

Título: ESTUDIOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR CON DUTPASA DE PLASMODIUM FALCIPARUM Y GLUTATION TRANSFERASA HUMANA

Nombre: Quesada Soriano, Indalecio

Universidad: Universidad de Almería

Departamento: QUIMICA FISICA, BIOQUIMICA Y QUIMICA INORGANICA

Fecha de lectura: 13/07/2009

Programa de doctorado: QUÍMICA AVANZADA

Dirección:

> **Director:** LUIS SEBASTIÁN GARCÍA FUENTES

Tribunal:

> **presidente:** CARMEN FRANCISCA BARÓN BRAVO

> **secretario:** FEDERICO GARCÍA MAROTO

> **vocal:** JOSÉ MARÍA LEAL VILLALBA

> **vocal:** BEGOÑA GARCÍA RUIZ

> **vocal:** Dolores González Pacanowska

Descriptores:

> QUIMICA

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

Localización: BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

Resumen: El funcionamiento de las células vivas a nivel molecular implica, por un lado, interacciones entre biomoléculas distintas y, por otro, viene determinado por las transiciones conformacionales de estas moléculas biológicas. Entre las interacciones más comunes conocidas se encuentran las de moléculas pequeñas con proteínas, como es la unión de sustratos, activadores o inhibidores a enzimas. También son de gran importancia las interacciones proteína-proteína, como antígeno-anticuerpo, y las de proteína-ácido nucleico.

Todas estas interacciones moleculares y las transiciones conformacionales están dirigidas por múltiples factores físicos débiles, y vienen acompañadas de un cambio de energía debido generalmente a fuerzas no covalentes. Estos factores determinan, por tanto, la energética de las uniones de las proteínas nativas a sus ligandos, sustratos u otros biopolímeros, así como el plegamiento mismo de las cadenas polipeptídicas. Como consecuencia, el estudio de los cambios de energía producidos representa una parte esencial en la caracterización fisicoquímica de muchos procesos biológicos, pudiendo ayudar a esclarecer las funciones desempeñadas por cada una de las biomoléculas implicadas.

En las últimas décadas se ha dedicado un gran esfuerzo a entender la estructura y función de las proteínas,

pues estas moléculas, además de jugar un papel central en todos los procesos de la vida, poseen también infinitas implicaciones en el que es uno de los campos más prometedores de la investigación bioquímica: el diseño de fármacos específicos. Así, la ruta seguida para dicho diseño parte del conocimiento del centro activo de la enzima, para sintetizar artificialmente después los compuestos de interés (fármacos) en cada caso, con los grupos funcionales teóricos necesarios para influir en su actividad biológica.

Por otro lado, los recientes avances en ingeniería genética hacen posible obtener proteínas mutadas en los aminoácidos deseados, lo que representa un campo repleto de posibilidades para conocer el papel de determinados residuos, fundamentalmente pertenecientes al sitio activo, en la interacción con otras moléculas. De esta forma, es posible estudiar el cambio energético producido al unirse un determinado ligando (natural o de síntesis) a la proteína natural y a la mutada en aminoácidos específicos del sitio de la unión, obteniéndose valiosa información sobre las interacciones producidas y, como consecuencia, sobre el papel desempeñado por dichos aminoácidos en la función biológica a nivel de las moléculas.

Cuando se plantea la necesidad de abordar la lucha eficaz contra una enfermedad, no hay mejor arma que el entendimiento de su mecanismo molecular de actuación. Por tanto, la descripción y racionalización de sus procesos moleculares y su correlación con una actividad funcional dada se basa fundamentalmente en información estructural de la propia proteína, la cual se muestra insuficiente para interpretar procesos e interacciones que, por definición, implican una considerable complejidad. Se hace necesario, por tanto, disponer de unos conocimientos tanto cinéticos como energéticos (termodinámicos) que permitan comprender en su conjunto cualquier actividad biológica en su dimensión molecular.

El gran avance biotecnológico producido en los últimos años permite que cada vez se conozca con mayor detalle la base atómica de estas interacciones. Esto es posible gracias al desarrollo de herramientas que permiten no sólo procesar la información generada a partir de diversas fuentes, sino también comenzar a modelar y predecir estas interacciones de forma específica en base a la información recopilada.

La caracterización energética de los procesos de unión entre una macromolécula y un ligando puede llevarse a cabo, en principio, mediante el uso de diversas técnicas. Sin embargo, de entre todas las técnicas desarrolladas y aplicadas en la actualidad la que resulta más directa en la medida de la entalpía del proceso de unión es la técnica calorimétrica y, más concretamente, la calorimetría isotérmica de valoración o ITC (Isothermal Titration Calorimetry).

Dado que las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, etc.) presentan masas moleculares muy elevadas, y que existe además una gran dificultad práctica en la obtención de grandes cantidades de muestra con la suficiente pureza, a la hora de aplicar de forma viable la técnica ITC los calorímetros usados deberán tener una sensibilidad térmica muy elevada y requerir cantidades de muestra muy pequeñas. Así, se han desarrollado los llamados microcalorímetros, dispositivos en los que se precisan pocos mililitros de disolución de muestra con una cantidad de material biológico generalmente inferior a un micromol, y que miden calores de decenas de microcalorías. Consecuentemente, la aparición de estos instrumentos ha resultado determinante para el avance y el grado de aplicación actual de las técnicas calorimétricas en la experimentación biotecnológica.

Estos sistemas microcalorimétricos suelen trabajar a presión constante (usualmente la atmosférica) determinándose, por tanto, los cambios de entalpía de los procesos. En algunos casos es posible obtener todos los parámetros termodinámicos de unión (cambios de entropía, entalpía, energía de Gibbs, constante microscópica de unión) a partir exclusivamente de las medidas calorimétricas. Sin embargo, en ocasiones el sistema no lo

permite, siendo necesaria alguna técnica adicional para la obtención de las constantes de unión. Entre estas técnicas complementarias de la calorimetría destaca la espectrofluorimetría.

La técnica ITC cuenta actualmente con una aplicación adicional, ya que también ha demostrado su gran utilidad a la hora de caracterizar cinéticamente las reacciones enzimáticas. Así, el calor intercambiado en dichas reacciones permite seguirlas mediante ITC, pudiendo realizar una evaluación cuantitativa de la actividad catalítica de la enzima, y proporcionando los valores de las constantes de velocidad así como del resto de parámetros cinéticos de las reacciones. Por tanto, mediante esta técnica es posible conseguir un mayor conocimiento y aprovechamiento de los procesos de unión en los que están implicadas estas enzimas, así como de sus mecanismos y propiedades catalíticas.

En cuanto a la caracterización energética de los cambios conformacionales inducidos por temperatura en sistemas biológicos, otra técnica calorimétrica, la calorimetría diferencial de barrido o DSC (Differential Scanning Calorimetry), es la que más posibilidades ofrece en la actualidad para este cometido. De hecho, los estudios de DSC sobre desnaturalización térmica de proteínas han jugado un papel fundamental en el desarrollo de los actuales puntos de vista acerca de los factores que determinan su estabilidad.

Entre los parámetros que pueden determinarse mediante esta técnica calorimétrica se encuentran la entalpía calorimétrica de la transición, las temperaturas características, o la diferencia de capacidad calorífica entre los estados desplegado y nativo de las proteínas. También permite obtener parámetros cinéticos, mediante la aplicación de modelos específicos, en los casos de desplegamiento proteico irreversible. Además, la técnica DSC puede proporcionar valiosa información sobre el número de estados intermedios en el desplegamiento para el desarrollo de la caracterización termodinámica del proceso (en aquellos casos en los que es posible aplicar la formulación basada en la termodinámica del equilibrio), a la vez que también permite obtener datos sobre las interacciones dominio- dominio.

El objeto de esta Memoria es doble: por un lado, se ha pretendido realizar una caracterización termodinámica de la enzima desoxiuridin 5'-trifosfato nucleótido-hidrolasa (dUTPasa) del protozoo parásito Plasmodium falciparum, además de llevar a cabo un estudio cinético de sus interacciones con diferentes inhibidores y/o análogos de su sustrato. Las dUTPasas juegan un papel determinante para la integridad del ADN en la división celular, además de ser objeto de estudio actualmente por sus aplicaciones en terapia contra diferentes tipos de cáncer. Concretamente, la dUTPasa de Plasmodium falciparum (PfdUTPasa) tiene, además, implicaciones en el desarrollo de nuevos fármacos contra la malaria pues, en la actualidad, el tratamiento de esta patología se encuentra bastante limitado por la ausencia de una vacuna eficaz y por la resistencia que provocan los principales fármacos probados hasta ahora. Por todo ello, resulta de especial interés ampliar

el conocimiento de las propiedades bioquímicas de PfdUTPasa, abordando un detallado estudio termodinámico y cinético de sus interacciones.

Como primer paso en dicho estudio con PfdUTPasa, se llevaron a cabo experimentos calorimétricos de unión con distintos inhibidores, a diversas temperaturas, diferentes condiciones de pH y de fuerza iónica. Posteriormente, se examinó la estabilidad térmica de la enzima en presencia y ausencia de inhibidores, sales y cofactores metálicos a diferentes velocidades de barrido, y se realizó un estudio cinético de la catálisis y especificidad enzimática frente a diferentes análogos del sustrato.

Por otro lado, y como segundo objetivo de esta Memoria, se planteó la caracterización energética de la enzima Glutation S-transferasa humana (hGSTP1-1) atendiendo a la importancia termodinámica y estructural de un residuo concreto situado en el llamado sitio H de la enzima: el aminoácido Tyr108. Dicho aminoácido se muestra determinante en la especificidad y la actividad catalítica de la hGSTP1-1, resultando especialmente importante un estudio termodinámico centrado en las interacciones de este residuo con el resto de aminoácidos y frente a la unión de diferentes ligandos. El interés de la Glutation S-transferasa, enzima implicada en el metabolismo de desintoxicación celular de xenobióticos, radica en que dicha función desintoxicante desempeña en ocasiones un efecto adverso durante la quimioterapia, ya que la GST ha sido asociada con efectos de resistencia a fármacos de las células tumorales. Por tanto, resulta crucial disponer de un amplio conocimiento de sus propiedades bioquímicas, cinéticas, estructurales y termodinámicas para controlar sus niveles de expresión y determinar la resistencia celular a carcinógenos, medicamentos antitumorales, tóxicos ambientales y productos del estrés oxidativo celular. Este conocimiento resulta básico, además, para avanzar en el diseño de inhibidores específicos que incrementen la eficiencia de los agentes anticancerígenos más comunes.

Siguiendo este planteamiento, se llevaron a cabo experimentos calorimétricos de unión con el mutante Y108V de la enzima, así como con otros mutantes relacionados, utilizando su sustrato natural, análogos de éste, y otros ligandos sintetizados expresamente para estos experimentos, a diferentes temperaturas, valores de pH, y disoluciones tamponantes. Además, se estudió la estabilidad térmica de la enzima a diferentes concentraciones de ligando y velocidades de barrido, y se realizaron experimentos de fluorescencia, tanto de unión macromolécula-ligando, como perfiles de desnaturalización química.

El conjunto de esta Memoria se enmarca dentro de la línea de investigación que se viene desarrollando en el Área de Química Física de la Universidad de Almería, cubriendo en gran parte los objetivos descritos en el Proyecto de Investigación BIO2004-02112:Termodinámica de proteínas diana con potencial terapéutico, financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia.