

Estudio teórico de la función catalítica de residuos altamente conservados en el sitio activo de las enzimas fosfatasa alcalinas

INFIQC
CONICET
U N C

FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas

Gabriela L. Borosky

UNC
Universidad
Nacional
de Córdoba

INFIQC, CONICET y Departamento de Química Teórica y Computacional, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba 5000, ARGENTINA.

E-mail: gborosky@fcq.unc.edu.ar

Introducción

Las fosfatasa alcalinas (alkaline phosphatases, APs) son metaloenzimas presentes en prácticamente todos los seres vivos, desde las bacterias hasta el hombre.¹ Catalizan la hidrólisis de ésteres de fosfato, liberando fosfato inorgánico y un alcohol, a la vez que participan en procesos de transfosforilación.² El mecanismo de catálisis comprende las siguientes etapas: activación de la serina catalítica; formación del intermediario covalente fosfoserina; hidrólisis de la fosfoserina; partida del producto fosfato, o su transferencia a un aceptor (Esquema 1). La comparación de secuencias de aminoácidos de fosfatasa alcalinas pertenecientes a distintas especies mostró una notable conservación de los residuos situados en el sitio activo y zonas adyacentes.³

La fosfatasa alcalina placentaria humana (PLAP) es una de las cuatro APs presentes en los seres humanos. Su interés radica en su aplicación como marcador de tumores en tejidos cancerosos humanos.⁴ Mediante cálculos mecánico-cuánticos se estudió el rol de los aminoácidos más relevantes presentes en el sitio activo de esta familia de enzimas, utilizando a la PLAP como proteína modelo.

Métodos Computacionales

Con el programa Gaussian 09 se realizó un estudio computacional según el procedimiento ONIOM, empleando dos zonas descriptas con diferentes métodos mecánico cuánticos (QM:QM). Se modeló el sitio activo de la PLAP de acuerdo a su estructura cristalográfica reportada en el Protein Data Bank (código 1EW2). Se construyeron las siguientes proteínas mutantes: Arg166Ser (reemplazando el residuo Arg166 por una serina), Asp42Ala, Asp316Ala, y Ser155Ala. Se efectuaron cálculos DFT empleando el funcional B3LYP para la capa constituida por los dianiones de los sustratos (monoésteres de fosfato), los tres cationes metálicos del sitio activo, los grupos carboxilato de glutamatos y aspartatos, $-CH_2OH$ de serinas, $-C(NH_2)_2$ de arginina, y las moléculas de agua involucradas en el mecanismo catalítico; se empleó la base 6-31+G* para los átomos de C, O, N, P, H y Mg, y el pseudopotencial Lanl2DZ para Zn. Para el resto de los átomos del sistema se utilizó el método semiempírico PM3MM. La influencia del entorno, constituido por el resto de la estructura de la proteína, fue simulada con un modelo continuo polarizado (IEFPCM), empleando una constante dieléctrica $\epsilon = 4$. Las posiciones de los átomos participantes en enlaces peptídicos se mantuvieron fijas para preservar la estructura del sitio activo, en tanto que las coordenadas del resto de los átomos fueron completamente optimizadas. Los mínimos y estados de transición de las superficies de energía potencial calculadas se caracterizaron mediante el cómputo de los correspondientes hessianos. Para todos los puntos estacionarios se obtuvieron valores de energía más precisos mediante cálculos single-point al nivel ONIOM(B3LYP/6-311+G(2d,p):PM3MM)-IEFPCM.

Figura 3. Superposición de los sitios activos de la PLAP (verde), R166S (violeta), y D42A (fucsia).

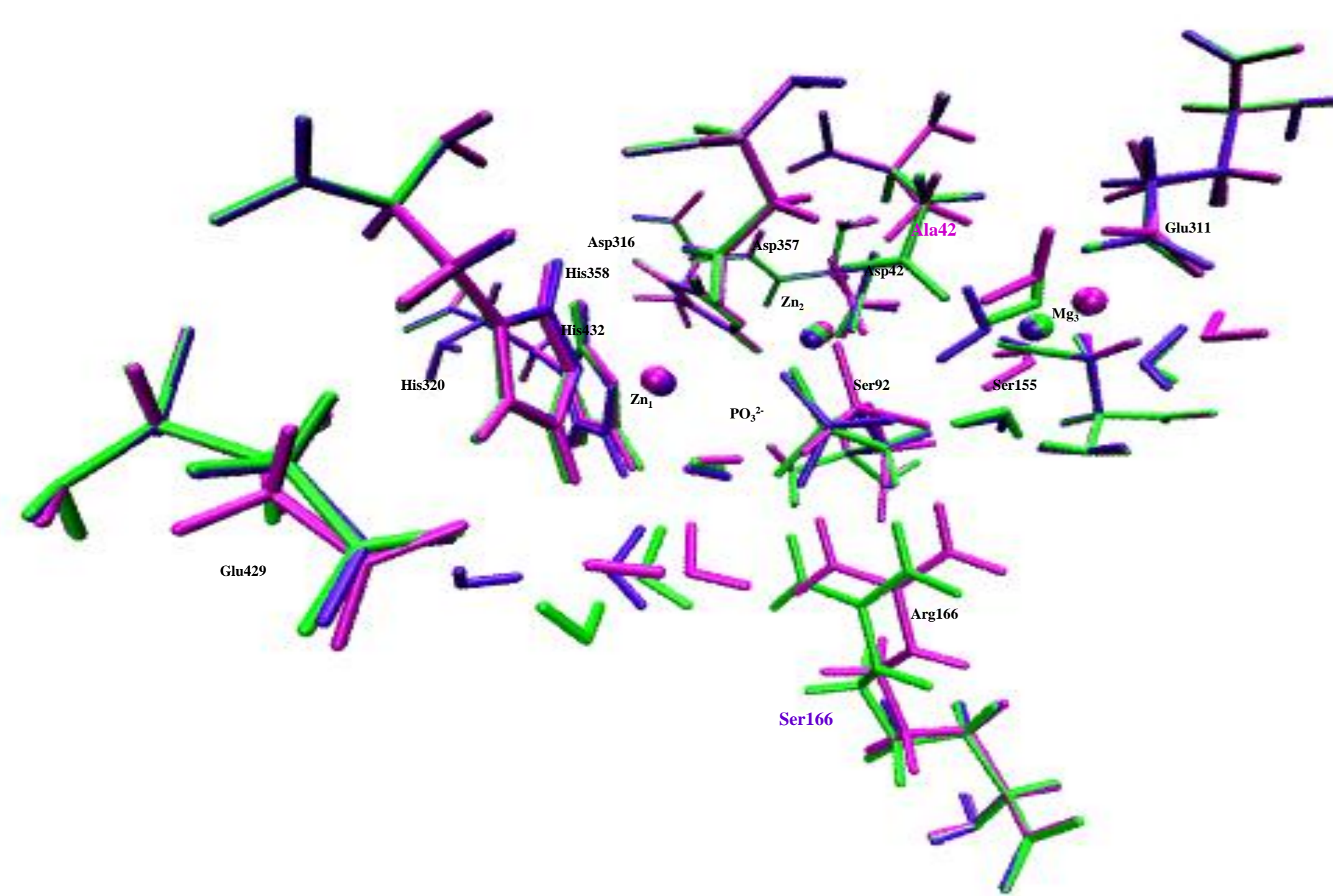
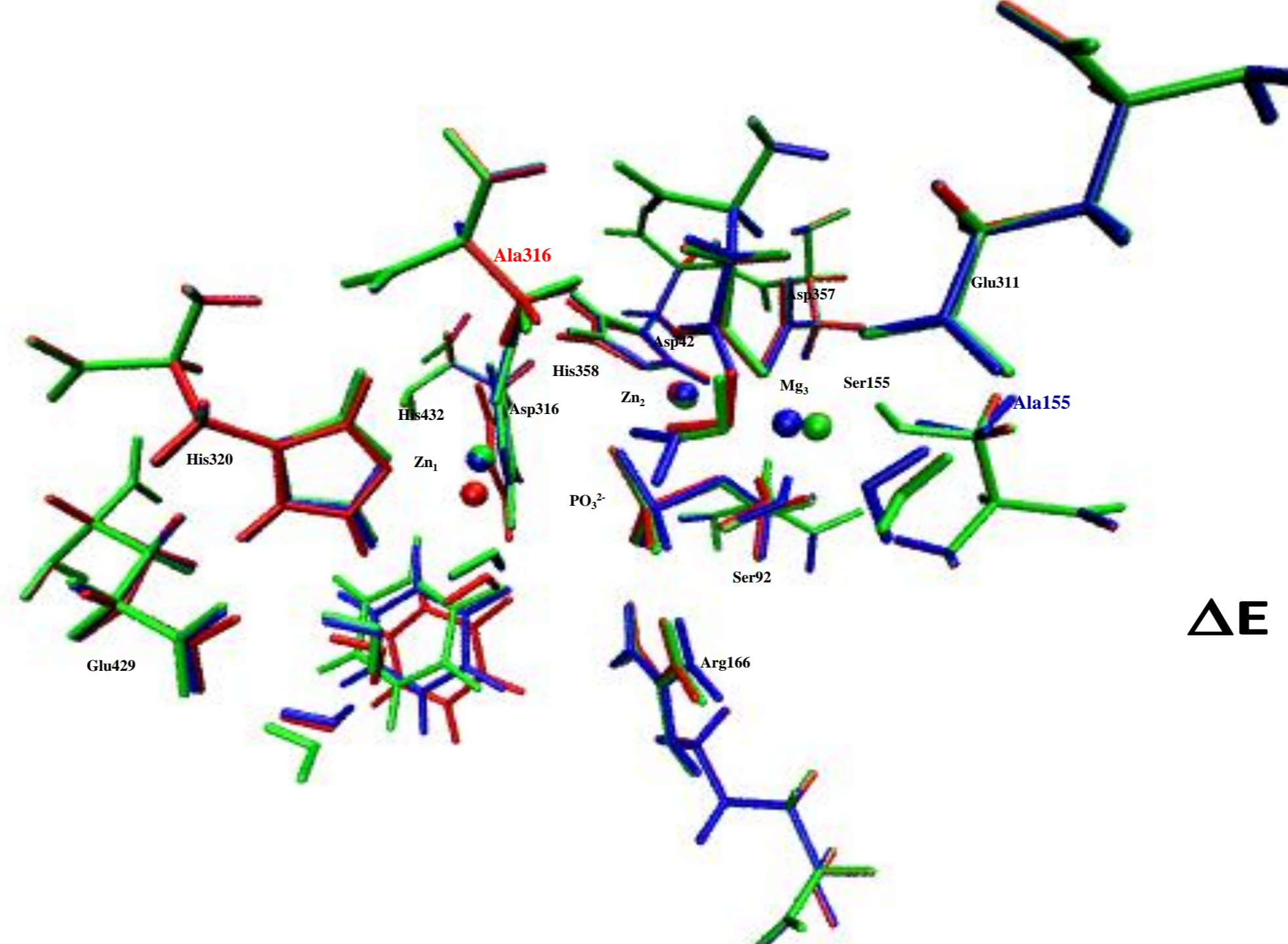


Figura 4. Superposición de los sitios activos de la PLAP (verde), D316A (rojo), y S155A (azul).



Conclusiones

Las barreras de energía calculadas para el mecanismo catalítico en las distintas proteínas presentaron muy buena correspondencia con los valores experimentales disponibles en literatura, lo cual sustenta las interpretaciones mecanísticas derivadas de las estructuras obtenidas computacionalmente.

El residuo Arg166 reduce la barrera de activación de la etapa determinante a través de la formación de interacciones puente hidrógeno entre el grupo guanidinio y los átomos de oxígeno del grupo fosforilo, posicionando a éste último en una orientación favorable para el ataque nucleofílico.

El residuo Asp42 estabiliza la posición del catión Mg^{2+} impidiendo la distorsión del sitio M3, que provocaría un aumento de la barrera de energía para la hidrólisis del intermediario covalente originada en la reorientación desfavorable del grupo fosforilo. A su vez, el resto Ser155 también contribuye a preservar la estructura óptima del sitio M3.

El resto Asp316 fija la posición del catión Zn_1 , evitando la alteración del sitio M1.

Esquema 1. Mecanismo de catálisis enzimática.

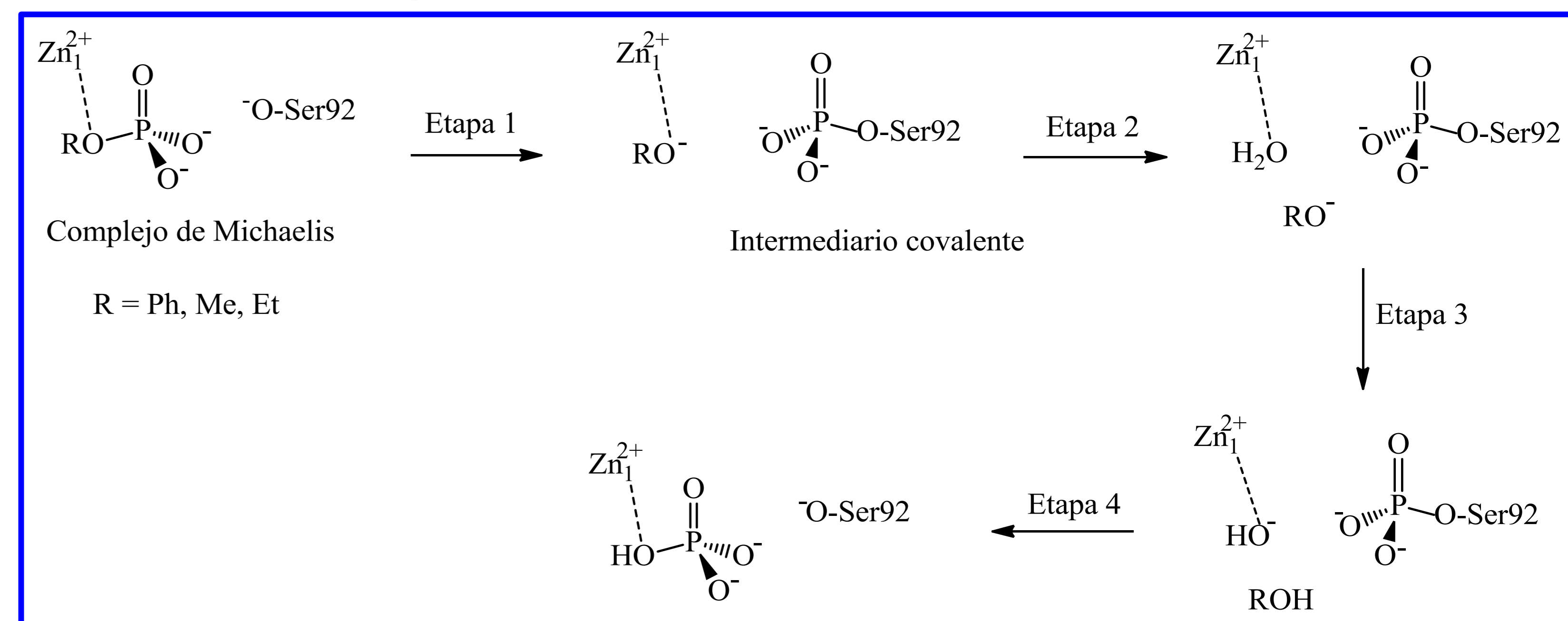


Figura 1. Sitio activo de la PLAP y aminoácidos más relevantes.

Residuos mutados
Proteínas mutantes
R166S (Arg166Ser)
D42A (Asp42Ala)
D316A (Asp316Ala)
S155A (Ser155Ala)

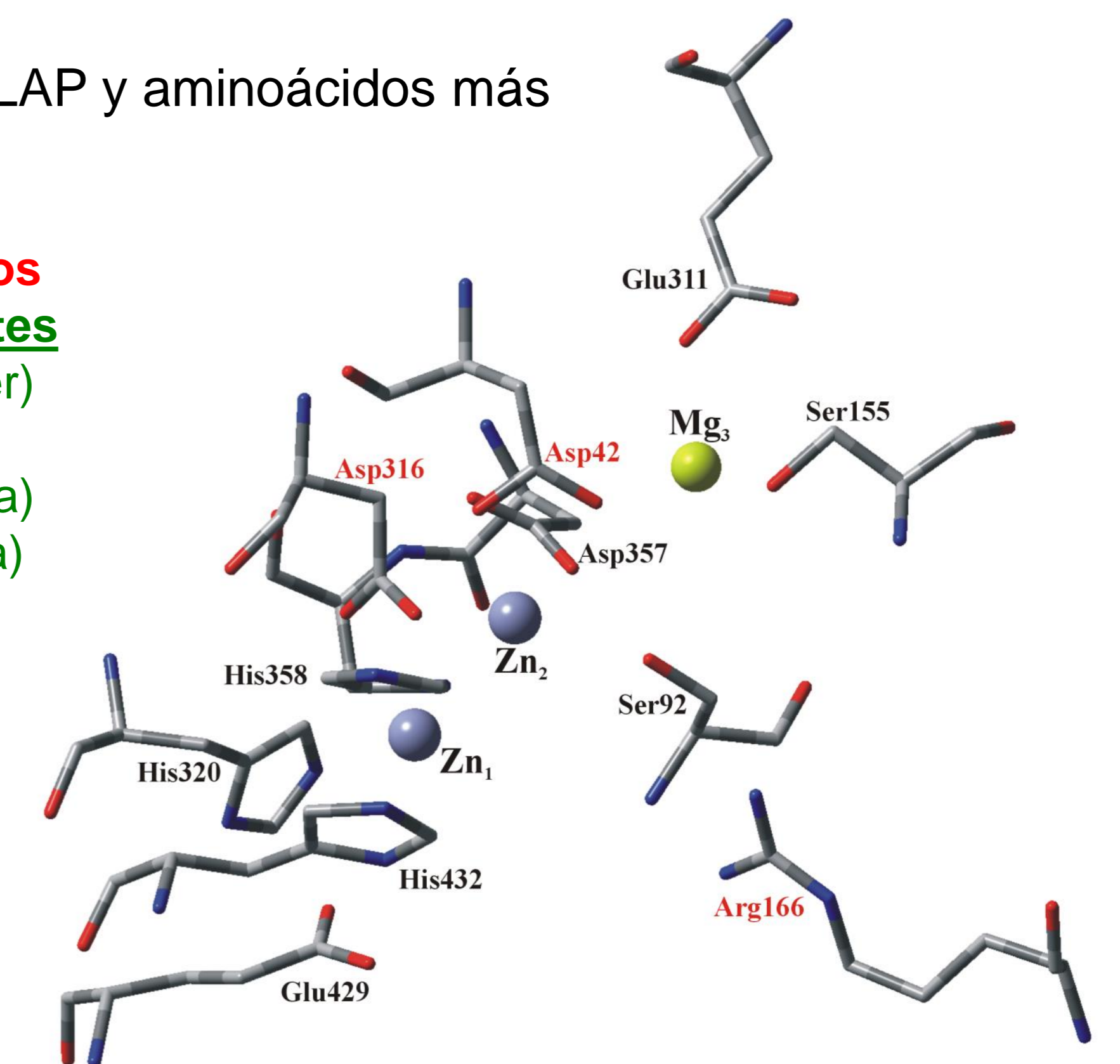
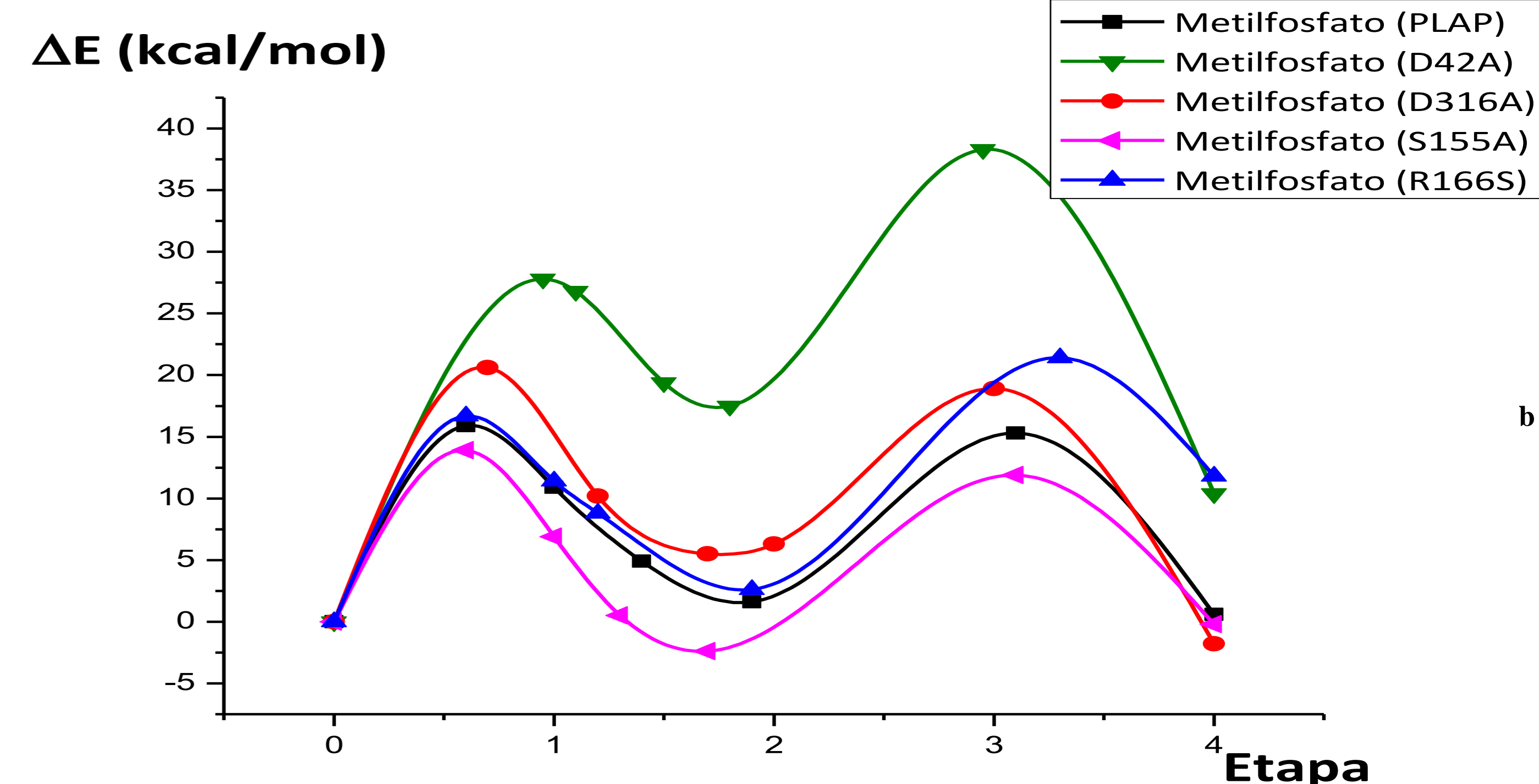
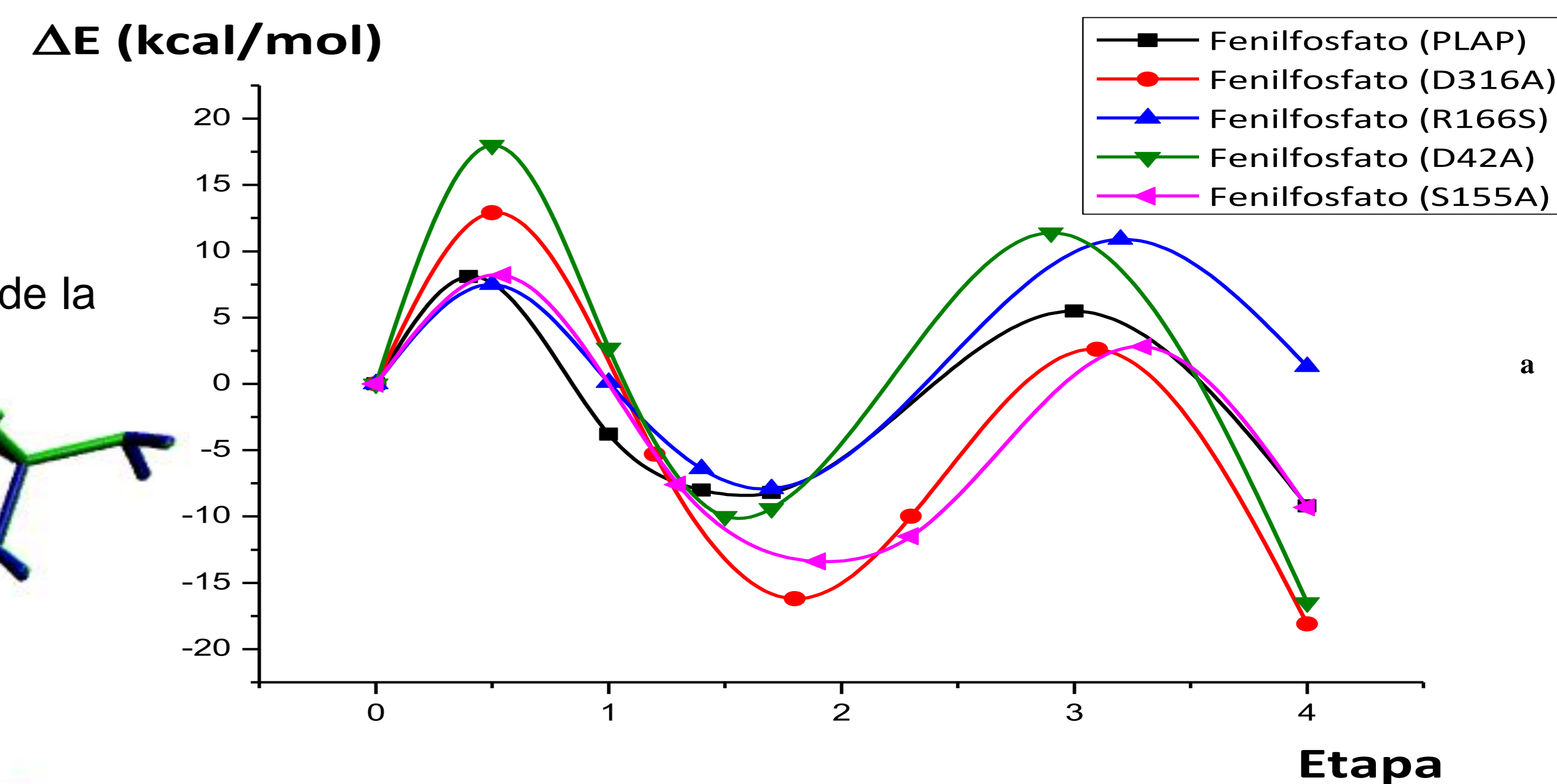


Figura 2. Comparación de los perfiles de energía potencial del mecanismo catalítico en la PLAP nativa y en las proteínas mutantes: a) Sustrato fenilfosfato; b) Sustrato metilfosfato.



Referencias

- (1) McComb, R. B., Bowers, G. N., Posen, S., *Alkaline Phosphatases*, 1979, Plenum Press: New York, pp 986-989.
- (2) (a) Schwartz, J. H., Lipmann, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, *47*, 1996. (b) Harris, H. *Clin. Chim. Acta* **1990**, *186*, 133.
- (3) Kim, E. E., Wyckoff, H. W., *Clin. Chim. Acta* **1990**, *186*, 175-178.
- (4) (a) Fishman, W. H., Inglis, N. I., Stolbach, L. L., Kraut, M. J. *Cancer Res.* **1968**, *29*, 150. (b) Kam, W. K., Bresalier, R. S., Kim, Y. S., in *Progress in Clinical and Biological Research*, Stigbrand, T., Fishman, W. H. (Eds.), **1984**, Liss, New York, Vol. 166, pp 207-222.