



“Ingeniería racional de las fructansacararas: Modificación de la especificidad de la reacción a través de predicciones de estructura función, dinámica y acoplamiento molecular.

Francisco Vera López Portillo, Agustín López Munguía, Clarita Olvera Carranza

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. CP62210
clarita@ibt.unam.mx

Palabras clave: Dinámica Molecular, Fructansacararas Biotecnología.

La aplicación de análisis de Acoplamiento Molecular (docking) en ingeniería de enzimas, para la búsqueda de residuos importantes en la interacción de las proteínas con algún componente del medio de reacción (sustrato, productos, solvente, etc.), se ha desarrollado con gran éxito por más de tres décadas. En años recientes, nuevas técnicas de Dinámica Molecular de proteínas han sido desarrolladas y su empleo en la Ingeniería de proteínas esta comenzando a impactar en los nuevos descubrimientos en el área de la interacción proteína-sustrato. El empleo de ambas metodologías de simulación de proteínas *In silico* junto a la predicción de la relación estructura función podría generar herramientas eficaces para descubrir las bases moleculares de la especificidad de las enzimas.

Desde hace mas de dos décadas nuestro grupo se ha enfocado en el estudio de un conjunto de enzimas denominadas fructansacararas, estas enzimas son capaces de producir fructanas (polímeros de fructosa) empleando como sustrato la sacarosa. Estas fructanas tienen propiedades físicas y químicas importantes que dependiendo de su tipo de enlace, tamaño y grado de ramificación tienen aplicación en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria.

El presente trabajo tuvo como objetivo conocer los residuos expuestos al solvente involucrados en la especificidad hacia el tipo de enlace de las fructansacararas bacterianas, para lo cual se realizaron comparaciones a nivel de estructura primaria de levansacararas (enzimas productoras de polímero con enlaces β 2-6) e inulosacararas (enzimas productoras de polímero con enlaces β 2-1), identificando residuos conservados y no conservados entre estas enzimas. Asimismo, se realizaron ensayos de acoplamiento y dinámica molecular empleando las estructuras resueltas de estas enzimas acoplados a los trisacáridos 1-kestosa y 6-kestosa, estos carbohidratos son intermediarios directos inherentes a la reacción de polimerización de las fructanas. Basados en ambos análisis se identificaron residuos considerados críticos para la especificidad al tipo de enlace de estas enzimas (Figura 1).

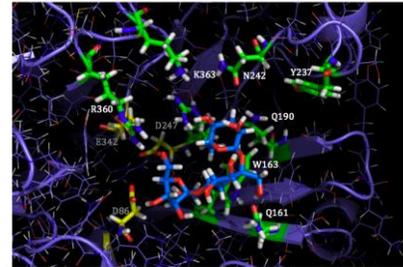


Figura 1.- Representación del acoplamiento molecular refinado mediante dinámica molecular, donde se encuentra a la 6-kestosa en posición favorecida para la transferencia del grupo fructosilo, en verde se encuentran los aminoácidos con posibles interacciones con la 6-kestosa y en amarillo los residuos catalíticos.

Mutantes en diversos residuos identificados como críticos para la especificidad de las fructansacararas: inulo y levansacarasa fueron generadas. Se realizó la caracterización, así como la comparación de los perfiles de productos de estas mutantes. Se demostró que mutantes en dos argininas cercanas al sitio activo (R360K y R433K), revelaban un cambio en el tipo de intermediarios de la reacción. La mutante R360K de la levansacarasa incrementó la producción del trisacárido 1-kestosa, intermediario de la síntesis de inulina (polímero con enlace β 2-1), resultados similares fueron observados con la mutante R433K. Estos resultados sugieren que las argininas identificadas mediante la combinación de técnicas de simulación de proteínas, están involucradas en la especificidad hacia el tipo de enlace.

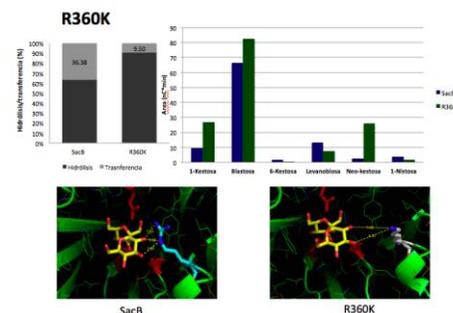


Figura 2. Comparación de la relación hidrólisis/transferencia y perfil de fructooligosacáridos intermediarios de las reacción producidos por la fructansacarasa silvestre (SacB) y la mutante R360K.

Este tipo de trabajos refleja la importancia de la implementación de técnicas de simulación en el diseño racional de proteínas y por consiguiente en el entendimiento de las bases moleculares de las reacciones enzimáticas.