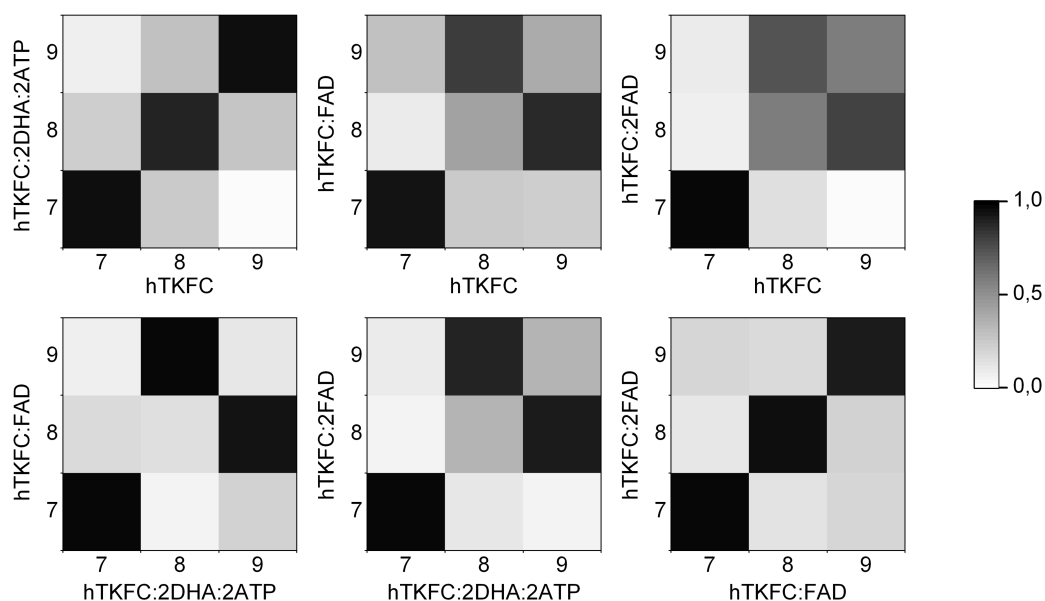


Figura 52: Comparación entre los primeros modos normales de los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP, hTKFC:FAD y hTKFC:2FAD. Una vez que los cuatro sistemas tienen número de átomos diferente, los modos normales correspondientes (vectores) tienen diferentes dimensiones y no se puede calcular su producto interno. Para comparar los modos normales, para cada sistema y para cada modo, se generó un *ensemble* de conformaciones, a partir del cual se extrajeron solamente los átomos de la cadena principal. Se obtienen así “trayectorias” correspondientes a los modos principales, todas con el mismo número de átomos. Con estas trayectorias se hizo un análisis de dinámica esencial, de lo cual resultan valores propios y vectores propios con la misma dimensión. El producto interno de los vectores propios es uno si son iguales, y por lo tanto, los modos normales son similares (cuadrado negro), y cero si los vectores propios son ortogonales, y luego los modos normales son muy diferentes (cuadrado blanco).

2.3 Resultados y discusión: experimentos de mutagénesis

Lo que se conoce de la dihidroxiacetona quinasa de *C. braaki* o CbDK [146,147,148] (Figura 31) y lo que muestran los estudios de modelado molecular de la proteína hTKFC (sección 2.2; Figura 33) indican que la forma nativa de ésta tiene dos centros activos, cada uno constituido con partes de los dominios K y L de distintas subunidades: L1K2 y L2K1. Puesto que DHA y gliceraldehído se unen al dominio K y el ATP se une al dominio L, era de esperar que ambos dominios sean necesarios para las actividades de tipo quinasa, lo cual sin embargo no se había demostrado. Por otra parte, no era seguro que ocurriese lo mismo respecto a las actividades liasa ciclante. Para dilucidar estas cuestiones y para evaluar el papel de algunos residuos aminoacídicos en las actividades enzimáticas, se construyeron diversos mutantes de hTKFC.

Los mutantes construidos fueron dos versiones truncadas de hTKFC, una correspondiente al dominio K y otra al dominio L (Figura 53), así como los mutantes puntuales T112A, D401A, D403A, C404A, S446A y D556A. La localización de los residuos mutados en la proteína hTKFC se resume en la Figura 54. Junto a los resultados obtenidos estudiando estos mutantes construidos específicamente para esta Tesis Doctoral, también consideraremos los resultados obtenidos con la proteína mutante H221A, construida y estudiada en la Tesis Doctoral de Ana Couto [2].

2.3.1 La actividad quinasa requiere los dos dominios K y L, pero el dominio L es suficiente para la actividad liasa ciclante, aunque ésta se hace insensible a la inhibición por dihidroxiacetona y gliceraldehído

Los dominios K y L de la proteína hTKFC fueron construidos y expresados por separado. En el primer caso se incluyeron los aminoácidos 1-339 y en el segundo los aminoácidos 359-575 (Figura 53). Los 19 aminoácidos que no se incluyeron en ninguna de las dos proteínas truncadas (340-358) corresponden al espaciador que enlaza ambos dominios en cada subunidad de la proteína completa. No se determinaron los pesos moleculares nativos de las proteínas truncadas, pero es de esperar que el dominio L se comporte como un monómero, mientras que el dominio K podría comportarse como un dímero. En la proteína hTKFC dimerica, los dominios K de las dos subunidades interaccionan entre sí de forma bastante estrecha y podrían seguir haciéndolo de manera similar en la forma truncada, dando lugar a dímeros de dominios K. En todo caso, era altamente improbable que ninguno de los dos dominios K y L por separado, ya sea cada uno de ellos en forma monomérica u oligomérica, pudiera constituir centros activos con actividad quinasa. Para confirmar esta suposición y para averiguar si uno de los dos dominios aislados podría tener actividad de tipo liasa ciclante, se midieron las actividades catalíticas de los dominios K y L expresados por separado.

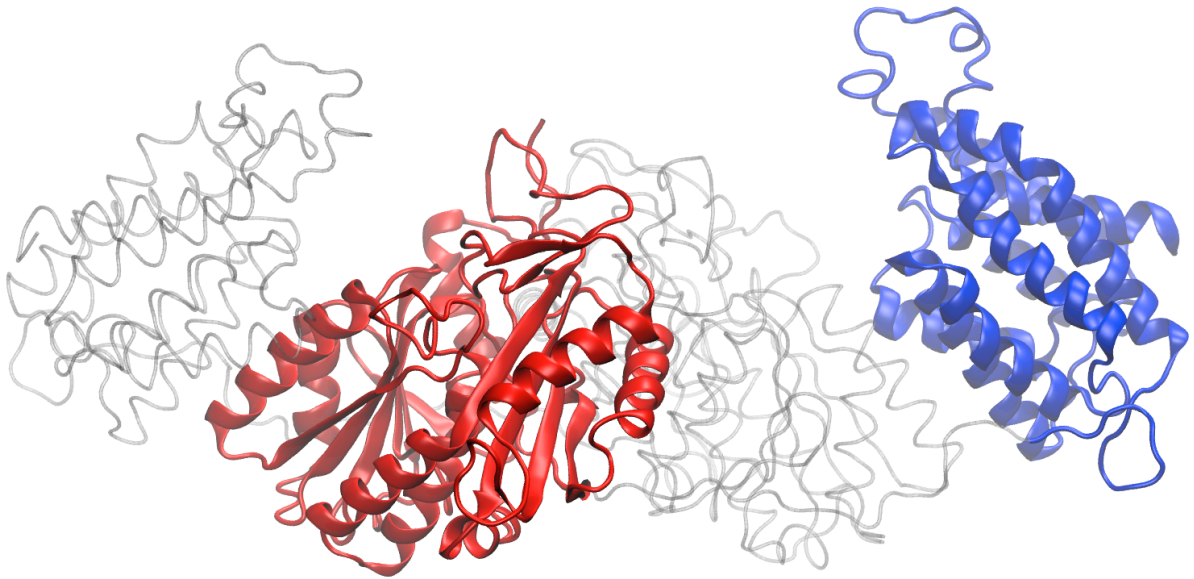


Figura 53: Dominios K y L de hTKFC construidos y expresados por separado. Los dominios K (rojo, aa 1-339) y L (azul, aa 359-575) se presentan sobre el modelo de la proteína dimérica completa, producido por *Modeller* (Figura 33.B).

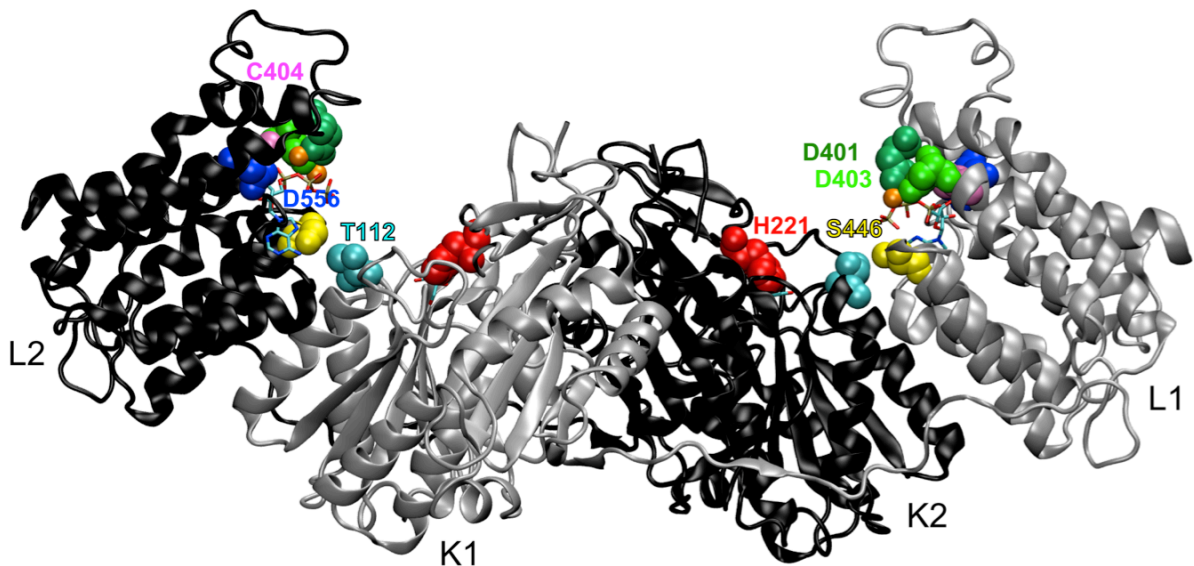


Figura 54: Localización de los aminoácidos de hTKFC mutados puntualmente. La estructura es la misma que fue preparada con *Modeller* (Figura 33.B). Cada aminoácido aparece dos veces en el dímero en el mismo color, pero sólo uno de ellos se ha rotulado. El aminoácido H²²¹ fue mutado en la Tesis de Ana Couto [2], mientras que los restantes fueron mutados en este trabajo.

En la Figura 55 se puede ver que ni el dominio K ni el dominio L presentaron actividades de DHA quinasa o GA quinasa en grado detectable. Respecto a la actividad liasa ciclante, el dominio K fue también inactivo, pero no así el dominio L, que presentó actividad liasa ciclante sobre FAD (Figuras 55 y 56; Tabla 4) y sobre ADP-glucosa (Figura 56; Tabla 4) en un grado significativo. Estos resultados indican que ambos dominios, K y L, son necesarios para la catálisis de las reacciones de transferencia de fosfato, mientras que el dominio L por sí solo es suficiente para la catálisis de las reacciones liasa ciclante con valores de k_{cat} alrededor de la mitad de los que presenta la proteína hTKFC completa (Tabla 4). No obstante, la presencia del dominio K (en la proteína hTKFC completa), si bien tiene poco efecto sobre la catálisis de tipo liasa ciclante, favorece claramente la unión de los sustratos FAD y ADP-glucosa, como se pone de manifiesto en unos valores de K_M que son unas 10 veces menores con la proteína hTKFC completa que con el dominio L (Tabla 4). Ello subraya la importancia que pueden tener algunos contactos observados entre la dimetilisoaloxazina del FAD y el dominio K (sección 2.2.2; Figuras 36.EG, 43 y 44; Vídeo 8). Por último, es también interesante que la actividad liasa ciclante del dominio L (separado de K) no fue inhibida apreciablemente por DHA y sólo muy débilmente por GA, mucho menos que la proteína hTKFC completa (Figura 57). El conjunto de resultados obtenidos con los dominios K y L separados concuerda con la observación anterior de que, aunque la actividad liasa ciclante es ligeramente inhibida por DHA y GA, tal inhibición tiene carácter parcial [1,2].

2.3.2 La mutación de residuos del dominio K afecta fuertemente a las actividades de tipo quinasa y a las inhibiciones producidas por dihidroxiacetona y gliceraldehído sobre la liasa ciclante pero afecta muy poco a esta actividad

Los dos residuos que se sometieron a mutagénesis puntual dentro del dominio K de la proteína hTKFC fueron His²²¹ [2] y Thr¹¹². El primero de ellos se escogió por ser equivalente (secuencial y espacialmente conservado) a la His²²⁰ de la DHA quinasa de *C. braaki*, aminoácido con el que se forma un complejo covalente de DHA o GA durante las reacciones quinasa [146,147]. El segundo, Thr¹¹², se escogió por hallarse en una posición intermedia entre las del donador y el receptor de fosfato en las reacciones de tipo quinasa, y por considerar en principio que tal vez la formación de fosforil-Thr pudiera servir como intermediario para facilitar una transferencia en la que donador y receptor se encuentran a una distancia demasiado grande el uno del otro [148]. No obstante, como ya se ha dicho, las simulaciones de dinámica molecular mostraron que el residuo Thr¹¹² puede formar un puente de hidrógeno con el grupo amino de la adenina cuando el ATP y el DHA unidos a hTKFC se aproximan lo suficiente para reaccionar entre sí (sección 2.2.4; Figura 46; Vídeo 7). Así pues, la Thr¹¹² puede tener un papel en la estabilización de dicha conformación.

La mutación H221A eliminó las actividades DHA quinasa y GA quinasa (Figura 54), mientras que tuvo poco efecto sobre la FMN ciclasa, pues no modificó su valor de k_{cat} y aumentó 4 veces el valor de K_M respecto a la proteína salvaje (Tabla 4). El efecto global de la mutación H221A sobre la actividad liasa ciclante con ADP-glucosa como sustrato fue similar: aunque el aumento de la K_M fue menos marcado, ello se compensó en términos de eficacia catalítica con una pequeña disminución de k_{cat} (Tabla 4). En contraste con el poco efecto sobre las actividades liasa ciclante, y de acuerdo con la pérdida de las actividades quinasa, la mutación H221A eliminó la inhibición de la FMN ciclasa por DHA o GA (Figura 57).

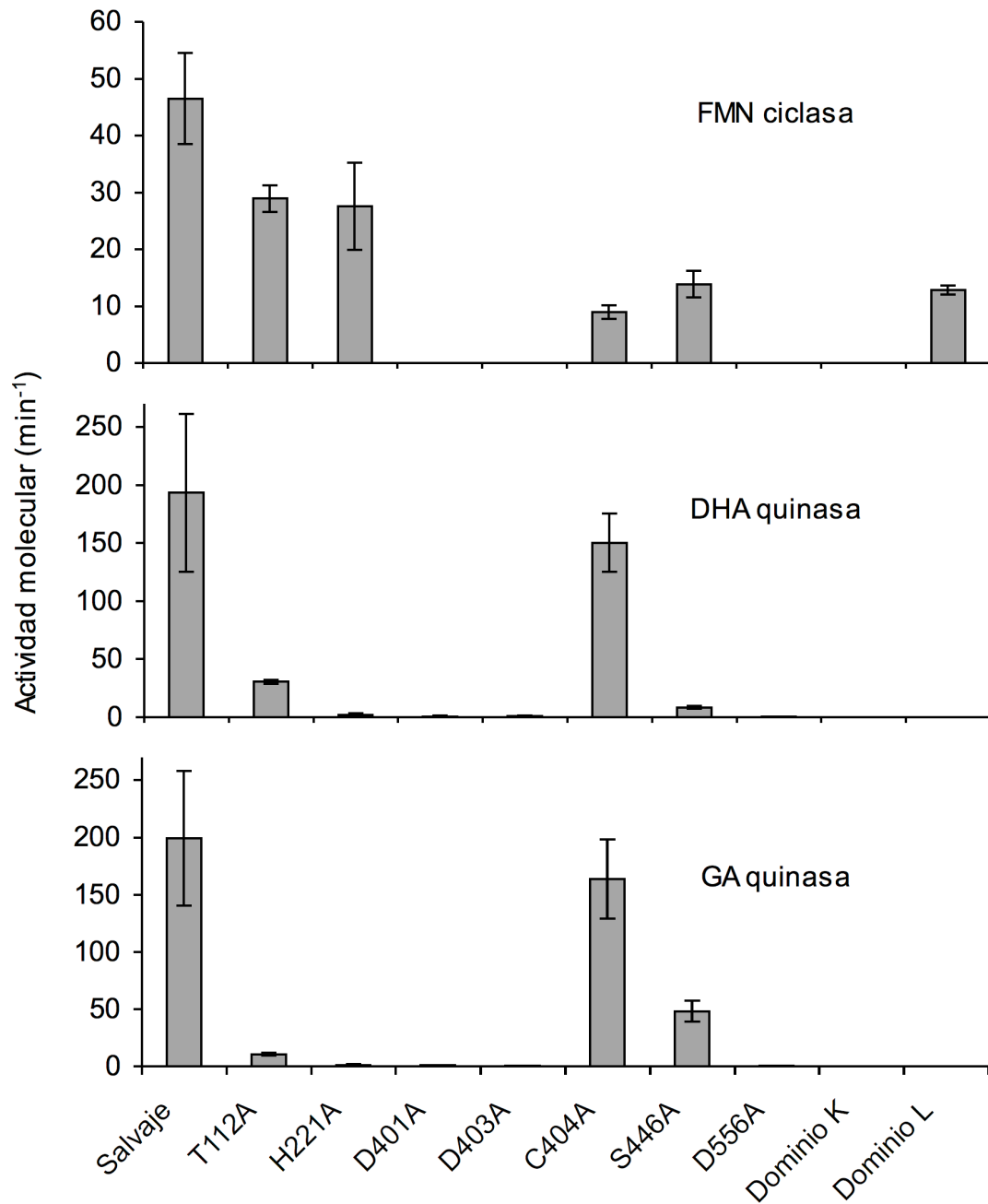


Figura 55: Actividades enzimáticas de las formas mutantes de hTKFC. La actividad FMN ciclasa se valoró por HPLC en las condiciones estándar descritas en la sección 3.7.2, con FAD 100 μ M y Mn^{2+} 6 mM. Las actividades DHA quinasa y GA quinasa se valoraron espectrofotométricamente en las condiciones estándar descritas en la sección 3.7.3, con DHA o GA 500 μ M, ATP 5 mM y Mg^{2+} 10 mM. Los resultados se expresan en forma de actividad molecular de un centro activo, como valores medios \pm desviación estándar de 3–5 experimentos independientes.

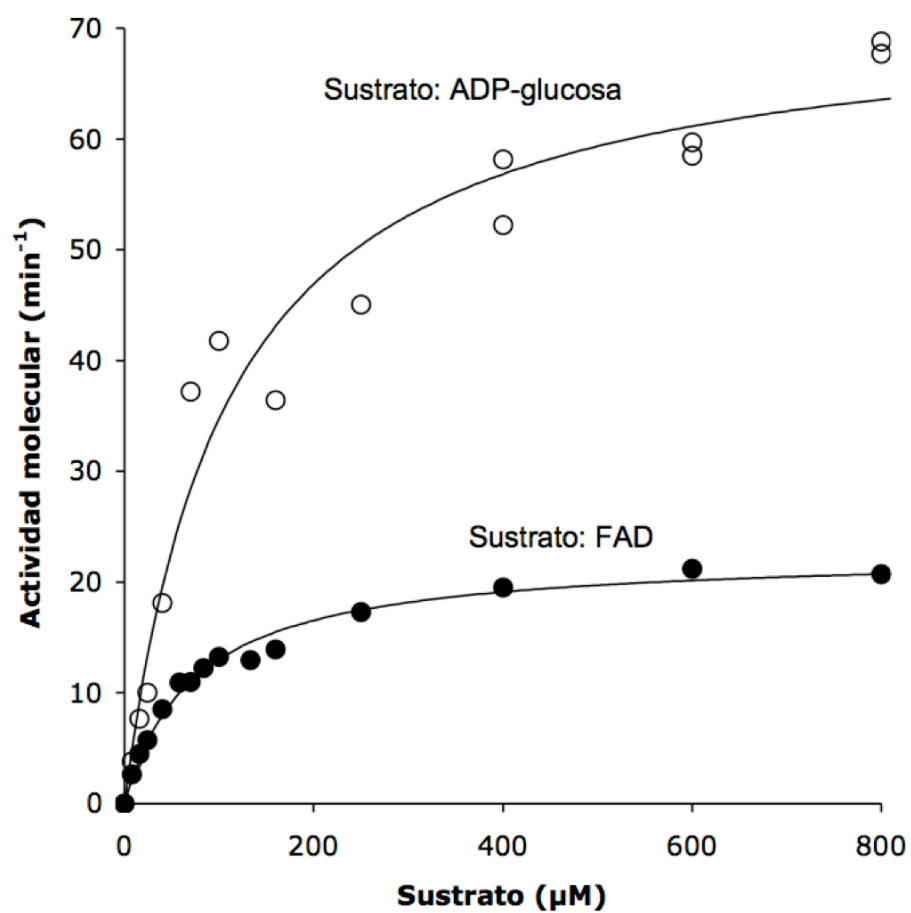


Figura 56: Saturación de las actividades de tipo liasa ciclante del dominio L de hTKFC. Las actividades liasa ciclante sobre ambos sustratos se valoraron por HPLC en las condiciones estándar descritas en la sección 3.7.2.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de las formas mutantes de hTKFC que presentan actividad liasa ciclante y/o quinasa detectable(s).

| Reacción (sustrato) | | Salvaje | T112A | H221A | C404A | S446A | Dominio L |
|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Liasa ciclante (FAD) | k_{cat} (s^{-1}) | 0,82 ± 0,21 | 0,67 ± 0,07 | 0,83 ± 0,02 | 0,39 ± 0,02 | 0,30 ± 0,01 | 0,39 ± 0,07 |
| | K_M (μM) | 7,0 ± 2,5 | 10,8 ± 3,4 | 27,2 ± 5,1 | 52,2 ± 0,4 | 6,8 ± 2,6 | 79,3 ± 31,2 |
| | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | 11,7 x 10 ⁴ | 6,2 x 10 ⁴ | 3,1 x 10 ⁴ | 0,75 x 10 ⁴ | 4,4 x 10 ⁴ | 0,49 x 10 ⁴ |
| Liasa ciclante (ADP-glucosa) | k_{cat} (s^{-1}) | 1,87 ± 0,49 | ne | 0,75 ± 0,13 | ne | ne | 1,2 |
| | K_M (μM) | 12,0 ± 1,0 | ne | 20,0 ± 5,6 | ne | ne | 108 |
| | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | 15,6 x 10 ⁴ | ne | 3,8 x 10 ⁴ | ne | ne | 1,1 x 10 ⁴ |
| DHA quinasa (DHA) | k_{cat} (s^{-1}) | 5,00 ± 1,55 | 0,51 ± 0,04 | nd | 2,26 ± 0,23 | 0,13 ± 0,01 | nd |
| | K_M (μM) | 1,55 ± 0,17 | 6,63 ± 0,29 | nd | 1,91 ± 0,58 | 0,99 ± 0,32 | nd |
| | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | 321 x 10 ⁴ | 7,6 x 10 ⁴ | nd | 118 x 10 ⁴ | 13,1 x 10 ⁴ | nd |
| DHA quinasa (ATP) | k_{cat} (s^{-1}) | 4,59 ± 1,21 | 0,50 ± 0,05 | nd | 2,17 ± 0,13 | 0,15 ± 0,01 | nd |
| | K_M (μM) | 43,2 ± 7,9 | 80,6 ± 21,7 | nd | 99,6 ± 11,9 | 5,74 ± 0,80 | nd |
| | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | 10,5 x 10 ⁴ | 0,64 x 10 ⁴ | nd | 2,18 x 10 ⁴ | 2,6 x 10 ⁴ | nd |
| GA quinasa (GA) | k_{cat} (s^{-1}) | 4,83 ± 1,25 | 0,16 ± 0,01 | nd | 2,27 ± 0,22 | 0,74 ± 0,03 | nd |
| | K_M (μM) | 18,1 ± 4,7 | 13,7 ± 0,2 | nd | 16,2 ± 0,67 | 7,1 ± 0,6 | nd |
| | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | 27,5 x 10 ⁴ | 1,2 x 10 ⁴ | nd | 14,0 x 10 ⁴ | 10,4 x 10 ⁴ | nd |
| GA quinasa (ATP) | k_{cat} (s^{-1}) | 3,94 ± 1,25 | 0,16 ± 0,01 | nd | 2,10 ± 0,15 | 0,66 ± 0,07 | nd |
| | K_M (μM) | 62,4 ± 8,6 | 85,3 ± 7,7 | nd | 183 ± 17 | 35,2 ± 5,4 | nd |
| | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | 6,3 x 10 ⁴ | 0,19 x 10 ⁴ | nd | 1,15 x 10 ⁴ | 1,9 x 10 ⁴ | nd |

ne, no estudiado

nd, actividad no detectable

Por su parte, la mutación T112A, aunque no eliminó las actividades de tipo quinasa, afectó fuertemente a sus valores de k_{cat} , que disminuyeron unas 10 veces en el caso de la DHA quinasa y unas 25-30 veces en el caso de la GA quinasa. Los correspondientes valores de K_M se vieron menos afectados, excepto un aumento de 4 veces en el valor de K_M para DHA (Tabla 4). Asimismo, esta mutación disminuyó ligeramente la inhibición de la actividad FMN ciclasa por DHA y GA (Figura 57), mientras que dejó casi inalterados los parámetros cinéticos de la actividad FMN ciclasa (Tabla 4).

En resumen, los efectos de la sustitución de la His²²¹ son coherentes con el papel de este aminoácido como puerto de unión covalente de las triosas DHA y GA que, en ausencia de His²²¹, no pueden participar ni como sustratos ni como inhibidores. El fuerte efecto de la modificación de Thr¹¹² sobre la actividad fosforiltransferasa (no sobre los efectos inhibidores de las triosas), es coherente con que un puente de hidrógeno de dicho aminoácido con el grupo amino de la adenina pudiera estabilizar la conformación en la que el ATP y el DHA unidos a hTKFC se aproximan lo suficiente, aunque la reacción podría tener lugar más lentamente en ausencia de dicho puente de hidrógeno (sección 2.2.4; Figura 46). El nulo o escaso efecto de ambas mutaciones sobre la catálisis de la reacción FMN ciclasa es coherente con la relativa irrelevancia de todo el dominio K para esta acción catalítica (pero no para la unión de FAD) (sección 2.3.1; Tabla 4).

2.3.3 La mutación de residuos del dominio L afecta a las actividades quinasa y liasa ciclante o sólo a esta última, pero no afecta a las inhibiciones producidas por dihidroxiacetona y gliceraldehído sobre la liasa ciclante

Dentro del dominio L se sometieron a mutagénesis los residuos Asp⁴⁰¹, Asp⁴⁰³, Cys⁴⁰⁴, Ser⁴⁴⁶ y Asp⁵⁵⁶. Todos ellos, excepto Cys⁴⁰⁴, están conservados secuencialmente y espacialmente en la proteína hTKFC respecto a CbDK, la DHA quinasa de *C. braaki*. En esta última proteína, la posición equivalente a Cys⁴⁰⁴ está ocupada por el residuo Thr³⁸⁸ (Figura 32).

La elección de los aminoácidos mutados se basó en que los aminoácidos de la DHA quinasa de *C. braaki* equivalentes a los residuos Asp⁴⁰¹, Asp⁴⁰³, Ser⁴⁴⁶ y Asp⁵⁵⁶ de hTKFC están implicados en interacciones importantes en la parte de centro activo que radica en el dominio L: Asp³⁸⁵-CbDK y Asp³⁸⁷-CbDK (equivalentes a Asp⁴⁰¹-hTKFC y Asp⁴⁰³-hTKFC) están unidos a los dos iones Mg²⁺ que interactúan con el grupo trifosfato del ATP; Ser⁴³¹-CbDK (equivalente a Ser⁴⁴⁶-hTKFC) forma puentes de hidrógeno con los fosfatos β y γ ; y Asp⁵³³-CbDK (equivalente a Asp⁵⁵⁶-hTKFC) forma puente de hidrógeno con los grupos OH de la ribosa [146]. Por otra parte, la elección de Cys⁴⁰⁴ se basó en que ocupa una posición equivalente a Thr³⁸⁸-CbDK, donde este aminoácido no es esencial para la actividad quinasa dependiente de ATP, y a His³⁸ en la subunidad L de las DHA quinasa dependientes de fosfoenolpiruvato (sistema PTS), donde dicho residuo de histidina sí es esencial para esa actividad [146].

En la proteína hTKFC, las mutaciones D401A y D403A eliminaron completamente las actividades de tipo quinasa (igual que ocurre con las mutaciones equivalentes en la proteína CbDK [146]) y también la actividad FMN ciclasa (Figura 55), poniendo de relieve la importancia de los metales del centro activo para la catálisis y/o para el posicionamiento

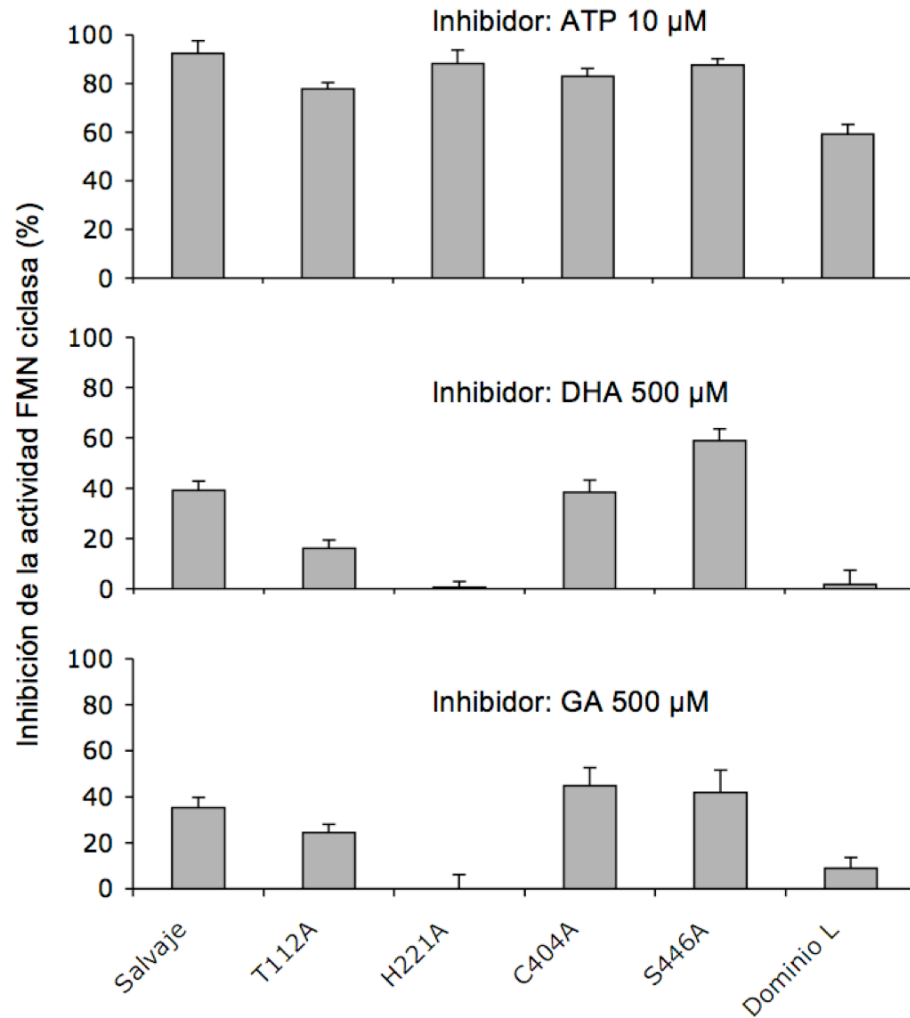


Figura 57: Inhibición de la actividad FMN ciclasa de formas mutantes de hTKFC por sustratos de la actividad quinasa. Los resultados corresponden al efecto inhibitorio producido sobre la actividad FMN ciclasa medida por HPLC, en las condiciones estándar descritas en la sección 3.7.2, con FAD 100 μM como sustrato y Mn^{2+} 6 mM.

correcto de los sustratos ATP o FAD. Es de destacar que las interacciones de Asp⁴⁰¹ y Asp⁴⁰³ con los iones de Mg²⁺ se mantuvieron prácticamente estables durante las trayectorias de todas las simulaciones dinámicas con los sistemas hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD (Videos 4-8; detalles no mostrados).

Por su parte, la mutación D556A, que no ha sido investigada con la proteína CbDK, también dio lugar a la inactivación completa de la proteína hTKFC, poniendo de manifiesto en este caso el papel esencial de los grupos 2'-OH y 3'-OH de la ribosa, posiblemente en el posicionamiento de los sustratos ATP y FAD. La interacción de Asp⁵⁵⁶ con uno u otro de dichos grupos hidroxilo se mantuvo también presente durante la mayor parte de la trayectoria de dinámica molecular de los sistemas hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD (Figuras 40.D y 43.C). La posible importancia de un puente de hidrógeno con el grupo 2'-OH de la ribosa se había indicado anteriormente, a la vista de experimentos de inhibición de la actividad FMN ciclasa por derivados fosforilados de adenosina y desoxiadenosina, en los que se observó que la potencia inhibidora de dADP y dATP es mucho menor que la de ADP y ATP, así como la menor eficacia de dATP como donador de fosfato en la reacción DHA quinasa comparado con el ATP [2,128].

La mutación S446A disminuyó las actividades quinasa y liasa ciclante, sin llegar a eliminarlas (Figura 55), con la particularidad de que los valores de K_M observados para la proteína mutante fueron iguales (FAD) o menores (ATP, DHA, GA) que los obtenidos para la enzima salvaje, y la pérdida de actividad se debió a la disminución de los valores de k_{cat} . El efecto más fuerte se produjo sobre la actividad DHA quinasa, cuyo valor de k_{cat} disminuyó unas 30 veces. En el caso de la actividad GA quinasa la disminución de k_{cat} fue de 6 veces y en el caso de la FMN ciclasa sólo de 2,7 veces (Tabla 4). Estos resultados dejan poco claro cuál puede ser el papel del hidroxilo de la Ser⁴⁴⁶ en las reacciones catalizadas por hTKFC. Debe decirse que algunos de los modelos moleculares estudiados mostraron un puente de hidrógeno entre el N amida de la cadena principal de Ser⁴⁴⁶ y el fosfato γ del ATP, y debe destacarse que la importancia de esta interacción no se tiene que ver necesariamente afectada por la mutación S446A, ya que este cambio no afecta a la cadena principal, sino sólo a la cadena lateral.

La mutación C404A produjo un marcado aumento del valor de K_M de FAD y un ligero aumento del de ATP, sin modificar los de DHA y GA, así como ligeros descensos en todos los valores de k_{cat} (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con la observación de que el residuo Thr³⁸⁸ de CbDK no es esencial para la actividad quinasa de la proteína bacteriana [146] y sugieren un papel especial de la Cys⁴⁰⁴ en la unión de FAD a hTKFC.

Por último, la falta de efectos de las mutaciones S446A y C404A sobre las inhibiciones de la FMN ciclasa por las triosas DHA y GA (Figura 57) es coherente con la localización de estos residuos en un dominio diferente de aquel al que se unen dichas triosas.

3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

3.1.1 Equipamiento de laboratorio

- Baños termostatzados: New Brunswick Scientific modelo G 76, Selecta modelo Unitronic 320 OR Precis-term y Selecta modelo 158 OR Precis-term
- Centrífuga refrigerada de alta velocidad: Sorvall modelo RC-5B con rotor SS-34
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): compuesto por un cromatógrafo Hewlett-Packard HP-1100, provisto de un detector de diodos, y asistido por un ordenador con el programa HP ChemStation
- Equipo de electroforesis geles de agarosa: Hoefer Scientific Instruments modelo HE33-8-1.5
- Equipo de electroforesis para SDS-PAGE: Hoefer Scientific Instruments modelo SE 250
- Equipo de preparación de agua ultrapura: Barnstead, módulos Ropure ST y NANOpure conectados en serie
- Equipo de ultrasonidos: B. Braun Labsonic U
- Espectrofotómetros de absorción ultravioleta-visible: Shimadzu modelos MPS-2000 y UV-160A
- Espectrofotómetro de absorción visible: Spectronic 20 Genesys modelo 4001/4
- Fuente de alimentación para equipos de electroforesis: Amersham Biosciences modelo EPS 601
- Incubadores agitadores para cultivos bacterianos: New Brunswick Scientific modelo G24; New Brunswick Scientific modelo C-24KC con capacidad de trabajo por debajo de la temperatura ambiente
- Incubador termostatzado: Eppendorf modelo Thermomixer Comfort, con capacidad de trabajo por debajo de la temperatura ambiente
- Medidor de pH: Crison modelo Basic 20+
- Microcentrífuga: Eppendorf 5415 R
- Termociclador: Bio-Rad iCycler

3.1.2 Productos comerciales

| | |
|--|---------------------|
| 2',3'-cAMP (2',3'-AMP cíclico) | Sigma |
| 3',5'-cAMP (3',5'-AMP cíclico) | Sigma |
| Ácido acético | Panreac |
| Ácido ascórbico | Merck |
| Acrilamida | Boehringer |
| bis-Acrilamida | Sigma |
| ADP-ribosa | Sigma |
| Agarosa | Roche |
| Ampicilina | Sigma |
| AMP desaminasa (de <i>Aspergillus</i> sp.) | Sigma |
| Arseniato sódico | Panreac |
| ATP | Sigma |
| Azul de bromofenol | Sigma |
| Bacto-agar | Difco |
| Bacto-peptona | Difco |
| Bromuro de etidio | Sigma |
| BSA (albúmina de suero bovino) | Roche |
| tert-Butóxido potásico | Aldrich |
| cADPR (ADP-ribosa cíclica) | Sigma |
| Cloruro de magnesio | Merck |
| Cloruro de manganeso | Merck |
| Cloruro potásico | Merck |
| Cloruro sódico | Merck |
| Complete™, Mini, EDTA-free | Roche |
| Coomassie Blue | Serva |
| DHA (dihidroxicetona) | Aldrich |
| Dimetilsulfóxido | Sigma |
| DNA ligasa T4 | New England Biolabs |
| DNA polimerasa PfuUltra® | Stratagene |
| DTT (ditiotreitól) | Sigma |
| <i>E. coli</i> BL21 Gold | Stratagene |
| <i>E. coli</i> JM109 | Promega |
| EDTA (etilén-diaminotetraacetato) | Merck |
| Enzima de restricción <i>DpnI</i> | New England Biolabs |
| Enzimas de restricción <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>SaII</i> , <i>BamHI</i> | Roche |
| Extracto de levadura | Difco |
| FAD (flavina-adenina dinucleótido) | Sigma |
| Fosfatasa alcalina de intestino de ternera | Roche |
| Fosfato sódico | Merck |
| Fosfodiesterasa de veneno de serpiente | Boehringer |
| GA (gliceraldehído) | Fluka |
| Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | Sigma |
| Glicerol | Merck |
| Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa | Roche |
| Glicilglicina | Merck |
| Glicina | Merck |
| GSH (glutación) | Sigma |
| GSH-Sepharose | Amersham |
| Heptamolibdato amónico | Merck |
| HIS-Select Nickel Affinity Gel | Sigma |
| Imidazol | Merck |
| IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) | Amersham |
| Marcadores de pesos moleculares (14,4-97,4 kDa) | Bio-Rad |
| Metanol | Romil |
| NAD (nicotinamida-adenina dinucleótido) | Boehringer (Roche) |
| NADH (nicotinamida-adenina dinucleótido reducido) | Sigma |
| Persulfato amónico | Sigma |
| Pirofosfato de tiamina | Sigma |
| Proteasa PreScission™ | Amersham |
| Proteasa TEV | Invitrogen |

| | |
|---|--------------------|
| Reactivo de Bradford | Bio-Rad |
| D-Ribosa | Merck |
| D-Ribosa-5-fosfato | Boehringer (Roche) |
| SDS (dodecilsulfato sódico) | Merck |
| Sephadex G-150 | Pharmacia |
| TBA (bromuro de tetrabutilamonio) | Merck |
| TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) | Sigma |
| Transcetolasa (de levadura de panadero) | Sigma |
| Triosa fosfato isomerasa | Sigma |
| Tris (tris-hidroximetilaminometano) | Roche |
| X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) | Roche |
| Xilulosa-5-fosfato | Sigma |

3.1.3 Purificación de cADPR

La cADPR comercial contiene ADP-ribosa como contaminante. Para eliminarlo, se disolvió 0,5 mg de cADPR comercial en 50 μ l de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y se trató esta disolución con 50 ng de fosfodiesterasa de veneno de serpiente y 60 ng de fosfatasa alcalina durante 4 horas a 25°C, seguidas por una incubación a 4°C durante una noche. Este procedimiento convirtió la ADP-ribosa en adenosina, ribosa y fosfato, dejando intacta a la cADPR que es resistente a la acción de las dos enzimas [41,42,71,72,73]. La cADPR se aisló, después del tratamiento enzimático, por HPLC (sección 3.6, método 3), consiguiéndose una pureza de 99,9%, estimada a partir de cromatogramas registrados a 260 nm, con una concentración próxima a 0,5 mM.

3.1.4 Preparación de pRib-AMP

El compuesto pRib-AMP, empleado como estándar para identificar el producto de hidrólisis de cADPR por la ADPRibasa-Mn, se preparó diluyendo 1 μ l de cADPR 20 mM (comercial; no purificado) en 125 μ l de dimetilsulfóxido que contenían 1 mg de *tert*-butóxido, e incubando esta disolución durante 60-120 min a 37°C [41]. Este tratamiento convirtió parcialmente cADPR a pRib-AMP, al tiempo que degradaba toda la ADP-ribosa contaminante a AMP (ensayos por HPLC; sección 3.6, método 4). El producto deseado se recogió purificado a la salida de la columna de HPLC.

3.1.5 Preparación de disoluciones de DHA

Las disoluciones acuosas recientes de DHA contienen una elevada proporción de forma dimérica que se disocia gradualmente a la forma monomérica [177]. Por ello, una vez preparadas, estas disoluciones se mantuvieron en el frigorífico durante 24 h antes de su uso.

3.1.6 Composición de tampones

- Tampón de lavado 1: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; NaCl 150 mM
- Tampón de lavado 2: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 200 mM
- Tampón de lisis: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 0,5 mM; DTT 1 mM; KCl 50 mM
- Tampón de proteasa TEV: Tris-HCl 50 mM, pH 8; EDTA 0,5 mM; DTT 1 mM; KCl 50 mM

- 5x tampón de muestra para SDS-PAGE: Tris-HCl 310 mM, pH 6,8; 100 g/l de SDS; 500 g/l de glicerol; 0,2 g/l de azul de bromofenol
- Tampón SDS-PAGE: Tris 25 mM; glicina 192 mM; 1 g/l de SDS; sin ajustar pH
- 10x tampón de muestra para geles de agarosa: 25 mg de azul de bromofenol disueltos en 100 ml de Tris 50 mM, pH 7,6; glicerol 60%
- Tampón TAE: Tris-acético 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8,3

3.1.7 Plásmidos

Los plásmidos codificadores de la ADPRibasa-Mn de rata (pGEX6P3-rADPRMn) y la hTKFC (pGEX6P3-hTKFC) ya se habían obtenido con anterioridad [1,4]. Estos dos vectores están basados en el plásmido pGEX-6P-3 (Amersham), que permite la expresión de la proteína glutatión S-transferasa (GST) fusionada a la proteína de interés (Figura 58.A). Las proteínas fusión resultantes tienen, entre las dos partes, un sitio de escisión para la proteasa PreScission™ (LEVLFQ↓GP, que es cortado en la posición indicada por la flecha). La expresión de la proteína fusión está bajo el control del promotor *tac*, inducible por IPTG.

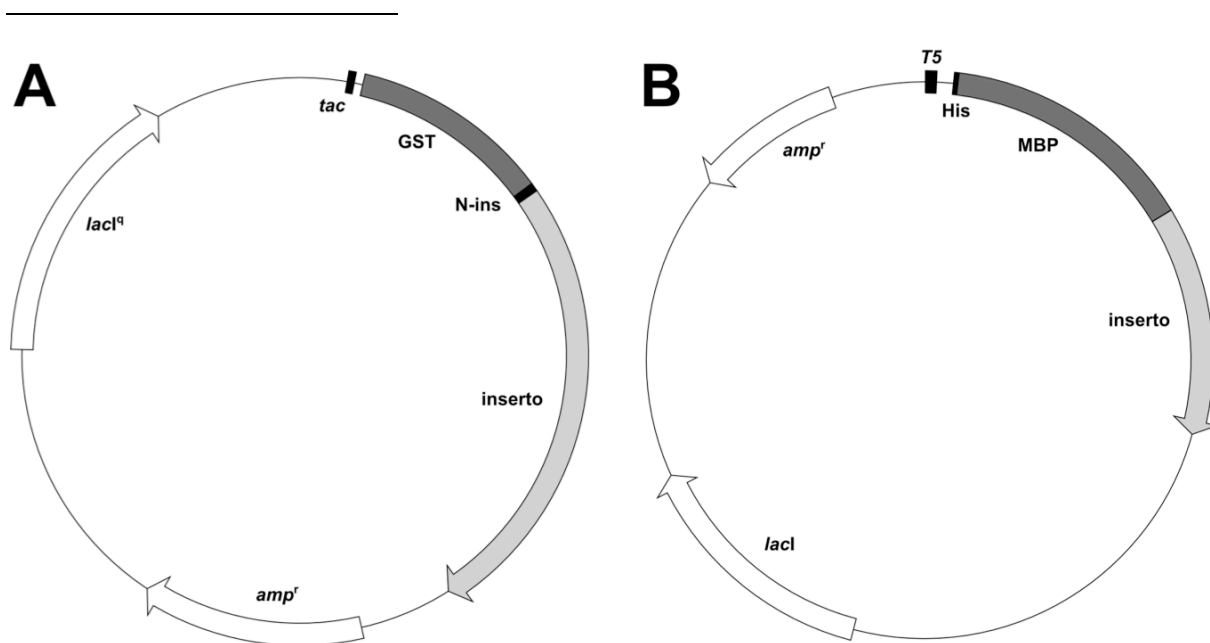


Figura 58: Plásmidos utilizados para expresar las proteínas salvajes y para los experimentos de mutagénesis. **A:** Plásmido pGEX6P3-inserto, donde el inserto es ADPRibasa-Mn de rata o hTKFC. Estos plásmidos contienen el promotor *tac*, inducido por IPTG, que controla la expresión de una fusión de GST con la proteína de interés (ADPRibasa-Mn de rata o hTKFC). La proteína fusión presenta un inserto (N-ins) de algunos aminoácidos (11 en la hTKFC; 8 en la ADPRibasa-Mn de rata) entre la GST y la proteína de interés y un sitio de escisión para la proteasa PreScission™ antes del N-ins. Estos plásmidos contienen también el gen *lacI^q*, que codifica el represor *lac*, y el gen *amp^r*, que confiere resistencia a la ampicilina. **B:** Plásmido pVP16-inserto, donde el inserto es la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*. Este plásmido codifica una proteína fusión compuesta por un segmento de ocho residuos de histidina (His) seguido por la proteína MBP y la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, con un sitio de escisión para la proteasa TEV entre las dos últimas. La expresión de la proteína fusión está bajo el control del promotor *T5*, que también es inducido por IPTG. Este plásmido también expresa el represor *lac* (gen *lacI*) y otorga resistencia a la ampicilina (gen *amp^r*).

El plásmido codificador de la ADPRibasa-Mn de pez cebra (pVP16-2NXF) se obtuvo del *Protein Structure Initiative Materials Repository* (<http://psimr.asu.edu/>), donde está depositado con el código DrCD00084013. Este plásmido codifica una proteína fusión compuesta por un segmento de ocho residuos de histidina seguido por la proteína MBP (*maltose-binding protein*) y la ADPRibasa-Mn de pez cebra (PDB ID 2NXF), con un sitio de escisión para la proteasa TEV entre las dos últimas (ENLYFQ↓S, que es cortado en la posición indicada por la flecha). La expresión de la proteína fusión está bajo el control del promotor *T5*, que también es inducido por IPTG (Figura 58.B). La secuencia codificadora de la ADPRibasa-Mn, en fase correcta con las etiquetas de polihistidina y MBP, se comprobó por secuenciación de las dos cadenas antes de usar el plásmido.

Los plásmidos codificadores de mutantes puntuales o truncados de las proteínas ADPRibasa-Mn de pez cebra y hTKFC se prepararon en el laboratorio como se describe en las secciones 3.2.1 y 3.2.2. Los vectores pGEX-6P-3 y pGEM-T-Easy se obtuvieron de GE Healthcare y Promega, respectivamente.

3.1.8 Medios informáticos empleados para modelado molecular

Todos los procedimientos de modelado molecular se pusieron en práctica mediante un ordenador Apple MacPro equipado con dos procesadores Quad-Core Intel Xeon a 3,2 GHz y con 8 GB de memoria RAM. En este ordenador se instaló el software *Sun Grid Engine*, lo que permitió gestionar las tareas de cálculo muy prolongadas mediante una cola de procesamiento. A continuación se relaciona el principal *software* empleado:

Programas empleados para cálculos prolongados, susceptibles de uso mediante la cola de procesamiento de Sun Grid Engine

- *Modeller*. Usado para la construcción de modelos de proteínas por homología y también para la construcción de partes de proteínas (*loop modelling*). Disponible en <http://salilab.org/modeller>.
- *AutoDock*. Usado para los cálculos de *docking* de pequeñas moléculas a modelos de proteína. Este programa tiene el código fuente disponible, lo que permitió modificar el programa como se describe en la sección 3.12. El programa original está disponible en <http://autodock.scripps.edu>.
- *GROMACS*. Conjunto de programas que permiten preparar, calcular y analizar simulaciones de dinámica molecular, minimizaciones de energía y análisis de modos normales. El código fuente está disponible en <http://www.gromacs.org>. El programa se compiló para funcionar con precisión simple para las simulaciones de dinámica, y con precisión doble para el análisis de modos normales.
- *GAMESS-US*. Usado para cálculos de química cuántica para obtener parámetros de fragmentos moleculares necesarios para algunas simulaciones de dinámica molecular. Está disponible en <http://www.msg.ameslab.gov/gamess>.

Programas usados de forma interactiva

- *ADT* o *AutoDockTools*. Usado en la preparación y análisis de cálculos de *docking*. Está disponible en <http://mgltools.scripps.edu>.
- *AmberTools*. Conjunto de programas que fue usado para la preparación de algunas simulaciones de dinámica molecular en las que se usó el campo de fuerzas AMBER03. Incluye el programa *RESP*, usado para el cálculo de cargas eléctricas parciales. El paquete está disponible en <http://ambermd.org/>.
- *ACPYPE*. Programa que permite la conversión de archivos en formato de Amber al formato de *GROMACS*. Está disponible en <http://code.google.com/p/acpype/>.
- *DrugScore^{PDB}*. Es una función de puntuación para evaluar las interacciones proteína-ligando. Está disponible en <http://pc1664.pharmazie.uni-marburg.de/>.
- *Fconv*. Herramienta que permite extraer información de los resultados de *docking*. Está disponible en <http://pc1664.pharmazie.uni-marburg.de/>.
- *LIGPLOT*. Programa que genera automáticamente diagramas esquemáticos de las interacciones proteína-ligando. Está disponible en <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT>.
- *MacMolPlt*. Programa usado en la preparación de archivos para cálculos en *GAMESS-US*. Está disponible en <http://www.scl.ameslab.gov/MacMolPlt/>
- *Marvin*. Editor molecular usado en la preparación de pequeñas moléculas. Está disponible en <http://www.chemaxon.com>.
- *PROCHECK*. Programa para verificar la estructura de una proteína. Está disponible en <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>
- *Reduce*. Programa que se usó para añadir átomos de hidrógeno a modelos moleculares de proteínas y predecir el estado de protonación de los residuos de proteínas ionizables. Está disponible en <http://kinemage.biochem.duke.edu/>.
- *R.E.D.-III tools*. Programa que se usó en el cálculo de las cargas eléctricas en algunos fragmentos moleculares. Aunque este programa no calcula dichas cargas, permite la preparación de archivos para los cálculos y sirve de interfaz entre los diversos programas necesarios. Disponible en <http://q4md-forcefieldtools.org/RED/>.
- *VMD*. Programa usado para la visualización y análisis de resultados de *docking* y dinámica molecular. Está disponible en <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- *WHAT_CHECK*. Programa para verificar la estructura de una proteína. Está disponible en <http://swift.cmbi.ru.nl/gv/whatcheck>
- *X-Score*. Es una función de puntuación para evaluar las interacciones proteína-ligando. Está disponible en <http://sw16.im.med.umich.edu/software/xtool>.

Programas usados online

- *RESP ESP charge Derive Server*. Equivalente *online* del programa *R.E.D.-III tools* descrito arriba. A través de este servidor se usaron los programas *RESP* y *Gaussian*. Accesible en <http://q4md-forcefieldtools.org/REDS/>.
- *WHAT IF*. Programa de modelado molecular que se usó para añadir átomos de hidrógeno a una molécula de agua particular en modelos de ADPRibasa-Mn de *D. rerio*. Accesible en <http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html>.

3.2 Mutagénesis

3.2.1 Construcción de mutantes puntuales

La construcción de mutantes puntuales se hizo utilizando el procedimiento conocido como *QuikChange*[®] (Stratagene) y los cebadores mutagénicos descritos en la Figura 59. Para la amplificación por PCR se emplearon como moldes los plásmidos codificadores de las proteínas salvajes (pGEX6P3-hTKFC y pVP16-2NXF) y la DNA polimerasa PfuUltra[™] *High Fidelity*. Los productos obtenidos se incubaron 1 h a 37°C con la endonucleasa *DpnI*, que degrada DNA metilado (DNA molde no mutado). La mezcla de reacción de la digestión se aplicó en un gel de agarosa y la banda observada con el tamaño esperado se cortó del gel y se purificó con el *QIAquick*[®] *Gel Extraction Kit* de Qiagen, para eliminar restos de cebadores, enzimas, etc. El DNA obtenido se utilizó para transformar células *E. coli* BL21 Gold con el siguiente protocolo: 30 min de incubación en hielo, 45 s de choque térmico a 42°C, 2 min de incubación en hielo, adición de 300 µl ó 500 µl de medio LB e incubación durante 60 min a 37°C con agitación, siembra en plato de agar-LB con ampicilina 0,1 mg/ml e incubación por la noche a 37°C. El DNA de varios clones obtenidos se extrajo utilizando el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Applied Science). La digestión de los DNAs con la enzima de restricción adecuada para cada caso (Figura 59) permitió identificar clones que debían contener la mutación deseada. Los plásmidos mutantes se secuenciaron y se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21 Gold que se emplearon para expresar las respectivas proteínas fusión puntualmente mutadas. Estas proteínas conservan las secuencias de escisión para proteasas descritas en la sección 3.1.7.

3.2.2 Construcción de mutantes truncados

Los plásmidos codificadores de los dominios N- y C-terminales de la hTKFC se obtuvieron a partir del plásmido pGEX6P3-hTKFC, codificador de la proteína hTKFC completa. La secuencia que codifica el dominio N-terminal (aa 1-339) fue amplificada por PCR con cebadores que incorporaban los sitios de restricción *EcoRI* y *SalI* en los oligonucleótidos directo (*forward*) e inverso (*reverse*), respectivamente (F-Nterm y R-Nterm; Figura 59). El cebador R-Nterm se diseñó para incluir un codón stop después del correspondiente al aminoácido 339. Después de digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *SalI*, el fragmento de DNA que codifica el dominio N-terminal se insertó entre los sitios correspondientes del vector pGEX-6P-3 empleando la DNA ligasa de T4, obteniéndose el plásmido pGEX6P3-Nterm-hTKFC. Este plásmido codifica los aminoácidos 1-339 de hTKFC precedidos por los aminoácidos LEVLFQ↓GPLGSPAS (el subrayado marca la secuencia reconocida por la proteasa PreScission y la flecha su punto de corte).

La secuencia que codifica el dominio C-terminal (aa 359-575) fue amplificada por PCR con cebadores que incorporan los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* en los oligonucleótidos directo (*forward*) e inverso (*reverse*), respectivamente (F-Cterm y R-Cterm; Figura 59). El fragmento amplificado se digirió con las endonucleasas *BamHI* y *EcoRI*, se insertó en el vector pGEM[®]-T Easy empleando la DNA ligasa de T4. El plásmido obtenido, pGEMTEasy-Cterm-hTKFC, se usó para transformar células *E. coli* JM109, que se sembraron

| | |
|---------|--|
| F-H97A | 5' GGAAT <u>GCC</u> GAGTTCTACAACCTCAGT <u>TCG</u> ACCATCGCTGCTCTCC 3' |
| | <i>SalI</i> |
| R-H97A | 5' GGAGAGCAGCGATGGT <u>TCG</u> ACTGAAGTTGTAGAACTC <u>GGC</u> ATTCCC 3' |
| | <i>SalI</i> |
| F-T112A | 5' CTTATCGTGAAGAACTAC <u>GCTGG</u> CGATCGTCTCAACTTCGGCCTG 3' |
| | <i>PvuI</i> |
| R-T112A | 5' CAGGCCGAAGTTGAGACGATCGCC <u>AGC</u> GTAGTTCTTCACGATAAG 3' |
| | <i>PvuI</i> |
| F-D401A | 5' CACCTGAATGCTTCTAGACCGTGCTGCTGGT <u>GCT</u> GGCGACTGTGGC 3' |
| | <i>XbaI</i> |
| R-D401A | 5' GCCACAGTCGCC <u>AGC</u> ACCAGCAGCACGGTCTAGAGCATTTCAGGTG 3' |
| | <i>XbaI</i> |
| F-D403A | 5' GGTGACGGC <u>GCT</u> GCGGCACCACCCACTTCTCGAGCGGCCAGAGC 3' |
| | <i>XhoI</i> |
| R-D403A | 5' GCTCTGGCCGCTCGAGAGTGGGTGGTGCCGCAG <u>GG</u> CGCCGTCACC 3' |
| | <i>XhoI</i> |
| F-C404A | 5' CTGGTGACGGCGAC <u>GCT</u> GGAACCACCCACTTCTCGAGCGGCCAGAG 3' |
| | <i>XhoI</i> |
| R-C404A | 5' CTCTGGCCGCTCGAGAGTGGGTGGTTCC <u>AGC</u> GTCGCCGTCACCAG 3' |
| | <i>XhoI</i> |
| F-S446A | 5' CTCCTCGAGAAGATGGGAGGC <u>G</u> CATCTGGGGCGCTCTATGGCCTG 3' |
| | <i>XhoI</i> |
| R-S446A | 5' CAGGCCATAGAGCGCCCCAGAT <u>G</u> CCCTCCCATCTTCTCGAGGAG 3' |
| | <i>XhoI</i> |
| F-D556A | 5' CAGCACGGCTCGAGCAGCCAG <u>CA</u> CCCGGGGCGGTGGCAGCTGC 3' |
| | <i>XhoI</i> |
| R-D556A | 5' GCAGCTGCCACCGCCCCGGG <u>TG</u> CTGGCTGCTCGAGCCGTGCTG 3' |
| | <i>XhoI</i> |
| F-Nterm | 5' CATCTCGAATT CCATGACCTCCAAGAAGCTG 3' |
| | <i>EcoRI</i> |
| R-Nterm | 5' AGTAGCGTCTGACTCA CACGTTAGGCCAGGCTGCTGC 3' |
| | <i>SalI stop</i> |
| F-Cterm | 5' CCGCATGGATCC GAGGCCCTGATTCCACTGCTGC 3' |
| | <i>BamHI</i> |
| R-Cterm | 5' TTACAGGAATT CCTAGCTCTGCAAGACCTCCAAG 3' |
| | <i>EcoRI</i> |

Figura 59: Cebadores utilizados en este trabajo. Los cebadores F-H97A y R-H97A fueron usados en la obtención del mutante H97A-ADPRibasa-Mn de *D. rerio*. Los restantes fueron usados en la obtención de las variantes de hTKFC. Las letras F y R designan los cebadores hacia adelante (*forward*) y reverso (*reverse*), respectivamente. En negrita se presentan los cambios de nucleótidos que se realizaron respecto a la secuencia original codificadora de la proteína salvaje. Estos cambios producen el cambio del aminoácido deseado (en cursiva y subrayado), o introducen un sitio de restricción sin que conlleve cambio de aminoácido (subrayado). Los cebadores diseñados para los mutantes puntuales incluyen un sitio de restricción que permite comprobar que clones llevan también el cambio puntual de aminoácido. Los cebadores diseñados para la construcción de los dominios N- y C-terminales incluyen un sitio de restricción que permite insertarlos en el vector que contiene los mismos sitios de restricción.

en agar-LB con X-gal e IPTG. Se extrajo el DNA de varios clones obtenidos y se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. El producto de digestión se insertó ahora en el vector pGEX-6P3, obteniéndose el plásmido pGEX6P3-Cterm-hTKFC. Este plásmido codifica los aminoácidos 359-575 de hTKFC precedidos por los aminoácidos LEVLFQ↓GPLGS (como arriba, el subrayado marca la secuencia reconocida por la proteasa PreScission y la flecha su punto de corte).

3.2.3 Secuenciación de los plásmidos mutados

La corrección de todas las construcciones preparadas por mutagénesis (mutantes puntuales y truncados) se comprobó por secuenciación de las dos cadenas del inserto. En todos los casos se confirmó la presencia de la mutación deseada en ausencia de cambios indeseados. Todas las secuenciaciones se hicieron por encargo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (IIB), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), en Madrid. Las secuenciaciones se hicieron en un secuenciador automático ABI-Prism 377. La confirmación de las secuencias nucleotídicas mutadas y sus traducciones pueden encontrarse en las Figuras 60–62.

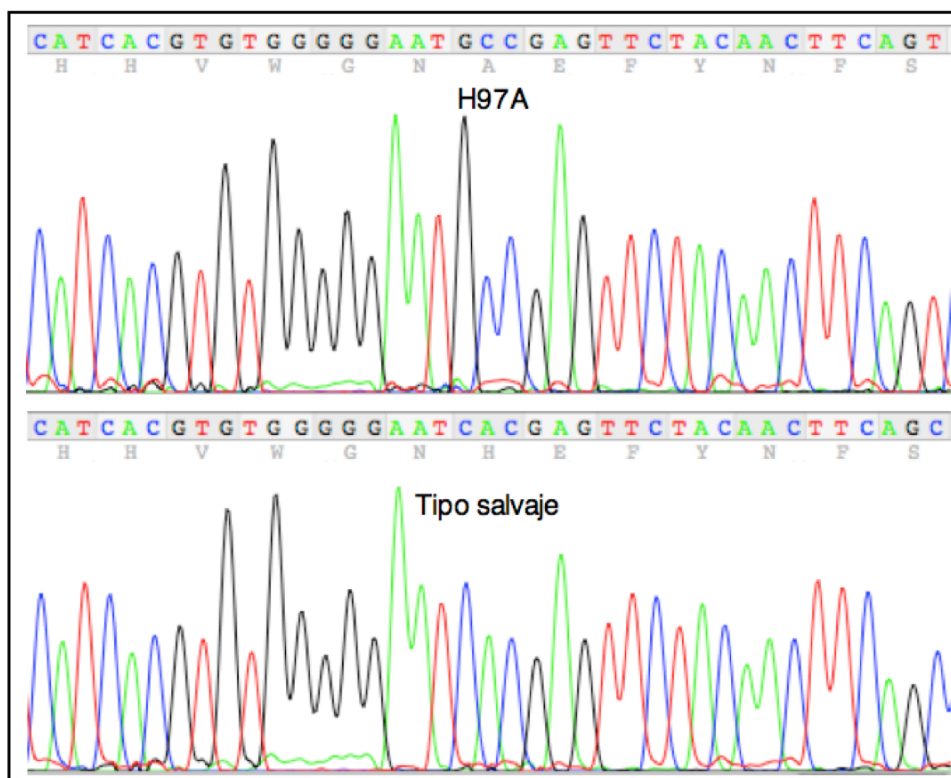
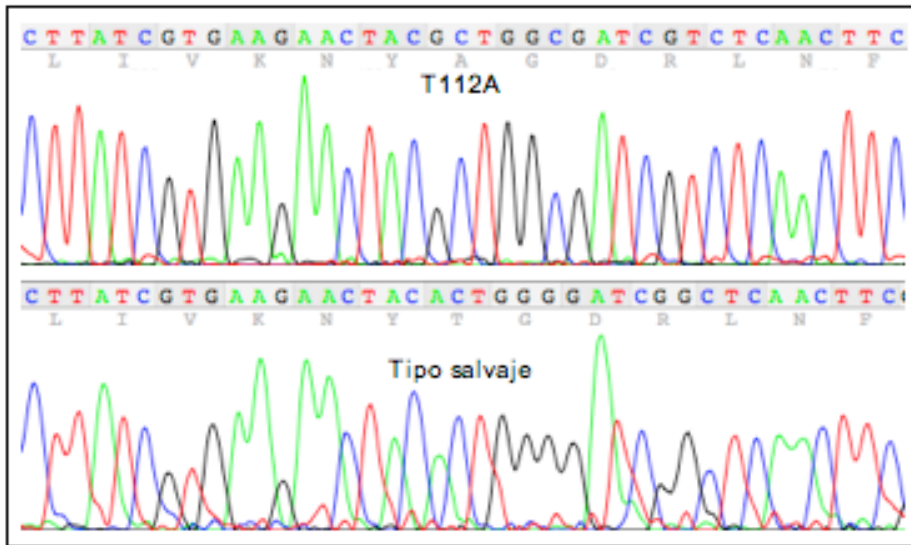
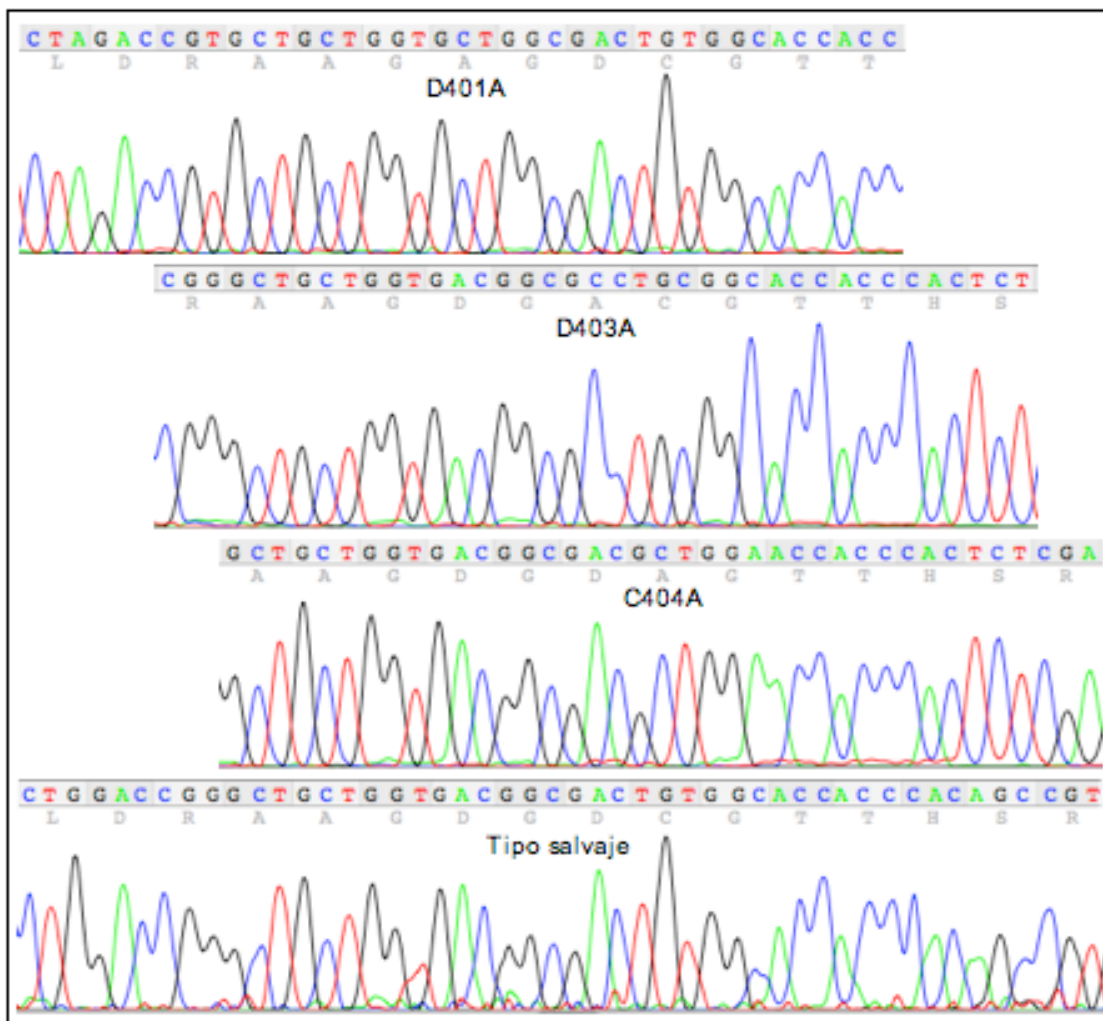


Figura 60: Secuenciación de las secuencias codificadoras del mutante puntual H97A de la ADPRibasa-Mn de *Danio rerio*.

A



B



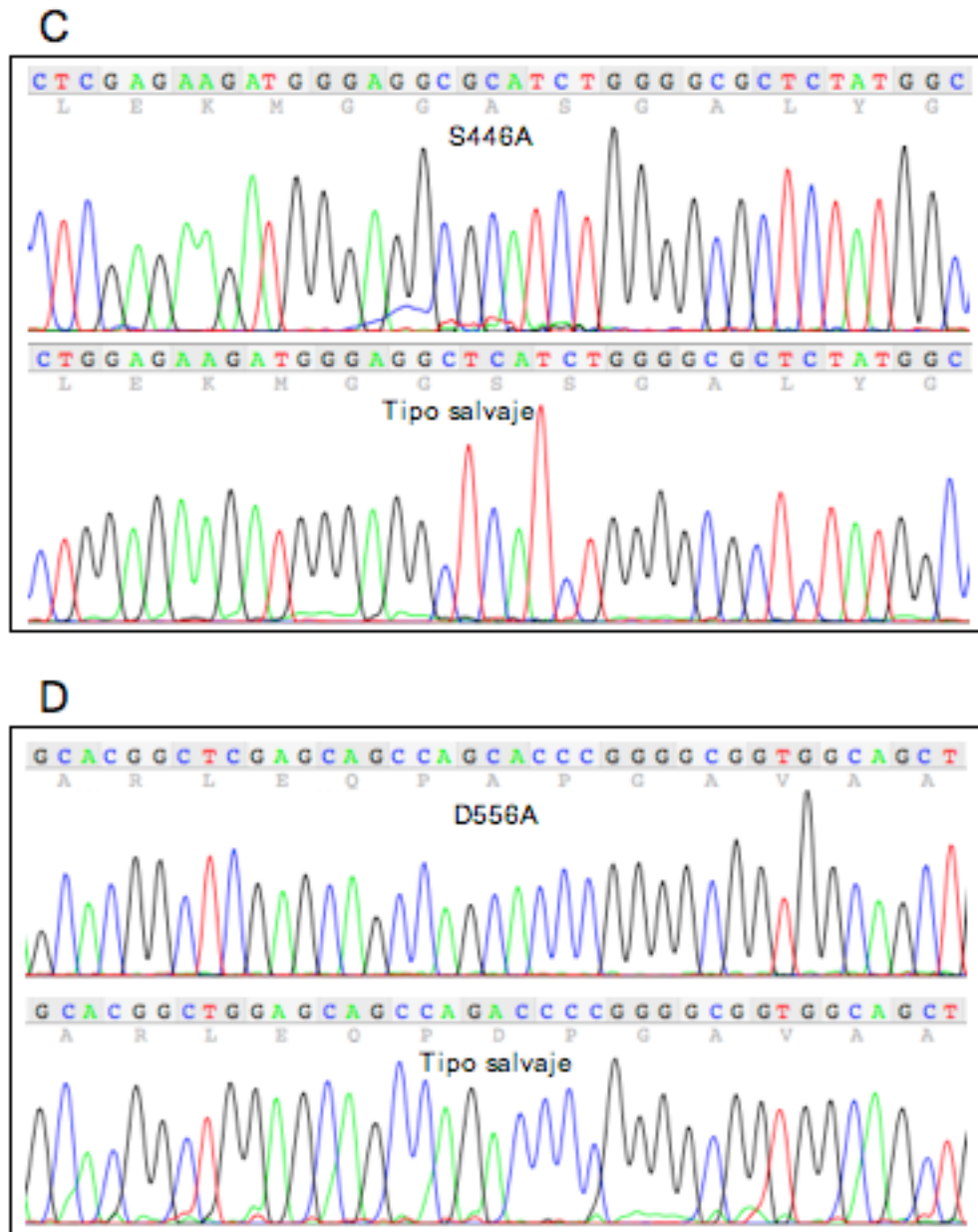


Figura 61: Secuenciación de las secuencias codificadoras de los mutantes puntuales de hTKFC.

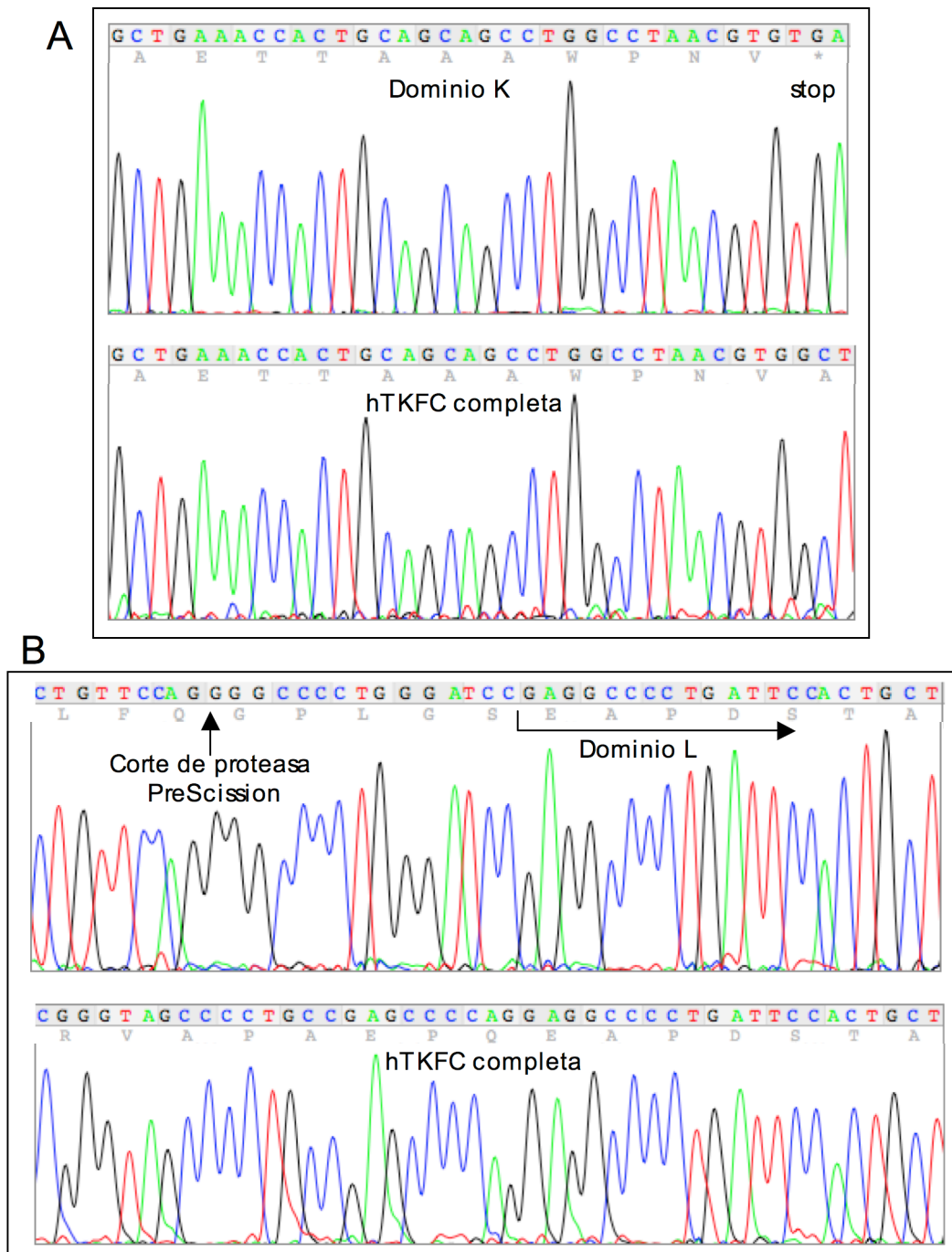


Figura 62: Secuenciación de las secuencias codificadoras de los dominios K y L de hTKFC.

3.3 Expresión de proteínas recombinantes

En este trabajo se expresaron la ADPRibasa-Mn de rata, la proteína salvaje y el mutante H97A de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, así como la proteína salvaje, los seis mutantes puntuales y los dominios N- y C-terminales de la hTKFC. Para obtener cada una de estas proteínas, se aisló una colonia de células *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido correspondiente y crecida sobre agar LB con 0,1 mg/ml de ampicilina. Estas colonias se inocularon en 10 ml de medio líquido LB con 0,1 mg/ml de ampicilina (amp-LB) y se incubaron durante una noche a 37°C. Cinco ml de los cultivos así obtenidos fueron inoculados en 100 ml de amp-LB, continuando su crecimiento a 30°C (ADPRibasa-Mn y sus mutantes) o a 27°C (hTKFC y sus mutantes) hasta que el valor de la absorbancia a 600 nm llegó a 0,6-0,8. En esas condiciones se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para una inducción de 2 horas a la misma temperatura. Las células fueron precipitadas por centrifugación a 9000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga Sorvall con rotor SS-34, y se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis (sección 3.1.6) que contenían además, disuelta, una tableta de un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete™, libre de EDTA). En algunas ocasiones se procesaron juntos dos cultivos de 100 ml y las células se resuspendieron en 20 ml del mismo tampón. Las células resuspendidas se lisaron por ultrasonidos, en hielo, a 170 W con pulsos de 0,1 segundo por segundo, durante 5 min (repetidos 3 veces a intervalos de 5 min). El lisado obtenido se centrifugó a 15000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para purificar la proteína fusión y el precipitado se resuspendió en 10 ml ó 20 ml de tampón de lisis para fines analíticos.

3.4 Purificación de proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas expresadas en *E. coli* sigue distintos protocolos, dependiendo del tipo de plásmido usado, pGEX-6P-3 para la ADPRibasa de rata y las variantes de hTKFC, y pVP16 para las proteínas de *D. rerio* ADPRibasa-Mn y H97A-ADPRibasa-Mn.

3.4.1 Proteínas expresadas desde plásmidos pGEX-6P-3 como fusiones con la etiqueta GST

Para la purificación y obtención de las proteínas recombinantes separadas de la etiqueta GST, el sobrenadante del lisado bacteriano (cerca de 10-20 ml; sección 3.3) fue aplicado a una columna de afinidad con matriz de GSH-Sepharose (1,5 ml), previamente equilibrada en tampón de lisis (sección 3.1.6). La columna fue después lavada con 10-15 volúmenes de tampón de lavado 1 (sección 3.1.6) hasta que el valor de A_{280} se hacía despreciable. Se aplicaron entonces 40 μ l de proteasa PreScission™ en 3 ml de tampón de lavado y se detuvo la columna durante 12 h, manteniéndola a 4°C, para permitir la separación proteolítica de la etiqueta GST y la proteína deseada. Después de la incubación, el producto

específico de la proteólisis intra-columna se eluyó con 5 ml del mismo tampón, recogándose fracciones de 1 ml que contenían la proteína purificada, generalmente en las dos primeras fracciones. Las proteínas recombinantes así obtenidas se conservaron congeladas a -80°C en alícuotas de 20-50 μl , en tubos eppendorf de baja adsorción de proteínas.

La columna de afinidad fue regenerada haciendo pasar sucesivamente 2-3 vol. de GSH 10 mM, 1-2 vol. de agua, 2 vol. de NaOH 0,1 M, agua nuevamente hasta que el pH volvía a ser neutro, y finalmente 15 volúmenes de tampón de lisis para equilibrar la columna de nuevo.

3.4.2 Proteínas expresadas desde plásmidos pVP16 como fusiones con las etiquetas polihistidina y MBP

Para la purificación y obtención de estas proteínas recombinantes separadas de las etiquetas de polihistidina y MBP, las proteínas fusión se purificaron por cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados (IMAC). Veinte mililitros del sobrenadante del lisado bacteriano (sección 3.3) fueron aplicados a una columna con 10 ml de *HIS-Select Nickel Affinity Gel* equilibrada en tampón de lavado 2 (sección 3.1.6). La columna fue después lavada con 10 volúmenes del mismo tampón hasta que el valor A_{280} se hacía despreciable. Después, la columna se eluyó con un gradiente lineal de 100 ml de 0-250 mM de imidazol en tampón de lavado, recogándose fracciones. Las fracciones que contenían la actividad enzimática que había sido fuertemente retenida se juntaron (unos 24 ml) y se concentraron hasta 1 ml por ultrafiltración (membrana DIAFLO PM-30; Amicon). La preparación concentrada se diluyó 10 veces en tampón de proteasa TEV (sección 3.1.6) y se repitió la ultrafiltración. A la muestra resultante (~ 2 ml) se añadieron 50 μl de proteasa TEV diluidos en 100 μl de tampón de proteasa TEV 20x y 20 μl de DTT 100 mM, incubándose después a 15°C durante la noche. Después, esta mezcla de incubación se diluyó hasta 8 ml y se aplicó otra vez a la columna IMAC, que se lavó a continuación con 5 volúmenes de tampón de lavado 2. En estas condiciones, las proteínas recombinantes quedaron ligeramente retenidas aunque estaban desprovistas de las etiquetas poli-histidina y MBP. Para eluir las, la columna se lavó con un gradiente lineal de 100 ml de 0-250 mM de imidazol en tampón de lavado. La actividad se recogió en las primeras fracciones del gradiente, las cuales se reunieron, y las proteínas recombinantes obtenidas de esta forma se conservaron congeladas a -80°C en alícuotas de 20-50 μl , en tubos eppendorf de baja adsorción de proteínas. La obtención de una proteína del tamaño esperado se comprobó por SDS-PAGE.

La identidad de la ADPRibasa-Mn de tipo salvaje de *D. rerio* se confirmó además por su huella peptídica tríptica (Unidad de Proteómica, Universidad Complutense y Parque Científico de Madrid, Madrid) que cubría con un alto grado de confianza un 69% de la secuencia aminoacídica de la proteína, incluyendo un péptido N-terminal de 27 aminoácidos que comenzaba por Ser y que confirmó el corte de la proteína fusión por la proteasa TEV.

3.4.3 Determinación de la concentración de proteína

Para determinar la concentración total de proteína en las preparaciones de ADPRibasa-Mn y hTKFC y de sus variantes se empleó el reactivo de Bradford [178] diluido en agua en la proporción de 1:2. En este procedimiento se emplearon muestras de diversos

volúmenes de enzima que se diluyeron hasta un volumen de 300 μl en el tampón de preparación de la enzima. A cada muestra se añadieron 450 μl de reactivo de Bradford diluido y se midió la absorbancia a 595 nm después de 20 min a temperatura ambiente. La concentración de proteína se determinó mediante una curva patrón con 10, 20, 30, 40, 50 y 60 μl de BSA 0,1 mg/ml (diluido hasta 300 μl en el tampón de la enzima).

3.5 Electroforesis en gel

3.5.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para las electroforesis de DNA se prepararon geles de agarosa al 1% en tampón TAE (sección 3.1.6) con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Las muestras aplicadas, de 9 μl , fueron previamente mezcladas con 1 μl de 10x tampón de muestra para geles de agarosa (sección 3.1.6). La electroforesis se desarrolló a 65 mA, con el gel inmerso en tampón TAE, hasta que la migración de las bandas fue satisfactoria.

3.5.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Se emplearon geles de 8,2 cm de anchura, 5,5 cm de altura y 0,75 mm de espesor. Cada uno de ellos consistió en un sistema discontinuo compuesto por un gel separador (inferior) con una altura de 4,5 cm y un gel concentrador (superior) con una altura de 1 cm. Para preparar el gel separador se empleó una disolución conteniendo 90 g/l de acrilamida; 2,4 g/l de *bis*-acrilamida; Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; 1 g/l de SDS; 0,75 g/l de persulfato amónico y 0,05% (vol./vol.) de TEMED. Para preparar el gel concentrador se empleó una disolución que incluía 37 g/l de acrilamida; 1 g/l de *bis*-acrilamida; Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; 1 g/l de SDS; 0,75 g/l de persulfato amónico y 0,06% (vol./vol.) de TEMED. Las muestras aplicadas en los geles contenían 4 μl de tampón de muestra para SDS-PAGE, 2 μl de DTT 1 M y 14 μl de preparación proteica. Las muestras se incubaron 2 min a 100°C antes de aplicarlas. En los depósitos de la cubeta de electroforesis se empleó tampón para SDS-PAGE (sección 3.1.6). La electroforesis se realizó a 30 mA durante aproximadamente 1 h. Los geles se revelaron por tinción con 1 g/l de Coomassie Blue en 50% (vol./vol.) de metanol y 10% (vol./vol.) de ácido acético durante 1 h, seguida de un lavado con una disolución de metanol (10%) y ácido acético (10%) durante varias horas, hasta conseguir una imagen satisfactoria.

Para obtener la huella peptídica de la ADPRibasa-Mn de tipo salvaje de *D. rerio* la proteína se aisló a partir de geles de SDS-PAGE preparados y tratados como los anteriores excepto que en la disolución de tinción se omitió el ácido acético.

3.6 Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)

En estos experimentos se emplearon columnas de Kromasil 100 (Teknokroma) de 150 mm x 4 mm, protegida por una pre-columna de 10 mm x 4 mm del mismo material. Las muestras se introdujeron en el sistema cromatográfico mediante un inyector manual preparado para dosificar 20 μ l. Los cromatogramas obtenidos fueron almacenados en soporte informático y analizados con el programa HP ChemStation de Hewlett-Packard. Se emplearon distintos métodos cromatográficos dependiendo del tipo de separación.

Método 1. Este método se empleó para analizar los productos formados por la ADPRibasa-Mn con todos los sustratos nucleotídicos estudiados excepto cADPR. En la fase móvil se usaron dos tampones de elución: (A) fosfato de sodio 5 mM, pH 7,0, tetrabutilamonio 20 mM y metanol a una concentración final de 10% (vol./vol.); (B) igual al tampón A pero con fosfato de sodio 100 mM. Antes de cada cromatografía, la columna estaba equilibrada con tampón A. La elución se hizo a un flujo de 1 ml/min con un gradiente lineal de 10 min de fosfato 5-100 mM, seguido de un lavado isocrático con tampón B. Los cromatogramas fueron registrados a una longitud de onda de 260 nm.

Método 2. Este método se empleó para analizar las mezclas de reacción con FAD y su conversión a cFMN. La fase móvil consistió en un lavado isocrático de 4,5 min a 0,4 ml/min con 10 mM de fosfato sódico, pH 7 y metanol a una concentración final de 40% (vol./vol.). Los cromatogramas fueron registrados a una longitud de onda de 430 nm.

Método 3. Este método se utilizó para la purificación de cADPR. La columna se equilibró en agua, y una muestra de 15 μ l de cADPR tratada para degradar la ADP-ribosa contaminante (sección 3.1.3) se inyectó en el cromatógrafo, con un flujo de 0,5 ml/min de agua y lectura de absorbancia a 260 nm y a 310 nm. La cADPR, con un tiempo de retención de 4 min, se recogió a la salida del cromatógrafo.

Método 4. Este método se empleó para seguir la conversión de cADPR en pRib-AMP por la ADPRibasa-Mn. En la fase móvil se usaron dos tampones de elución: (C) fosfato de sodio 33,5 mM, pH 8,5, tetrabutilamonio 20 mM y metanol a una concentración final de 10% (vol./vol.); (D) igual al tampón C pero con fosfato de sodio 62 mM. Antes de cada cromatografía, la columna estaba equilibrada con tampón C. La elución se hizo a un flujo de 1 ml/min con un gradiente lineal de 10 min de fosfato 33,5-62 mM, seguido de un lavado isocrático con tampón D. Los cromatogramas fueron registrados simultáneamente a longitudes de onda de 260 nm y 310 nm, aunque en algunas ocasiones el detector de diodos se programó para registrar espectros de absorción ultravioleta-visible completos. El uso de la fase móvil a pH 8,5 permitió la detección específica de compuestos que contenían N^1 -(ribosil)-adenosina (Rib-Ado), como cADPR y pRib-AMP (Figura 6), ya que a pH 8,5 (pero no, por ejemplo, a pH 7) las disoluciones de estos compuestos presentan valores de ϵ_{310} mucho mayores que los simples derivados de adenosina, como ADP-ribosa o AMP [39,40,41] (Figura 7).

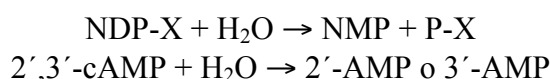
Método 5. Este método se empleó para seguir la conversión de ADP-glucosa en adenosina por la actividad liasa ciclante de la hTKFC y algunas de sus variantes, en mezclas de reacción suplementadas con fosfatasa alcalina para desfosforilar el producto de reacción AMP. La fase móvil consistió en un lavado isocrático de 8 min a 1 ml/min con 19 mM de fosfato sódico, pH 7,0; tetrabutilamonio 20 mM y metanol al 20% (vol./vol.). Los cromatogramas fueron registrados a una longitud de onda de 260 nm.

3.7 Valoraciones enzimáticas

Todos los ensayos enzimáticos se realizaron a 37°C, en condiciones en que la actividad enzimática medida era lineal con el tiempo de reacción y con la cantidad de enzima. Se incubaron y analizaron blancos con y sin sustrato y/o enzima. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de transformar 1 μmol de sustrato/min en las condiciones del ensayo.

3.7.1 Actividades fosfohidrolasa de la ADPRibasa-Mn

Con los sustratos sin fosfatos terminales tipo NDP-X o 2',3'-cAMP, que no son susceptibles de hidrólisis por la actividad fosfomonoesterasa de la fosfatasa alcalina, la actividad de la ADPRibasa-Mn se midió valorando colorimétricamente el fosfato liberado, a partir de los productos de reacción, con un ensayo acoplado a la fosfatasa alcalina [4,5]. Las reacciones estudiadas por este método eran de uno de los tipos siguientes:



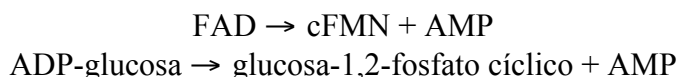
Los productos de estas dos reacciones son sustratos de la fosfatasa alcalina, que libera fosfato. En las condiciones estándar de este método, las mezclas de reacción contenían Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, BSA 0,1 mg/ml, MnCl₂ 5 mM, 500 μM de sustrato, 1,5 μg/ml de fosfatasa alcalina (5,5 unidades/ml) y una cantidad apropiada de enzima. Cuando el experimento lo requería se emplearon distintas condiciones de pH, concentración de sustrato, concentración de Mn²⁺ y/o sustitución de éste por Mg²⁺ u otros iones, adición de posibles inhibidores, etc. Las mezclas se incubaron durante períodos de tiempo programados a conveniencia. La reacción se detenía añadiendo un reactivo de SDS-ascorbato-molibdato (6 volúmenes de heptamolibdato amónico 3,4 mM en H₂SO₄ 0,5 M, 1 vol. de ácido ascórbico 570 mM y 1 vol. de SDS 130 mM). Además de detener la reacción enzimática, este reactivo reaccionaba con el fosfato formando un complejo coloreado, y después de 20 min a 45°C se medía A₈₂₀, para determinar la concentración de fosfato generado por comparación con patrones de concentración conocida. La velocidad de reacción se calculaba tomando como referencia la estequiometría de que 1 mol de sustrato hidrolizado daba lugar a 2 mol (NDP-X) o a 1 mol de fosfato (2',3'-cAMP).

Para valorar la actividad fosfohidrolasa sobre ADP se omitió la fosfatasa alcalina en la mezcla de reacción, midiéndose el fosfato liberado directamente por la ADPRibasa-Mn (1 mol de fosfato por mol de ADP hidrolizado).

Para valorar la actividad fosfohidrolasa sobre cADPR (cADPR + H₂O → pRib-AMP; Figura 8), en la mayoría de los experimentos se midió por HPLC el consumo de cADPR y la formación de pRib-AMP (sección 3.6, método 4), aunque ocasionalmente se empleó también el método acoplado a fosfatasa alcalina arriba descrito. La velocidad de reacción se calculaba tomando como referencia las áreas de los picos (A₂₆₀) correspondientes a sustrato y producto que, en las condiciones de los análisis, presentan igual coeficiente de extinción molar.

3.7.2 Actividades de tipo liasa ciclante

Las actividades liasa ciclante de la hTKFC y sus variantes, sobre FAD y ADP-glucosa, correspondientes a las reacciones:



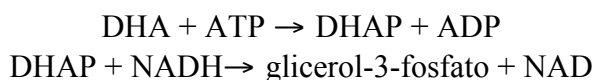
se valoraron midiendo por HPLC la conversión de FAD en cFMN o la de ADP-glucosa en AMP.

Las mezclas de reacción para medir la actividad FMN ciclasa contenían, además de enzima, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; FAD 100 μM , MnCl_2 6 mM y BSA 1 mg/ml. Cuando el experimento lo requería se emplearon distintas concentraciones de FAD, y/o se añadieron posibles inhibidores. Las mezclas se preincubaron durante 10 min a 37°C, antes de iniciar la reacción por adición del sustrato a partir de una disolución concentrada también preincubada a 37°C. Se tomaron periódicamente fracciones alícuotas de 100 μl que fueron inmediatamente mezcladas con 20 μl de EDTA 0,2 M, incubadas en un baño a ebullición durante 2 min, enfriadas en agua y hielo y centrifugadas 5 min a 11000 rpm. Los sobrenadantes se mantuvieron congelados a -20°C hasta el momento de analizarlos por HPLC (sección 3.6, método 2). La velocidad de reacción se calculaba tomando como referencia la cantidad de cFMN formado, teniendo en cuenta las áreas relativas de los picos del producto y del sustrato que, en todos los casos y en las condiciones de los análisis, presentan igual coeficiente de extinción molar.

La actividad liasa ciclante sobre ADP-glucosa se valoró en mezclas de reacción iguales que las anteriores salvo que se empleó ADP-glucosa en lugar de FAD y que se suplementaron con fosfatasa alcalina para convertir el producto AMP en adenosina, pues este nucleósido se separa mejor de la ADP-glucosa por HPLC que el propio AMP (sección 3.6, método 5). La velocidad de reacción se calculaba tomando como referencia la cantidad de adenosina formada, teniendo en cuenta las áreas relativas de los picos del producto y del sustrato, que presentan igual coeficiente de extinción molar.

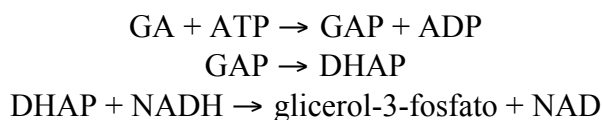
3.7.3 Actividades de tipo quinasa

El procedimiento estándar para valorar la actividad DHA quinasa de hTKFC y de sus variantes consistió en un ensayo acoplado a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa como enzima auxiliar indicadora. En esta secuencia de reacción, por cada mol de DHA fosforilado, se oxida un mol de NADH a NAD, lo que ocasiona una disminución del valor de A_{340} ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$):



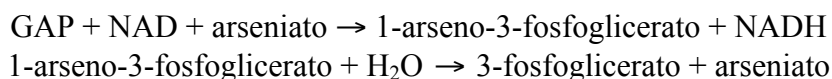
Siguiendo este procedimiento, y dependiendo de las circunstancias de cada experimento, se emplearon mezclas de reacción de diferente composición. Las mezclas de reacción estándar (vol. 0,6 ml) contenían Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NADH 0,18 mM, MgCl₂ 10 mM, DHA 0,5 mM, ATP 5 mM, 2,8 U/ml de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, BSA 0,1 mg/ml y la cantidad adecuada de hTKFC o una de sus variantes. La reacción era iniciada por adición de DHA, registrándose antes y después la absorbancia a 340 nm (A_{340}) para calcular la velocidad de reacción a partir de la pendiente lineal negativa registrada. Cuando el experimento lo requería se emplearon distintas concentraciones de sustrato, y/o ATP y se añadieron posibles inhibidores.

El método estándar para la valoración de la actividad GA quinasa de hTKFC y sus variantes consistió en un ensayo acoplado a las enzimas triosa fosfato isomerasa y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, utilizadas como enzimas auxiliares. En esta secuencia de reacción, por cada mol de GA fosforilado, se oxida un mol de NADH a NAD, lo que ocasiona una disminución del valor de A_{340} ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$):



El procedimiento es similar al usado para valorar la actividad DHA quinasa, salvo por la inclusión de la triosa fosfato isomerasa que cataliza la reacción intermedia. Las mezclas de reacción estándar (volumen 0,6 ml) contenían Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NADH 0,18 mM, MgCl₂ 10 mM, GA 0,5 mM, ATP 5 mM, 2,8 U/ml de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, 15 U/ml triosa fosfato isomerasa, BSA 0,1 mg/ml y la cantidad adecuada de hTKFC o una de sus variantes. La reacción era iniciada por adición de GA, registrándose antes y después A_{340} para calcular la velocidad de reacción a partir de la pendiente lineal negativa registrada. Cuando el experimento lo requería se emplearon distintas concentraciones de sustrato, y/o ATP y se añadieron posibles inhibidores.

No obstante, el procedimiento de ensayo anterior, acoplado a triosa fosfato isomerasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, no es válido para estudiar la inhibición de la actividad GA quinasa por DHA, pues ambos compuestos reaccionan como sustratos con la DHA quinasa y los dos productos de fosforilación, GAP y DHAP, darían lugar a consumo de NADH. Por ello, para este tipo de experimentos se empleó un método de ensayo distinto en el que sólo la actividad GA quinasa da una señal medible. Este método consiste en el acoplamiento de la actividad GA quinasa, productora de GAP, a la reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en presencia de arseniato (en lugar de fosfato):



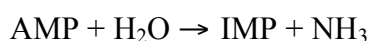
En esta secuencia de reacción, por cada mol de GA fosforilado, se reduce un mol de NAD a NADH enzimáticamente, lo que ocasiona un aumento del valor de A_{340} ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La hidrólisis del 1-arseno-3-fosfoglicerato es una reacción no enzimática que tiene lugar rápidamente y que garantiza la irreversibilidad de la secuencia de reacción [179]. En este procedimiento, las mezclas de reacción contenían Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NAD 0,5 mM, MgCl₂ 10 mM, GA 0,5 mM, ATP 5 mM, arseniato sódico 5 mM, 4,5 U/ml de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, BSA 0,1 mg/ml y la cantidad adecuada de hTKFC o una de sus variantes. La reacción de la hTKFC en este sistema era iniciada por la adición de ATP,

registrándose antes y después A_{340} . La pendiente lineal positiva registrada se usó para calcular la velocidad inicial de reacción. Obsérvese que, siguiendo este procedimiento, aunque hTKFC genere DHAP por fosforilación de DHA, esta reacción no es detectada por el sistema auxiliar.

3.7.4 Valoraciones enzimáticas de AMP y D-ribosa-5-fosfato

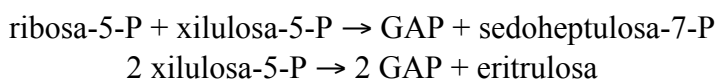
Estos dos compuestos se forman por hidrólisis de pRib-AMP, y se valoraron para demostrar la formación de éste por la acción de ADPRibasa-Mn sobre cADPR (sección 1.2.3).

El AMP se valoró con AMP desaminasa en un ensayo a punto final. Las muestras a analizar se incluyeron en mezclas de reacción de un volumen final de 0,6 ml que contenían además citrato sódico 10 mM, pH 6,5, y KCl 33 mM. Se registró la línea base de absorbancia a 265 nm y la valoración se inició por adición de 1 μ l de AMP desaminasa recién preparada (100 mg/ml en KCl 1 M) y se registró el descenso de A_{265} concomitante con la conversión de AMP en IMP ($\epsilon = 8100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) según la reacción



hasta que se alcanzó una nueva línea base. El aumento de A_{265} debido a la enzima se determinó mediante una segunda adición. La diferencia de A_{265} entre las líneas base anterior y posterior a la primera adición de AMP desaminasa, corregida con la diferencia debida a la segunda, se empleó para calcular la concentración de AMP.

La D-ribosa-5-fosfato se valoró mediante un ensayo cinético de su reacción con D-xilulosa-5-fosfato 35 μ M, catalizada por la transcetolasa. Las muestras a analizar se incluyeron en mezclas de reacción de 0,6 ml que contenían además: glicilglicina 25 mM, pH 7,3, MgCl_2 5 mM, pirofosfato de tiamina 0,22 mM, arseniato sódico 5 mM, NAD 1 mM, 0,1 mg/ml de BSA, 5 μ g/ml de transcetolasa (disuelta en glicilglicina 250 mM, pH 7,3) y 60 mU de D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (previamente valorada en estas condiciones con D-gliceraldehído-3-fosfato 80 μ M como sustrato). La transcetolasa forma un mol de GAP por mol de D-xilulosa-5-fosfato, ya sea por reacción monosustrato o bisustrato con D-ribosa-5-fosfato [180,181]



En el ensayo, la formación de GAP estaba acoplada a su oxidación dependiente de arseniato y NAD, catalizada irreversiblemente por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ver sección 3.7.3). En las condiciones descritas, la velocidad inicial de reducción de NAD, puesta en marcha por adición de D-xilulosa-5-fosfato y registrada por el aumento de absorbancia a 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se relacionaba linealmente con la concentración de D-ribosa-5-fosfato (hasta 25 μ M) presente en la mezcla de reacción. Por lo tanto, la concentración de D-ribosa-5-fosfato se valoró empleando volúmenes de muestra que debían dar, en la mezcla de reacción, concentraciones de analito dentro de los límites de respuesta lineal del sistema. Las medidas se hicieron siempre frente a una gráfica de calibrado obtenida en la misma sesión de trabajo con concentraciones estándar de D-ribosa-5-fosfato 0–25 μ M. Se comprobó que, en este sistema, la D-ribosa no reaccionaba, pues la adición de este azúcar a mezclas de reacción

sin D-ribosa-5-fosfato, hasta una concentración de 1 mM, no cambió la pendiente registrada a 340 nm en presencia de xilulosa-5-fosfato.

Todas las muestras y estándares se ensayaron en duplicado en cada experimento. La preparación de las muestras para los ensayos de AMP y D-ribosa-5-fosfato llevaba consigo su incubación durante 15 min en un baño de agua hirviendo, por lo tanto se evaluó la recuperación de dichos compuestos después de aplicar el tratamiento a estándares de concentración conocida, encontrándose que se recuperaba $101 \pm 1\%$ de AMP, pero sólo $63 \pm 2\%$ de D-ribosa-5-fosfato ($n = 3$). Así pues, las cifras de D-ribosa-5-fosfato obtenidas en el ensayo cinético fueron corregidas teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación.

3.8 Preparación de modelos moleculares de proteínas

Los modelos tridimensionales de proteínas pueden tener origen experimental o teórico. Las estructuras de origen experimental, mayoritariamente obtenidas por cristalografía de rayos X, suelen estar disponibles en el *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org>; [182]). Las estructuras de origen teórico son generalmente obtenidas por modelado por homología y pueden encontrarse en bases de datos tales como *SWISS-MODEL Repository* [52] o *ModBase* [150]. En esta Tesis hemos partido, para diversos propósitos, de estructuras experimentales y teóricas obtenidas de bases de datos. Todas ellas presentaban algunas anomalías o estaban incompletas, y parte de nuestro trabajo se dedicó a corregirlas o completarlas en diverso grado empleando técnicas de modelado, en la mayor parte de los casos por homología, pero en otros por modelado *de novo*. Para estas tareas se empleó el programa *Modeller* (versión 9.5) [44], ya que en un estudio comparativo de distintos programas de modelado por homología, este programa resultó ser uno de los más efectivos [183]. En todas las preparaciones de modelos, se instruyó a *Modeller* para que generara 200-500 estructuras posibles y se seleccionó la mejor, empleando para ello la función de evaluación *DOPE* (*Discrete Optimized Protein Energy*) [184], salvo que se indique otra cosa. Puesto que *Modeller* crea estructuras sin átomos de hidrógeno, éstos fueron añadidos posteriormente con el programa *Reduce* [185] para obtener modelos completos (*all-atom*). Con el mismo programa se determinó el estado de protonación más probable de los residuos de histidina, al mismo tiempo que todos los residuos de aspartato, glutamato, lisina y arginina fueron considerados como ionizados.

En todos los casos, la forma estándar de representar las estructuras de partida y las obtenidas por modelado fueron archivos en formato PDB, que contienen, entre otras cosas, la identificación de todos los átomos y sus coordenadas cartesianas. La herramienta empleada en general para visualizar estos archivos PDB como modelos moleculares fue el programa *VMD* [38]. Para los experimentos de *docking* con el programa *AutoDock* (sección 3.9), en lugar de emplear archivos PDB, fue necesario usar archivos en formato PDBQT que contienen además, para cada átomo, su carga eléctrica parcial y su clasificación por tipos según un código alfabético, datos que *AutoDock* necesita. La obtención de archivos PDBQT a partir de archivos PDB se hizo con la ayuda de *ADT* [186], programa que hace los cálculos necesarios. En sentido inverso, los resultados de simulaciones de *docking* obtenidos en forma de archivos PDBQT fueron finalmente convertidos a ficheros PDB, que es el formato usado más frecuentemente.

3.8.1 Preparación de un modelo de la ADPRibasa-Mn de rata

Con la ADPRibasa-Mn de rata se realizaron simulaciones de unión de ligandos y de dinámica molecular. Para estos fines, preparamos un modelo de esta proteína partiendo de un modelo teórico disponible en *SWISS-MODEL Repository* con el código de acceso Q5M886, que fue modificado por nosotros para los propósitos mencionados. Dicho modelo teórico está basado en la estructura cristalina de la proteína ortóloga del pez cebra, *Danio rerio* (PDB ID 2NXF), determinada por difracción de rayos X [35,90]. La proteína 2NXF, usada como molde, tiene 322 residuos, pero ocho de ellos faltan en el archivo PDB por no haber sido resueltos en el análisis cristalográfico: dos son residuos N-terminales, Ser¹ y Glu², y seis (117-122) están en un lazo que precede a la segunda hoja β (sección 3.8.2). En cambio, en el modelo teórico de la ADPRibasa-Mn de rata (Q5M886), dicho lazo está presente, siendo incluso mayor que en la proteína molde. Aunque en la base de datos no se encuentra información específica sobre este aspecto, suponemos que dicho lazo debe haber sido modelado *de novo* por los autores de la estructura teórica [52]. Sin embargo, debe decirse que la proteína de rata es algo mayor que el molde (337 frente a 322 aminoácidos) y en el modelo teórico de la primera faltaban los 14 primeros y los 3 últimos¹⁰ aminoácidos. Además, es también importante que la estructura cristalina de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* contiene cuatro iones Zn²⁺, dos de ellos en un centro dimetálico típico del sitio activo de las metalofosfoesterasas (sección 3.8.2), pero ninguno de ellos estaba incluido en el modelo teórico de la proteína de rata.

Al preparar el modelo de la ADPRibasa-Mn de rata para los experimentos de *docking*, se consideró que la ausencia de los 14 aminoácidos N-terminales y los 2 aminoácidos C-terminales, no tendría que ser un problema, pues dichos residuos deben de estar alejados del centro activo. Por otra parte, puesto que existe una excelente similitud entre las proteínas de pez cebra y de rata respecto a los residuos localizados a una distancia de hasta 5 Å de los iones Zn²⁺ (*rmsd* = 0,082 Å), las coordenadas de los metales en la estructura cristalina se usaron para añadir los dos iones del centro dimetálico a la estructura teórica de la proteína de rata. No se añadieron, sin embargo, los otros dos iones caracterizados por una baja ocupación en los cristales de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*. El programa *Reduce* se usó para añadir átomos de H a la ADPRibasa-Mn de rata y determinar el estado de protonación de los residuos de histidina y otros aminoácidos. El anillo imidazol de la histidina fue protonado en el N δ 1 para las histidinas His⁵¹, His¹⁵¹, His¹⁹⁰, His²⁴¹, His²⁸⁰ y His²⁹², en el N ϵ 2 para las histidinas His⁴⁷, His¹⁰⁵, His¹⁰⁶, His¹¹¹, His²⁷⁸, His²⁹³ y His³¹³, y en los dos sitios para His¹³⁸ y His²⁶⁸. El programa *ADT* [186] se usó para añadir cargas parciales de Kollman y para "fusionar" los átomos de hidrógeno no polares con sus átomos de carbono y así obtener un modelo *united-atom* con hidrógenos polares, lo cual es un requisito del programa *AutoDock* [36]. El archivo de tipo PDBQT producido por el programa *ADT* fue editado manualmente para asignarle cargas a los iones Zn²⁺. El modelo de la ADPRibasa-Mn de rata así obtenido se empleó para los experimentos de *docking* (Figura 4.A).

Para los experimentos de dinámica molecular, el modelo preparado como se describe en el párrafo anterior, se refinó adicionalmente. La diferencia más importante respecto a lo anterior, es que los 16 aminoácidos terminales fueron añadidos por modelado *de novo* (sección 3.10.1).

¹⁰ Al modelo más reciente que hay actualmente en la base de datos con el mismo código de acceso le faltan en el extremo C-terminal solamente dos aminoácidos.

3.8.2 Preparación de un modelo de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*

La estructura de la proteína de *D. rerio* fue determinada originalmente por cristalografía de rayos X con una resolución de 1,7 Å y está depositada en el *Protein Data Bank* con el código 2NXF [35,90]. La proteína cristalizada tenía las metioninas sustituidas por selenometioninas. La proteína tiene 322 residuos, pero ocho de ellos no están resueltos estructuralmente: dos son residuos N-terminales, Ser¹ y Glu², y seis (117-122) están en un lazo que precede la segunda hoja β, todos ellos lejos del centro activo. La proteína presenta cuatro metales, identificados en el archivo PDB como zinc. Dos de ellos están en el sitio activo y tienen una ocupación de 0,80, mientras que los otros dos están localizados cerca de la hélice 7 (residuos 161-175) y tienen una ocupación mucho menor (0,20 y 0,10). Además de aguas de cristalización, el modelo presenta un ión fosfato, que coordina en puente a los dos metales del centro activo, y una molécula de etanol situada lejos del centro activo.

Para obtener un modelo estructural de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio* adecuado para los estudios computacionales de unión de ligandos, se llevaron a cabo diversas modificaciones de la estructura depositada con PDB ID 2NXF. De forma manual, se eliminaron todas las aguas de cristalización del archivo PDB descargado, excepto una de ellas que liga los dos iones metálicos del centro activo, y que está identificada en el archivo PDB como el residuo #844. Además se sustituyeron las selenometioninas por metioninas, cambiando para ello los átomos de Se por S. Empleando el programa *Modeller*, se añadieron los ocho residuos aminoacídicos que no habían sido resueltos cristalográficamente (ver arriba). Para ello, se generaron con *Modeller* 500 conformaciones y se seleccionó la mejor según la función *DOPE* [184]. Sobre el modelo resultante, se optimizaron con el mismo programa *Modeller* las conformaciones de las metioninas, generándose para ello 250 modelos distintos y seleccionando de nuevo el mejor según *DOPE*. Esta última optimización consistió básicamente en refinar algunas longitudes y ángulos de enlace de los átomos S añadidos en sustitución de Se. Los átomos de H fueron añadidos con *Reduce*. Las histidinas His⁶⁵, His⁹¹, His¹⁶⁶, His¹⁷⁴, His²²⁸, His²⁴⁵ y His²⁶⁷ quedaron con el anillo imidazol protonado en el Nδ1, mientras que las histidinas His⁹², His⁹⁷, His¹⁶⁴, His¹⁷⁶, His²¹⁸, His²³², His²⁶⁵, His²⁸⁰, His²⁹² y His²⁹⁴ quedaron protonadas en el Nε2. Solamente la His²⁵⁵ fue protonada en los dos nitrógenos del anillo imidazol. El programa *WHAT IF* (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html>) se empleó para añadir los átomos de hidrógeno de la única molécula de agua de cristalización conservada (ver arriba). Finalmente, se eliminaron los dos iones zinc que no forman parte del centro dimetálico (ver arriba), teniendo en cuenta que su grado de ocupación en los cristales es muy bajo. Finalmente, el modelo de la proteína de *D. rerio* fue preparado para los experimentos de *docking* con el programa *ADT* y se definieron los parámetros de los iones de zinc de la misma forma que se había hecho con la proteína de rata (sección 3.8.1).

También se construyeron algunos modelos alternativos de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*. Por una parte, se prepararon modelos sustituyendo el agua #844 por un ion OH⁻, por sustracción de uno u otro átomo de H. Para estos modelos, las cargas parciales atribuidas a OH⁻ se tomaron de la literatura [187]. Por otra parte, se construyó un modelo de la ADPRibasa-Mn sin la molécula de agua #844, siguiendo los mismos pasos que se emplearon para construir el modelo que contiene dicha molécula de agua.

3.8.3 Preparación de modelos de la DHA quinasa de *Citrobacter braaki*

Para el modelado de la proteína hTKFC en forma dimérica, unida a los sustratos ATP y DHA, así como a los iones Mg^{2+} , se disponía de estructuras de la DHA quinasa de *Citrobacter braaki* (CbDK) determinadas por cristalografía de rayos X en ausencia de ligandos (PDB ID 1UN8) y en presencia de DHA, Mg^{2+} y AMPPNP, un análogo de ATP (PDB ID 1UN9) [146]. CbDK es un buen molde para hTKFC porque ambas proteínas presentan un 40% de identidad. No obstante, las estructuras 1UN8 y 1UN9 presentaban diversos problemas que se prefirió resolver antes de emplearlas como moldes para elaborar estructuras teóricas de hTKFC.

A la estructura 1UN8 le faltaban, en las dos cadenas del dímero, los residuos 518-525 (correspondientes a un *loop*), y 551-552 (extremo C-terminal), así como algunos átomos en las cadenas laterales de Met¹ y Arg⁵³⁸. Los segmentos de 8 residuos, así como los otros aminoácidos defectuosos, fueron añadidos o corregidos manualmente en la secuencia y su conformación fue generada *de novo* mediante las rutinas de *loop modelling* del programa *Modeller*. Es conocido que este programa es capaz de generar la conformación correcta en un 80% de los casos de *loops* con 8 residuos. El modelo final se seleccionó entre 500 conformaciones posibles generadas por *Modeller*. El archivo PDB resultante se encuentra en el suplemento CD-ROM con la ID 1UN8-c.pdb.

A la estructura 1UN9 le faltaban, también en las dos cadenas, los residuos 516-528 y 551-552, mientras que los residuos 1 y 538 aparecían identificados como alaninas, cuando, según la secuencia de la proteína analizada, deberían ser, respectivamente, metionina y arginina. Las rutinas de *loop modelling* de *Modeller* se usaron en un primer paso para añadir los residuos C-terminales y corregir los residuos Met¹ y Arg⁵³⁸. De la estructura resultante, se obtuvieron 500 conformaciones y se seleccionó la mejor. Los *loops* grandes no se construyeron *de novo* con *Modeller*, pues el porcentaje de éxito de este programa disminuye rápidamente para *loops* de más de 8 residuos [188]. En su lugar, estos *loops* se construyeron por modelado por homología con el propio programa *Modeller*, usando como molde la estructura de 1UN8-c.pdb (ver arriba), y manteniendo invariable el resto de la estructura de 1UN9. Finalmente, en la estructura resultante se sustituyó el ligando AMPPNP por ATP, simplemente por cambio del átomo de N por un átomo de O. El archivo PDB resultante se encuentra en el suplemento CD-ROM con la ID 1UN9-c.pdb.

3.8.4 Preparación de un modelo dimérico de hTKFC

Este modelo se empleó para estudios de *docking*, dinámica molecular y modos normales. Su construcción se hizo usando *Modeller* y aplicando técnicas de modelado por homología con los modelos descritos en la sección 3.8.3. Los detalles se describen en la sección 2.2.1, como uno de los resultados importantes de la Tesis Doctoral en el que se obtuvo un modelo dimérico con ATP y DHA unidos (archivo hTKFC.pdb, suplemento CD-ROM; Figura 33.B). Además, para construir este modelo fue necesario hacer previamente una parametrización del radical trihidroxiprop-2-ilo (sección 3.14.1), que aparece unido a los residuos His²²¹ del dímero hTKFC como consecuencia de la reacción con DHA.

Para los experimentos de *docking*, del archivo PDB resultante del proceso anterior, se eliminaron manualmente DHA y ATP, y a continuación se aplicó el programa *Reduce* para

añadir los átomos de H y determinar la ionización de los residuos de histidina. En la cadena A, los residuos His⁵⁹, His⁶³, His²²¹ e His⁴⁰⁸ quedaron con el anillo imidazol protonado en el Nδ1; His³⁴, His⁵⁹, His¹⁶¹, His²⁴⁴, His²⁵³ e His³⁹¹ quedaron protonadas en el Nε2. En la cadena B, los residuos His⁵⁹, His⁶³, His¹⁶¹, His²²¹ e His²⁴⁴ quedaron con el anillo imidazol protonado en el Nδ1; His³⁴, His⁵⁹, His²⁵³, His³⁹¹ e His⁴⁰⁸ quedaron protonadas en el Nε2. Finalmente, el archivo se procesó con el programa *ADT* de la misma forma que se había hecho con la ADPRibasa-Mn de rata (sección 3.8.1) y se asignaron cargas 2+ a los iones de magnesio. El archivo obtenido, guardado en formato PDBQT, es el que se empleó para los experimentos de *docking* (sección 3.9).

Para los experimentos de dinámica y modos normales, el modelo de hTKFC (archivo hTKFC.pdb, suplemento CD-ROM; Figura 33.B) se procesó adicionalmente como se describe en las secciones 3.10.2 y 3.11.

3.9 Simulación de unión de ligandos a modelos proteicos

El *docking* es un método en el cual se intenta predecir la estructura de un complejo intermolecular. Este procedimiento se desarrolló con *AutoDock 4.0* [36,189], que consiste en dos programas principales: *AutoGrid* y *AutoDock*. El programa *AutoGrid* hace un cálculo previo de las energías de interacción de cada uno de los tipos de átomos del ligando con la estructura del receptor (en este trabajo una proteína), dando lugar a una malla tridimensional (*grid map*) de interacción de cada tipo de átomo del ligando con la proteína completa o, si es posible predecir un sitio de unión del ligando, sólo con una región proteica definida. *AutoDock* calcula el acoplamiento del ligando a las mallas tridimensionales definidas.

A partir de los modelos de la ADPRibasa-Mn de rata y de pez cebra obtenidos en las secciones 3.8.1 y 3.8.2 (archivos PDBQT), el programa *AutoGrid* se usó para construir mallas tridimensionales de 33,8 x 29,2 x 29,2 Å (con un espaciamiento de los elementos de dichas mallas de 0,375 Å), delimitando la región donde después se hizo la búsqueda del modo de unión de los ligandos y que incluía el centro activo de la proteína.

El modelo dimérico de hTKFC preparado como se ha descrito en la sección 3.8.4 (archivo PDBQT), se usó para construir con *AutoGrid* dos conjuntos de mallas tridimensionales, de dimensiones 35,2 x 35,2 x 33,8 Å cada uno (espaciamiento de los elementos, 0,375 Å), centrados en cada uno de los dos centros activos de la enzima.

AutoDock 4.0 crea un gran número de estructuras posibles, y para ello ofrece cuatro métodos: *simulated annealing* o "recocido" simulado, búsqueda local, algoritmo genético tradicional y algoritmo genético lamarckiano, siendo este último una combinación del algoritmo genético tradicional con la búsqueda local. El algoritmo genético lamarckiano es considerado el más eficiente [36] y es el que hemos usado. Los ligandos fueron preparados como se describe en la Sección 3.12.1. Para cada experimento de *docking*, al programa *AutoDock* se le proporcionaron los archivos correspondientes a las mallas tridimensionales definidas con *AutoGrid*, al ligando en estudio, y a los parámetros necesarios para instruir a *AutoDock* sobre las condiciones del experimento. Para llegar a obtener una posición plausible del ligando en estudio (pose o postura), empleando el algoritmo genético lamarckiano se

generaron aleatoriamente poblaciones de conformaciones de dicho ligando (típicamente 150 para las ADPRibasa-Mn y 300 para hTKFC) dentro del espacio definido por las mallas creadas con *AutoGrid* para delimitar el centro activo. La aptitud de cada conformación resultante para el entorno proteico se determinó mediante cálculos de energías de interacción. Estos cálculos se hicieron con un campo de fuerzas de energía libre, semi-empírico, que combina los tradicionales campos de fuerzas de la mecánica molecular con pesos empíricos y/o funciones empíricas [189]. El proceso de selección del algoritmo genético lamarckiano elimina las conformaciones peor adaptadas (energías altas), y "reproduce" preferentemente las mejor adaptadas (energías bajas), que se transmiten a la generación siguiente. Después, de manera aleatoria, se permitió que el 80% de las conformaciones intercambiaran "genes" (posiciones, orientaciones y/o torsiones) y que el 2% sufrieran modificaciones de sus "genes" ("mutaciones"). Además, se permitió el paso de la mejor conformación a la generación siguiente sin sufrir cambios ("elitismo"). Una fracción (6%) de la población de conformaciones resultante se sometió entonces a la búsqueda local, consistente en 300 iteraciones de minimización de energía [190]. Este proceso generacional se repitió miles de veces, interrumpiéndose al llegar a 27000 (ADPRibasa-Mn) o 100000 (hTKFC) generaciones, o al haber realizado 50×10^6 (ADPRibasa-Mn) o 100×10^6 valoraciones de energía (hTKFC). Al final de este proceso, se conservó únicamente la mejor conformación del ligando.

Para llegar a obtener el número de poses deseado para un ligando determinado, se repitió todo el proceso descrito en el párrafo anterior tantas veces como fue necesario. Como resultado, *AutoDock* daba lugar a un único archivo para cada experimento de *docking*, del cual se podían extraer los datos relativos a las conformaciones y las energías de interacción de los ligandos. El resultado final de un experimento se obtuvo por elección de una o varias poses siguiendo criterios que se explican junto a los resultados (secciones 1.2.1 y 1.2.2 para ADPRibasa-Mn; sección 2.2.2 para hTKFC). En las simulaciones de unión de cADPR a la ADPRibasa-Mn, se descartaron las poses en las que, como resultado del procedimiento especial seguido para modelar el ligando (sección 3.12.1), la quiralidad resultante del C4 de la N¹-ribosa era incorrecta.

3.10 Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular constituyen una de las principales herramientas para el estudio teórico de proteínas [191,192]. Durante la dinámica se generan sucesivos fotogramas de un sistema mediante la integración de las leyes del movimiento de Newton. El resultado de una simulación de dinámica molecular es una trayectoria que especifica como varían con el tiempo las posiciones de los átomos del sistema. Esto aporta información detallada sobre posibles fluctuaciones y cambios conformacionales, que pueden predecir cambios conformacionales reales.

En términos generales, el punto de partida de una simulación de dinámica molecular es un fotograma del sistema energéticamente minimizado, en la cual los átomos están identificados por sus coordenadas cartesianas y tienen asignadas velocidades nulas. Para empezar, se asigna al azar un vector velocidad a cada átomo. A continuación, la fuerza total en un átomo dado, en el tiempo t , es calculada como un vector-suma de las interacciones entre el átomo y los átomos vecinos. A partir de la fuerza en cada átomo se puede calcular el vector

aceleración que se combina con la posición y la velocidad en el tiempo t para calcular las posiciones y velocidades en el tiempo $t + \delta t$. Las fuerzas de los átomos en las nuevas posiciones se vuelven a determinar, permitiendo el cálculo de nuevas posiciones y velocidades en el tiempo $t + 2\delta t$, y así sucesivamente. El lapso de tiempo δt (*time step* o paso de integración), predeterminado por el usuario, es muy corto y debe ser menor que la frecuencia de vibración más rápida de los átomos del sistema. Las fuerzas se obtienen teniendo en cuenta las ecuaciones y parámetros definidos en un campo de fuerzas de mecánica molecular escogido por el usuario, que incluye términos para interacciones enlazantes y no enlazantes. A esta descripción simplificada del proceso, debe añadirse que durante su curso se introducen mecanismos, por ejemplo, para el control de la temperatura y presión o para constreñir las longitudes de los enlaces.

En las simulaciones de dinámica molecular, el tratamiento correcto de los átomos en las fronteras del sistema simulado es esencial. El método más utilizado es el uso de condiciones periódicas de entorno (*periodic boundary conditions, PBC*), pues permiten llevar a cabo simulaciones con un número relativamente pequeño de moléculas de solvente. En este método, la caja o celda primaria, que contiene los átomos que constituyen el sistema en estudio, está replicada en todas las direcciones formando una matriz periódica, y haciendo desaparecer el artefacto de frontera. Cuando un átomo se mueve en la celda primaria, se mueve de la misma forma en las celdas periódicas. Asimismo, si un átomo abandona la celda, es substituido por otro átomo que entra por el lado opuesto de la caja. La celda cúbica es el sistema periódico más sencillo de visualizar y programar, aunque una celda puede tener otras formas, siempre que puedan yuxtaponerse exactamente sin dejar espacios libres.

En este trabajo, todas las simulaciones se llevaron a cabo con el programa *GROMACS* [170,171]. Los sistemas estudiados fueron diversos modelos de las proteínas ADPRibasa-Mn o hTKFC, libres y unidas a ligandos (secciones 3.8.1 y 3.8.4), adicionalmente modificados y/o ajustados a los requisitos de dicho programa, como se describe en las secciones 3.10.1 y 3.10.2. El punto de partida de cada simulación fue un fotograma del sistema energéticamente minimizado. Cada simulación comenzó con la atribución a los átomos de velocidades que correspondían a una temperatura de 300 K. Después de un periodo de equilibrado se inició la fase de producción. Las trayectorias obtenidas se registraron almacenando periódicamente en un archivo de tipo *trayectoria.xtc* la sucesión de fotogramas (uno cada 500 pasos de integración). Estos archivos pueden ser leídos por programas de visualización y análisis de estructuras moleculares.

3.10.1 Dinámica molecular de la ADPRibasa-Mn de rata y sus complejos con ADP-ribosa y cADPR

El modelo de la ADPRibasa-Mn de rata utilizado para los cálculos de *docking* (sección 3.8.1; Figura 3.B), y los complejos ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa y ADPRibasa-Mn:cADPR, resultantes de dichos cálculos (secciones 1.2.1 y 1.2.2; Figuras 4.ABC y 5), no tenían los residuos 1-14 y 335-337. Esta ausencia era un inconveniente para las simulaciones dinámicas, pues podía afectar a los resultados. Por lo tanto, estos residuos fueron añadidos con el programa *Modeller* de forma similar a lo descrito en la sección 3.8.2 para la proteína de pez cebra. El modelado se hizo sobre la ADPRibasa-Mn de rata sin sustrato y los modelos de los complejos ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa y ADPRibasa-Mn:cADPR se consiguieron añadiendo manualmente el ligando en la misma conformación y posición en que se encontraba como

resultado del *docking*. Cada uno de estos modelos corregidos se colocó en una caja cúbica periódica, manteniendo una distancia mínima de 10 Å entre los átomos de la proteína y las caras de la caja. A estos sistemas se les añadieron moléculas de agua (modelo SPC [193]) y NaCl 50 mM (Figura 63), realizándose en estas condiciones una minimización de energía (1000-3500 iteraciones) en el programa *GROMACS* 3.3.3 [170] utilizando el campo de fuerzas GROMOS 53A6 [194] con las adiciones que se describen en la sección 3.13. Finalmente, los sistemas solvatados fueron equilibrados con 100 ps de dinámica molecular a 300 K y 1 atm, con una fuerte restricción en las posiciones de los átomos de proteína. Con estos tres sistemas se realizaron las simulaciones dinámicas, empleando el mismo campo de fuerzas. En este punto se iniciaron las fases de producción, con las siguientes condiciones (también usadas en las fases anteriores de minimización y equilibrado, cuando eran de aplicación).

(a) La temperatura (300 K) y la presión (1 atm) fueron mantenidas constantes con los algoritmos (termostato y presostato) de Berendsen [195].

(b) Se empleó un paso de integración de 2 fs, para lo cual las longitudes de los enlaces en la proteína y en el ligando fueron mantenidas constantes con el algoritmo LINCS [196,197] y las del agua con SETTLE [198].

(c) Las energías potenciales de las interacciones de van der Waals se calcularon (función de potencial de Lennard-Jones) con distinta frecuencia, dependiendo de las distancias interatómicas registradas en una lista de pares atómicos vecinos que se actualizaba cada cinco pasos de simulación. Las interacciones a menos de 8 Å se evaluaron en todos los pasos; las interacciones entre 8-14 Å se evaluaron cada vez que se actualizaba la lista de vecinos, manteniéndose constantes en los pasos intermedios; las interacciones a más de 14 Å no se calcularon.

(d) Las energías potenciales de las interacciones electrostáticas establecidas a menos de 14 Å se calcularon usando la ley de Coulomb en los mismos pasos de integración que las de van der Waals. Las establecidas a mayor distancia se evaluaron en todos los pasos, pero de una forma simplificada, usando el método del campo de reacción (*reaction field*), en el cual se supone que el medio tiene una constante dieléctrica de 66 [199].

Las coordenadas cartesianas descriptivas de los sistemas se guardaron cada 500 pasos de integración, generándose así una imagen instantánea por cada picosegundo de trayectoria. Con cada uno de los sistemas estudiados se simularon 25 ns de trayectoria. El tiempo real de computación fue aproximadamente de 4 h/ns, es decir unas 100 h para calcular cada trayectoria en el equipo informático descrito en la sección 3.1.7.

3.10.2 Dinámica molecular de trioquinasa/FMN ciclasa humana (hTKFC) libre y unida a sustratos

Respecto a esta proteína, se hicieron simulaciones con la enzima libre de sustratos, hTKFC, y con los complejos hTKFC:2DHA:2ATP y hTKFC:FAD (Tabla 3). Cada uno de estos modelos se colocó en una caja periódica en forma de dodecaedro rómbico (para ahorrar solvente, respecto a lo que sería necesario con una caja cúbica), manteniendo una distancia

mínima de 10 Å entre los átomos de la proteína y las caras de la caja. A estos sistemas se les añadieron moléculas de agua (modelo TIP3P [200]) y NaCl 50 mM (Figura 63), y se hizo una minimización de energía (2000 iteraciones) en el programa *GROMACS* 4.0.4 [171] utilizando el campo de fuerzas AMBER03 [158] con las adiciones que se describen en las secciones 3.13 y 3.14.2. Después los sistemas se equilibraron en tres etapas: 20 ps de dinámica a volumen constante con restricciones de posición en los átomos de proteína, metales y ligandos; 200 ps de dinámica a presión y temperatura constante con iguales restricciones; y por último 200 ps de dinámica libre a presión y temperatura constante. En este punto se iniciaron las fases de producción, con las siguientes condiciones (también usadas en las fases anteriores de minimización y equilibrado, cuando eran de aplicación).

(a) La temperatura (300 K) y la presión (1 atm) fueron mantenidas constantes con los algoritmos (termostato y presostato) de Berendsen [195].

(b) Se empleó un paso de integración de 2 fs, para lo cual las longitudes de los enlaces covalentes con átomos de hidrógeno, en la proteína y en el ligando, fueron mantenidas constantes con el algoritmo LINCS [196] y en el agua con SETTLE [198].

(c) Las energías potenciales de las interacciones de van der Waals se evaluaron en todos los pasos de integración para pares atómicos distanciados menos de 9 Å según una lista que se actualizaba cada diez pasos. Los cálculos se hicieron con la función de potencial de Lennard-Jones, aunque para las distancias entre 8-9 Å se aplicó una función correctora de manera que la energía potencial calculada disminuía suavemente hasta hacerse nula a 9 Å.

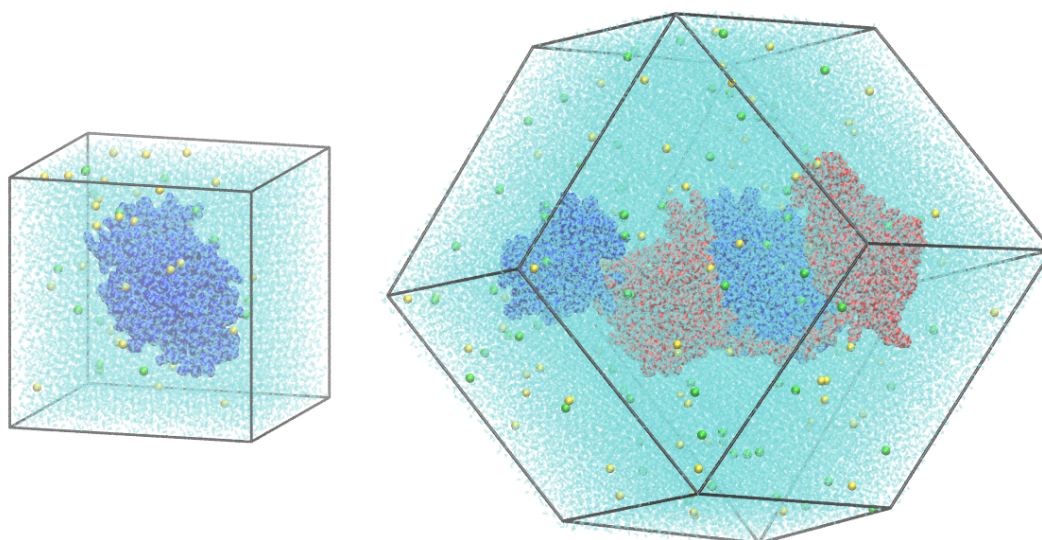


Figura 63: Sistemas estudiados por simulaciones de dinámica molecular. A la izquierda, el sistema ADPRibasa-Mn, que fue simulado en una caja periódica cubica. A la derecha, el sistema hTKFC, simulado en una celdilla en forma de dodecaedro rómbico. Las moléculas de agua se presentan en color azul claro, los iones Na^+ en esferas amarillas y los iones Cl^- en esferas verdes. La ADPRibasa-Mn se presenta en esferas azul oscuro mientras las dos cadenas de la hTKFC se presentan en esferas azules y rojas.

(d) Las energías potenciales de las interacciones electrostáticas se evaluaron en todos los pasos de integración aplicando el método *Particle Mesh Ewald* (PME) [201]. Este método requiere el uso de condiciones periódicas de entorno y permite calcular las energías electrostáticas en una celda replicada infinitamente. Para cada átomo, las interacciones electrostáticas se dividieron en dos grupos, uno que incluía las interacciones a menos de 9 Å, y otro las de mayor alcance. Las energías del primer grupo se calcularon directamente en el espacio real, usando un potencial de Coulomb modificado. Las energías del segundo grupo, que incluye un número de átomos mucho mayor, se calcularon en el espacio denominado recíproco o de Fourier, después de interpolar las cargas sobre una malla (*mesh*) tridimensional [201], lo que permite disminuir en gran medida el tiempo de cálculo.

Las coordenadas cartesianas descriptivas de los sistemas se guardaron cada 500 pasos, generándose un fotograma por picosegundo. Con cada uno de los sistemas estudiados se simularon 42 ns de dinámica molecular. El tiempo real de computación fue aproximadamente de 39 h/ns, es decir cerca de 1600 h para calcular cada trayectoria.

3.10.3 Análisis de dinámica esencial o de los componentes principales de las trayectorias dinámicas de la trioquinasa/FMN ciclasa humana (hTKFC) y sus complejos

En los estudios de la dinámica molecular de la proteína hTKFC y sus complejos, después de obtener las trayectorias en la forma que se describe en la sección 3.10.2, se llevaron a cabo análisis de los componentes principales de dichas trayectorias. El movimiento aparentemente caótico de las simulaciones de dinámica molecular hace difícil la identificación de movimientos colectivos. Una forma de identificarlos es por análisis de sus componentes principales (PCA, *principal component analysis*), también llamado de dinámica esencial [202,203,204]. Después de alinear cada conformación de una trayectoria con una conformación de referencia para eliminar los movimientos de traslación y rotación, se obtiene una trayectoria $\mathbf{x}(t)$ que puede ser representada por una matriz de $3N \times M$ valores, donde N es el número de átomos considerados (con cada átomo representado por 3 coordenadas cartesianas) y M es el número de conformaciones recogidas a lo largo del tiempo simulado. A partir de esta matriz, con el programa *g_covar*, dentro de *GROMACS* 4.5.5 [171], se calcula la matriz de covarianza \mathbf{C} , simétrica, de dimensiones $3N \times 3N$, cuyos elementos son los indicados en la ecuación

$$C_{ij} = \langle (x_i - \langle x_i \rangle) (x_j - \langle x_j \rangle) \rangle$$

en donde $\langle \rangle$ significa promedio en el tiempo. Con el mismo programa, se hace la diagonalización de \mathbf{C} , que permite encontrar las matrices $\mathbf{\Lambda}$ y \mathbf{R} , tal que

$$\mathbf{\Lambda} = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2 \dots \lambda_{3N}) = \mathbf{R}^T \mathbf{C} \mathbf{R}$$

en donde $\mathbf{\Lambda}$ es una matriz diagonal que contiene $3N$ valores propios λ_i , también denominados eigenvalores o autovalores, ordenados por orden decreciente, \mathbf{R} es una matriz $3N \times 3N$ que contiene en sus columnas los vectores propios, también denominados eigenvectores, o autovectores, y el índice T denota la matriz traspuesta. La i -ésima columna de la matriz \mathbf{R} es el vector propio asociado con el valor propio λ_i de la matriz $\mathbf{\Lambda}$. Cada vector propio describe un

movimiento colectivo de partículas. El valor propio asociado a dicho vector es la varianza de sus fluctuaciones y mide la magnitud del movimiento colectivo. El primer vector propio representa así el mayor cambio conformacional, y la mayoría de las fluctuaciones residen en un subconjunto de los primeros valores propios que es mucho más pequeño que $3N$. El análisis de los vectores y valores propios se hizo con el programa *g_anaeig*, también dentro de *GROMACS* 4.5.5.

Para simplificar los cálculos, los análisis de dinámica esencial se hicieron solamente con los 4600 átomos de las cadenas principales, usando los 40000 fotogramas correspondientes a los últimos 40 ns de cada simulación, obteniéndose una matriz **C** de dimensiones 13800x13800, de la cual se extrajeron 13800 vectores propios y sus respectivos valores propios.

3.11 Análisis de los modos normales de hTKFC libre y unida a sustratos

El análisis de los modos normales es un método teórico usado para identificar y caracterizar movimientos moleculares de amplitud grande, que ocurren en lapsos de tiempo relativamente largos, y que en la práctica son inaccesibles por los métodos de dinámica molecular [166,167,168,169]. Para analizar los modos normales se requieren un conjunto de coordenadas de un modelo molecular, un campo de fuerzas que describe las interacciones entre los átomos constituyentes, y el programa informático para realizar los cálculos. El análisis se procesa en 3 etapas: en primer lugar, la energía potencial del sistema en estudio debe ser bien minimizada, después se calcula la llamada matriz *hessiana*, que contiene las segundas derivadas de la energía potencial respecto a las coordenadas atómicas, y finalmente, se diagonaliza esta matriz para obtener los respectivos vectores propios y valores propios. Los vectores propios, o modos normales, al igual que en el análisis de dinámica esencial, representan direcciones espaciales de movimientos atómicos colectivos. Los valores propios son las frecuencias angulares al cuadrado y definen la frecuencia de oscilación del modo normal. Los valores propios se ordenan habitualmente por orden creciente y resulta que los seis primeros valores propios, llamados modos triviales, son próximos a cero y corresponden a movimientos de traslación y rotación del sistema entero como un bloque rígido (NM1-NM6, no mostrados). Los valores propios siguientes están asociados a movimientos vibratorios que conllevan cambios de conformación. Las frecuencias más bajas están asociadas con movimientos colectivos de mayor amplitud, que corresponden a los cambios conformacionales más amplios y que, por lo tanto, tienen mayor interés en una enzima como hTKFC, que exige un acercamiento entre ATP y DHA para que tenga lugar la transferencia de fosfato.

Este tipo de análisis se aplicó a la proteína en cuatro versiones: hTKFC, hTKFC:2DHA:2ATP, hTKFC:FAD y hTKFC:2FAD. Las coordenadas que describen estos sistemas se tomaron del modelo de la proteína construido con *Modeller* (sección 2.2.1; Figura 33.B) y de los resultados de *docking* de FAD (sección 2.2.2; Figura 36.EG). En el sistema hTKFC:2FAD, la segunda molécula de FAD se obtuvo aplicando una matriz de transformación, calculada con el programa *VMD*, que permitía girar la subunidad 1 para alinearla con la subunidad 2. El ligero solapamiento atómico que podía resultar se resolvió minimizando la energía potencial del nuevo complejo.

El análisis de modos normales se hizo con un conjunto de programas compilados con precisión doble que integran el paquete *GROMACS* 4.0.7 [171]. El campo de fuerzas utilizado fue *AMBER03* [158] con las adiciones que se describen en las secciones 3.13 y 3.14.2. Los modelos fueron primeramente optimizados con el programa *mdrun* en vacío mediante 5000 iteraciones de minimización de energía por el método del descenso más pronunciado (*steepest descent*), seguidos por otra minimización (10000-15000 iteraciones) con el algoritmo *l-bfgs* (*low-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno*) para conseguir que la fuerza máxima en cualquier átomo fuera inferior a 10^{-6} kJ mol⁻¹ nm⁻¹. Para los cálculos energéticos de estas minimizaciones, se tuvieron en cuenta las interacciones electrostáticas y las interacciones de van der Waals que tenían lugar hasta una distancia de 10 Å, aunque por encima de 8 Å se aplicó una función correctora para llevar a valores nulos las energías resultantes en las interacciones a 10 Å.

Las conformaciones minimizadas fueron utilizadas para calcular sus matrices hessianas **H** cuyos elementos son los indicados en la ecuación

$$H_{ij} = \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial x_j}$$

en donde x_i y x_j son las coordenadas cartesianas de los átomos i y j , y V es la energía potencial. A partir de la matriz hessiana **H**, obtenida con el programa *mdrun*, se determinaron sus valores propios y vectores propios con el programa *g_nmeig*:

$$\Lambda = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2 \dots \lambda_{3N}) = \mathbf{R}^T \mathbf{M}^{-1/2} \mathbf{H} \mathbf{M}^{-1/2} \mathbf{R}$$

en donde **Λ** es una matriz diagonal que contiene 3N valores propios λ_i , **R** es una matriz que contiene los vectores propios en columnas, el índice T indica la matriz traspuesta, y **M** es una matriz que contiene las masas atómicas. Los vectores propios son los modos normales: vectores unitarios de dimensiones 3N (N = número de átomos), que dan la dirección del movimiento. Los eigenvalores λ_i permiten calcular la frecuencia del modo normal por

$$\nu_i = \frac{\sqrt{\lambda_i}}{2\pi}$$

A partir de la estructura minimizada y de los vectores propios (modos normales), el programa *g_nmtraj* se usó para generar trayectorias virtuales para visualizar los movimientos armónicos de cada modo.

Para comparar el movimiento asociado a un determinado modo normal entre dos diferentes sistemas (con distintos número de átomos, por ejemplo hTKFC y hTKFC:FAD), se hizo lo siguiente: para cada modo normal, se generó un conjunto de 5000 conformaciones a una temperatura dada (300 K) con el programa *g_nmens*, incluido en *GROMACS*. De estas conformaciones se extrajeron solamente los átomos del esqueleto de la proteína, lo cual resulta en igual número de átomos en cada modelo. Con el conjunto de conformaciones del esqueleto se hizo un análisis de componentes principales de manera similar a la descrita en la sección 3.10.3. De este análisis, se extrajeron valores y vectores propios característicos del modo normal, de los cuales sólo el primer valor propio es significativo, mientras que los restantes son prácticamente nulos. Para valorar la similitud entre las direcciones de los modos

normales, se calculó el producto interno entre los vectores propios (unitarios) de la cadena principal, que varía entre uno, para vectores idénticos, y cero para vectores ortogonales.

3.12 Preparación de modelos de ligandos para experimentos de *docking*

Los ligandos que se utilizaron en experimentos de *docking* son los que aparecen en la Figura 64. Los modelos tridimensionales iniciales de los ligandos ADP-ribosa, CDP-colina, CDP-etanolamina y CDP-glicerol se obtuvieron de la base de datos *PubChem* (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) [205] en forma de archivos *sdf* que contienen, entre otras cosas, las coordenadas de cada átomo y la definición de los enlaces de la molécula. En algunos casos se hicieron pequeñas modificaciones en estos archivos, empleando el editor molecular *Marvin* (www.chemaxon.com). El modelo tridimensional de fosfato en formato *PDB* se obtuvo extrayendo las coordenadas de la estructura de la ADPRibasa-Mn de pez cebra (*PDB* ID 2NXF) y los enlaces se definieron con *Marvin*. El ligando hidrogenofosfato se construyó a partir del anterior con *Marvin*. El modelo tridimensional de FAD fue generado con *Marvin* a partir de su estructura 2D. Todos los archivos anteriores fueron convertidos al formato *mol2* con *Marvin*, en algunos casos después de asignar las cargas atómicas parciales con el mismo programa, utilizando el método de Marsili-Gasteiger ("cargas de Gasteiger"; [206]). En otras ocasiones, la asignación de estas cargas se hizo con el programa *ADT* sobre los archivos *mol2* generados con *Marvin*. Todos los archivos fueron procesados con *ADT* para fusionar los átomos de hidrógeno apolares con sus carbonos, clasificar todos los átomos por tipos y definir las torsiones activas (enlaces con capacidad de giro; Figura 64). Los archivos de tipo *PDBQT* resultantes se usaron para los experimentos de *docking*, excepto el de *cADPR* que se procesó como se explica a continuación.

La preparación de un modelo de *cADPR* exigió un procedimiento especial. Una limitación del programa *AutoDock*, usado en los experimentos de *docking*, es que no puede tratar las estructuras cíclicas como flexibles, y por lo tanto, los anillos de todos los ligandos, incluyendo los anillos de ribosa, se consideraron rígidos. En el caso de la *cADPR*, dado su carácter de macrociclo (Figura 64), si éste se considerase rígido los únicos grupos que tendrían flexibilidad serían los cuatro grupos OH de las ribosas. Para introducir flexibilidad en el macrociclo de *cADPR*, se utilizó la estrategia propuesta por Forli y Botta para *AutoDock 3.0.5* [207]. Sin embargo, dicha estrategia no puede aplicarse directamente en *AutoDock 4.0*, pero pudo hacerse alterando el código fuente del programa, como sugerido por Yang Ye [208]. En pocas palabras, la estrategia consiste en romper el anillo del ligando y "estirarlo" para después aplicar un potencial fuertemente atractivo entre los átomos del enlace roto y conseguir que, durante la búsqueda conformacional, el anillo vuelva a cerrarse progresivamente. En este procedimiento es necesario asegurarse que, en el resultado del *docking*, la posible quiralidad de los átomos participantes en el enlace no resulta invertida. En concreto, para *cADPR*, partiendo de su estructura 2D, se obtuvo en primer lugar, con *Marvin*, una estructura tridimensional de la molécula cerrada en formato de archivo *mol2*. Este archivo se abrió con el programa *VMD*, se rompió el enlace entre los átomos C4 y C5 de la N¹-ribosa, se guardó la estructura resultante en formato *mol2*, y se procesó con *ADT* para llevar a cabo las operaciones arriba descritas para los otros ligandos, con dos peculiaridades: por una parte, las cargas parciales asignadas a los átomos de la estructura abierta se calcularon en realidad a partir de un archivo de tipo *PDBQT* correspondiente a la forma cerrada de *cADPR*; por otra

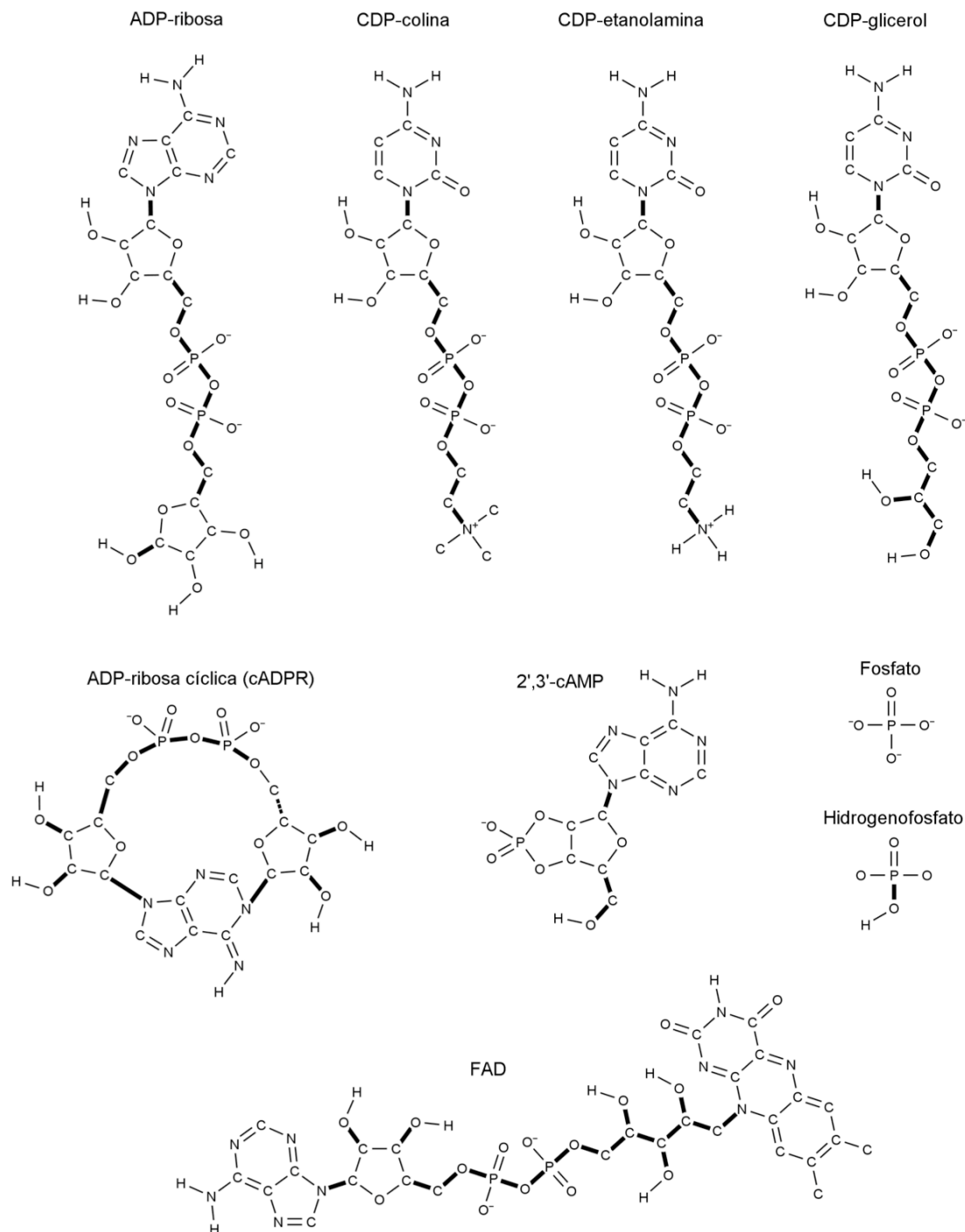


Figura 64: Ligandos empleados en las simulaciones de unión (*docking*) a las proteínas ADPRibasa-Mn y hTKFC. Los átomos de los ligandos se muestran todos de forma explícita. En el programa *AutoDock*, los ligandos son modelados sin los átomos de H enlazados a átomos de C, pero se preservan los átomos de H involucrados en enlaces polares (modelo de tipo *united-atom*). Los enlaces en negrito señalan las torsiones que se tornaran activas, esto es, las torsiones en las cuales se permitieron el movimiento de rotación en torno de dicho enlace. Para ahorrar recursos computacionales, ni todas las posibles torsiones se hicieron activas. El enlace discontinuo en la cADPR identifica el enlace que se rompió para que fuera posible introducir flexibilidad en el macro anillo.

parte, a los átomos C4 y C5 de la N¹-ribosa se les atribuyó el tipo especial G (*glue atom*; para identificarlos como los átomos a reunir durante el proceso de búsqueda conformacional del *docking*). Este modelo de cADPR (archivo PDBQT), con el enlace C4-C5 roto, presentaba un total de 12 posibles torsiones (Figura 64). Esta estructura fue optimizada, en ausencia de proteína, utilizando una función auxiliar de *AutoDock* que, como paso previo al *docking*, calcula el estado del ligando libre que es de esperar que corresponda a una conformación extendida o "estirada". La estructura resultante de este proceso, en formato PDBQT, fue usada en los experimentos de *docking*. Al hacerlo hubo que tener en cuenta el carácter quiral de C4, no de C5, como se ha comentado arriba.

3.13 Parametrización de ligandos para experimentos de dinámica molecular

Varias de las simulaciones de dinámica molecular y modos normales de esta Tesis se hicieron a partir de complejos obtenidos, uno de hTKFC modelado por homología (sección 2.2.1) y otros obtenidos por *docking* de ligandos a la ADPRibasa-Mn de rata (secciones 1.2.1 y 1.2.2) o a la hTKFC (sección 2.2.2). Dichos complejos están descritos en archivos de tipo PDB. Estos archivos contenían las coordenadas cartesianas de los átomos, pero no otros parámetros que son necesarios para la dinámica molecular: cargas eléctricas parciales, tipo de átomo, enlaces establecidos por cada átomo y los datos necesarios para describir el comportamiento de los enlaces, ángulos y ángulos diedros. En las simulaciones dinámicas se emplearon los campos de fuerzas GROMOS 53A6 [194] (ADPRibasa-Mn; sección 1.2.4) y AMBER03 [158] (hTKFC; sección 2.2.3). Las bibliotecas de residuos de estos campos de fuerzas incluyen los parámetros necesarios para los aminoácidos y otras moléculas e iones, pero no para varios de los ligandos presentes en los complejos estudiados. Por ello fue necesario, añadir a las bibliotecas de residuos de los mencionados campos de fuerzas los conjuntos de parámetros (que suelen denominarse "topologías") de los ligandos pertinentes.

Las topologías de ADP-ribosa y cADPR se construyeron manualmente por analogía con las topologías de NAD y del monómero AMP, incluidas en la biblioteca de residuos de GROMOS 53A6. Las cargas parciales de la ADP-ribosa y de los residuos de ribosa y pirofosfato de cADPR se tomaron también de NAD y AMP. Sin embargo, las cargas eléctricas parciales de la adenina de cADPR, que está disustituida en las posiciones 1 y 9, exigieron una atención especial, pues en el campo de fuerzas GROMOS 53A6 no existe ningún compuesto de este tipo, y hubo que determinarlas. Para simplificar el proceso, las cargas parciales de la adenina disustituida fueron calculadas empleando como modelo 1,9-bis(1-hidroxietil)-adenina. Para este compuesto, se realizó un cálculo de optimización geométrica por el método de Hartree-Fock, con la función de base 6-31G* [209], usando el programa *GAMESS-US* [210]. A partir del potencial electrostático, calculado con *GAMESS-US*, se obtuvieron cargas parciales según el método *RESP* [211]. La estabilidad de las moléculas de ADP-ribosa y cADPR con las topologías resultantes (Archivo Top_1.pdf, Suplemento CD-ROM) se comprobó mediante simulaciones de 20 ns de dinámica molecular en solvente explícito, empleando el programa *GROMACS*. Para las simulaciones dinámicas de los complejos ADPRibasa-Mn:ADP-ribosa y ADPRibasa-Mn:cADPR, dichas topologías se añadieron al archivo informático que contenía la biblioteca de residuos de GROMOS 53A6

Las topologías del FAD y del ATP, estudiados como ligandos de hTKFC, se tomaron de la base de datos REDdb (código de acceso F-91), se convirtieron al formato ITP

(reconocible por *GROMACS*) empleando el programa *ACPYPE* [212]. Los archivos resultantes se añadieron a la colección de la biblioteca de residuos de AMBER03.

3.14 Modelado del residuo 221 de la trioquinasa/FMN ciclasa humana (hTKFC) unida a DHA: N^{τ} -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina

Por analogía con la DHA quinasa de *C. braakii*, que contiene DHA unida covalentemente a His²²⁰ por un enlace hemiaminal [146], supusimos que la proteína hTKFC debía contener DHA covalentemente unido al residuo equivalente, His²²¹. En realidad, en esta forma ligada a histidina, la DHA adopta la forma de radical trihidroxi-prop-2-ilo, dando lugar al residuo aminoácido no estándar N^{τ} -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina. Este residuo también se encuentra en un regulador de la transcripción de *Lactococcus lactis* ([213]; código PDB 2IU4).

La N^{τ} -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina no formaba parte del conjunto de entidades químicas reconocidas por *Modeller*, programa empleado para el modelado de hTKFC, y tampoco estaba incluida en la biblioteca de residuos estándar del campo de fuerzas AMBER03 [158], empleado para las simulaciones de tipo dinámico. Ambas deficiencias tuvieron que suplirse como se describe a continuación.

3.14.1 Tratamiento del radical trihidroxi-prop-2-ilo para el modelado de la trioquinasa/FMN ciclasa humana (hTKFC) con *Modeller*

El programa *Modeller* hace uso del campo de fuerzas CHARMM22 [214]. Para conseguir una descripción completa de la N^{τ} -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina que fuese compatible con dicho campo de fuerzas, nos basamos en que el radical trihidroxi-prop-2-ilo, además de producirse por reacción de DHA con la cadena lateral de histidina, se puede considerar derivado del glicerol. Por lo tanto, la definición de dicho radical con sus parámetros y topología específicos, en una forma compatible con CHARMM22, se hizo empleando los datos de una molécula de glicerol. Estos datos se tomaron de un artículo publicado en 2008 en el que se incluían descripciones de múltiples carbohidratos acíclicos apropiadas para CHARMM22 [215]. Desafortunadamente, este artículo fue posteriormente retractado debido a "...violations of the ACS ethical guidelines" (no especificadas) [216], cuando el modelado de hTKFC estaba ya concluido con los datos tomados de dicha referencia. La topología del radical trihidroxi-prop-2-ilo (Archivo Top_3.pdf, Suplemento CD-ROM) se añadió manualmente a la biblioteca de *Modeller* con la que se realizó el modelado de hTKFC unida a sustratos.

Conviene destacar que la incertidumbre en los datos de la topología del trihidroxi-prop-2-ilo no debe afectar a las conclusiones alcanzadas con el modelo de hTKFC preparado con *Modeller*. Dicho modelo en torno a la N^{τ} -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina (Figura 34.B), resultó casi indistinguible de la estructura de la proteína molde CbDK, obtenida por

crystalografía de rayos X (Figura 34.A). Además, el modelo de hTKFC con el residuo de N^ϵ -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina se empleó para simulaciones de dinámica (sección 3.10.2) y de modos normales (sección 3.11), en los cuales, como paso previo, la estructura fue minimizada energéticamente. Esto, sin duda, habrá contribuido a limar posibles inexactitudes conformacionales en dicho residuo y su entorno. Finalmente, destacar también que la simulación de *docking* de FAD a la hTKFC se hizo con el modelo de la proteína desprovisto del radical trihidroxi-prop-2-ilo (sección 2.2.2).

3.14.2 Parametrización de N^ϵ -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina para simulaciones de dinámica molecular con GROMACS

La topología de N^ϵ -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina, para su adición a biblioteca del campo de fuerzas AMBER03, fue preparada como parte de esta Tesis Doctoral, y se encuentra depositada con el código de acceso F-86 en la base de datos REDDB (<http://q4md-forcefieldtools.org/REDDB>) [217]. El procedimiento seguido para su preparación se describe a continuación.

Por una parte, los tipos de átomos (que determinan las interacciones de van der Waals) y los parámetros relativos a enlaces, ángulos y ángulos diedros de N^ϵ -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina se tomaron de los campos de fuerzas AMBER03 y GAFF. Los datos para la porción de histidina se tomaron de la biblioteca de residuos del propio campo de fuerzas AMBER03, que contiene información específica para dicho aminoácido. Los restantes datos (los necesarios para definir el radical trihidroxi-prop-2-ilo y su unión al anillo imidazol de la histidina) se tomaron del campo de fuerzas GAFF, que es compatible con AMBER03 y contiene información sobre átomos individuales y pequeños grupos atómicos que permiten parametrizar moléculas pequeñas de diversa índole [218].

Por otra parte, el cálculo de las cargas eléctricas centradas en los átomos de N^ϵ -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina se hizo con la ayuda del programa *R.E.D.-III tools* [219] que sirvió de interfaz entre los distintos programas necesarios para las tres etapas del proceso: obtención de una o varias geometrías moleculares optimizadas, cálculo del mapa de potencial electrostático de cada estructura optimizada y ajuste iterativo de las cargas eléctricas de los átomos hasta conseguir reproducir el mapa de potencial electrostático.

Para la optimización de la geometría se empleó como modelo la *N*-acetil- N^ϵ -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina-*N'*-metilamida, en la que los radicales acetilo y metilamida ocupan las posiciones equivalentes a dos aminoácidos unidos a la N^ϵ -(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-L-histidina por enlaces peptídicos. Este compuesto modelo se construyó en dos conformaciones próximas, respectivamente, a una hélice α y a una hoja β . Estas dos conformaciones fueron optimizadas con el programa *GAMESS-US* [210] por el método de Hartree-Fock usando las funciones de base 6-31G** [158] y se muestran en la Figura 65.

Para obtener el mapa de potencial electrostático de las conformaciones optimizadas, dicho potencial se valoró en puntos accesibles al solvente, alrededor de la molécula, definidos según el algoritmo de Connolly [220]. Los cálculos de potencial se hicieron por el método B3LYP/cc-pVTZ en el servidor *RESP ESP charge Derive Server* [221] usando el programa *Gaussian 03* [222] con las mismas opciones utilizadas en la parametrización del campo de fuerzas AMBER03 [158]. Para cada una de las dos conformaciones, se utilizaron 4 orientacio-

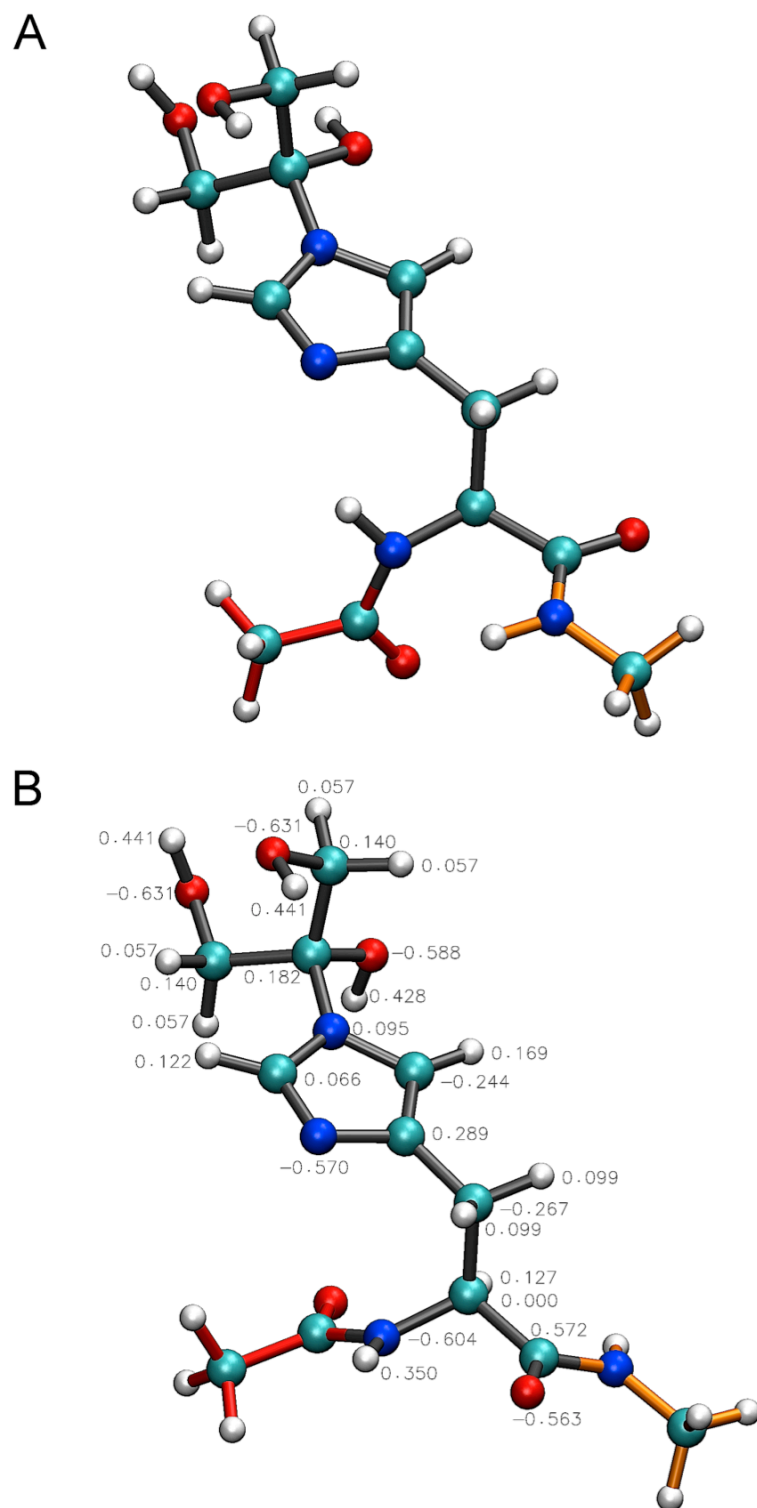


Figura 65: Geometrías optimizadas de *N*-acetil-*N*^ε-(1,2,3-trihidroxi-prop-2-il)-*L*-histidina)-*N*'-metilamida. Las esferas están coloreados según el elemento químico: C en azul claro, N en azul oscuro, O en rojo y H en blanco. Las varillas evidencian los fragmentos *N*-acetilo en rojo, trihidroxipropil-*L*-histidina en gris y *N*'-metilamida en naranja. Conformación correspondiente a **A**: hélice α y **B**: hoja β . Junto a esta conformación se muestran las cargas eléctricas parciales de los átomos de la trihidroxipropil-*L*-histidina.

nes distintas, definidas mediante el algoritmo RBRA (*rigid-body re-orientation algorithm*) incluido en el programa *R.E.D.-III tools*.

El ajuste iterativo simultáneo (global) de las cargas eléctricas de los átomos a los ocho mapas de potencial electrostático mencionados arriba se llevó a cabo también en el servidor *RESP ESP charge Derive Server* con el programa *RESP* [211], que calcula el potencial electrostático a partir de las cargas. Al hacer este cálculo, la carga neta de los radicales acetilo y metilamida del compuesto modelo se restringió para que se mantuviera igual a cero. La concordancia entre los mapas de potencial electrostático obtenidos por el método B3LYP/cc-pVTZ y el producido por las cargas parciales calculadas fue satisfactoria (valor de RRMS o *Relative Root Mean Square* igual a 0,13). La Figura 65.B muestra las cargas parciales de los átomos del fragmento molecular de *N^ε-(1,2,3-trihidroxiprop-2-il)-L-histidina* resultantes del ajuste global.

La topología y parametrización resultantes de este procedimiento (Archivo Top_3.pdf, Suplemento CD-ROM) se añadieron a la biblioteca de residuos de AMBER03. Para comprobar la estabilidad del residuo de *N^ε-(1,2,3-trihidroxiprop-2-il)-L-histidina* con dicha parametrización, se construyó el tripéptido alanina-*N^ε-(1,2,3-trihidroxiprop-2-il)-L-histidina*-alanina empleando el programa *tleap* (*AmberTools*; <http://ambermd.org>). La descripción del tripéptido se convirtió en archivos propios para *GROMACS* con el programa *ACPYPE* [212]. Con estos archivos se hizo una simulación de 10 ns de dinámica molecular en disolvente explícito, usando el campo de fuerzas AMBER03 en *GROMACS* [223,224]. Los resultados de esta simulación fueron satisfactorios.

4. CONCLUSIONES

Relativas a los “ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES Y CENTRO ACTIVO DE LA ADPRibasa-Mn DE *RATTUS NORVEGICUS* Y DE *DANIO RERIO*”

- 1 Por vez primera se hace coincidir información estructural y bioquímica en la misma proteína de la familia *ADPRibase-Mn* (la de *D. rerio*).
- 2 La ADPRibasa-Mn de rata hidroliza la unión fosfoanhídrido de ADP-ribosa cíclica (cADPR) formando como único producto *N*¹-(5-fosforribosil)-adenosina 5'-monofosfato (pRib-AMP), siendo ésta la primera enzima que se demuestra que posee este tipo de actividad.
- 3 La ADPRibasa-Mn de *D. rerio* tiene actividad fosfodiesterasa sobre 2',3'-cAMP, que da 3'-AMP como principal producto.
- 4 La ADPRibasa-Mn de *D. rerio* responde al Mn²⁺ de manera diferente a la de rata, pues ésta presenta curvas de saturación hiperbólicas por dicho metal, mientras que la primera presenta distintos tipos de curvas dependiendo del sustrato.
- 5 El centro activo de las proteínas ADPRibasa-Mn se localiza en un bolsillo estructural cerrado en el que se acomodan bien los sustratos por técnicas de modelado molecular (*docking*).
- 6 Una molécula de agua presente en los cristales de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*, y unida al centro dimetálico de la proteína, puede atacar en línea al P del enlace P–O escindible del sustrato, con la significativa excepción del cADPR que no es hidrolizado a velocidades significativas.
- 7 La cadena lateral de His⁹⁷ forma un puente de hidrógeno con el O del enlace P–O escindible y puede actuar como catalizador por orientación, con la excepción del sustrato rígido 2',3'-cAMP, cuya hidrólisis, a diferencia de los otros sustratos, se ve escasamente afectada en el mutante H97A de la ADPRibasa-Mn de *D. rerio*.

Relativas a los “ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES Y CENTRO ACTIVO DE LA TRIOQUINASA/FMN CICLASA HUMANA”

- 8 En una estructura homodimérica de hTKFC, modelada por homología con la DHA quinasa de *Citrobacter braaki*, cada subunidad (1 y 2) tiene dos dominios globulares (K1 y L1; K2 y L2) unidos por un largo espaciador, de manera que en el dímero se suceden de forma aproximadamente lineal los dominios L2–K1–K2–L1.
- 9 Los sustratos DHA y ATP se unen a centros activos abiertos entre los dominios K1L2 y K2L1, uniéndose DHA de forma covalente a His²²¹ (dominio K) e interaccionando el ATP con los dominios L, con la base adenina en un bolsillo hidrofóbico, la ribosa en puente de hidrógeno con Asp⁵⁵⁶, y el trifosfato coordinado con dos iones metálicos, que a su vez están coordinados por Asp³⁹⁶, Asp⁴⁰¹ y Asp⁴⁰³.
- 10 En esta estructura, la distancia entre DHA y ATP es de unos 14 Å, demasiado grande para la reacción de transferencia de fosfato.
- 11 En simulaciones de la dinámica molecular del complejo hTKFC:2ATP:2DHA se produce el cierre de uno de los centros activos con un acercamiento muy marcado de un hidroxilo de DHA al fósforo γ del ATP, a distancias próximas (≈ 5 Å) a las necesarias para la transferencia de fosfato.
- 12 En esta conformación se observa un puente de hidrógeno de Thr¹¹² (dominio K) con el grupo 6-amino del ATP (unido al dominio L enfrentado), y otro puente de hidrógeno de Lys²⁰⁴ (dominio K) con el carbonilo del esqueleto peptídico de Arg³⁹⁷ o de Ala³⁹⁸ (dominio L), interacciones bien posicionadas para estabilizar la forma cerrada del centro activo.
- 13 La unión de FAD (*docking*) a uno de los centros activos de hTKFC ocurre de forma similar a la unión de ATP.
- 14 El FAD puede adoptar una conformación con el grupo 4'-OH bien orientado para un ataque nucleofílico interno sobre el fósforo proximal, como se espera que ocurra en la reacción monosustrato de la actividad liasa ciclante.
- 15 Los dominios K y L, expresados por separado, carecen de actividad quinasa, mientras que el dominio L (pero no el K) es activo como FMN ciclasa, con una k_{cat} próxima al 50% de hTKFC, aunque con una K_M 10 veces mayor que hTKFC.
- 16 Mutaciones en aminoácidos clave del dominio K (Thr¹¹² e His²²¹) eliminan o afectan fuertemente a las actividades quinasa, con efectos sólo parciales sobre la FMN ciclasa.
- 17 Mutaciones en aminoácidos clave del dominio L (Asp⁴⁰¹, Asp⁴⁰³ y Asp⁵⁵⁶) eliminan las actividades quinasa y ciclasa, o bien (Cys⁴⁰⁴ y Ser⁴⁴⁶) afectan parcialmente, en distinto grado, a ambas actividades.

5. REFERENCIAS

1. Cabezas A, Costas MJ, Pinto RM, Couto A, Cameselle JC (2005) Identification of human and rat FAD-AMP lyase (cyclic FMN forming) as ATP-dependent dihydroxyacetone kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1682-1689.
2. Couto A (2010) Trioquinasa - FMN ciclase: Un Producto del Gen Humano DAK con Actividades Quinasa y Liasa Ciclante Distinguibiles por Mutagénesis Dirigida. Tesis Doctoral (Cameselle JC, Pinto RM, directores). Badajoz: Universidad de Extremadura.
3. Canales J, Fernández A, Ribeiro JM, Cabezas A, Cameselle JC, Costas MJ (2007) Molecular cloning and expression of the Mn(II)-dependent ADP-ribose/CDP-alcohol pyrophosphatase from the rat: a non-Nudix metallophosphatase preferentially expressed in immune cells. XXX Congreso de la SEBBM, Málaga, Libro de Actas, com T16-12.
4. Canales J, Fernández A, Ribeiro JM, Cabezas A, Rodrigues JR, Cameselle JC, Costas MJ (2008) Mn²⁺-dependent ADP-ribose/CDP-alcohol pyrophosphatase: a novel metallophosphoesterase family preferentially expressed in rodent immune cells. *Biochem J* 413: 103-113.
5. Canales J, Fernández A, Rodrigues JR, Ferreira R, Ribeiro JM, Cabezas A, Costas MJ, Cameselle JC (2009) Hydrolysis of the phosphoanhydride linkage of cyclic ADP-ribose by the Mn²⁺-dependent ADP-ribose/CDP-alcohol pyrophosphatase. *FEBS Lett* 583: 1593-1598.
6. Rodrigues JR, Fernandez A, Canales J, Cabezas A, Ribeiro JM, Costas MJ, Cameselle JC (2012) Characterization of *Danio rerio* Mn²⁺-dependent ADP-ribose/CDP-alcohol diphosphatase, the structural prototype of the ADPRibase-Mn-like protein family. *PLoS One* 7: e42249.
7. Canales J, Pinto RM, Costas MJ, Hernández MT, Miró A, Bernet D, Fernández A, Cameselle JC (1995) Rat liver nucleoside diphosphosugar or diphosphoalcohol pyrophosphatases different from nucleotide pyrophosphatase or phosphodiesterase I: substrate specificities of Mg²⁺- and/or Mn²⁺-dependent hydrolases acting on ADP-ribose. *Biochim Biophys Acta* 1246: 167-177.
8. Bernet D, Pinto RM, Costas MJ, Canales J, Cameselle JC (1994) Rat liver mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase in the matrix space with low K_m for free ADP-ribose. *Biochem J* 299: 679-682.

9. Carloto A, Costas MJ, Cameselle JC, McLennan AG, Ribeiro JM (2006) The specific, submicromolar- K_m ADP-ribose pyrophosphatase purified from human placenta is enzymically indistinguishable from recombinant NUDT9 protein, including a selectivity for Mn^{2+} as activating cation and increase in K_m for ADP-ribose, both elicited by H_2O_2 . *Biochim Biophys Acta* 1760: 1545-1551.
10. Perraud AL, Shen B, Dunn CA, Rippe K, Smith MK, Bessman MJ, Stoddard BL, Scharenberg AM (2003) NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem* 278: 1794-1801.
11. Ribeiro JM, Carloto A, Costas MJ, Cameselle JC (2001) Human placenta hydrolases active on free ADP-ribose: an ADP-sugar pyrophosphatase and a specific ADP-ribose pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1526: 86-94.
12. Zha M, Zhong C, Peng Y, Hu H, Ding J (2006) Crystal structures of human NUDT5 reveal insights into the structural basis of the substrate specificity. *J Mol Biol* 364: 1021-1033.
13. Cameselle JC, Costas MJ, Günther Sillero MA, Sillero A (1984) Two low K_m hydrolytic activities on dinucleoside 5',5'''- P^1, P^2 -tetrphosphates in rat liver. Characterization as the specific dinucleoside tetrphosphatase and a phosphodiesterase I-like enzyme. *J Biol Chem* 259: 2879-2885.
14. Lin S, Gasmi L, Xie Y, Ying K, Gu S, Wang Z, Jin H, Chao Y, Wu C, Zhou Z, Tang R, Mao Y, McLennan AG (2002) Cloning, expression and characterisation of a human Nudix hydrolase specific for adenosine 5'-diphosphoribose (ADP-ribose). *Biochim Biophys Acta* 1594: 127-135.
15. Miró A, Costas MJ, García-Díaz M, Hernández MT, Cameselle JC (1989) A specific, low K_m ADP-ribose pyrophosphatase from rat liver. *FEBS Lett* 244: 123-126.
16. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411: 595-599.
17. Ash DE, Schramm VL (1982) Determination of free and bound manganese(II) in hepatocytes from fed and fasted rats. *J Biol Chem* 257: 9261-9264.
18. Hutton JJ, Jegga AG, Kong S, Gupta A, Ebert C, Williams S, Katz JD, Aronow BJ (2004) Microarray and comparative genomics-based identification of genes and gene regulatory regions of the mouse immune system. *BMC Genomics* 5: 82.
19. Berger F, Ramirez-Hernandez MH, Ziegler M (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* 29: 111-118.
20. Hilz H (1997) ADP-ribose. A historical overview. *Adv Exp Med Biol* 419: 15-24.
21. Gasser A, Bruhn S, Guse AH (2006) Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *J Biol Chem* 281: 16906-16913.
22. Gerth A, Nieber K, Oppenheimer NJ, Hauschildt S (2004) Extracellular NAD^+ regulates intracellular free calcium concentration in human monocytes. *Biochem J* 382: 849-856.
23. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A (2005) TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflügers Arch* 451: 212-219.
24. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM (2005) Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 280: 6138-6148.
25. Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, Furuichi K (2001) Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science* 293: 1327-1330.
26. Kent C (2005) Regulatory enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis: a personal perspective. *Biochim Biophys Acta* 1733: 53-66.
27. Vance JE, Vance DE (2004) Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 82: 113-128.

28. Bessman MJ, Frick DN, O'Handley SF (1996) The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* 271: 25059-25062.
29. McLennan AG (2006) The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci* 63: 123-143.
30. Klabunde T, Sträter N, Fröhlich R, Witzel H, Krebs B (1996) Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. *J Mol Biol* 259: 737-748.
31. Lohse DL, Denu JM, Dixon JE (1995) Insights derived from the structures of the Ser/Thr phosphatases calcineurin and protein phosphatase 1. *Structure* 3: 987-990.
32. Richter W (2002) 3',5' Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: members, structure, and catalytic mechanism. *Proteins* 46: 278-286.
33. Shenoy AR, Capuder M, Draskovic P, Lamba D, Visweswariah SS, Podobnik M (2007) Structural and biochemical analysis of the Rv0805 cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* 365: 211-225.
34. Phillips GN, Jr., Fox BG, Markley JL, Volkman BF, Bae E, Bitto E, Bingman CA, Frederick RO, McCoy JG, Lytle BL, Pierce BS, Song J, Twigger SN (2007) Structures of proteins of biomedical interest from the Center for Eukaryotic Structural Genomics. *J Struct Funct Genomics* 8: 73-84.
35. Bitto E, Wesenberg GE, Phillips Jr. GN, McCoy JG, Bingman CA (2006) Crystal structure of a dimetal phosphatase from *Danio rerio* LOC 393393. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2NXF>.
36. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* 19: 1639-1662.
37. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 8: 127-134.
38. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD - visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33-38.
39. Smith DW, Ames BN (1965) Phosphoribosyladenosine monophosphate, an intermediate in histidine biosynthesis. *J Biol Chem* 240: 3056-3063.
40. Kim H, Jacobson EL, Jacobson MK (1993) Position of cyclization in cyclic ADP-ribose. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1143-1147.
41. Gu Q-M, Sih CJ (1994) Cyclic ADP-ribose: synthesis and structural assignment. *J Am Chem Soc* 116: 7481-7486.
42. Kim H, Jacobson EL, Jacobson MK (1993) Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD glycohydrolases. *Science* 261: 1330-1333.
43. Alonso H, Bliznyuk AA, Gready JE (2006) Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med Res Rev* 26: 531-568.
44. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779-815.
45. Keppetipola N, Shuman S (2008) A phosphate-binding histidine of binuclear metallophosphodiesterase enzymes is a determinant of 2',3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. *J Biol Chem* 283: 30942-30949.
46. London WP, Steck TL (1969) Kinetics of enzyme reactions with interaction between a substrate and a (metal) modifier. *Biochemistry* 8: 1767-1779.
47. Fontes R, Ribeiro JM, Sillero A (2000) Inhibition and activation of enzymes. The effect of a modifier on the reaction rate and on kinetic parameters. *Acta Biochim Pol* 47: 233-257.
48. Segel IH (1975, reprinted 1993) *Enzyme Kinetics*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
49. StatSoft, Inc (2013) *How to Calculate the Relationship between Independent Variables and a Dependent Variable, Nonlinear Estimation*. Electronic Statistics Textbook. Tulsa, Oklahoma. <http://www.statsoft.com/textbook/nonlinear-estimation/>: StatSoft.
50. Gabelli SB, Bianchet MA, Ohnishi Y, Ichikawa Y, Bessman MJ, Amzel LM (2002) Mechanism of the *Escherichia coli* ADP-ribose pyrophosphatase, a Nudix hydrolase. *Biochemistry* 41: 9279-9285.
51. Gabelli SB, Bianchet MA, Bessman MJ, Amzel LM (2001) The structure of ADP-ribose pyrophosphatase reveals the structural basis for the versatility of the Nudix family. *Nat Struct Biol* 8: 467-472.

52. Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, Bordoli L, Schwede T (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 37: D387-392.
53. Cabezas A, Fernández A, Canales J, Ribeiro JM, Pinto RM, López-Villamizar I, Rodrigues JR, Costas MJ, Cameselle JC (2011) The active site of human Mn(II)-dependent ADP-ribose/CDP-alcohol diphosphatase or ADPRibase-Mn: a mutagenesis study. XXXIV Congreso de la SEBBM, Barcelona, Libro de Actas.
54. Rao F, Qi Y, Murugan E, Pasunooti S, Ji Q (2010) 2',3'-cAMP hydrolysis by metal-dependent phosphodiesterases containing DHH, EAL, and HD domains is non-specific: Implications for PDE screening. *Biochem Biophys Res Commun* 398: 500-505.
55. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R (2005) Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 18: 61-69.
56. Beck A, Kolisek M, Bagley LA, Fleig A, Penner R (2006) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes. *FASEB J* 20: 1220-1223.
57. Partida-Sánchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, Kusser K, Goodrich S, Howard M, Harmsen A, Randall TD, Lund FE (2001) Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance *in vivo*. *Nat Med* 7: 1209-1216.
58. Schuber F, Lund FE (2004) Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med* 4: 249-261.
59. Lee HC, Aarhus R (1991) ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul* 2: 203-209.
60. Takasawa S, Tohgo A, Noguchi N, Koguma T, Nata K, Sugimoto T, Yonekura H, Okamoto H (1993) Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP. *J Biol Chem* 268: 26052-26054.
61. Summerhill RJ, Jackson DG, Galione A (1993) Human lymphocyte antigen CD38 catalyzes the production of cyclic ADP-ribose. *FEBS Lett* 335: 231-233.
62. Zocchi E, Franco L, Guida L, Benatti U, Bargellesi A, Malavasi F, Lee HC, De Flora A (1993) A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1459-1465.
63. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, Walseth TF, Lee HC (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262: 1056-1059.
64. Lee HC, Zocchi E, Guida L, Franco L, Benatti U, De Flora A (1993) Production and hydrolysis of cyclic ADP-ribose at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 639-645.
65. Lee HC (2006) Structure and enzymatic functions of human CD38. *Mol Med* 12: 317-323.
66. Yamamoto-Katayama S, Ariyoshi M, Ishihara K, Hirano T, Jingami H, Morikawa K (2002) Crystallographic studies on human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl cyclase and NAD glycohydrolase activities. *J Mol Biol* 316: 711-723.
67. Hirata Y, Kimura N, Sato K, Ohsugi Y, Takasawa S, Okamoto H, Ishikawa J, Kaisho T, Ishihara K, Hirano T (1994) ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett* 356: 244-248.
68. Ziegler M, Jorcke D, Schweiger M (1997) Identification of bovine liver mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem J* 326: 401-405.
69. Davis LC, Morgan AJ, Ruas M, Wong JL, Graeff RM, Poustka AJ, Lee HC, Wessel GM, Parrington J, Galione A (2008) Ca²⁺ signaling occurs via second messenger release from intraorganelle synthesis sites. *Curr Biol* 18: 1612-1618.
70. Zhao YJ, Lam CM, Lee HC (2012) The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations. *Sci Signal* 5: ra67.
71. Takahashi K, Kukimoto I, Tokita K, Inageda K, Inoue S, Kontani K, Hoshino S, Nishina H, Kanaho Y, Katada T (1995) Accumulation of cyclic ADP-ribose measured by a

- specific radioimmunoassay in differentiated human leukemic HL-60 cells with all-*trans*-retinoic acid. FEBS Lett 371: 204-208.
72. Graeff R, Lee HC (2002) A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar sensitivity. Biochem J 361: 379-384.
 73. Lee HC (2002) Cyclic ADP-ribose and NAADP: A story of two calcium messengers. In: Lee HC, editor. Cyclic ADP-ribose and NAADP Structures, Metabolism and Functions. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 1-21.
 74. Inageda K, Takahashi K, Tokita K, Nishina H, Kanaho Y, Kukimoto I, Kontani K, Hoshino S, Katada T (1995) Enzyme properties of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase: comparison with NAD glycohydrolase of CD38 antigen. J Biochem 117: 125-131.
 75. Kukimoto I, Hoshino S, Kontani K, Inageda K, Nishina H, Takahashi K, Katada T (1996) Stimulation of ADP-ribosyl cyclase activity of the cell surface antigen CD38 by zinc ions resulting from inhibition of its NAD⁺ glycohydrolase activity. Eur J Biochem 239: 177-182.
 76. Alifano P, Fani R, Lio P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS, Bruni CB (1996) Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. Microbiol Rev 60: 44-69.
 77. Stepansky A, Leustek T (2006) Histidine biosynthesis in plants. Amino Acids 30: 127-142.
 78. Sana TR, Gordon DB, Fischer SM, Tichy SE, Kitagawa N, Lai C, Gosnell WL, Chang SP (2013) Global mass spectrometry based metabolomics profiling of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. PLoS One 8: e60840.
 79. Jones ML, Cottingham C, Rayner JC (2009) Effects of calcium signaling on *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion and post-translational modification of gliding-associated protein 45 (PfGAP45). Mol Biochem Parasitol 168: 55-62.
 80. Mitic N, Smith SJ, Neves A, Guddat LW, Gahan LR, Schenk G (2006) The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. Chem Rev 106: 3338-3363.
 81. White DJ, Reiter NJ, Sikkink RA, Yu L, Rusnak F (2001) Identification of the high affinity Mn²⁺ binding site of bacteriophage lambda phosphoprotein phosphatase: effects of metal ligand mutations on electron paramagnetic resonance spectra and phosphatase activities. Biochemistry 40: 8918-8929.
 82. Kimura E (2000) Dimetallic hydrolases and their models. Curr Opin Chem Biol 4: 207-213.
 83. Smoukov SK, Quaroni L, Wang X, Doan PE, Hoffman BM, Que L, Jr. (2002) Electro-nuclear double resonance spectroscopic evidence for a hydroxo-bridge nucleophile involved in catalysis by a dinuclear hydrolase. J Am Chem Soc 124: 2595-2603.
 84. Swingle MR, Honkanen RE, Ciszak EM (2004) Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. J Biol Chem 279: 33992-33999.
 85. Funhoff EG, Wang Y, Andersson G, Averill BA (2005) Substrate positioning by His92 is important in catalysis by purple acid phosphatase. FEBS J 272: 2968-2977.
 86. Jarvis RA, Patrick EA (1973) Clustering using a similarity measure based on shared near neighbors. IEEE Trans Comput C22: 1025-1034.
 87. Keppetipola N, Shuman S (2007) Characterization of the 2',3' cyclic phosphodiesterase activities of *Clostridium thermocellum* polynucleotide kinase-phosphatase and bacteriophage lambda phosphatase. Nucleic Acids Res 35: 7721-7732.
 88. Shenoy AR, Sreenath N, Podobnik M, Kovacevic M, Visweswariah SS (2005) The Rv0805 gene from *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. Biochemistry 44: 15695-15704.
 89. Miller DJ, Shuvalova L, Evdokimova E, Savchenko A, Yakunin AF, Anderson WF (2007) Structural and biochemical characterization of a novel Mn²⁺-dependent phosphodiesterase encoded by the *yfcE* gene. Protein Sci 16: 1338-1348.
 90. Bitto E, Wesenberg GE, Phillips Jr. GN, McCoy JG, Bingman CA (2006) Dimetal phosphatase from *Danio rerio* LOC 393393. Center for Eukaryotic Structural Genomics (CESG), University of Wisconsin-Madison Biochemistry Department. <http://www.uwstructuralgenomics.org/gallery/2nxf.pdf>.
 91. Finney LA, O'Halloran TV (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. Science 300: 931-936.

92. Rodrigues JR, Couto A, Cabezas A, Pinto RM, Ribeiro JM, Costas MJ, Cameselle JC (2010) Mutagenesis and molecular modeling studies of human triokinase/FMN cyclase. XVII Congresso Nacional de Bioquímica, Porto, Abstract Book, com P A27.
93. Rodrigues JR, Cabezas A, Costas MJ, Cameselle JC (2008) Effects of S446A, D556A and T112A mutations on the activities of the triose kinase/FMN cyclase encoded by the human DAK gene. XXXI Congreso de la SEBBM, Bilbao, Libro de Actas, com T16-13.
94. Rodrigues JR, Cabezas A, Costas MJ, Cameselle JC (2007) Site-directed mutagenesis of the ATP-binding site in the K domains of the human homodimeric DHA kinase/FMN cyclase. XXX Congreso de la SEBBM, Málaga, Libro de Actas, com T16-12.
95. Hers HG, Kusaka T (1953) Le métabolisme du fructose-1-phosphate dans le foie. *Biochim Biophys Acta* 11: 427-437.
96. Sillero MAG, Sillero A, Sols A (1969) Enzymes involved in fructose metabolism in liver and the glyceraldehyde metabolic crossroads. *Eur J Biochem* 10: 345-350.
97. Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R (2005) Fructose metabolizing enzymes from mouse liver: influence of age and caloric restriction. *Biochim Biophys Acta* 1721: 37-43.
98. Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R (2008) Enzymes of glycerol and glyceraldehyde metabolism in mouse liver: effects of caloric restriction and age on activities. *Biosci Rep* 28: 107-115.
99. Schomburg D, Schomburg I, Chang A (2007) Triokinase 2.7.1.28. In: Schomburg D, Schomburg I, editors. *Springer Handbook of Enzymes*, Vol 35, Class 2, Transferases, 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 342-344.
100. Schomburg D, Schomburg I, Chang A (2007) Glycerone kinase 2.7.1.29. In: Schomburg D, Schomburg I, editors. *Springer Handbook of Enzymes*, Vol 35, Class 2, Transferases, 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 345-350.
101. Schomburg D, Schomburg I, Chang A (2007) Glycerol kinase 2.7.1.30. *Springer Handbook of Enzymes*, Vol 35, Class 2, Transferases, 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 351-365.
102. Gancedo C, Llobell A, Ribas JC, Luchi F (1986) Isolation and characterization of mutants from *Schyzosaccharomyces pombe* defective in glycerol catabolism. *Eur J Biochem* 159: 171-174.
103. Daniel R, Stuertz K, Gottschalk G (1995) Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *J Bacteriol* 177: 4392-4401.
104. Norbeck J, Blomberg A (1997) Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J Biol Chem* 272: 5544-5554.
105. Wang W, Sun J, Hartlep M, Deckwer WD, Zeng AP (2003) Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Bioeng* 83: 525-536.
106. McCabe ERB (2001) Disorders of glycerol metabolism. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, Childs B et al., editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill. pp. 2217-2237.
107. Brisson D, Vohl MC, St-Pierre J, Hudson TJ, Gaudet D (2001) Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? *Bioessays* 23: 534-542.
108. Mayes PA (1993) Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 58: 754S-765S.
109. Jenkins BT, Hajra AK (1976) Glycerol kinase and dihydroxyacetone kinase in rat brain. *J Neurochem* 26: 377-385.
110. Stanko RT, Robertson RJ, Galbreath RW, Reilly JJ, Jr., Greenawalt KD, Goss FL (1990) Enhanced leg exercise endurance with a high-carbohydrate diet and dihydroxyacetone and pyruvate. *J Appl Physiol* 69: 1651-1656.
111. Stanko RT, Robertson RJ, Spina RJ, Reilly JJ, Jr., Greenawalt KD, Goss FL (1990) Enhancement of arm exercise endurance capacity with dihydroxyacetone and pyruvate. *J Appl Physiol* 68: 119-124.
112. Levy SB (1992) Dihydroxyacetone-containing sunless or self-tanning lotions. *J Am Acad Dermatol* 27: 989-993.

113. Soler C, Soley M (1993) Rapid and delayed effects of epidermal growth factor on gluconeogenesis. *Biochem J* 294: 865-872.
114. Ivy JL (1998) Effect of pyruvate and dihydroxyacetone on metabolism and aerobic endurance capacity. *Med Sci Sports Exerc* 30: 837-843.
115. Taguchi T, Murase S, Miwa I (2002) Glyceraldehyde metabolism in human erythrocytes in comparison with that of glucose and dihydroxyacetone. *Cell Biochem Funct* 20: 223-226.
116. Miwa I, Kito Y, Okuda J (1994) Purification and characterization of triokinase from porcine kidney. *Prep Biochem* 24: 203-223.
117. Burns SP, Murphy HC, Iles RA, Bailey RA, Cohen RD (2000) Hepatic intralobular mapping of fructose metabolism in the rat liver. *Biochem J* 349: 539-545.
118. Steinmann B, Gitzelmann R, Van den Berghe G (2001) Disorders of fructose metabolism. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, Childs B et al., editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill. pp. 1489-1520.
119. Sievenpiper JL, Carleton AJ, Chatha S, Jiang HY, de Souza RJ, Beyene J, Kendall CW, Jenkins DJ (2009) Heterogeneous effects of fructose on blood lipids in individuals with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of experimental trials in humans. *Diabetes Care* 32: 1930-1937.
120. Tappy L, Le KA (2010) Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90: 23-46.
121. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH (2010) The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 251-264.
122. Johnson RJ, Sanchez-Lozada LG, Nakagawa T (2010) The effect of fructose on renal biology and disease. *J Am Soc Nephrol* 21: 2036-2039.
123. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K (2010) Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E685-694.
124. Samuel VT (2011) Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 22: 60-65.
125. Madero M, Perez-Pozo SE, Jalal D, Johnson RJ, Sanchez-Lozada LG (2011) Dietary fructose and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 13: 29-35.
126. Costas MJ, Couto A, Pinto RM, Rodrigues JR, Cabezas A, Ribeiro JM, Cameselle JC (2008) Triokinase is a product of the *DAK* gene with FMN cyclase activity. XXXI Congreso de la SEBBM, Bilbao, Libro de Actas, com T18-19.
127. Fraiz FJ, Pinto RM, Costas MJ, Avalos M, Canales J, Cabezas A, Cameselle JC (1998) Enzymic formation of riboflavin 4',5'-cyclic phosphate from FAD: evidence for a specific low- K_m FMN cyclase in rat liver. *Biochem J* 330: 881-888.
128. Cabezas A, Pinto RM, Fraiz F, Canales J, González-Santiago S, Cameselle JC (2001) Purification, characterization, and substrate and inhibitor structure-activity studies of rat liver FAD-AMP lyase (cyclizing): preference for FAD and specificity for splitting ribonucleoside diphosphate-X into ribonucleotide and a five-atom cyclic phosphodiester of X, either a monocyclic compound or a *cis*-bicyclic phosphodiester-pyranose fusion. *Biochemistry* 40: 13710-13722.
129. Canales J, Cabezas A, Pinto RM, Cameselle JC (2005) Fluorimetric HPLC detection of endogenous riboflavin 4',5'-cyclic phosphate in rat liver at nanomolar concentrations. *Anal Biochem* 341: 214-219.
130. Sánchez-Moreno I, Iturrate L, Martín-Hoyos R, Jimeno ML, Mena M, Bastida A, García-Junceda E (2009) From kinase to cyclase: an unusual example of catalytic promiscuity modulated by metal switching. *Chembiochem* 10: 225-229.
131. Cabezas A (2001) Purificación y Caracterización de la FAD-AMP Liasa (Ciclante) o FMN Ciclasa de Hígado de Rata. Tesis Doctoral (Cameselle JC, Pinto RM, directores). Badajoz: Universidad de Extremadura.
132. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6062-6067.

133. Pontius JU, Wagner L, Schuler GD (2003) UniGene: a unified view of the transcriptome. The NCBI Handbook. Bethesda, MD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>): National Center for Biotechnology Information.
134. Diao F, Li S, Tian Y, Zhang M, Xu LG, Zhang Y, Wang RP, Chen D, Zhai Z, Zhong B, Tien P, Shu HB (2007) Negative regulation of MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral signaling by the dihydroxyacetone kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 11706-11711.
135. Komuro A, Bamming D, Horvath CM (2008) Negative regulation of cytoplasmic RNA-mediated antiviral signaling. *Cytokine* 43: 350-358.
136. Tessier FJ, Monnier VM, Sayre LM, Kornfield JA (2003) Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem J* 369: 705-719.
137. Petersen AB, Wulf HC, Gniadecki R, Gajkowska B (2004) Dihydroxyacetone, the active browning ingredient in sunless tanning lotions, induces DNA damage, cell-cycle block and apoptosis in cultured HaCaT keratinocytes. *Mutat Res* 560: 173-186.
138. Usui T, Shimohira K, Watanabe H, Hayase F (2004) Detection and determination of glyceraldehyde-derived advanced glycation end product. *Biofactors* 21: 391-394.
139. Takeuchi M, Yamagishi S (2004) Alternative routes for the formation of glyceraldehyde-derived AGEs (TAGE) in vivo. *Med Hypotheses* 63: 453-455.
140. Usui T, Shizuuchi S, Watanabe H, Hayase F (2004) Cytotoxicity and oxidative stress induced by the glyceraldehyde-related Maillard reaction products for HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 333-340.
141. Molin M, Pilon M, Blomberg A (2007) Dihydroxyacetone-induced death is accompanied by advanced glycation endproduct formation in selected proteins of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics* 7: 3764-3774.
142. Kitahara Y, Takeuchi M, Miura K, Mine T, Matsui T, Yamagishi S (2008) Glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs). A novel biomarker of postprandial hyperglycaemia in diabetic rats. *Clin Exp Med* 8: 175-177.
143. Molin M, Norbeck J, Blomberg A (2003) Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone. *J Biol Chem* 278: 1415-1423.
144. Uzcátegui NL, Denninger V, Merkel P, Schoenfeld C, Figarella K, Duszenko M (2007) Dihydroxyacetone induced autophagy in african trypanosomes. *Autophagy* 3: 626-629.
145. Uzcátegui NL, Carmona-Gutiérrez D, Denninger V, Schoenfeld C, Lang F, Figarella K, Duszenko M (2007) Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3960-3968.
146. Siebold C, Arnold I, Garcia-Alles LF, Baumann U, Erni B (2003) Crystal structure of the *Citrobacter freundii* dihydroxyacetone kinase reveals an eight-stranded alpha-helical barrel ATP-binding domain. *J Biol Chem* 278: 48236-48244.
147. Garcia-Alles LF, Siebold C, Nyffeler TL, Flukiger-Bruhwiller K, Schneider P, Burgi HB, Baumann U, Erni B (2004) Phosphoenolpyruvate- and ATP-dependent dihydroxyacetone kinases: covalent substrate-binding and kinetic mechanism. *Biochemistry* 43: 13037-13045.
148. Erni B, Siebold C, Christen S, Srinivas A, Oberholzer A, Baumann U (2006) Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases. *Cell Mol Life Sci* 63: 890-900.
149. Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 291-325.
150. Pieper U, Eswar N, Webb BM, Eramian D, Kelly L, Barkan DT, Carter H, Mankoo P, Karchin R, Marti-Renom MA, Davis FP, Sali A (2009) MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Res* 37: D347-354.
151. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 26: 283-291.

152. Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE (1996) Errors in protein structures. *Nature* 381: 272.
153. Denessiouk KA, Rantanen VV, Johnson MS (2001) Adenine recognition: a motif present in ATP-, CoA-, NAD-, NADP-, and FAD-dependent proteins. *Proteins* 44: 282-291.
154. Wang R, Lai L, Wang S (2002) Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des* 16: 11-26.
155. Gohlke H, Hendlich M, Klebe G (2000) Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol* 295: 337-356.
156. Charifson PS, Corkery JJ, Murcko MA, Walters WP (1999) Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J Med Chem* 42: 5100-5109.
157. Clark RD, Strizhev A, Leonard JM, Blake JF, Matthew JB (2002) Consensus scoring for ligand/protein interactions. *J Mol Graph Model* 20: 281-295.
158. Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, Yang R, Cieplak P, Luo R, Lee T, Caldwell J, Wang J, Kollman P (2003) A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem* 24: 1999-2012.
159. Lou H, Cukier RI (2006) Molecular dynamics of apo-adenylate kinase: a principal component analysis. *J Phys Chem B* 110: 12796-12808.
160. Haider S, Parkinson GN, Neidle S (2008) Molecular dynamics and principal components analysis of human telomeric quadruplex multimers. *Biophys J* 95: 296-311.
161. Roccatano D, Mark AE, Hayward S (2001) Investigation of the mechanism of domain closure in citrate synthase by molecular dynamics simulation. *J Mol Biol* 310: 1039-1053.
162. Loeffler HH, Kitao A (2009) Collective dynamics of periplasmic glutamine binding protein upon domain closure. *Biophys J* 97: 2541-2549.
163. Cramer CJ (2004) *Essentials of Computational Chemistry. Theories and Models*. 2nd ed. Chichester, England: John Wiley & Sons.
164. Hess B (2000) Similarities between principal components of protein dynamics and random diffusion. *Phys Rev E* 62: 8438-8448.
165. Hess B (2002) Convergence of sampling in protein simulations. *Phys Rev E* 65: 031910.
166. Hayward S (2001) Normal mode analysis of biological molecules. In: Becker OM, MacKerell Jr. AD, Roux B, Watanabe M, editors. *Computational Biochemistry and Biophysics*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 153-168.
167. Go N, Noguti T, Nishikawa T (1983) Dynamics of a small globular protein in terms of low-frequency vibrational modes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3696-3700.
168. Case DA (1994) Normal mode analysis of protein dynamics. *Curr Opin Struct Biol* 4: 285-290.
169. Brooks B, Karplus M (1983) Harmonic dynamics of proteins: normal modes and fluctuations in bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6571-6575.
170. van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26: 1701-1718.
171. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* 4: 435-447.
172. Ma J (2005) Usefulness and limitations of normal mode analysis in modeling dynamics of biomolecular complexes. *Structure* 13: 373-380.
173. Trakhanov S, Vyas NK, Luecke H, Kristensen DM, Ma J, Quioco FA (2005) Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry* 44: 6597-6608.
174. Meireles L, Gur M, Bakan A, Bahar I (2011) Pre-existing soft modes of motion uniquely defined by native contact topology facilitate ligand binding to proteins. *Protein Sci* 20: 1645-1658.
175. Lukman S, Grant GH (2009) A network of dynamically conserved residues deciphers the motions of maltose transporter. *Proteins* 76: 588-597.

176. Bahar I, Chennubhotla C, Tobi D (2007) Intrinsic dynamics of enzymes in the unbound state and relation to allosteric regulation. *Curr Opin Struct Biol* 17: 633-640.
177. Davis L (1973) The structure of dihydroxyacetone in solution. *Bioorg Chem* 2: 197-201.
178. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
179. Harris JI, Waters M (1976) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: Boyer PD, editor. *The Enzymes*, 3rd ed, Vol 13. New York: Academic Press. pp. 1-49.
180. Sevostyanova IA, Solovjeva ON, Kochetov GA (2006) Two methods for determination of transketolase activity. *Biochemistry (Mosc)* 71: 560-562.
181. Bykova IA, Solovjeva ON, Meshalkina LE, Kovina MV, Kochetov GA (2001) One-substrate transketolase-catalyzed reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 845-847.
182. Rose PW, Bi C, Bluhm WF, Christie CH, Dimitropoulos D, Dutta S, Green RK, Goodsell DS, Prlic A, Quesada M, Quinn GB, Ramos AG, Westbrook JD, Young J, Zardecki C, Berman HM, Bourne PE (2013) The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education. *Nucleic Acids Res* 41: D475-482.
183. Wallner B, Elofsson A (2005) All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs. *Protein Sci* 14: 1315-1327.
184. Shen MY, Sali A (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* 15: 2507-2524.
185. Word JM, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC (1999) Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation. *J Mol Biol* 285: 1735-1747.
186. Sanner MF (2005) A component-based software environment for visualizing large macromolecular assemblies. *Structure* 13: 447-462.
187. Pang YP (2001) Successful molecular dynamics simulation of two zinc complexes bridged by a hydroxide in phosphotriesterase using the cationic dummy atom method. *Proteins* 45: 183-189.
188. Fiser A, Do RK, Sali A (2000) Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci* 9: 1753-1773.
189. Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem* 28: 1145-1152.
190. Solis FJ, Wets RJ-B (1981) Minimization by random search techniques. *Math Oper Res* 6: 19-30.
191. van Gunsteren WF, Berendsen HJC (1990) Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew Chem Int Ed Eng* 29: 992-1023.
192. Leach AR (2001) *Molecular Modeling: Principles and Applications*, 2nd. ed. Harlow, Essex, England: Pearson Education Limited.
193. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Hermans J (1981) Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B, editor. *Intermolecular Forces*. Dordrecht: Reidel. pp. 331-342.
194. Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, van Gunsteren WF (2004) A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem* 25: 1656-1676.
195. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81: 3684-3690.
196. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 18: 1463-1472.
197. Hess B (2008) P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J Chem Theory Comput* 4: 116-122.
198. Miyamoto S, Kollman PA (1992) SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comp Chem* 13: 952-962.
199. Winger M, Yu H, Redfield C, van Gunsteren WF (2007) Molecular dynamics simulation of human interleukin-4: comparisons with NMR data and effect of pH, counterions and force field on tertiary structure stability. *Mol Simul* 33: 1143-1154.

200. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79: 926.
201. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys* 103: 8577.
202. Amadei A, Linssen AB, Berendsen HJ (1993) Essential dynamics of proteins. *Proteins* 17: 412-425.
203. Garcia AE (1992) Large-amplitude nonlinear motions in proteins. *Phys Rev Lett* 68: 2696-2699.
204. Kitao A, Hirata F, Go N (1991) The effects of solvent on the conformation and the collective motions of protein: Normal mode analysis and molecular dynamics simulations of melittin in water and in vacuum. *Chem Phys* 158: 447-472.
205. Bolton EE, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH (2008) PubChem: Integrated platform of small molecules and biological activities. *Annu Rep Comput Chem* 4: 217-241.
206. Gasteiger J, Marsili M (1980) Iterative partial equalization of orbital electronegativity - A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 36: 3219-3228.
207. Forli S, Botta M (2007) Lennard-Jones potential and dummy atom settings to overcome the AUTODOCK limitation in treating flexible ring systems. *J Chem Inf Model* 47: 1481-1492.
208. Ye Y (2007) ADL: flexible docking of cycles? in *The Autodock Archives* <http://mgldev.scripps.edu/pipermail/autodock/2007-September/002847.html>.
209. Micaelo NM, Teixeira VH, Baptista AM, Soares CM (2005) Water dependent properties of cutinase in nonaqueous solvents: a computational study of enantioselectivity. *Biophys J* 89: 999-1008.
210. Schmidt MW, Baldrige KK, Boatz JA, Elbert ST, Gordon MS, Jensen JH, Koseki S, Matsunaga S, Nguyen KA, Su SJ, Windus TL, Dupuis M, Montgomery JA (1993) General atomic and molecular electronic-structure system. *J Comp Chem* 13: 1347-1363.
211. Bayly CI, Cieplak P, Cornell WD, Kollman PA (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J Phys Chem* 97: 10269-10280.
212. Sousa da Silva AW, Vranken WF (2012) ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res Notes* 5: 367.
213. Christen S, Srinivas A, Bahler P, Zeller A, Pridmore D, Bieniossek C, Baumann U, Erni B (2006) Regulation of the DHA operon of *Lactococcus lactis*: A deviation from the rule followed by the tetr family of transcription regulators. *J Biol Chem* 281: 23129-23137.
214. MacKerell Jr. AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack Jr. RL, Evanseck J, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT, Prodhom B, Reiher I, W. E., Roux B, Schlenkrich M, Smith J, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiorkiewicz-Kuczera J, Yin D, Karplus M (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of protein. *J Phys Chem B* 102: 3586-3616.
215. Kamath G, Guvench O, MacKerell Jr. AD (2008) CHARMM additive all-atom force field for acyclic carbohydrates and inositol. *J Chem Theory Comput* 4: 765-778.
216. Kamath G, Guvench O, MacKerell Jr. AD (2008) Retraction - CHARMM additive all-atom force field for acyclic carbohydrates and inositol. *J Chem Theory Comput* 4: 1990.
217. Dupradeau FY, Cézard C, Lelong R, Stanislawiak É, Pêcher J, Delepine JC, Cieplak P (2008) R.E.D.D.B.: A database for RESP and ESP atomic charges, and force field libraries. *Nucleic Acids Res* 36: D360-367.
218. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004) Development and testing of a general Amber force field. *J Comput Chem* 25: 1157.
219. Dupradeau FY, Pigache A, Zaffran T, Savineau C, Lelong R, Grivel N, Lelong D, Rosanski W, Cieplak P (2010) The R.E.D. tools: Advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Phys Chem Chem Phys* 12: 7821.
220. Connolly ML (1983) Analytical molecular surface calculation. *J Appl Cryst* 16: 548-558.
221. Vanquelef E, Simon S, Marquant G, Garcia E, Klimerak G, Delepine JC, Cieplak P, Dupradeau FY (2011) R.E.D. Server: A web service for deriving RESP and ESP

- charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments. *Nucleic Acids Res* 39: W511.
222. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery J, J.A., Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA (2004) *Gaussian 03*, Revision E.01. Wallingford CT: Gaussian, Inc.
223. Sorin EJ, Pande VS (2005) Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations. *Biophys J* 88: 2472-2493.
224. DePaul AJ, Thompson EJ, Patel SS, Haldeman K, Sorin EJ (2010) Equilibrium conformational dynamics in an RNA tetraloop from massively parallel molecular dynamics. *Nucleic Acids Res* 38: 4856-4867.

6. CONTENIDO DEL SUPLEMENTO CD-ROM

6.1 Artículos

- Articulo_1_biochemj_2008.pdf Canales J, Fernández A, Ribeiro JM, Cabezas A, Rodrigues JR, Cameselle JC and Costas MJ (2008) Mn^{2+} -dependent ADP-ribose/CDP-alcohol pyrophosphatase: a novel metallophosphoesterase family preferentially expressed in rodent immune cells. *Biochemical Journal* 413: 103-113.
- Articulo_2_febstet_2009.pdf Canales J, Fernández A, Rodrigues JR, Ferreira R, Ribeiro JM, Cabezas A, Costas MJ, Cameselle JC (2009) Hydrolysis of the phosphoanhydride linkage of cyclic ADP-ribose by the Mn^{2+} -dependent ADP-ribose/CDP-alcohol pyrophosphatase. *FEBS Letters* 583: 1593-1598.
- Articulo_3_plosone_2012.pdf Rodrigues JR, Fernández A, Canales J, Cabezas A, Ribeiro JM, Costas MJ, Cameselle JC (2012) Characterization of *Danio rerio* Mn^{2+} -Dependent ADPRibose/CDP-Alcohol Diphosphatase, the Structural Prototype of the ADPRibase-Mn-Like Protein Family. *PLoS ONE* 7: e42249.

6.2 Estructuras

- ADPRM_APR.pdb Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de rata (ADPRM) en complejo con ADP-ribosa (APR)
- ADPRM_CXR.pdb Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de rata en complejo con cADPR (CXR)
- 2NXF_APR_1.pdb Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de *Danio rerio* (2NXF) en complejo con ADP-ribosa

| | |
|----------------|--|
| 2NXF_APR_2.pdb | Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> en complejo con una pose alternativa de ADP-ribosa |
| 2NXF_CXR.pdb | Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> en complejo con cADPR |
| 2NXF_C2G.pdb | Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> en complejo con CDP-glicerol (C2G) |
| 2NXF_CDE_1.pdb | Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> en complejo con CDP-etanolamina (CDE) |
| 2NXF_CDE_2.pdb | Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> en complejo con una pose alternativa de CDP-etanolamina |
| 2NXF_CDC.pdb | Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> en complejo con CDP-colina (CDC) |
| 2NXF_ACK_1.pdb | Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> en complejo con 2',3'-cAMP (ACK) |
| 2NXF_ACK_2.pdb | Modelo completo de la ADPRibasa-Mn de <i>Danio rerio</i> en complejo con una pose alternativa de 2',3'-cAMP |
| 1UN8-c.pdb | Modelo completo de la CbDK usado como molde para construir el modelo de hKTFC |
| 1UN9-c.pdb | Modelo completo de la CbDK en complejo con ATP y DHA usado como molde para construir el modelo de hTKFC |
| hTKFC.pdb | Modelo completo de la hTKFC en complejo con ATP y DHA modelado por homología |
| hTKFC_FAD.pdb | Modelo del complejo hTKFC:FAD preparado por <i>docking</i> |

6.3 Vídeos

| | |
|---------|--|
| Vídeo 1 | (Video_1_ADPRM.mpg) Simulación de 25 ns de dinámica molecular de la ADPRibasa-Mn de rata ¹¹ |
| Vídeo 2 | (Video_2_ADPRM_ADP-ribosa.mpg) Simulación de 25 ns de dinámica molecular de la ADPRibasa-Mn de rata en complejo con ADP-ribosa ¹¹ |
| Vídeo 3 | (Video_3_ADPRM_cADPR.mpg) Simulación de 25 ns de dinámica molecular de la ADPRibasa-Mn de rata en complejo con cADPR ¹¹ |
| Vídeo 4 | (Video_4_hTKFC.mpg) Simulación de 42 ns de dinámica molecular de la hTKFC ¹² |
| Vídeo 5 | (Video_5_hTKFC_2ATP.mpg) Simulación de 42 ns de dinámica molecular de la hTKFC en complejo con dos moléculas de ATP y dos moléculas de DHA ¹² |

¹¹ Estos vídeos están hechos usando 2500 fotogramas obtenidos de las trayectorias de 25 ns a intervalos regulares de 10 ps.

¹² Estos vídeos están hechos usando 4200 fotogramas obtenidos de las trayectorias de 42 ns a intervalos regulares de 10 ps.

- Vídeo 6 (Video_6_hTKFC_2ATP_K12.mpg) Detalle del sitio K1L2 de la simulación de 42 ns de dinámica molecular de la hTKFC en complejo con dos moléculas de ATP y dos moléculas de DHA¹²
- Vídeo 7 (Video_7_hTKFC_2ATP_32-36ns.mpg) Detalle del sitio K1L2 en el periodo de tiempo 32-36 ns de la simulación de dinámica molecular de la hTKFC en complejo con dos moléculas de ATP y dos moléculas de DHA¹³
- Vídeo 8 (Video_8_hTKFC_FAD.mpg) Simulación de 42 ns de dinámica molecular de la hTKFC en complejo con una molécula de FAD¹²
- Vídeo 9 (Video_9_hTKFC_PCA.mpg) Análisis de la dinámica esencial de las tres simulaciones de hTKFC: primer componente principal
- Vídeo 10 (Video_10_hTKFC_NM7.mpg) Análisis de modos normales de hTKFC: primer modo no trivial
- Vídeo 11 (Video_11_hTKFC_NM8.mpg) Análisis de modos normales de hTKFC: segundo modo no trivial
- Vídeo 12 (Video_12_hTKFC_NM9.mpg) Análisis de modos normales de hTKFC: tercer modo no trivial

6.4 Topologías y parámetros

- Top_1.pdf Definición de los ligandos ADP-ribosa y cADPR compatibles con el campo de fuerzas GROMOS 53A6
- Top_2.pdf Definición de glicerol usada para modelar DHA unida a histidina en *Modeller*
- Top_3.pdf Definición de la *N*^ε-(1,2,3-trihidroxiprop-2-il)-L-histidina compatible con el campo de fuerzas AMBER03

6.5 Copia de la Tesis en formato PDF

Tesis_Doctoral_J_Rui_Rodrigues.pdf

¹³ Este vídeo está hecho usando 4000 fotogramas obtenidos de la trayectoria de 42 ns del sistema hTKFC:2DHA:2ATP a intervalos regulares de 1 ps en el intervalo de tiempo 32-36 ns.