

DINAMICA MOLECULAR COM A EINA PER AL DISSENY DE MUTANTS DE PROTEINES. Aplicació a l'estudi comparatiu de l'inhibidor proteic de la carboxipeptidasa A de la patata i dels seus mutants Pro36Gly i Tyr37Phe.

Oliva B., Daura X., Molina M.A., Marino C., Canals F., Avilés F.X. i Querol E.

Institut de Biologia Fonamental i Dept. Bioquímica, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona).

S'han realitzat simulacions MD de les formes silvestre, mutant Pro36Gly i mutant Tyr37Phe, de l'inhibidor proteic (PCI) de la Carboxipeptidasa A de la patata (CPA), amb l'objecte d'estudiar els seus espais configuracionals a dos nivells: 1) el de la proteïna sencera, que ens permet determinar l'estabilitat estructural, i 2) el de la regió C-terminal, que ens permet predir les capacitats inhibidores respectives. Com a conclusió d'aquest treball, es dedueix que la capacitat d'inhibició d'ambdós mutants és sols lleugerament inferior a la del PCI nadiu.

Introducció.

L'estructura de les proteïnes, la seva estabilitat tèrmica i la seva funcionalitat, poden ser alterades mitjançant mutagènesi dirigida. Els mètodes d'Enginyeria de Proteïnes estan sent actualment emprats per al disseny de proteïnes amb propietats particulars que poden ser d'utilitat terapèutica i/o industrial. No obstant, la producció d'un mutant amb propietats i característiques predeterminables no és tan senzilla com pot semblar: mutacions puntuals poden implicar canvis deslocalitzats en l'estructura que afectin les propietats de la molècula (Bowie et al.,1990) i que difícilment siguin detectables mitjançant models moleculars estàtics. En aquest sentit, la Dinàmica Molecular (MD) comporta una ajuda fonamental en l'estudi de l'espai conformacional de la proteïna (van Gunsteren,1988), donant una visió molt més ampla que la que ens ofereix el model abans mencionat.

En el present estudi s'ha analitzat el pèptid inhibidor (PCI) de la Carboxipeptidasa A de la patata (CPA)(Hass & Ryan,1982), amb el propòsit de dissenyar nous inhibidors. El PCI, pel seu petit tamany, és un cas particular de proteïna fàcilment analitzable per MD (Oliva et al.,1991a) i, tantmateix, es coneix la seva estructura 3D tant per difracció de raigs X (formant complexe amb la CPA (Rees & Lipscomb,1982)) com per RMN (Clare et al.,1987). A més, es dona el cas que el nostre grup ha clonat i expressat el corresponent gen sintètic (Molina et al.,1992).

Material i mètodes.

A partir de l'estructura del PCI (isoforma PCI-IIa, i sense els residus Glu1 i Gly39) en la conformació que presenta unit a la CPA (Rees & Lipscomb,1982), es va realitzar, prèvia optimització de 1800 passos amb Steepest Descent, una simulació per MD, de 250ps, amb acoplament a un bany tèrmic (temps de relaxació=0.1ps, temperatura constant=293K), amb l'objecte d'estudiar l'estabilitat estructural del mateix i d'analitzar les propietats de la regió C-terminal (residus 35 al 38), en particular, donada la seva importància en la inhibició de la CPA, l'orientació d'aquesta cua respecte al nucli de l'estructura (residus 8 al 34). Idèntics anàlisi s'han realitzat sobre els mutants en la regió de la cua C-terminal del PCI, Pro36Gly i Tyr37Phe, les estructures dels quals s'obtingueren per simple substitució de residus en les coordenades cristal·logràfiques del PCI nadiu.

L'optimització i la simulació es van executar mitjançant el paquet de rutines GROMOS (van Gunsteren & Berendsen, 1987) seguint el model NIS, el camp de forces del qual contempla la neutralització de les càrregues del sistema, imitant així la presència de contraions (Åqvist et al., 1986; Åqvist et al., 1985; Nilsson et al., 1990; Oliva et al., 1991a; Oliva et al., 1991b). Per a l'anàlisi es va utilitzar el paquet de subrutines NICE (Nilsson, 1990), i la visualització gràfica es va dur a terme mitjançant mdFRODO (Nilsson, 1990). Per a l'estudi de l'espai configuracional de la regió C-terminal, es va desenvolupar un programa propi en el que es van definir els angles Ψ i θ , sobre el pla π format pels residus del nucli, Phe23, Ala26 i Asn29 (figura 1). Aquest programa permet calcular la densitat de probabilitat per valors determinats dels angles Ψ i θ (Tapia et al., 1991), per a les tres formes, silvestre, mutant Pro36Gly i mutant Tyr37Phe, del PCI.

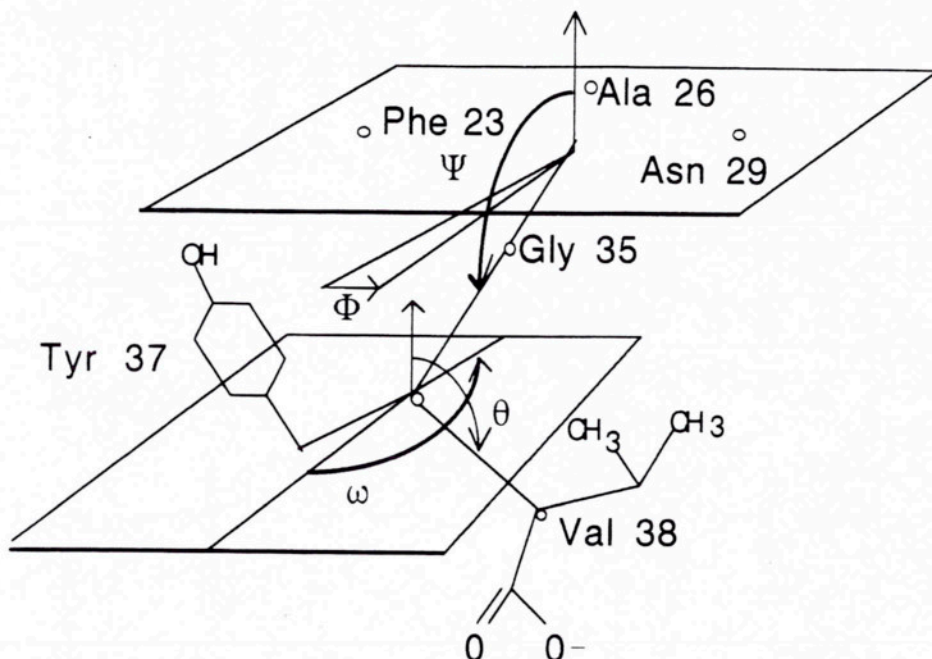


Figura 1:
Representació dels angles de la regió C-terminal i del pla π

Resultats i discussió.

L'energia potencial de la forma silvestre del PCI es va establir al cap de 40ps de començar la dinàmica, fluctuant seguidament en torn a una energia potencial promig de -1150 Kj/mol (Oliva et al., 1991a). La forma mutant Pro36Gly va trigar 50ps en establir la seva energia potencial, i aquesta va quedar també en torn als -1150 Kj/mol (Oliva et al., 1991b). En quant al mutant Tyr37Phe, es va establir energèticament al cap de 30 ps d'engegada la simulació i l'energia potencial promig dels passos següents va quedar en un valor de -1100 Kj/mol (lleugerament menys estable).

L'anàlisi dels factors B de temperatura (figura 2) demostra que els tres sistemes posseeixen propietats semblants, sent a més les seves fluctuacions comparables a les de l'estructura obtinguda per raigs-X (a excepció de la regió C-terminal, doncs el grup carboxílic no es troba unit al Zn^{2+} de la CPA en cap moment de la simulació). Així mateix, la comparació de les estructures promitjades en el període en que l'energia potencial es troba establitzada, demostra que les dues formes mutants

estudiades són molt semblants en estructura a la forma silvestre; en particular, la regió C-terminal es va trobar en ambdós casos amb una orientació favorable per a la interacció amb la CPA.

En aquest sentit, del càlcul de la probabilitat de que la conformació de la regió C-terminal de cada un dels mutants entrés dins d'uns marges conformacionals considerats com a bons per a que es produeixi la inhibició en la forma silvestre del PCI, s'ha deduït quin pot ser el percentatge relatiu d'inhibició per als mutants Pro36Gly i Tyr37Phe; prenent com a hipòtesi que la inhibició es produeix per xoc efectiu entre el PCI i la CPA.

Els resultats teòrics han demostrat que els espais conformacionals de la regió C-terminal dels mutants Pro36Gly i Tyr37Phe són molt semblants entre si i al del PCI nadiu, i que la probabilitat de que els angles abans definits prenguin valors que es trobin dins del rang dels que possibilitarien un xoc efectiu, és elevada. Amb tot això, i tal com s'ha vist per estudis experimentals realitzats també pel nostre grup (obtenció dels mutants esmentats per expressió heteròloga en *E. coli*), es comprova que la capacitat d'inhibició serà molt semblant en els tres casos.

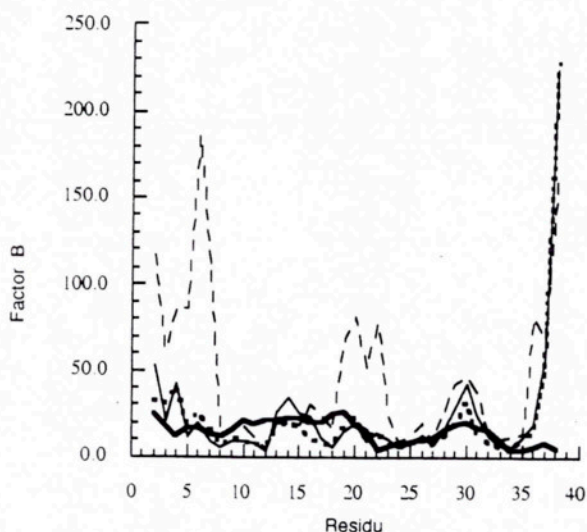


Figura 2

Representació dels factors B de temperatura. En línia contínua gruixuda la del cristal·lí, i en línia contínua fina la de la forma silvestre. En línia discontinua la dels mutants del PCI Pro36/Gly (fina) i Tyr37/Phe (gruixuda).

AGRAIMENTS. Aquest treball ha estat subvencionat mitjançant ajuts de la PLANICYT, BIO88-0456, i BIO91-0477. B.O., M.M., i F.C. agraiexen la concessió de beques de recerca del MEC.

BIBLIOGRAFIA

- Bowie, J.V., Reidhar-Olson, J.F., Lim, W.A. & Sauer, T.R. (1990) *Science* **247**, 1306-1310.
- Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Nilges, M. & Ryan, C.A. (1987) *Biochemistry* **26**, 8012-8023.
- Hass, G.M. & Ryan, C.A. (1982) *Methods in Enzimology* **80**, 778-791.
- Molina, M.A., Avilés, F.X. & Querol, E. (1992) *Gene*, in press.
- Nilsson, O., Tapia, O. & van Gunsteren, W.F. (1990) *Biophys. Biochem. Res. Comm.* **171**, 581-588.
- Nilsson, O. (1990) *J. Mol. Graph.* **8**, 192-201.
- Oliva, B., Wästlund, M., Nilsson, O., Cardenas, R., Querol, E., Avilés, F.X. & Tapia, O. (1991a) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**, 616-621.
- Oliva, B., Nilsson, O., Wästlund, M., Cardenas, R., Querol, E., Avilés, F.X. & Tapia, O. (1991b) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**, 627-632.
- Rees, D.C. & Lipscomb, W.N. (1982) *J. Mol. Biol.* **160**, 475-498.
- Tapia, O., Oliva, B., Nilsson, O., Querol, E. & F.X. Avilés (1991) *Molecular Engineering* **1**, 249-266.
- van Gunsteren, W.F. & Berendsen, H.J.C. (1987) *GROMOS Lybrary Manual*. Biomos B.V. Nijenborgh 16, Groningen, The Neetherlands.
- van Gunsteren, W.F. (1988) *Protein Engineering* **2**, 5-13.
- Åqvist, J., Sandblom, P., Jones, T.A., Newcomer, M.E., van Gunsteren, W.F. & Tapia, O. (1986) *J. Mol. Biol.* **192**, 593-604.
- Åqvist, J., van Gunsteren, W.F., Leijonmark, M. & Tapia, O. (1985) *J. Mol. Biol.* **83**, 461-477.