

SIMPOSIO 9.
ENZIMAS, CINÉTICA Y MECANISMOS

MEDICINA (Buenos Aires) 2004; 64 (Supl. II): 45-47

FERREDOXINA NADP(H) REDUCTASAS: EL ÉXITO NO SIEMPRE VA ASOCIADO A LA EFICIENCIA

CECCARELLI, EDUARDO A.; CARRILLO, NÉSTOR; CATALANO DUPUY, DANIELA L.; RIAL, DANIELA V.; MUSUMECI, MATÍAS Y PALADINI, DARÍO

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), CONICET - Universidad Nacional de Rosario.

Las ferredoxinas (flavodoxinas)-NADP(H) reductasas (FNR) son flavoenzimas cuyo grupo prostético es el FAD, FMN o la riboflavina, el cual se encuentra firmemente o covalentemente unido a la cadena polipeptídica. Estas enzimas participan de un amplio espectro de procesos de oxido-reducción. Del total de flavoenzimas conocidas hasta el presente, un 65% han sido clasificadas como oxidoreductasas. Estas catalizan más del 60% del total de reacciones de este tipo en los seres vivos, exhibiendo una versatilidad ausente en enzimas dependientes de otros cofactores. La lógica estructural, el mecanismo catalítico y la regulación de estas enzimas han despertado la curiosidad de investigadores por años y, últimamente, el interés biotecnológico por la versatilidad de compuestos naturales y artificiales que pueden ser sus sustratos. La FNR de plantas, la cual participa de la última etapa del transporte fotosintético de electrones, se ha convertido en el modelo estructural de esta amplia familia de enzimas.

Sorprendentemente, la FNR cloroplástica posee una preferencia de 32.000 veces mayor por NADP(H) que por NAD(H), exhibiendo números de recambio entre 20 y 100 veces más alto que FNRs de bacterias. Sin embargo, ellas comparten una extensa similitud estructural. En las FNR de plantas, el FAD se encuentra interaccionando con tres tirosinas altamente conservadas (Y89, Y114 e Y308 en FNR de arveja). Tyr89 posee contactos de tipo van der Waals con la flavina y puente

hidrógeno con el ribitol 3'-hidroxilo. Del otro lado de la isoaloxacina el aminoácido terminal Tyr308 se encuentra en una posición prácticamente planar, participando de una interacción aromática o tipo p-p. El estudio detallado de un conjunto de mutantes aromáticos y no aromáticos de estos aminoácidos, la elucidación de estructuras cristalográficas de FNRs mutantes unidas a NADP⁺ y el análisis de la filogenia de estas proteínas nos han permitido observar los mecanismos por los cuales discriminan a sus sustratos nucleotídicos como así también como modulan sus eficiencias catalíticas de manera de adaptarse a las demandas de las diferentes rutas metabólicas en que se encuentran involucradas. La interacción a través del fostato 2' del NADP no es suficiente para lograr la discriminación contra el NAD⁺ por parte de la enzima. La tirosina Y308 actuaría incrementando esta discriminación mediante desestabilización de la interacción entre la nicotinamida y la flavina (idéntica para ambos nucleótidos). El mecanismo general puede explicarse de la siguiente forma: para potenciar la discriminación entre sustratos diferentes no solo se utilizarían interacciones con las regiones distintas, sino que se puede debilitar las interacciones con aquellas regiones idénticas. Igualmente, la existencia de la tirosina terminal, su movilidad, conjuntamente a la adopción de una conformación extendida del grupo prostético podrían ser las bases para la modulación de la eficiencia catalítica de estas enzimas.

**NEW X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC STRUCTURES OF ENZYMES FROM
 GLUCOSYL HYDROLASE FAMILIES 27, 32 AND 35**

IGOR POLICARPO

IFSC/USP, São Carlos, SP, Brazil.

Here we report crystallographic determination and structure analysis of three glucosyl hydrolases from the families 27, 32 and 35.

The crystal structures of α -galactosidase from the mesophilic fungus *Trichoderma reesei* and its complex with the competitive inhibitor, b-D-galactose, have been

determined at 1.54 Å and 2.0 Å resolution, respectively. The α -galactosidase structure was solved by the quick cryo-soaking method using a single Cs derivative. The refined crystallographic model of the α -galactosidase consists of two domains, an N-terminal catalytic domain of the (b/a)₈ barrel topology and a C-terminal domain which is formed by an antiparallel β -structure. The galactose molecule binds to the active site pocket located in the center of the barrel of the catalytic domain. The conservation of two catalytic Asp residues, identified for this family (GHF 27), is consistent with a double-displacement reaction mechanism for the α -galactosidase.

Exo-inulinases hydrolyze terminal, non-reducing 2,1- and 2,6-linked β -D-fructofuranose residues in inulin, levan and sucrose releasing β -D-fructose. Here we present the X-ray structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*, a member of glycoside hydrolase family 32, solved by SIRAS method using the heavy atom sites derived from a quick cryo-soaking technique at 1.55 Å resolution. The tertiary structure of this enzyme folds into two domains: the N-terminal catalytic domain of an unusual five-bladed β -propeller fold and the C-terminal domain folded in a β -sandwich-like structure. The X-ray structure of the enzyme:fructose complex, at a resolution of 1.87 Å, reveals two catalytically important residues: Asp41 and Glu241, a nucleophile and a catalytic acid/base, respectively. The distance between the side chains of these

residues is consistent with a double displacement mechanism of reaction. Asp189, which is part of the Arg-Asp-Pro motif, provides hydrogen bonds important for substrate recognition.

β -galactosidases catalyse the hydrolysis of β (1-3) and β (1-4) galactosyl bonds in oligosaccharides as well as the inverse reaction of enzymatic condensation and transglycosylation. The crystallographic structures of *Penicillium sp.* β -galactosidase and its complex with galactose were solved by the SIRAS quick cryo-soaking technique at 1.90 Å and 2.10 Å resolution, respectively. The amino acid sequence of this 120 kDa protein was first putatively assigned on the basis of inspection of the experimental electron density maps and then determined by nucleotide sequence analysis. Primary structure alignments reveal that *Penicillium sp.* β -galactosidase belongs to family 35 of glycosyl hydrolases (GHF-35). This model is the first 3D structure for a member of GHF-35. Five distinct domains which comprise the structure are assembled in a way previously unobserved for β -galactosidases. Superposition of this complex with other β -galactosidase complexes from several hydrolase families allowed the identification of residue Glu 200 as the proton donor and residue Glu 299 as the nucleophile involved in catalysis. *Penicillium sp.* β -galactosidase is a glycoprotein containing seven N-linked oligosaccharide chains and is the only structure of a glycosylated β -galactosidase described to date.

ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y EVOLUCIÓN DE METALO-BETA-LACTAMASAS, ENZIMAS MODULARES DISEÑADAS PARA LA RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

L.I. LLARRULL, P.E. TOMATIS, J.M. GONZÁLEZ, L. ABRIATA, V. CAMPOS BERMÚDEZ, M.F. TIONI y A.J. VILA

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), Universidad Nacional de Rosario.

Las β -lactamasas representan el principal mecanismo de resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos. Las metalo- β -lactamasas (MBLs) son la última generación de estas enzimas, siendo capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Este amplio espectro de sustrato, sumado a que su mecanismo catalítico aún no ha sido dilucidado en detalle, ha impedido el diseño de inhibidores de uso clínico para estas enzimas.

En nuestro laboratorio hemos estudiado el papel de distintos residuos localizados en el sitio activo de la enzima en su función y estructura, utilizando técnicas espectroscópicas, cristalografía y estudios enzimológicos. También hemos estudiado el proceso de unión de distintos sustratos a las enzimas mediante estudios de fluorescencia en condiciones de estado pre-estacionario. En

todos los casos, se observa la acumulación de un intermediario de reacción químicamente intacto. La apoenzima fue incapaz de unir ningún sustrato, indicando que el Zn(II) es esencial para la unión de los mismos. Esta evidencia es coincidente con la falta de un sitio de reconocimiento de sustrato en la enzima, que da lugar a su amplio espectro hidrolítico.

Con fines de explorar la potencialidad funcional de estas enzimas, realizamos experimentos de evolución dirigida sobre la enzima BcII de *B.cereus* frente a cefalexina, un sustrato pobremente hidrolizado por ésta. Como resultado, se obtuvo una biblioteca de mutantes capaces de conferir una resistencia 64 veces mayor a este antibiótico. Este efecto se correlacionó con mutaciones específicas, y se observó que era debido a un aumento en la eficiencia catalítica de la enzima.

MULTIFUNCIONALIDAD EN LA REGULACIÓN ENZIMÁTICA. ACTIVACIÓN DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE LOS CLOROPLASTOS DE COLZA POR TIORREDOXINA Y 2-CYS PEROXIRREDOXINA

R.A. WOLOSUIK, D. CAPORALETTI, M. ARAN, A. SENN, F. STOLOWICZ y S. MORA-GARCÍA

Instituto Leloir

En los cloroplastos de las plantas superiores, el sistema ferredoxina tiorredoxina [ferredoxina, ferredoxina-tiorredoxina reductasa, tiorredoxina (Trx)] vincula la cadena fotosintética de transporte de electrones ubicada en los tilacoides con la regulación enzimática situada en el estroma. La estimulación de una de estas enzimas, la fructosa-1,6-bisfosfatasa (CFBPasa), requiere la escisión de un puente disulfuro específico por la Trx reducida y es máxima por la acción concertada de metabolitos cloroplásticos. Las cisteínas de la CFBPasa funcionales en la activación no sólo están ausentes en las contrapartes insensibles a la estimulación lumínica sino también residen en una secuencia interna del polipéptido que emerge como una región expuesta al solvente en la estructura terciaria conteniendo una alta densidad de cargas negativas superficiales («170's loop»). Este rasgo estructural determina una importante contribución de las interacciones electrostáticas en la modulación de la CFBPasa por las Trx por cuanto el aumento y la disminución de las cargas positivas en las Trx, *via* mutagénesis sitio-dirigida, aumenta y disminuye, respectivamente, la afinidad por la CFBPasa. Los resultados obtenidos apoyaban la participación del «170's loop» exclusivamente en la activación reductiva

porque mecanismos paralelos para la modulación enzimática eran desconocidos en los cloroplastos. Sin embargo, los estudios de nuestro laboratorio mostraron que, en presencia de fructosa 1,6-bisfosfato y Ca^{2+} , la 2-Cys peroxirredoxina cloroplástica (2-Cys Prx), también estimula la actividad de la CFBPasa en un proceso independiente de la actividad peroxidática. Aunque presenta características que la diferencian claramente del sistema ferredoxina-tiorredoxina; la estimulación enzimática con la 2-Cys Prx requiere estrictamente que la CFBPasa mantenga tanto el puente disulfuro intrínseco como las tres cisteínas en el «170's loop». Estos resultados muestran una nueva función para el «170's loop» y, además, introducen a la 2-Cys Prx, una peroxidasa ubicua desprovista de grupos hemo, como un nuevo modulador en el concierto de la regulación enzimática de los cloroplastos. Pero, más importante, esta nueva función de la 2-Cys Prx que no utiliza la actividad peroxidasa en la interacción con otros componentes celulares (i.e. moonlighting protein) permea en otros aspectos de la biología porque revela que la capacidad para el control del estrés oxidativo no estaría circunscripta exclusivamente al ajuste del tenor intracelular de H_2O_2 .