

TESIS DOCTORAL

030E BIOQUÍMICA CLINICOMÉDICA E INMUNOLOGÍA 2ª EDICIÓN

VALENCIA 2012

**ESTRUCTURA – FUNCIÓN –
ESPECIFICIDAD EN EL ÁMBITO
DE LAS TRANSCARBAMILASAS:
LA PUTRESCINA
TRANSCARBAMILASA**



**LUIS MARIANO
POLO ILACQUA**

Dirigida por: Dr. VICENTE RUBIO ZAMORA

Tutora: Dra. EULALIA ALONSO IGLESIAS



**UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA**



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALÈNCIA



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
030E Bioquímica Clínicomedica e Inmunología 2ª Edición

ESTRUCTURA – FUNCIÓN – ESPECIFICIDAD
EN EL ÁMBITO DE LAS TRANSCARBAMILASAS:
LA PUTRESCINA TRANSCARBAMILASA

Memoria presentada por
Luis Mariano Polo Ilacqua
Para optar al grado de Doctor

Director:

Dr. Vicente Rubio Zamora

Laboratorio de Enzimopatología Estructural
Departamento de Genómica y Proteómica
Instituto de Biomedicina de Valencia
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
y CIBERER-ISCI

Valencia, a 19 de Octubre de 2012

Vicente Rubio Zamora, Doctor en Medicina, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Profesor Titular de Bioquímica (en Excedencia) de la Universidad de Valencia.

Certifica que:

Luis Mariano Polo Ilacqua, licenciado en Biología Molecular por la Universidad Nacional de San Luis (Argentina) ha realizado, bajo su dirección, el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “*Estructura – función – especificidad en el ámbito de las transcarbamilasas: la putrescina transcarbamilasa*”.

Revisado el trabajo, expresa su conformidad para que éste sea sometido a defensa ante el Tribunal correspondiente, ya que considera que la presentación del mismo reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

En Valencia, a 19 de Octubre de 2012

Fdo. Vicente Rubio Zamora

A Sole y a mis padres

Para la realización de esta Tesis, Luis Mariano Polo Ilacqua ha disfrutado de una Beca de las Cátedras volantes BSCH-CSIC del Convenio de Colaboración entre el Banco de Santander Central Hispano (BSCH) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Máquinas Moleculares para el metabolismo de aminoácidos y de pirimidinas: estructura, función, control, arquitectura, patología y organización génica.” (BFU2004-05159) y “Complejos macromoleculares, proteínas multifuncionales, pluriempleo y enfermedades raras en la familia aminoácido quinasa” (BFU2008-05021) financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación. El interés del grupo en transcarbamilasas se relaciona directamente con las patologías del ciclo de la urea que constituyen una de sus líneas de actuación dentro del CIBERER-ISCIII.

AGRADECIMIENTOS

En estos años de tesis con tantas experiencias, anécdotas y decisiones es para mí un placer agradecer a las personas que me han acompañado y enseñado.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Vicente Rubio por todas las cosas que me ha enseñado, por darme un lugar en su equipo y por permitirme unas “fervorosas” discusiones científicas que tanto nos han nutrido.

Fundamentales en el desarrollo de esta tesis han sido mis compañeros de labo: Fer, Leo, Jose, Enea, Nadine, Elena, Lourdes, Sergio, Ángela, Clara, Juanma, Alicia, Carles, Blanca, Belén y Carmen. Hemos pasado muy buenos momentos juntos. No puedo, sino acentuar mis agradecimientos para Fer, Leo, Elena, Jose, Enea, Nadine y Sergio, que no sólo han sido compañeros en el laboratorio y en las tertulias, sino que también se han convertido en buenos amigos que espero conservar. Entre ellos, un destacado agradecimiento merecen: Fernando, por su ayuda incansable, por las tantas charlas, las enseñanzas estructurales (y las que no) y por estar siempre para evacuar las dudas, incluso ahora, a través del teléfono; Leo, que siempre estuvo dispuesta a aportar/discutir ideas y enseñarme muchas de las cosas que necesitaba aprender; y Elena, que siempre me ayudo con una sonrisa constante, me enseñó a tomarme las cosas mucho mejor y que tanto me hubiese gustado, hubiera podido asistir a la defensa de esta defensa de tesis.

A Santi y Aaron, por mostrarme las cosas desde un punto de vista diferente a la estándar, por sus criticas muy constructivas, por compartir sus conocimientos y valoraciones, pero sobre todo por ser buenos amigos.

Al Dr. Juan José Calvete por su apoyo incondicional tanto científico como personal.

Al Dr. Ignacio Fita, por acogerme en su laboratorio cuando la cristalografía me enfrentó a un problema que parecía no tener solución, por ayudarme a solucionarlo, pero más importante aún, por enseñarme a abordarlo de una manera sistemática y a la vez optimista.

A Jero y Alberto, cristalógrafos de referencia en del instituto, por aportar sus conocimientos e ideas inagotables, en el IBV y en el sincrotrón.

A todo el IBV: especialmente a los chicos de mantenimiento y de informática, a las chicas de limpieza, al personal de seguridad, a la administración, a la bibliotecaria, a los investigadores, a los pre y los post, y a los técnicos, porque han participado y colaborado como engranajes en este mecanismo, para que el trabajo del día a día fuese mejor y más agradable. A los que están y a los que han estado. Bien saben que me gustaría nombrarlos a todos y cada uno, pero ya que es imposible voy a permitirme mencionar a unos pocos: Paco, Nacho, Pepe, Irene, Mariluz, Amparo, Josep, Manolo's, Yolanda, Jose, Amalia, Jordi's, Libia, Marta, Benito, Luisa, Marisa, Gema, Paula y Celso.

A mis amigos, sin importar su nacionalidad, por acompañarme en este desafío, entre ellos a los chicos del colegio mayor San Juan de Ribera.

A Nati, Cheeky, Iñaki y Martín, por ser como una parte de mi familia en España.

A mis padres y a mi hermana por apoyarme, por creer en mí y por enseñarme las cosas más importantes, siempre con el ejemplo. A Ricardo, Olga y Pablo por escucharme en largas catarsis, casi siempre telefónicas y por darme ánimos para seguir.

A Sole por aguantarme, porque en todos estos años ha sido “mi cable a tierra”, mi vía de escape y mi asesora técnica, por las largas sesiones de discusión científica en la bici, en la playa, frente a la pizarra o en cualquier otro lugar, pero sobre todo por hacer lo que está a su alcance para que cada día de mi vida sea mejor.

Quiero agradecer a todos y a cada uno. He aprendido muchísimo, no sólo de ciencia, sino de la vida en sí.

ABREVIATURAS NO USUALES

ADI: Arginina deiminasa

AgDI: Agmatina deiminasa

ATC: L-aspartato transcarbamilasa

AOTC: N α -acetil-L-ornitina transcarbamilasa

BSA: Albúmina sérica bovina

CK: Carbamato quinasa

CP: carbamifosfato

efOTC: L-ornitina transcarbamilasa de *Enterococcus faecalis*

FPLC: Una modalidad de cromatografía líquida para proteínas, de alta velocidad

Gdn: Ion guanidinio

GdnCl: Cloruro de guanidinio

hOTC: L-ornitina transcarbamilasa humana

HPLC: Una modalidad de cromatografía líquida para proteínas, de alta presión

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

MPD: 2-metil-2,4-pentanodiol

OTC: L-ornitina transcarbamilasa

PALA: N-fosfonoacetil-L-aspartato

PALAO: N α -acetil-N δ -fosfonoacetil-L-ornitina

PALO: N δ -fosfonoacetil-L-ornitina

PAPU: fosfonoacetilputrescina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PEG: Polietilén glicol

pfOTC: L-ornitina transcarbamilasa de *Pyrococcus furiosus*

PDB: Banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*)

PTC: Putrescina transcarbamilasa

RMSD: Raíz cuadrada de la media de los cuadrados de las desviaciones (Root Mean Square Deviation); para un conjunto de n puntos v y w,

$$rmsd(v, w) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|v_i - w_i\|^2}$$

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio

SOTC: N α -succinil-L-ornitina transcarbamilasa

TLS: Translation, Libration, Screw

ÍNDICE GENERAL

Introducción.....	1
1. Contexto biológico.....	3
1.1 <i>Enterococcus faecalis</i> y el descubrimiento de la putrescina transcarbamilasa.....	3
1.1.1 Primeros acercamientos al catabolismo de arginina y agmatina	3
1.1.2 Identificación de la vía catabólica de arginina y caracterización de sus componentes.....	4
1.1.3 La búsqueda de la putrescina transcarbamilasa.....	6
1.2 Operones catabólicos de arginina y agmatina.....	8
1.2.1 El operón que codifica para las enzimas del catabolismo de arginina.....	8
1.2.2 Primera identificación del gen para la putrescina transcarbamilasa	10
1.2.3 Organismos que contienen el operón AgDI	12
1.3 Los papeles del operón catabólico de la agmatina deiminasa.....	13
1.4 El origen evolutivo del gen de la putrescina transcarbamilasa y del operón que lo contiene	14
1.4.1 La evolución de las transcarbamilasas.....	14
1.4.2 La evolución del operón de <i>E. faecalis</i> que contiene el posible gen de la PTC.....	16
1.5 Posibles potencialidades de las proteínas de estos operones como dianas	17

1.5.1 <i>E. faecalis</i> como organismo patogénico	17
1.5.2 Otras posibles dianas bacterianas	19
2. Contexto enzimológico	21
2.1 El descubrimiento de las transcarbamilasas	21
2.2 La gran familia de las transcarbamilasas.....	22
2.3 La ATC como modelo estructural.....	25
2.4 OTCs anabólicas y catabólicas.....	27
2.5 La estructura de las transcarbamilasas y el uso de inhibidores específicos	28
2.5.1 El trímero como unidad biológica básica de las transcarbamilasas.....	31
2.5.2 El protómero de las transcarbamilasas.....	34
2.6 La putrescina transcarbamilasa es una proteína poco caracterizada pero de conocimiento antiguo	39
3. De qué trata esta tesis.....	41
Objetivos.....	43
Metodología.....	47
1. Preparación de fosfonoacetilputrescina (PAPU)	49
2. Clonación de genes y mutagénesis dirigida.....	52
2.1 Clonación.	52
2.2 Mutagénesis del residuo Arg-54.	55
2.3 Mutación ²³⁰ YGLY>VSMG del lazo 230	55
3. Sobreexpresión y purificación de PTC y de sus variantes.....	56
4. Ensayos de actividad enzimática	57

5. Cristalización y determinación de estructuras mediante difracción de rayos X.....	59
5.1 Cristalización y determinación de la estructura de PTC con PAPU	59
5.2 Cristalización y determinación de la estructura de PTC con PALO....	64
5.3 Cristalización y determinación de la estructura de PTC sin sustratos .	66
5.4 Cristalización y determinación de la estructura de las variantes de la PTC R54G, sin la hélice 13 e YGLY>VSMG con PALO.....	68
6. Validación de las estructuras	70
7. Otros materiales y métodos	71
Resultados y Discusión.....	75
1. El grupo de genes de catabolismo de agmatina en <i>E. faecalis</i>	77
2. El producto del gen <i>agcB</i> es una putrescina transcarbamilasa genuina.....	79
2.1 La PTC es un trímero estable en solución.....	84
3. PAPU inhibe específicamente PTC	85
3.1 La inhibición con PAPU aclara el orden de unión de los sustratos	88
4. La PTC usa ornitina como un sustrato genuino aunque pobre	90
4.1 La actividad de PTC no corresponde a una contaminación de la ornitina con putrescina.....	91
4.2 La actividad observada con ornitina no se debe a una contaminación con OTC.....	92
4.3 Una mutación inactivante de PTC confirma que la actividad observada con ornitina es genuinamente de la PTC	94
5. Cristalización de PTC en presencia de PAPU y PALO.....	94
6. Estructura de la PTC	97

6.1 Estructura del protómero de PTC.....	102
6.2 Estructura del trímero de PTC.....	106
6.3 La unión de un ion metálico a la estructura de PTC	109
7. El sitio activo de PTC	110
7.1 La discriminación entre putrescina y ornitina	112
7.2 Ingeniería del lazo 230 de la PTC para favorecer el uso de ornitina .	117
7.3 Estructura de PTC con el lazo 230 modificado (²³⁰ YGLY>VSMG) formando un complejo con PALO	119
8. El papel de la hélice C-terminal exclusiva de PTC.....	123
8.1 Efecto de la supresión de la hélice 13	126
8.2 Estructura de la PTC truncada.....	129
9. Una firma diagnóstica simple para la identificación de PTCs por secuencia.....	132
10. Mecanismo catalítico de la PTC	133
10.1 Sustitución de la arginina 54 del centro activo por glicina o leucina. Efecto de guanidinio exógeno	136
10.2 La estructura de PTC-R54G con PALO y Gdn.....	139
10.3 Un segundo ion Gdn neutraliza al grupo carboxilato de PALO en cada subunidad.....	147
10.4 El modelado de la cadena lateral de leucina en el mutante R54L explica la menor reactivación de dicho mutante por GdnCl	148
11. Cambios conformacionales asociados a la unión de los inhibidores bisustrato.....	150

12. Una estructura de PTC-apo ha sido publicada por un grupo competidor.....	158
13. Reflexiones finales.....	161
13.1 El origen del operón AgDI.....	161
13.2 La PTC en el universo de las transcarbamilasas	167
13.3 El significado biológico de la especificidad parcial de la PTC.....	170
13.4 La reacción catalizada por la PTC	170
Conclusiones	175
Bibliografía	179
Anexo	215

Introducción

Esta tesis se ocupa de una transcarbamilasa que ha sido casi desconocida durante mucho tiempo, la putrescina transcarbamilasa (PTC). En este trabajo identificamos inequívocamente su gen confirmando que codifica para el catalizador correcto y, debido a que la para PTC existía un único verdadero trabajo de caracterización, estudiamos propiedades que no habían sido ensayadas previamente. Además, determinamos su estructura, en la que pudimos identificar rasgos de gran interés, algunos de ellos relacionados con la especificidad de esta proteína y con la de ornitina transcarbamilasa.

El gen que codifica para esta enzima forma parte del operón para el catabolismo fermentativo de la agmatina, presente en una serie de organismos, por lo que comenzaré describiendo el contexto biológico y luego me ocuparé del contexto enzimático, dentro de la amplia familia de las transcarbamilasas.

1. Contexto biológico

1.1 *Enterococcus faecalis* y el descubrimiento de la putrescina transcarbamilasa

1.1.1 Primeros acercamientos al catabolismo de arginina y agmatina

El género *Enterococcus* está compuesto de bacterias grampositivas, anaerobias facultativas, que no forman esporas, pertenecientes al grupo de las bacterias ácido-lácticas [LAB, de sus sílabas en inglés: lactic acid bacteria, (Klein, 2003)]. La primera descripción del grupo *Enterococcus* fue hecha por Thiercelin en 1899, cuando se identificó en microorganismos intestinales (Klein, 2003). Originalmente se consideraba que dos de las especies más

importantes de este grupo, hoy conocidas como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, eran el mismo enterococo, hasta que durante la primera mitad del siglo pasado fueron separados en especies diferentes pertenecientes al mismo género (Sherman, 1937). En la búsqueda de características que permitieran una fácil diferenciación de estas especies se estableció que, aunque todos los enterococos podían hidrolizar arginina, sólo *E. faecalis* era capaz de utilizar este aminoácido como fuente de energía, como así también su derivado decarboxilado, la agmatina (Deibel, 1964).

1.1.2 Identificación de la vía catabólica de arginina y caracterización de sus componentes

Como se ha señalado, *E. faecalis* tiene la capacidad de acoplar la energía resultante del catabolismo de la arginina a su crecimiento (Deibel, 1964). La enzima encargada de la hidrólisis de arginina fue en un principio denominada arginina dihidrolasa (Hills, 1940), aunque posteriormente, Slade y Slamp demostraron que no se trataba de una enzima única sino de un sistema de enzimas (Slade y Slamp, 1952). La primera de ellas es la arginina deiminasa (ADI, EC 3.5.3.6, Figura 1) que hidroliza arginina a citrulina y amonio (Oginsky y Gehrig, 1952; Mercenier y cols., 1980; Rahman y cols., 1980), enzima que fue purificada y caracterizada bioquímicamente por primera vez a partir de *E. faecalis* (Petrack y cols., 1957).

En 1953 se estableció que la enzima siguiente en la vía, la ornitina transcarbamilasa (OTC, EC 2.1.3.3, Figura 1), se encargaba de la conversión de citrulina a ornitina (Oginsky y Gehrig, 1953) con formación de un enlace

fosfato de alta energía (Knivett, 1954), en un compuesto que fue identificado como carbamilfosfato (Jones y cols., 1955).

Junto a la identificación del carbamilfosfato (CP), se estableció que la enzima carbamato quinasa (CK, EC 2.7.2.2, Figura 1) es la encargada de transferir el grupo fosfato desde el carbamilfosfato al ADP (Jones y cols., 1955), siendo purificada en un principio a partir de extractos de *Serratia marcescens* (Glasziou, 1956) y más tarde de *E. faecalis* (Mokrasch y cols., 1960).

Finalmente, un transportador de tipo antiportador se encarga de intercambiar arginina del medio por ornitina (Figura 1), alimentando la vía (Poolman y cols., 1987). Éste ha sido estudiado a partir de los genes correspondientes de *Pseudomonas aeruginosa* (Verhoogt y cols., 1992) y de *Halobacterium salinarum* (Wimmer y cols., 2008).

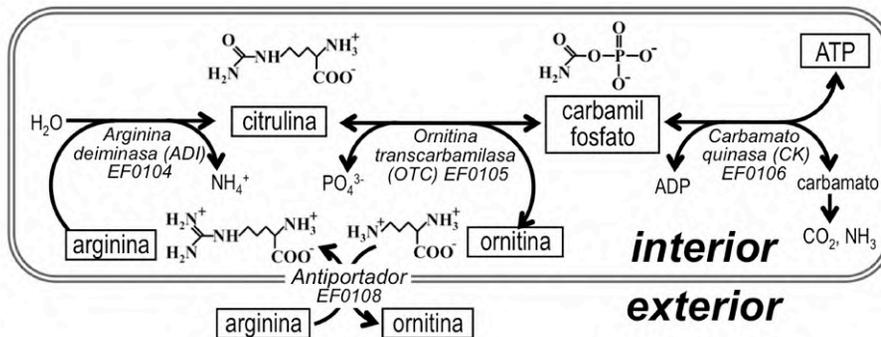


Figura 1. Ruta de la arginina deiminasa para la fermentación de la arginina. Se detallan los nombres de las enzimas que catalizan los pasos enzimáticos y los genes que las codifican.

Esta ruta metabólica, denominada de la arginina deiminasa (abreviado ADI, Figura 1), está presente en algunas eubacterias (Abdelal, 1979; Mercenier y cols., 1980; Cunin y cols., 1986; D'Hooghe y cols., 1997),

arqueas (Ruepp y Soppa, 1996) y eucariotas unicelulares (Schofield y cols., 1992; Morada y cols., 2011), pero no se ha encontrado en organismos multicelulares.

1.1.3 La búsqueda de la putrescina transcarbamilasa

Como se mencionó previamente, además de fermentar arginina, *E. faecalis* es capaz de utilizar agmatina, el derivado decarboxilado de la arginina, como fuente de energía (Deibel, 1964). Carbamilputrescina y putrescina fueron identificados como intermediarios del catabolismo de la agmatina (Møller, 1955). Como estos compuestos son análogos de citrulina y ornitina, respectivamente, se postuló que sus producción podría estar mediada por las mismas enzimas de la vía ADI (Roon y Barker, 1972). Sin embargo, cuando se estudió en detalle la OTC se demostró que ésta no es capaz de catalizar la reacción de carbamilación de putrescina (Burnett y Cohen, 1957), dando lugar a la búsqueda de una enzima diferente, con la función putrescina transcarbamilasa.

La actividad putrescina transcarbamilasa fue parcialmente purificada a partir de extractos de *E. faecalis* crecido en presencia de agmatina (Roon y Barker, 1972), que además tenían alrededor de 20 veces menos actividad OTC que aquellos con crecimiento en arginina, mientras que aparecía la actividad putrescina transcarbamilasa ausente en los extractos de cultivos con arginina (Roon y Barker, 1972). Además, la proporción de la actividad ornitina transcarbamilasa disminuía frente a la actividad putrescina transcarbamilasa tras un paso de purificación por exclusión molecular, que demostró masas moleculares diferentes para ambas actividades (Roon y Barker, 1972). Por

tanto, estos autores propusieron una vía de degradación de agmatina similar a la vía ADI, con un paso catalizado por una agmatina deiminasa y otro por la putrescina transcarbamilasa (Roon y Barker, 1972). Más tarde, la proteína con actividad putrescina transcarbamilasa (PTC, EC 2.1.3.6) fue purificada y caracterizada bioquímicamente a partir de extractos de *E. faecalis* (Wargnies y cols., 1979). Diez años después se incluyó la secuencia N-terminal de la PTC purificada de *E. faecalis* en un repertorio de secuencias N-terminales de transcarbamilasas (Tricot y cols., 1989).

De este modo, confirmando las hipótesis propuestas previamente (Roon y Barker, 1972), se determinó que la vía por la que se metaboliza la agmatina está compuesta de tres pasos catalizados por enzimas solubles y un antiportador (Simon y Stalon, 1982; Driessen y cols., 1988), del mismo modo que la vía ADI, y fue denominada vía de la agmatina deiminasa (vía AgDI, Figura 2).

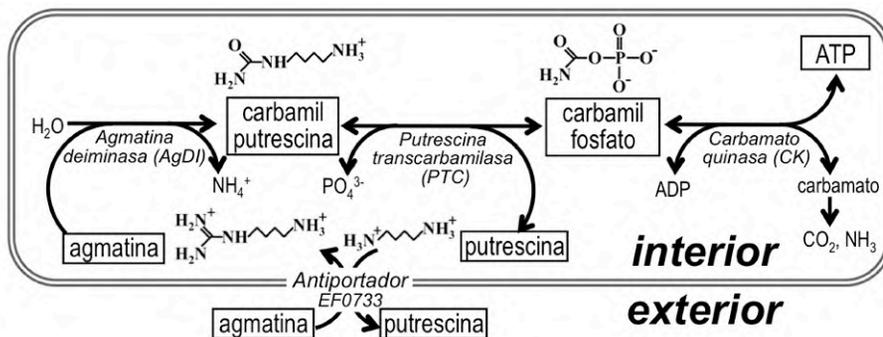


Figura 2. Ruta de la agmatina deiminasa para la fermentación de la agmatina. Se detallan los nombres de las enzimas que catalizan los pasos enzimáticos.

Así, el primer paso de esta vía es catalizado por la agmatina deiminasa (AgDI, EC 3.5.3.12) y resulta en la hidrólisis de uno de los grupos amino del

guanidinio de la agmatina, produciendo carbamilputrescina (Simon y Stalon, 1982). En el segundo paso, la PTC cataliza la fosforólisis de la carbamilputrescina dando carbamilfosfato (CP) y putrescina (Simon y Stalon, 1982). En el último paso enzimático de la vía, una carbamato quinasa (CK, EC 2.7.2.2) dedicada usa el CP para fosforilar ADP, generando una molécula de ATP por molécula de agmatina que entra en la ruta (Simon y Stalon, 1982). Como en la vía ADI para el par arginina/ornitina, la putrescina se intercambia con agmatina del medio por medio de un antiportador agmatina/putrescina (Driessen y cols., 1988).

Hasta el momento de comenzar esta tesis no existía información estructural sobre ninguno de los componentes de la vía, aunque la estructura de otra CK de *E. faecalis* (con una identidad del 49% con la de esta vía) había sido determinada ya en el laboratorio, estableciendo el primer ejemplo estructural de un plegamiento característico que hoy conocemos como de la familia aminoácido quinasa (Marina y cols., 1999). Durante el desarrollo de este trabajo, dos de los componentes de este operón, AgDI y PTC, fueron caracterizados enzimática y estructuralmente (Llácer y cols., 2007; Polo y cols., 2012), siendo la última de estas proteínas el eje central de esta tesis.

1.2 Operones catabólicos de arginina y agmatina.

1.2.1 El operón que codifica para las enzimas del catabolismo de arginina

La organización de los genes que codifican la vía ADI fue estudiada primero en *Pseudomonas aeruginosa* (Luthi y cols., 1986; Baur y cols., 1987;

Baur y cols., 1989), especie en la que se observó que los genes para las tres enzimas y para el transportador forman un grupo de genes contiguos (Figura 3) (Verhoogt y cols., 1992), denominados respectivamente *arcA*, *arcB*, *arcC* y *arcD*, para ADI, OTC, CK y el antiportador (Luthi y cols., 1986; D'Hooghe y cols., 1997; Barcelona-Andres y cols., 2002). Su regulación ha sido estudiada en varias bacterias (Mercenier y cols., 1980; Rahman y cols., 1980; Crow y Thomas, 1982; Park y cols., 1997; Maghnoúj y cols., 1998; Gruening y cols., 2006), entre las que se encuentra *E. faecalis*, cuya organización génica, diferente y más compleja que la de *P. aeruginosa*, fue determinada por el laboratorio donde he realizado este trabajo [Figura 3, (Barcelona-Andres y cols., 2002)].

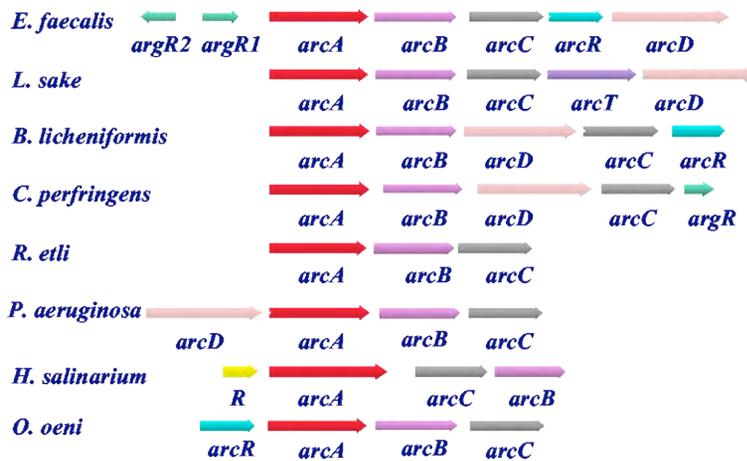


Figura 3. Organización de los genes del operón ADI
 Comparación de la organización génica del operón ADI de varios microorganismos: *E. faecalis*, *Lactobacillus sakei*, *Bacillus licheniformis*, *Clostridium perfringens*, *Rhizobium etli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Halobacterium salinarum*, y *Oenococcus oeni*. Tomado con autorización de los autores de Barcelona-Andrés y col. (2002).

1.2.2 Primera identificación del gen para la putrescina transcarbamilasa

Durante mucho tiempo no hubo otra información genética sobre la ruta AgDI que la observación de que tres cepas mutantes de *E. faecalis* que no podían utilizar agmatina carecían bien de actividad AgDI, bien de actividad PTC, bien de ambas (Simon y Stalon, 1982). La pérdida de dos enzimas en un mutante y la inducción por agmatina de aumentos coordinados en los niveles de actividades AgDI y PTC estaban de acuerdo con la asociación de los genes para estos dos enzimas en el mismo operón, como en el caso de los genes para los pasos equivalentes de la ruta ADI (Barcelona-Andres y cols., 2002).

Más recientemente, al identificarse el gen que codifica para una enzima AgDI en *P. aeruginosa*, denominado *aguA* (Nakada e Itoh, 2003), involucrado en la biosíntesis de putrescina y poliaminas en plantas y microorganismos (Bagni y Tassoni, 2001) que decarboxilan la arginina (no es el caso de *E. faecalis*), se identificó un posible gen *aguA* en el organismo responsable de la caries dental, *Streptococcus mutans* (Loesche, 1986) y por similitud de secuencia, en *E. faecalis* [gen *EF0734* del genoma de *E. faecalis* V583 (Griswold y cols., 2004)]. Tanto en *S. mutans* como en *E. faecalis* este gen viene precedido por los genes para un posible antiportador y para una transcarbamilasa (que en *E. faecalis* V583 corresponden respectivamente a los genes *EF0733* y *EF0732*), y está seguido de un gen para una posible carbamato quinasa (en *E. faecalis* V583, *EF0735*), formando un grupo de genes con todas las enzimas requeridas en la vía AgDI [Figura 4, (Griswold y cols., 2004)]. Además, en *S. mutans* se han realizado experimentos de

mutación polar en el primer gen del grupo, que han resultado en una importante disminución de la actividad AgDI medida en células permeabilizadas, tal como cabría esperar para el operón el grupo de Labedan (Griswold y cols., 2004). Aún más, se encontró simultáneamente por otros (Naumoff y cols., 2004a) que la secuencia de aminoácidos predicha a partir del gen de *E. faecalis* EF0732 coincide en su parte N-terminal con la secuencia N-terminal publicada mucho tiempo antes (Tricot y cols., 1989) y olvidada para la PTC de *E. faecalis*, lo que llevó al co-descubrimiento del gen para dicha enzima.

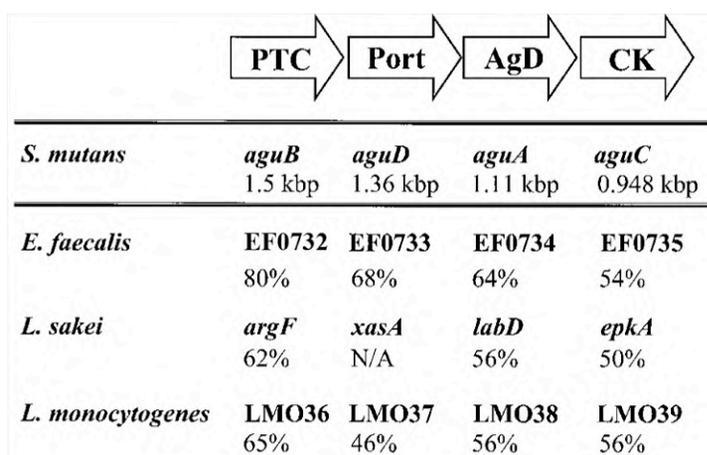


Figura 4. El grupo de genes de AgDI.

Organización del grupo de genes de AgDI en *S. mutans* UA159 y porcentaje de identidad de grupos génicos similares encontrados en otras bacterias. Port, antiportador agmatina-putrescina; AgD, agmatina deiminasa; N/A, sin información disponible. Adaptado de Griswold y col. (2004).

Sin embargo, la prueba más concluyente para la atribución de funciones a genes, es decir, la clonación del gen, su expresión, la purificación y caracterización funcional de su correspondiente producto génico, se ha producido solamente en el trabajo que se describe en esta tesis, fruto de un

esfuerzo paralelo para desentrañar los genes de la ruta AgDI y para caracterizar estructuralmente sus productos. Así, el laboratorio ha clonado los genes de *E. faecalis* EF0732 y EF0734, y yo he sobreexpresado, purificado y caracterizado funcionalmente el producto del gen EF0732, demostrando taxativamente que se trata de la PTC, mientras otros miembros del grupo, con mi colaboración, han hecho lo mismo para el gen EF0734 y para su producto, AgDI (Llácer y cols., 2007).

1.2.3 Organismos que contienen el operón AgDI

Con posterioridad a los hallazgos en *S. mutans* y *E. faecalis* de Griswold y cols. (2004), Naumoff y cols. (2004) y nuestro mismo trabajo (Llácer y cols., 2007), otros han identificado grupos génicos conteniendo los genes predichos para la vía AgDI en los genomas de: *Streptococcus rattii*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus criceti*, *L. monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus* (Alberto y cols., 2007; Ladero y cols., 2011). Nuestra búsqueda en las bases de genomas bacterianos (Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>; Comprehensive Microbial Resource, <http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/ComrHomePage.cgi>), así como de proteínas (UniProt, <http://www.uniprot.org/uniprot/>; Protein, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) nos han permitido identificar el operón AgDI en: *Vibrio orientalis*, *Vibrio sinaloensis*, *E. faecium* [sorprendentemente, ya que se describió como no fermentador de agmatina (Deibel, 1964)], *Lb. buchneri*, *Eggerthella lenta*, *Parvibaculum*

lavamentivorans, *Mycoplasma mycoides*, *Caulobacter sp.*, *Hyphomicrobium sp.* y *Mycoplasma leachii*.

1.3 Los papeles del operón catabólico de la agmatina deiminasa

Además del papel de la vía AgDI en la producción de ATP, la expresión del operón AgDI ha sido relacionada en reiteradas ocasiones con la resistencia de algunas bacterias al estrés ácido y con la detoxificación de agmatina (Griswold y cols., 2006; Chen y cols., 2009; Griswold y cols., 2009). Hasta el momento se han descrito dos tipos de vías catabólicas de aminoácidos relacionadas con la resistencia al ambiente ácido. En estas vías donde se descarboxilan aminoácidos y se excreta la amina al medio, usándose una descarboxilasa y un transportador. Entre estas, destacan las de descarboxilación de tirosina a tiramina e histidina a histamina (Cotter y Hill, 2003; Fernández y Zúñiga, 2006). Por otro lado están las vías AgDI y ADI, revisadas en esta introducción, que producen ATP además de la putrescina u ornitina que se exportan al medio, y carbamato, que se descompone químicamente a dióxido de carbono y amoníaco. El CO₂ pasa a la atmósfera, mientras que el amoníaco, al unir un protón y convertirse en ión amonio alcaliniza el citoplasma (junto al amonio producido en la reacción de la deiminasa) y ayuda a la bacteria a sobrevivir en ambientes ácidos. Se ha descrito el papel de la vía AgDI en la resistencia al medio ácido en *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus brevis* (Lucas y cols., 2007; Liu y Burne, 2009; Arena y cols., 2011b; Chen y cols., 2011; Rimaux y cols., 2012).

La barrera ácida del estómago es uno de los sistemas de defensa del huésped que debe ser franqueado por los patógenos entéricos durante la colonización del sistema digestivo (Audia y cols., 2001). Del mismo modo, la resistencia o tolerancia al estrés ácido ha sido relacionada con la virulencia de algunas bacterias como *L. monocytogenes* (Chaturongakul y cols., 2008), lo que acentúa la importancia de la caracterización de la PTC, que por su capacidad demostrada taxativamente por mí [ver esta memoria, (Llácer y cols., 2007) y (Polo y cols., 2012)] para catalizar tanto la reacción con putrescina como con ornitina, ha sido relacionada con las dos vías, AgDI y ADI, a través de las que proporciona dicha resistencia (Chen y cols., 2011).

Así, resulta evidente que el conocimiento bioquímico y estructural de las enzimas que forman la vía AgDI podría dar lugar al diseño de inhibidores con impacto en la patogenicidad/virulencia de las bacterias patógenas que contienen dicha vía.

1.4 El origen evolutivo del gen de la putrescina transcarbamilasa y del operón que lo contiene

1.4.1 La evolución de las transcarbamilasas

La evolución de las transcarbamilasas fue primeramente estudiada para las ATCs y OTCs a causa de la temprana disponibilidad de información y de secuencias para estas enzimas (Labedan y cols., 1999). Éstas mostraban una alta similitud de secuencias, en algunos casos motivos comunes a ambas familias y en otros con motivos específicos para cada transcarbamilasa (Labedan y cols., 1999). La constancia de estas observaciones para bacterias,

arqueas y eucariotas, demostraron que las transcarbamilasas provienen de un único gen ancestral y tienen un origen común para todos los organismos existentes en la actualidad (Labedan y cols., 1999). Sin embargo, las OTCs y las ATCs actuales han sido subdivididas en dos grupos cada una (Labedan y cols., 1999).

Con la llegada de la secuenciación de los genomas se identificaron nuevos genes para transcarbamilasas no conocidas anteriormente, entre los que se encontraban posibles genes para la PTC de varias especies, algunos genes para transcarbamilasas de especificidades identificadas posteriormente, como N α -succinil-L-ornitina transcarbamilasa (SOTC) de *Bacteroides fragilis* y N α -acetil-L-ornitina transcarbamilasa (AOTC), y otros genes codificando transcarbamilasas reconocidas sólo por su secuencia y los motivos de unión a CP, pero cuyo sustrato carbamizable aun está por revelar (Naumoff y cols., 2004a). Las PTCs han sido ubicadas dentro de la rama de las OTCs, aunque formando un grupo monofilético propio [Figura 5, (Naumoff y cols., 2004a)]. Este grupo emerge antes de la subdivisión de las OTCs. En el transcurso de esta tesis discutiremos la estrecha relación entre la PTC y la OTC valiéndonos de los conocimientos bioquímicos y de la información estructural.

También las AOTCs y las SOTCs han sido ubicadas dentro de la rama de las OTCs, aunque mucho más cerca de la raíz del árbol. Además, de la raíz salen las secuencias de algunas transcarbamilasas de función desconocida (denominadas UTCs, por sus siglas en inglés).

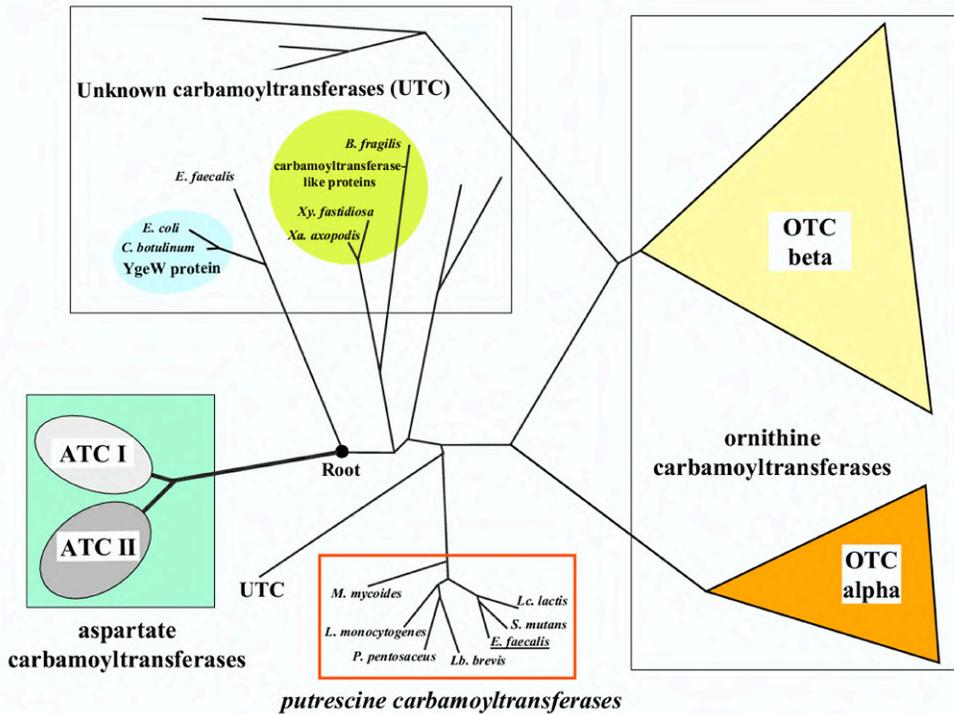


Figura 5. Vista esquemática del árbol evolutivo de las transcarbamilasas. La raíz se indica con un círculo negro. Se han demarcado las dos familias de OTCs (triángulos), las dos de ATCs (óvalos grises) y la de las PTCs (encuadrada en rojo). Las transcarbamilasas cuyas ramas están alejadas de ATC, OTC y PTC se marcan como desconocidas (UTC). Tomado de Naumoff y col. (2004).

1.4.2 La evolución del operón de *E. faecalis* que contiene el posible gen de la PTC

Los contextos génicos para las respectivas transcarbamilasas son muy similares entre las vías ADI y AgDI y en las diferentes especies bacterianas. Como se ha explicado previamente, se identifican en la vía AgDI una aminoácido permeasa, una carbamato quinasa y una proteína anotada previamente como hipotética y conservada, pero identificada como una AgDI (Griswold y cols., 2004) por homología con la proteína codificada por el gen *AguaA* de *P. aeruginosa* (Nakada y cols., 2001). En el genoma de *P.*

aeruginosa no se encontró una posible PTC, aunque sí una carbamilputrescina amidohidrolasa. En el caso de *P. aeruginosa*, agua y el gen para la amidohidrolasa forman parte de una ruta de obtención de putrescina que tiene como primer paso la decarboxilación de la arginina (Nakada y cols., 2001).

Si bien se observó que los grupos de genes de la vía ADI y aquellos que incluyen las posibles PTCs tienen distribuciones similares y que algunos de sus miembros están evolutivamente relacionados, no han sido aclarados los procesos evolutivos que conectan estos dos grupos génicos. Nuestro laboratorio caracterizó funcional y estructuralmente la proteína AgDI de *E. faecalis* (Llácer y cols., 2007), que contiene un plegamiento similar a una turbina de cinco aspas, análoga a la encontrada en el dominio catalítico de ADI (Das y cols., 2004; Galkin y cols., 2004), mostrando un posible origen común para ADI y AgDI a pesar de su escasa similitud de secuencia (11,6% de identidad) sugiriendo que la separación entre estas especificidades sucedió en un pasado muy lejano.

En el presente trabajo aportaremos nuevas reflexiones y datos hipótesis sobre los mecanismos que pudieron dar lugar al operón AgDI.

1.5 Posibles potencialidades de las proteínas de estos operones como dianas

1.5.1 *E. faecalis* como organismo patogénico

Durante mucho tiempo los enterococos han sido considerados como comensales inofensivos del tracto intestinal. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha detectado un aumento en las enfermedades nosocomiales

producidas por enterococos, resistentes a múltiples fármacos (Rice, 2001; Leavis y cols., 2006), llegando a ser considerados patógenos importantes asociados a los sistemas de salud de todo el mundo (Hidron y cols., 2008; Lester y cols., 2008; Sood y cols., 2008). Estudios epidemiológicos recientes sugieren que el aumento de la importancia de *E. faecalis* y *E. faecium* como patógenos nosocomiales puede deberse al desarrollo de linajes específicos asociados a hospitales, en los cuales la resistencia a los antibióticos y los determinantes de virulencia se han ido acumulando con el tiempo (McBride y cols., 2007; Galloway-Pena y cols., 2009). Actualmente, *E. faecalis* es la especie de enterococo más común y es la responsable de más del 80% de las infecciones provocadas por enterococos en seres humanos (Jett y cols., 1994; Jones y cols., 2004; Akhter y cols., 2011). Además, es importante considerar que como residentes de la flora intestinal, los enterococos posiblemente están en posición de adquirir resistencia a antibióticos a partir de genes de otros comensales o bacterias (Engel y cols., 1980; Weigel y cols., 2003).

Asimismo, *E. faecalis* es el microorganismo más comúnmente aislado de lesiones dentales peri-radicales (Salah y cols., 2008; Siqueira y Rocas, 2009), incluso tras un tratamiento de endodoncia (Siqueira y Rocas, 2004; Sedgley y cols., 2006). Su patogenicidad y su resistencia tanto a antibióticos como a condiciones de crecimiento que podrían resultar adversas para otras bacterias [como la presencia de altas concentraciones de agmatina, (Griswold y cols., 2006)], hace de especial interés conocer a fondo el metabolismo de *E. faecalis*, e identificar y caracterizar las enzimas relacionadas con su supervivencia en estas condiciones.

1.5.2 Otras posibles dianas bacterianas

Teniendo en cuenta que la agmatina está presente en la saliva y en la placa dental en concentraciones que pueden resultar tóxicas para algunas bacterias [hasta 750 nmoles mg proteína⁻¹, (Griswold y cols., 2006)], que además puede ser encontrada en grandes cantidades en la cerveza (Glória e Izquierdo-Pulido, 1999) y en la leche (Santos y cols., 2003), y que se ha identificado una relación entre la bacteria *S. mutans*, responsable principal de la caries dental, y la expresión del operón AgDI para su supervivencia en ambientes ácidos y en la detoxificación de agmatina (Griswold y cols., 2006), es posible considerar las enzimas codificadas por esta vía como posibles dianas terapéuticas en la caries y quizá en otras enfermedades de la cavidad bucal.

El metabolismo de agmatina podría ser una diana para controlar otras bacterias que contienen el operón AgDI en su genoma y que sobreviven en ambientes ácidos, como *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. hilgardii* y *P. pentosaceus*, que suelen estar presentes en el vino (Lucas y cols., 2007), donde además es posible encontrar importantes concentraciones de agmatina (Arena y cols., 2011a; Arena y cols., 2011b) que llegan hasta 22 mg l⁻¹ (Galgano y cols., 2012). Es importante tener en cuenta que la presencia de putrescina, uno de los productos de la vía AgDI, ha sido propuesta como una medida de la calidad del vino, donde además es la amina biogénica más abundante (Arena y cols., 2008). Algunas de estas bacterias han sido relacionadas con la producción de compuestos responsables de otorgarle al vino características

desagradables y potencialmente tóxicos, como las tetrahidropiridinas [sabor a ratón, (Heresztyn, 1986)], el etilcarbamato que es un carcinógeno [uretano, (Azevedo y cols., 2002; Tonon y Lonvaud-Funel, 2002)], o la producción de polisacáridos que otorgan un aumento de viscosidad (Manca de Nadra y Strasser de Saad, 1995).

En las cepas patogénicas de *L. monocytogenes*, la vía AgDI ha sido involucrada en la resistencia al ambiente ácido y la virulencia (Chen y cols., 2009). Esta bacteria gram-positiva, muy distribuida en el entorno y causante de infecciones animales esporádicas y de brotes zoonóticos, fue descrita por primera vez en 1926, aunque no fue hasta principios de los 80 que, debido a un brote de listeriosis en humana Canadá, se la comenzó a relacionar con problemas serios de salud (Schlech y cols., 1983). Se ha establecido que 95% de los casos esporádicos de listeriosis son transmitidos por los alimentos (Mead y cols., 1999). *L. monocytogenes* es un patógeno oportunista que casi siempre afecta a personas con una enfermedad o circunstancia subyacente grave (como transplantados, pacientes con leucemia, SIDA, cáncer de pulmón, etc), a mujeres embarazadas, fetos, recién nacidos y personas mayores (Anónimo-OMS, 2004). La mayor parte de los casos en los que estuvo en riesgo la vida del paciente correspondieron a uno de los siguientes tres síndromes clínicos: listeriosis maternofetal o listeriosis neonatal, infección del torrente sanguíneo y meningoencefalitis. La alta mortalidad de la listeriosis, llegando hasta el 20-30% en casos de tratamiento inadecuado (Mead y cols., 1999), le dan al estudio un interés especial del metabolismo de *L.*

monocytogenes y, en especial, a los genes relacionados con su virulencia y a su resistencia a pH ácido.

2. Contexto enzimológico

2.1 El descubrimiento de las transcarbamilasas

El primer acercamiento a las reacciones catalizadas por las transcarbamilasas fue realizado por Hans A. Krebs y Kurt Henseleit en 1932 con su teoría sobre el ciclo de la urea (Krebs y Henseleit, 1932), en cuyo primer paso describían la síntesis de citrulina como la unión al δ -amino de ornitina de un grupo carboxilato (de una molécula de dióxido de carbono) y la amidación de este último (de una molécula de amoníaco). La teoría sobre el mecanismo de carbamilación de ornitina fue posteriormente modificada, en un principio hipotetizándose que era el carbamilglutamato el intermediario que proveía directamente el grupo carbamilo a ornitina (Cohen y Grisolia, 1948), pero más tarde, haciendo uso de preparaciones de la fracción soluble obtenida de hígado de rata, se volvió a proponer que una molécula de dióxido de carbono y un ion amonio eran los responsables de la carbamilación a través de un compuesto carbamilo (Grisolia y Cohen, 1951), que también relacionaron con un intermediario fosforilado. Durante la caracterización de este intermediario fosforilado, denominado compuesto X (Grisolia y Cohen, 1952), se establecieron dos pasos en la síntesis de citrulina a partir de ornitina, en el primero de los cuales se sintetizaba el compuesto X y en el segundo se carbamilaba la ornitina (Grisolia y Cohen, 1952). Esta fue la primera identificación de una enzima a la que más tarde se denominó ornitina

transcarbamilasa (Burnett y Cohen, 1957). El compuesto X fue posteriormente identificado como carbamifosfato (Jones y cols., 1955).

El descubrimiento de la segunda transcarbamilasa conocida, que cataliza la transferencia del grupo carbamilo del carbamifosfato al grupo α -amino de aspartato y ha sido denominada aspartato transcarbamilasa (ATC), fue casi contemporáneo al de la ornitina transcarbamilasa, siendo descrita por primera vez en 1956 por Lowenstein y Cohen (Lowenstein y Cohen, 1956). A pesar de no haber sido la primera transcarbamilasa en ser descubierta, la ATC fue la primera en ser caracterizada estructuralmente, como veremos más adelante.

2.2 La gran familia de las transcarbamilasas

Las transcarbamilasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo carbamilo a un átomo de nitrógeno u oxígeno (denominadas N- u O-transcarbamilasas, respectivamente). A causa de que el grupo carbamilo tiene un único átomo de carbono, la comisión de enzimas (EC) les asigna a las transcarbamilasas el número 2.1.3.X, el cual es compartido con las carboxitransferasas (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

La mayoría de las transcarbamilasas que han sido identificadas tienen como sustrato carbamilable una amina primaria (Burnett y Cohen, 1957; Wargnies y cols., 1979; Hommes y cols., 1983; Kantrowitz y Lipscomb, 1988; Shi y cols., 2005; Shi y cols., 2006a), aunque en una de ellas (la oxamato transcarbamilasa) el aceptor del grupo carbamilo es un átomo de nitrógeno de una amida (Tigier y Grisolia, 1965), mientras que unas pocas han sido

descritas como capaces de carbamilar un grupo alcohol (Coque y cols., 1995; Xu y cols., 2004).

Todas las transcarbamilasas descritas hasta el momento usan el carbamilfosfato como sustrato (Burnett y Cohen, 1957; Tigier y Grisolia, 1965; Wargnies y cols., 1979; Hommes y cols., 1983; Kantrowitz y Lipscomb, 1988; Coque y cols., 1995; Shi y cols., 2005; Shi y cols., 2006a), que es un anhídrido fosfórico rico en energía (Figuras 1 y 2), con un posible origen en el mundo prebiótico (Keefe y Miller, 1995).

Entre las transcarbamilasas cuya acción ocurre sobre un grupo alcohol, generalmente llamadas O-transcarbamilasas, encontramos la 3'-hydroxymethylcephem-O-carbamiltransferasa de *Nocardia lactamdurans* (EC 2.1.3.7, (Coque y cols., 1995)) y novN de *Streptomyces spheroides* (Xu y cols., 2004), ambas involucradas en la síntesis de antibióticos (Coque y cols., 1995; Xu y cols., 2004).

La oxamato transcarbamilasa (EC 2.1.3.5) es la única transcarbamilasa descrita que en lugar de una amina primaria o un grupo alcohol es capaz de carbamilar una amida. La actividad oxamato transcarbamilasa ha sido identificada a partir de enterococos por varios autores (Bojanowski y cols., 1964; Tigier y Grisolia, 1965; Vander Wauven y cols., 1986), aunque aún no ha sido purificada ni identificado su gen.

En el presente trabajo de tesis nos hemos centrado en el estudio de la PTC, una de las enzimas del grupo de transcarbamilasas que catalizan la transferencia del grupo carbamato a un grupo amino libre de un aminoácido o derivado de aminoácido (Figura 6). A este grupo de enzimas también

pertenecen la aspartato transcarbamilasa [ATC, EC 2.1.3.2, (Kantrowitz y Lipscomb, 1988)], la lisina transcarbamilasa [EC 2.1.3.8, (Hommes y cols., 1983)], la ornitina transcarbamilasa [OTC, EC 2.1.3.3, (Burnett y Cohen, 1957)], y las transcarbamilasas de dos derivados acilados de ornitina, la acetilornitina transcarbamilasa [AOTC, 2.1.3.9, (Shi y cols., 2005)] y la succinilornitina transcarbamilasa [SOTC, 2.1.3.11, (Shi y cols., 2006a)].

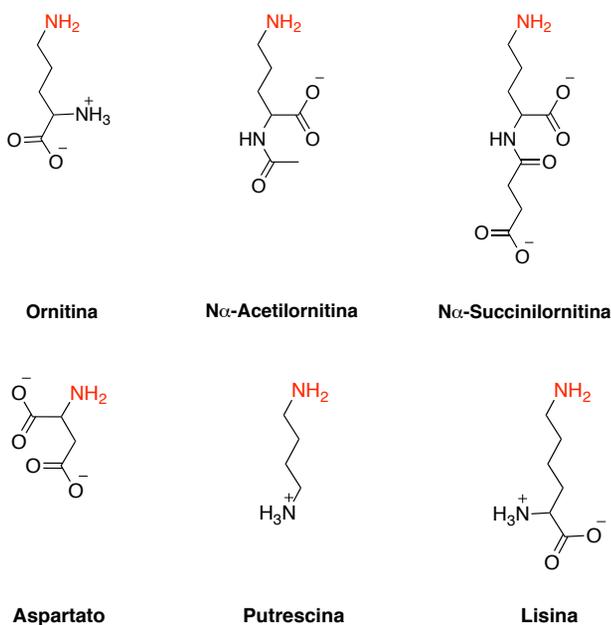


Figura 6. Aminas que han sido identificadas como sustrato de diferentes transcarbamilasas.

En rojo se muestra el grupo amino que sufre la modificación, no mostrándose cargado ya que ésta es la forma en la que reacciona.

A través de las transcarbamilasas, el carbamifosfato está involucrado en vías anabólicas, en las que se da lugar a la formación de moléculas orgánicas fundamentales para todas las formas de vida, como las pirimidinas y la arginina (Jones, 1963), y en vías catabólicas, como el catabolismo de

arginina (Barcelona-Andres y cols., 2002), agmatina (Roon y Barker, 1972) y oxalurato (Bojanowski y cols., 1964). Hasta el momento, sólo la OTC ha sido descrita participando en vías catabólicas y anabólicas, como veremos más adelante. Además, la OTC es la única transcarbamilasa catabólica que ha sido estudiada en detalle.

A partir de este punto cuando nos refiramos a transcarbamilasas, nos referiremos a las N-transcarbamilasas, específicamente a aquellas que carbamilan un sustrato con un grupo amino libre.

2.3 La ATC como modelo estructural

La aspartato transcarbamilasa resultó una proteína con un interés especial debido a sus propiedades alostéricas (Gerhart y Pardee, 1964; Jacobson y Stark, 1973), lo que puso un foco especial en el estudio de sus características estructurales. Se observó una cooperatividad positiva entre los sustratos, una inhibición por CTP y una activación por ATP (Gerhart y Pardee, 1962). La enzima de *E. coli* exhibía un peso molecular de ~320 kDa, con seis cadenas catalíticas y otras seis cadenas reguladoras (Figura 7) de ~35 y ~20 kDa cada una (Weber, 1968a, b; Rosenbusch y Weber, 1971).

Se determinaron dos formas conformacionales diferentes (Gerhart y Schachman, 1968), llamados estado T (apretado, Tight, de menor actividad) y estado R (relajado, Relaxed, de alta afinidad). Por medio de la difracción de rayos X, se determinó la estructura cristalina a 2,8 Å de resolución del estado T formando un complejo con CTP (Monaco y cols., 1978) y, más tarde, la del

estado R estabilizado por el inhibidor N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA, que veremos más adelante), a 3,5 Å de resolución (Ladner y cols., 1982).

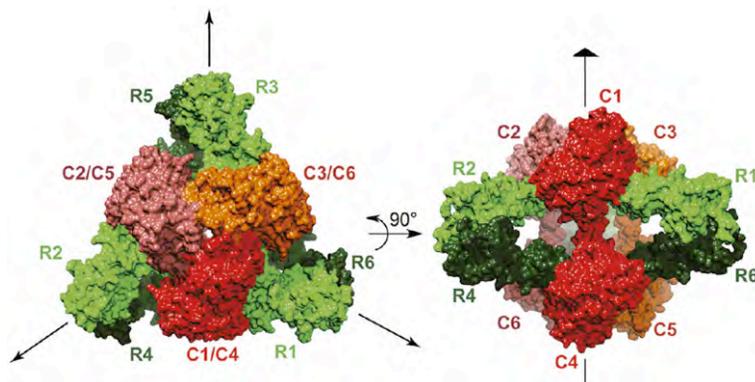


Figura 7. Representación esquemática de la estructura cuaternaria de ATC de *E. coli*. Las cadenas catalíticas C1-C2-C3 y C4-C5-C6 corresponden a los trímeros, mientras que los dímeros de cadenas regulatorias han sido denominados R1-R2, R3-R4 y R5-R6. En el panel izquierdo se muestran los tres ejes binarios y en el de la derecha el eje terciario. Tomado de Lipscomb y Kantrowitz (2012).

Los conocimientos tempranos de la estructura de ATC facilitaron el estudio del mecanismo enzimático de transcarbamilación y posteriormente suministraron un acercamiento al conocimiento sobre la estructura de otras transcarbamilasas, en un principio como base para el modelado, como en el caso de la OTC (Tuchman y cols., 1995) o, cuando las estructuras cristalinas estuvieron disponibles, para realizar comparaciones entre las diferentes proteínas (Ha y cols., 1997; Shi y cols., 2000).

En esta tesis nos hemos valido de algunos conocimientos generados a partir de la estructura de la ATC de *E. coli* (Roberts y cols., 1976; Stebbins y cols., 1992) como referencia para discutir aspectos de la PTC, particularmente en el contexto de su del mecanismo catalítico .

2.4 OTCs anabólicas y catabólicas

Se han caracterizado OTCs involucradas en vías anabólicas (biosíntesis de arginina) y catabólicas (degradación de arginina), que explotan los dos sentidos de la reacción catalizada por esta enzima (Cunin y cols., 1986). En la biosíntesis de arginina la OTC cataliza la transferencia del grupo carbamilo del carbamilfosfato al grupo δ -amino de ornitina, formando citrulina que es un precursor de la arginina y, en los animales, de la urea. En la vía catabólica ADI, esta enzima media la reacción en el sentido termodinámicamente menos favorecido, es decir, la fosforólisis de la citrulina, produciendo ornitina y carbamilfosfato. Algunos organismos utilizan ambas funciones, aunque tienen proteínas diferentes para cada una de ellas (Stalon y cols., 1967; Laishley y Bernlohr, 1968; Legrain y cols., 1977). Por ejemplo, en *P. aeruginosa* se han caracterizado dos OTCs, una involucrada en la biosíntesis de arginina y la otra implicada en la degradación de este aminoácido (Ramos y cols., 1967; Stalon y cols., 1967). Estas enzimas generalmente difieren en sus pesos moleculares nativos, en sus termoestabilidades, propiedades cinéticas y pH óptimos.

De hecho, en contraste con las OTCs anabólicas, generalmente triméricas (Legrain y cols., 1977), las OTCs catabólicas usualmente muestran una mayor diversidad estructural (Legrain y cols., 1977; Falmagne y cols., 1985), como las OTCs de *E. faecalis* y de *L. hilgardii*, hexaméricas en solución (Nakamura y Jones, 1970; de Las Rivas y cols., 2007) y la *P. aeruginosa*, que es dodecamérica (Villerety cols, 1995).

Hay que mencionar que existen microorganismos que poseen genes para diferentes OTCs anabólicas, como es el caso de *E. coli* y *Canavalia lineata* (Van Vliet y cols., 1984; Lee y cols., 2001). Existen evidencias que indican que los dos genes de OTCs de *E. coli*, *argI* y *argF*, podrían haber divergido a partir de uno de ellos (*argI*) por un mecanismo que incluiría dos elementos IS1 flanqueando a *argF* (Van Vliet y cols., 1984). Sin embargo, el grado de homología entre *argF* y *argI* no excluye que la divergencia haya ocurrido en una de las ramas que ha llevado a producir las *E. coli* actuales, con posibles transferencias posteriores entre cepas (Van Vliet y cols., 1984).

Por otro lado, una de las dos OTCs del genoma de *C. lineata* es capaz de catalizar la carbamilación de canalina, un aminoácido no proteinogénico (Lee y Kwon, 2000; Lee y cols., 2001). La existencia de esa reacción secundaria conlleva una pérdida de dos ordenes de magnitud en la actividad con ornitina respecto a la de la otra OTC, y ha sido relacionada con una serie de mutaciones en el motivo STRT, de unión a CP (Lee y cols., 2001).

2.5 La estructura de las transcarbamilasas y el uso de inhibidores específicos

Algunos inhibidores análogos de los sustratos o de los estados de transición de las transcarbamilasas han desempeñado un papel central en la comprensión de la unión de los sustratos y los cambios conformacionales de las transcarbamilasas. Tal es el caso del N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA, Figura 8), un derivado fosfónico no hidrolizable del aspartato que fue descrito como un potente análogo del estado de transición de la ATC (Collins y Stark,

1971; Swyryd y cols., 1974; Mori y cols., 1977), y que posteriormente fue utilizado como ligando de la enzima para obtener la estructura cristalina y describir algunos de sus cambios conformacionales que acompañan a la unión de los sustratos (Ke y cols., 1988).

La estructura de OTC ha sido obtenida en presencia de inhibidores, como la N δ -fosfonoacetil-L-ornitina [PALO, Figura 8, (Penninckx y Gigot, 1978; Ha y cols., 1997)] y la norvalina (Shi y cols., 2001), un análogo de la ornitina carente del grupo δ -amino. También se ha descrito como inhibidor bisustrato de la N α -acetil-L-ornitina transcarbamilasa el derivado acetilado de PALO, N α -acetil-N δ -fosfonoacetil-L-ornitina [PALAO, Figura 8, (Morizono y cols., 2006)], que ha sido recientemente descrito en complejo con la enzima (Li y cols., 2010). Si bien un derivado fosfonoacetilado de putrescina (PAPU, Figura 8A) había sido previamente sintetizado (Penninckx y Gigot, 1978), hasta el momento de comenzar este trabajo no se había publicado ningún estudio de inhibición de PTC utilizando este compuesto, lo que nos llevó a sintetizar dicho análogo y realizar los estudios de inhibición correspondientes, como así también a utilizarlo en los experimentos de cristalización de la proteína, lo que nos ha permitido describir los motivos y movimientos relacionados con la unión de los sustratos, como presentaremos en esta tesis.

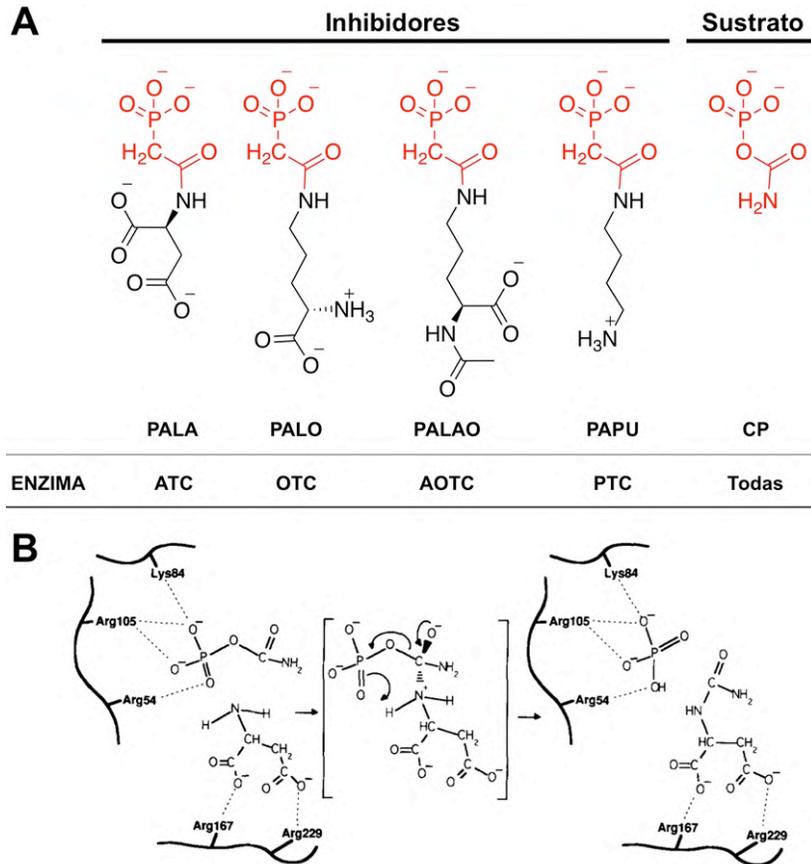


Figura 8. Los inhibidores bisustrato de las transcarbamilasas y esquema del mecanismo catalítico.

(A) Se comparan los inhibidores bisustratos descritos para las transcarbamilasas. En rojo se muestra el grupo fosfonoacetilo, que no puede ser hidrolizado y que es similar al CP (también en rojo y a la derecha). (B) Esquema de la reacción catalizada por la ATC, aunque se supone similar para todas las transcarbamilasas. La numeración de los residuos corresponde a la enzima de *E. coli*. Tomado de Stebbins y cols. (1992)

Las estructuras de las transcarbamilasas, ATC y OTC (Sankaranarayanan y cols., 2008; Lipscomb y Kantrowitz, 2012), formando complejos con los inhibidores análogos bisustrato han favorecido la propuesta de un mecanismo de la reacción de transcarbamilación. En este mecanismo, una amina no cargada ataca al átomo de carbono del CP mientras que el grupo fosfato del CP está en estado dianiónico (Stebbins y cols., 1992) (Figura 8B),

permitiendo, a través de uno de sus átomos de oxígeno negativamente cargados, coordinar y posteriormente abstraer uno de los protones unidos a la amina atacante. El resultado es la aparición de un intermediario inestable que contiene un carbono tetrahédrico, con cuatro enlaces fuertemente polarizados, que colapsa en la formación de un ion fosfato libre y la amina carbamílada. Este mecanismo implica un papel central para la arginina del motivo SxRT, presente en el sitio de unión a CP de todas las transcarbamilasas, con (Stebbins y cols., 1992). En el presente trabajo, valiéndonos de la información obtenida a partir de otras transcarbamilasas y de las estructuras aquí propondremos que este mecanismo es también válido para la PTC.

2.5.1 El trímero como unidad biológica básica de las transcarbamilasas

Hasta el momento en todas las transcarbamilasas cuya estructura ha sido descrita, un homotrímero característico constituye la forma oligomérica básica (Figura 9), aunque algunas de ellas forman oligómeros mayores a partir de estos trímeros. Ejemplo de estos oligómeros mayores son algunas ATCs y OTCs (Ke y cols., 1984; de Las Rivas y cols., 2009), que forman hexámeros por dimerización de los trímeros básicos (además, algunas ATCs tiene seis cadenas reguladoras), y las OTCs de *P. aeruginosa* y *Pyrococcus furiosus*, en las que los trímeros se asocian formando dodecámeros (Villeret y cols., 1995; Villeret y cols., 1998).

El trímero es esencial para la actividad enzimática, como se demostró utilizando híbridos de protómeros activos e inactivos de ATC (Robey y

Schachman, 1985). Los trímeros tienen forma de cáliz, con una cara cóncava, donde residen los sitios activos (Figura 10), y una cara convexa (Jin y cols., 1997).

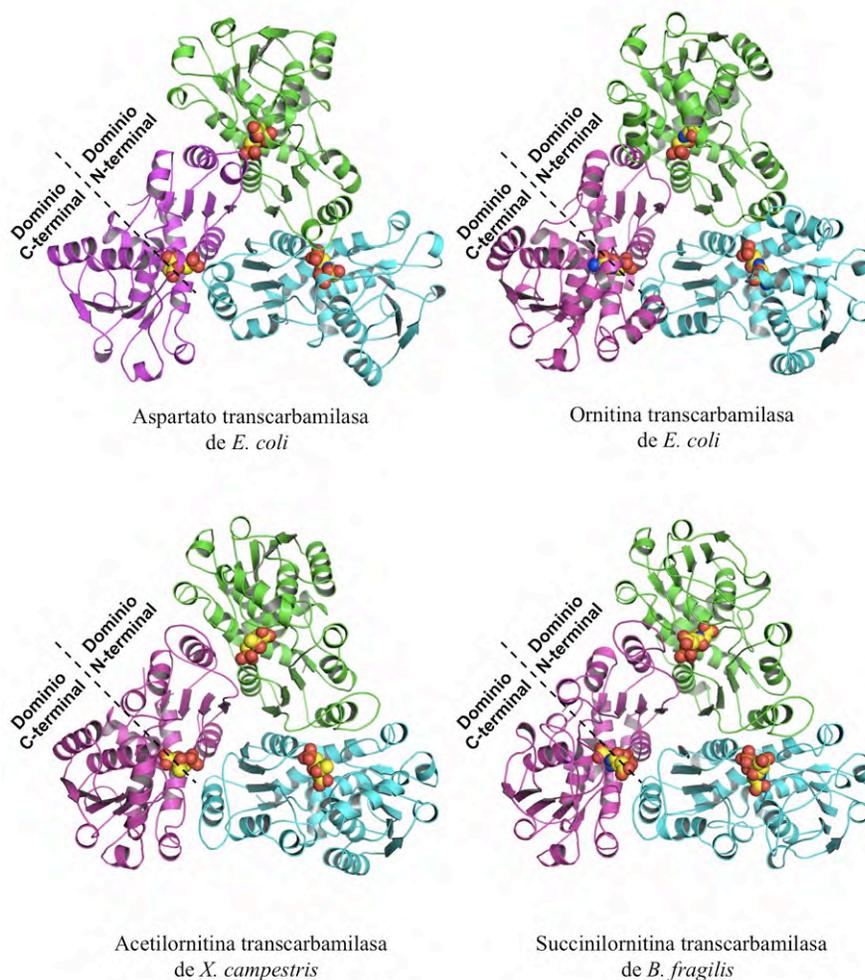


Figura 9. Estructura del trímero básico de las transcarbamilasas.

Se muestra en cintas el trímero catalítico básico de ATC de *E. coli* con PALA (PDB: 1EKX), la OTC de *E. coli* con PALO (PDB: 2OTC), la AOTC de *X. campestris* con PALAO (PDB: 3M4J) y la SOTC con succinil-norvalina y sulfato (PDB: 2FG7). Los ligandos han sido representados en esferas, con los átomos de carbono de color amarillo. La vista es desde la cara cóncava a través del eje 3 del trímero. En el protómero coloreado en magenta se señalan los dominios N- y C-terminal, también llamados en ATC polar y ecuatorial.

Al mirar hacia el interior de la cavidad podemos encontrar los dominios N-terminales, que están ubicados al centro y al fondo (Figura 9), mientras que los C-terminales forman protuberancias alejadas del centro y más cercanas al observador (Jin y cols., 1997).

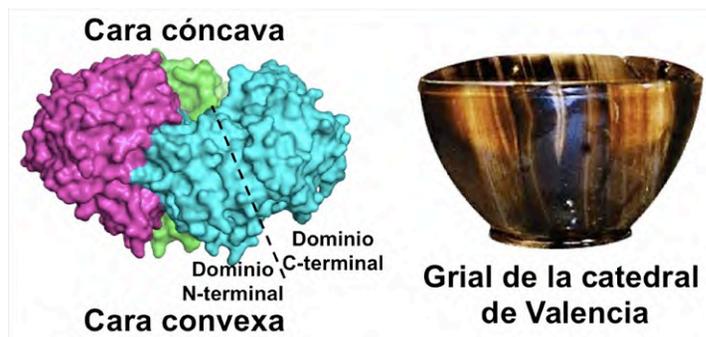


Figura 10. El trímero de las transcarbamilasas tiene forma de cáliz. Se muestra en superficie el trímero de OTC de *E. coli* con PALO (PDB: 2OTC) con cada uno de los protómeros de un color diferente con una orientación en la que el eje 3 está vertical y paralelo a la página. A la derecha, el grial de la catedral de Valencia, para ilustrar la similitud con un cáliz. En el protómero de color cian se señalan los dominios N- y C-terminales.

A nivel estructural es posible identificar la razón por la que el trímero es la unidad oligomérica básica de las transcarbamilasas, observando que algunos residuos de uno de los protómeros están en contacto con uno o ambos sustratos unidos al centro activo de un protómero vecino (Ke y cols., 1984; Villeret y cols., 1995; Ha y cols., 1997; Shi y cols., 2006a; Shi y cols., 2006b). Si bien previamente se había identificado que la PTC es trimérica en solución (Wargnies y cols., 1979), en esta tesis mostraremos la estructura de los trímeros y las comparaciones con los de otras transcarbamilasas, donde describiremos diferencias en el área de interacción entre las subunidades debidas a la presencia de un elemento estructural específico de la PTC.

Previamente, se reportó que la OTC de hígado de rata es capaz de unir cadmio (Aoki y cols., 1988). Este hallazgo hace especialmente interesante la observación posterior de un átomo de níquel en una posición específica del eje 3 del trímero de algunas OTCs catabólicas, como las de *Lactobacillus hilgardii* y *Giardia lamblia* (de Las Rivas y cols., 2009; Galkin y cols., 2009), abriendo la puerta al estudio de éste como un posible sitio de unión a metales de transición divalentes en las transcarbamilasas. En nuestras estructuras, la PTC también une un átomo de níquel en el eje terciario formado por los protómeros del trímero (como se mostrará en esta tesis).

2.5.2 El protómero de las transcarbamilasas

Cada uno de los protómeros que componen los trímeros de las transcarbamilasas está formado de dos dominios muy similares (Figura 11), que posiblemente han sido producto de la duplicación de un gen ancestral (Labedan y cols., 1999). Ambos dominios tienen un plegamiento de tipo Rossmann, con emparedados $\alpha/\beta/\alpha$, con una hoja- β rodeada por hélices- α (Ke y cols., 1984; Villeret y cols., 1995; Ha y cols., 1997; Shi y cols., 2006a; Shi y cols., 2006b). Los dos dominios están conectados por dos hélices, una de las cuales está aproximadamente a mitad de la secuencia aminoacídica y la otra al final.

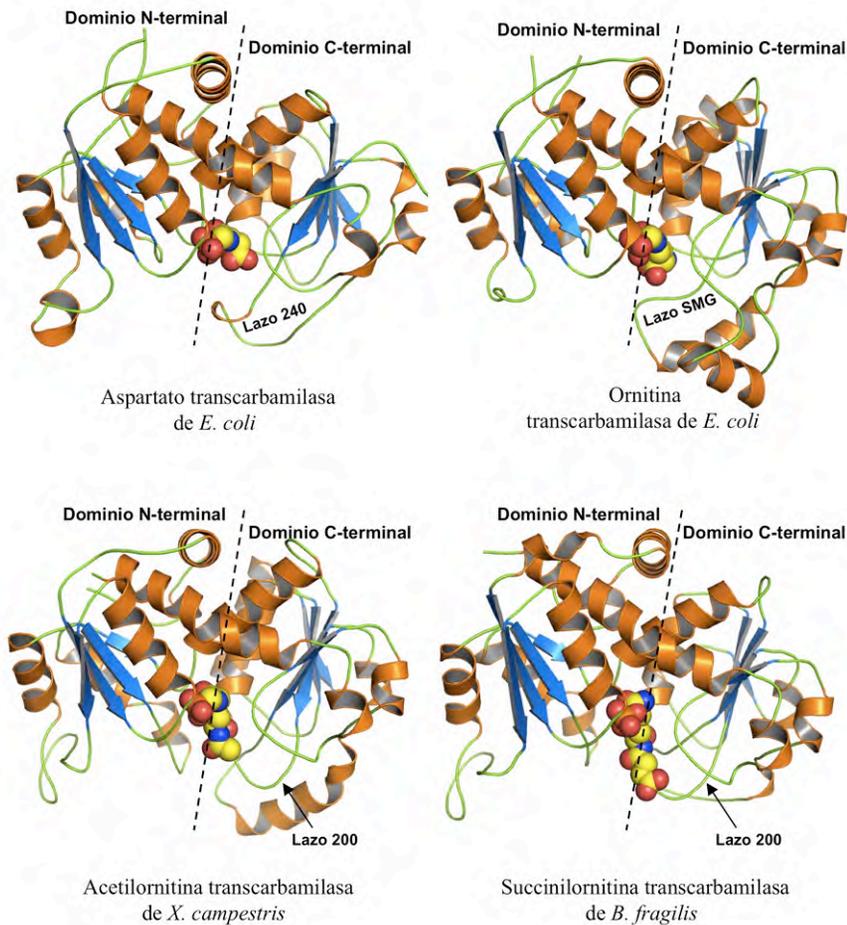


Figura 11. El protómero de las transcarbamilasas.

Se muestra en cintas el protómero de ATC de *E. coli* con PALA (PDB: 1EKX), OTC de *E. coli* con PALO (PDB: 2OTC), AOTC de *X. campestris* con PALAO (PDB: 3M4J) y SOTC de *Bacteroides fragilis* con succinilnorlvalina y sulfato (PDB: 2FG7). El eje 3 está vertical y es paralelo a la página. La cara cóncava del trímero mira hacia abajo. Se señalan los dominios N- y C-terminales, y los lazos del dominio C-terminal que cierran el sitio activo. Las hélices, los lazos y las láminas- β están coloreados respectivamente en anaranjado, verde y azul. Los ligandos han sido representados en esferas, con los átomos de carbono de color amarillo.

El dominio N-terminal se encuentra más cerca del eje 3 del trímero y es el que aporta la mayor proporción de residuos al sitio de unión del carbamilsulfato. También ha sido denominado “dominio polar” por su posición en el hexámero de ATC de *E. coli* (Ke y cols., 1988). Este dominio

es además el responsable de la mayor parte de los contactos entre subunidades dentro del trímero. El dominio C-terminal está ubicado más alejado del eje 3 del trímero y aporta la mayor cantidad de residuos al sitio de unión del sustrato a carbamilar. En ATC se denomina dominio ecuatorial por su posición en el hexámero (Ke y cols., 1988). En el hiato entre ambos dominios se encuentra ubicado el centro activo (Figura 11).

En la secuencia aminoacídica del dominio N-terminal es posible reconocer una secuencia de unión a grupos fosforilo (Sachsenheimer y Schulz, 1977), que consiste en un aminoácido que contiene en su cadena lateral un grupo hidroxilo, que en el caso de PTC es serina, separado por un aminoácido de otro cargado positivamente, que en PTC corresponde a una arginina (Houghton y cols., 1984). La secuencia completa estaría conservada en la mayoría de las transcarbamilasas, denominándose motivo SxRT (Houghton y cols., 1984). Además, como ya se ha dicho, se ha demostrado que estos residuos están involucrados en la unión del carbamilfosfato y la catálisis (Kuo y cols., 1988; Stebbins y cols., 1989; Xu y Kantrowitz, 1989, 1991; Stebbins y cols., 1992), conformando un motivo con el que es posible reconocer las transcarbamilasas a partir de su secuencia (Houghton y cols., 1984).

El dominio C-terminal es el que determina la especificidad para el sustrato que se carbamila. Esto fue demostrado haciendo quimeras entre ATC y OTC, en los que se combinó el dominio N-terminal de una OTC con el dominio C-terminal de una ATC y se consiguió el cambio en la especificidad de sustrato (Wild y Wales, 1990). Además, en el dominio C-terminal de las OTC y ATC se ha identificado un lazo que está especialmente involucrado en

la especificidad y al que en la primera se ha denominado lazo SMG (Ha y cols., 1997) y en la segunda lazo 240 (Yuan y cols., 1996), respectivamente (señalados en la Figura 11). Este lazo tiene una secuencia específica, característica de la enzima, siendo ésta DxxxSMG en las OTCs y RxQxER en las ATCs. Cierra el sitio activo tras la unión de los sustratos y con frecuencia está desordenado en las estructuras sin ligandos (Yuan y cols., 1996; Ha y cols., 1997).

En AOTC y SOTC, transcarbamilasas que usan acetilornitina y succinilornitina respectivamente, el dominio C-terminal incluye un nudo interno (Figura 12), que involucra un lazo que contacta al centro activo, llamado lazo 200, y que es más largo que el lazo equivalente de las otras transcarbamilasas (Virnau y cols., 2006). Este tipo de plegamiento anudado ha sido relacionado con una mayor estabilidad en la estructura de las proteínas (Sulkowska y cols., 2008).

Previamente se ha descrito con las transcarbamilasas para aspartato, ornitina y succinilornitina cambios conformacionales asociados a la unión de los sustratos (Ha y cols., 1997; Jin y cols., 1999; Shi y cols., 2006a). En el caso de la ATC de *E. coli*, que ha sido estudiada estructuralmente en detalle, y para la que, como en el caso de la PTC (ver más adelante), el mecanismo es secuencial ordenado con el CP uniéndose en primer lugar, se ha establecido que la unión del CP produce cambios en los lazos del centro activo que conllevan una alteración en el potencial del mismo que le confieren carácter positivo, pudiendo aceptar la unión del aspartato (Wang y cols., 2005). Ello conlleva entonces un movimiento del lazo 240 del dominio ecuatorial que

tiene como consecuencia un cambio en la relación entre ambos dominios de la subunidad catalítica. Para cuantificar los cambios en las posiciones relativas de estos dominios se han utilizado los centros geográficos de ambos dominios, alrededor de un vértice establecido en el $C\alpha$ del residuo ecuatorial frente al polar. Así, la unión del aspartato conlleva un decremento estimado de hasta 13° en dicho ángulo (Endrizzi y cols., 2000). Valores en un rango entre 3° y 6° se han descrito con mayor frecuencia y en relación a la unión de ambos sustratos o análogos de los mismos en esta y otras transcarbamilasas (Krause y cols., 1985; Ha y cols., 1997; Endrizzi y cols., 2000; Shi y cols., 2006a).

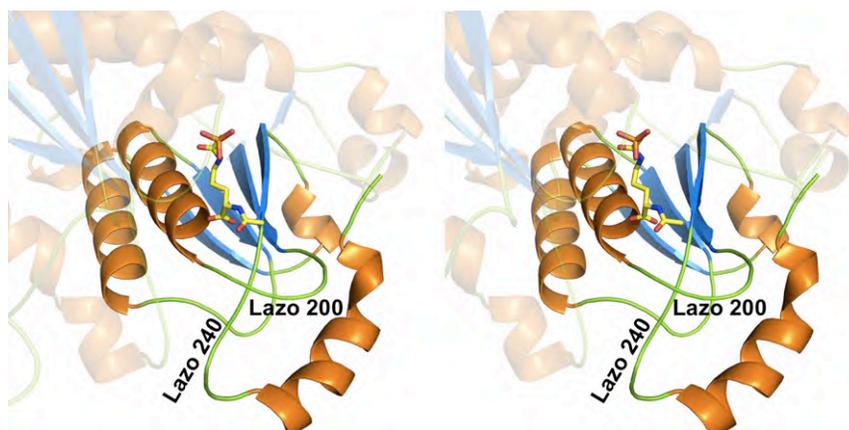


Figura 12. El nudo encontrado en la estructura de AOTC.

Vistas estéreo de las estructuras involucradas en la formación del nudo de AOTC de *X. campestris* con PALAO (panel superior, PDB: 3M4J). Se señalan los lazos del dominio C-terminal más importantes en la formación del mencionado nudo. El resto del protómero se muestra en semitransparencia. Las hélices, los lazos y las láminas están coloreados respectivamente en anaranjado, verde y azul. El ligando ha sido representado en palillos, con los átomos de carbono de color amarillo.

En el presente trabajo de tesis se caracterizan, haciendo uso de las distintas estructuras cristalinas de la PTC, los cambios conformacionales asociados a la unión de inhibidores análogos bisustrato.

2.6 La putrescina transcarbamilasa es una proteína poco caracterizada pero de conocimiento antiguo

Como se describió previamente, la actividad de PTC fue parcialmente purificada por primera vez a partir de extractos de células de *E. faecalis* crecidas en presencia de agmatina (Roon y Barker, 1972), antes de ser purificada y caracterizada bioquímicamente a partir de extractos celulares del mismo microorganismo (Wargnies y cols., 1979).

En esta tesis estudiamos la enzima putrescina transcarbamilasa (PTC), de la cual, hasta el momento de comenzar esta tesis, no existía más información estructural que su estado oligomérico en solución (Wargnies y cols., 1979). En el estudio de Wargnies con la PTC de *E. faecalis* purificada, se estableció que tenía un peso molecular de ~140 kDa, infiriendo que podría ser trimérica, a diferencia de la OTC de *E. faecalis*, cuyo peso molecular había sido determinado previamente como de 260 kDa, indicando un oligómero muy superior, posiblemente un hexámero (Marshall y Cohen, 1972a). También se concluyó en aquel estudio, que el orden de unión de los sustratos debía ser al azar, con una preferencia por unir primero el carbamifosfato cuando la concentración de los sustratos es cercana al valor de su K_m (Wargnies y cols., 1979). Además, se presentaron evidencias que mostraban que esta enzima no era completamente específica para putrescina, sino que podía catalizar la reacción de transcarbamilación de otras diaminas, como cadaverina, ornitina, espermidina y espermina, si bien no se utilizaron controles suficientes que demostraran concluyentemente que la actividad con los sustratos alternativos

se debía a contaminaciones bien por otras enzimas o por trazas de putrescina en los otros sustratos examinados.

En el presente trabajo profundizamos principalmente en el conocimiento estructural sobre la PTC. Teniendo en cuenta que la OTC es una enzima específica para su sustrato (Burnett y Cohen, 1957), la falta de especificidad de PTC reportada previamente nos indujo a corroborar taxativamente esta interesante característica y, a partir de ello, a estudiar los elementos estructurales determinantes de la especificidad entre OTCs y PTCs.

Por otro lado, Naumoff y cols. (2004) propusieron a partir de la secuencia N-terminal de la PTC publicada previamente (Tricot y cols., 1989), la primera identificación del gen de la PTC entre algunos marcos de lectura anotados erróneamente como OTCs. Los genomas en los que realizaron dicha identificación fueron los de *E. faecalis*, *Lc. lactis*, *S. mutans*, *P. pentosaceus*, *Lb. brevis*, *Lb. sakei*, *L. monocytogenes* y *Mycoplasma mycoides*. También propusieron una anotación de los genes que estaban en el contexto, llegando a aventurar la identificación de un gen para una agmatina deiminasa y para una carbamato quinasa en muchos de estos genomas (Naumoff y cols., 2004a).

Tanto la identificación de Griswold y cols. (2004), como la de Naumoff y cols. (2004), no constituían evidencias directas de que estos genes propuestos codificaran para proteínas con las actividades esperadas. Ésta ha sido una aportación de nuestro laboratorio, en el que hemos clonado los genes para AgDI y PTC, expresándolos en un huésped heterólogo, y purificando sus productos génicos e incluso cristalizándolos y determinado sus estructuras [(Llácer y cols., 2007) y esta tesis].

3. De qué trata esta tesis

El laboratorio donde he desarrollado esta tesis identificó el gen la carbamato quinasa de la vía ADI de *E. faecalis* y caracterizó la enzima estructuralmente (Marina y cols., 1998), tras lo que se embarcaron en la identificación de los genes que forman el operón ADI en *E. faecalis* (Barcelona-Andres y cols., 2002), el esclarecimiento de su regulación y el establecimiento de los posibles genes para dos reguladores transcripcionales de la vía.

Con la determinación de la secuencia del genoma de *E. faecalis* (Paulsen y cols., 2003) se facilitó la identificación automática de sus genes a partir de su secuencia, muchos de los cuales fueron erróneamente anotados, como el gen para la PTC. Las similitudes entre las vías ADI y AgDI, junto con los conocimientos generados previamente en el laboratorio sobre la vía ADI y sus componentes, abrieron las puertas al estudio de las enzimas de la posible vía AgDI identificada en el genoma de *E. faecalis*.

Si bien en el momento de comenzar este trabajo había una gran cantidad de información concerniente a las transcarbamilasas clásicas, ATC y OTC, había muy poca información disponible respecto a PTC, que se limitaba a información bioquímica y a la propuesta de la identificación de su gen (Wargnies y cols., 1979; Griswold y cols., 2004; Naumoff y cols., 2004a).

Teniendo en cuenta que la demostración definitiva para atribuir una función específica a un gen es su clonación, expresión y la purificación y caracterización de su producto génico y esto no había sido publicado para ninguno de los genes de la vía AgDI, nos embarcamos en este proyecto

buscando identificar y caracterizar inequívocamente las enzimas que componían esta vía y luego caracterizarlas estructuralmente, siguiendo una estrategia en paralelo, en la que mientras otros miembros del laboratorio estudiaban la enzima AgDI, yo me centré en el estudio de la PTC.

Objetivos

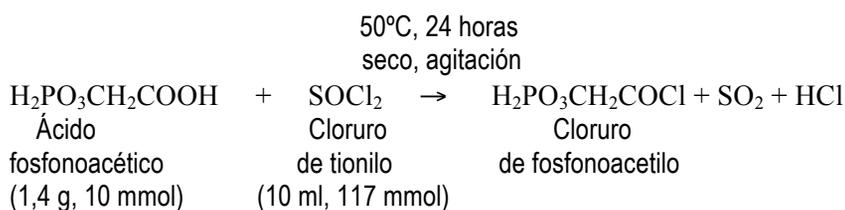
1. Corroborar bioquímicamente que la proteína codificada por el gen *EF0732* del genoma de *E. faecalis* es la PTC.
2. Determinar inequívocamente si la PTC es capaz de utilizar ornitina como sustrato.
3. Determinar y caracterizar la estructura cristalina de la PTC unida a sustratos o análogos de los sustratos como base para aclarar estructuralmente su especificidad de sustrato y para inferir su mecanismo catalítico.
4. Corroborar las bases de la especificidad mediante ingeniería de proteínas y estudios funcionales y estructurales.
5. Comprobar aspectos del mecanismo mediante pruebas experimentales basadas en mutagénesis dirigida y estudios funcionales.
6. Tratar de explotar la información estructural para cambiar la especificidad de la PTC para que prefiera usar otro sustrato carbamizable.
7. Corroborar la función de una hélice C-terminal única entre las transcarbamiasas mediante su delección y estudios funcionales y estructurales de la proteína truncada.
8. Dilucidar estructuralmente el mecanismo de cura por guanidinio de una forma mutante del motivo STRT.
9. Determinar la estructura de la PTC sin sustratos o análogos de los sustratos e inferir los cambios conformacionales asociados a la unión de los sustratos.

Metodología

1. Preparación de fosfonoacetilputrescina (PAPU)

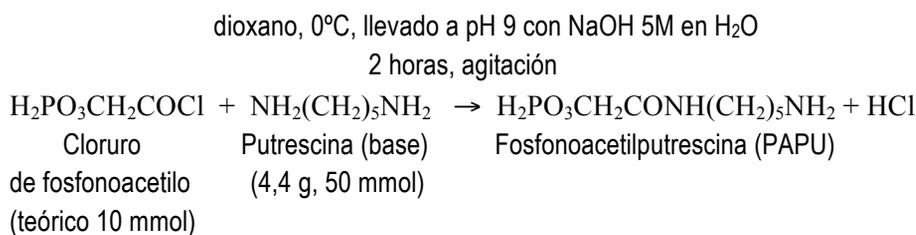
Se esquematizan los pasos de esta síntesis, que es una modificación de la descripción de Penninckx y Gigot (1978) utilizando cloruro de tionilo para producir el cloruro de ácido.:

Paso 1) Síntesis de cloruro de fosfonoacetilo (Swyryd y cols., 1974)



Paso 2) Aislamiento de cloruro de fosfonoacetilo: Evaporación exceso de tionilo, SO₂ y HCl (76°C). El cloruro de fosfoacetilo se aísla como una sustancia oleosa.

Paso 3) Síntesis de fosfonoacetilputrescina



El PAPU precipita y se recoge por filtración (filtro Whatman) y lavado con dioxano seco.

Paso 4) Eliminación de putrescina y Na⁺. Columna (2,3x20 cm) de Dowex 50W-X8, malla 200-400, forma H⁺ (temperatura ambiente). Se aplicó la muestra disuelta en 70 ml de agua y se recogió el efluente más el eluido con

agua (1 volumen de columna). Evaporación del agua y del HCl (rotavapor, 65°C).

Paso 5) Purificación de la fosfonoacetilputrescina. Se disolvió el polvo en 3 ml de agua, llevando el pH a 8 con Tris base. La solución se aplicó a una columna (1,5x25 cm) de AG1-X8 de malla 200-400, forma Cl⁻, equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 8, seguida de lavado con 1 volumen de columna del mismo tampón, y aplicación de un gradiente lineal de 500 ml entre 0 y 1 M NaCl en el mismo tampón, recogiendo fracciones de 2 ml, ensayando en cada fracción la presencia de grupos amino libres y de fosfato total mediante las reacciones de la ninhidrina (Spies, 1957) y de Fiske-Subbarow (Leloir y Cardini, 1957), esta última tras digestión en ácido sulfúrico. Usando soluciones de fosfoetanolamina y de fosfato como patrones respectivos.

Las fracciones correspondientes a concentraciones de NaCl de 30-60 mM presentaron reactividades molares aproximadamente equivalentes para ninhidrina y para fosfato, como cabía esperar si contuvieran PAPU. Se confirmó la presencia y el contenido en PAPU mediante HPLC de fase reversa tras derivatización de amina libre con o-ftaldialdehido (OPA) y detección fluorescente (Alonso y Rubio, 1985). Tras la mezcla de volúmenes iguales de solución de la fracción adecuadamente diluida en agua (generalmente 1:10) y de solución de OPA (preparada disolviendo 50 mg de OPA en 1,25 ml de metanol, adición de 0,05 ml de β-mercaptoetanol y de 11,2 ml de tampón borato sódico 0,4 M, pH 9,5; guardada en oscuridad 24 horas pre-uso), se inyectó la mezcla 2 min después a una columna HPLC Resolve C-18 (5 μm, 3,9 × 150 mm; de Waters) equilibrada con solución A (2% de metanol y 2%

de tetrahidrofurano en 50 mM de acetato sódico, 50 mM de fosfato dibásico de sodio, llevada a pH 7,5 con ácido acético), por la que se pasaba dicha solución a 1,5 ml/min. Tras 1 min se inició un gradiente con un ascenso hasta 45% de solución B (65:35 metanol:agua) de 4 min, seguido del ascenso indicado en la Fig X en 20 min hasta 100% de B, manteniendo dicha concentración durante 3,5 min adicionales. La detección fue fluorescente (excitación 338 nm, emisión 425 nm), usando como estándar fosfoetanolamina. Este último patrón salió a los 11,5 min y las fracciones en las que se esperaba la presencia de PAPU dieron un pico único a los 14,1 min, que correspondió en equivalencia a fosfoetanolamina a la cantidad esperada a partir de los ensayos de determinación de fosfato (Figura 13). En consecuencia, se consiguió una solución final de 4,6 mM PAPU en Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 50 M. Se corroboró la resonancia exclusiva del grupo fosfonato mediante NMR para ^{31}P (11 horas de acumulación en un espectrómetro Varian Gemini a 300 MHz con sonda de ^{31}P , realizado por el Dr. Miguel Cantín en el ITQ-CSIC, Valencia) y espectrometría de masas por el procedimiento de MALDI-TOF/TOF (CIPF, Valencia) que arrojó un valor de 212,05 Da, en buen acuerdo con la masa esperada de 211,2 Da (resultados no mostrados).

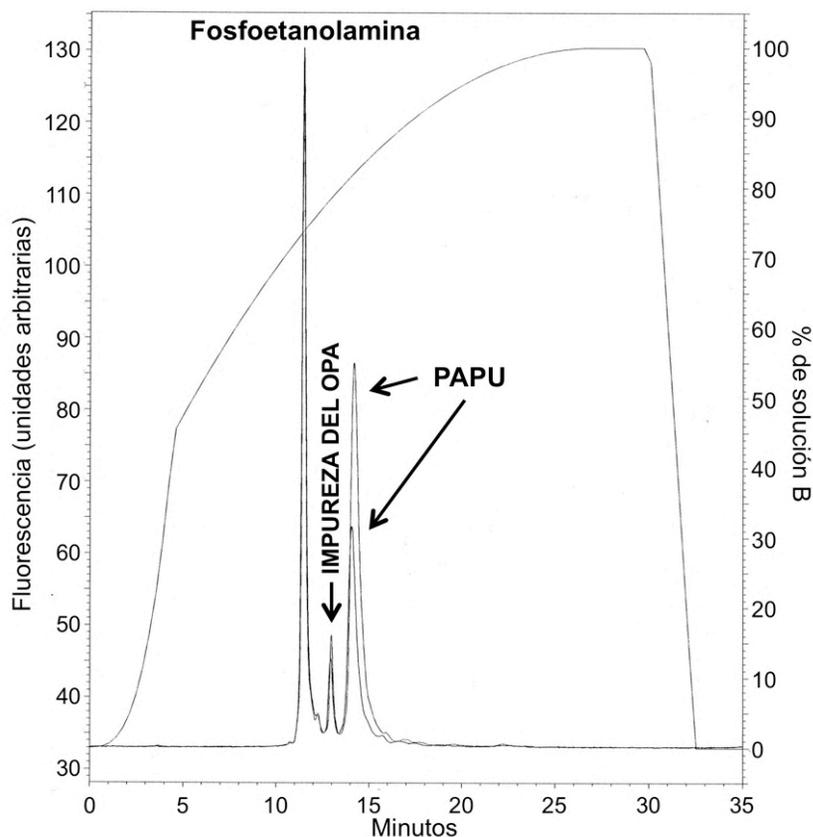


Figura 13. Investigación de la pureza del PAPU mediante HPLC-OPA. Se superponen dos inyecciones, ambas con un mismo patrón de fosfoetanolamina (primer pico) mezclado en un caso con 5 μ l y en otro con 10 μ l de una dilución 1:10 de la solución final de PAPU (picos de diferente altura en la misma posición). La línea más fina representa el gradiente de 0 a 100% de solución B aplicado. Para más detalles, ver el texto.

2. Clonación de genes y mutagénesis dirigida.

2.1 Clonación.

Aunque el gen completo de la PTC se clonó poco antes de mi llegada al laboratorio, por el Dr. Benito Alarcón, para facilitar la comprensión resumiré el procedimiento, que ha sido publicado (Llácer y cols., 2007).

Se amplificó mediante PCR el gen *agcB* de *Enterococcus faecalis* SD10 (Slade y Slamp, 1952; Barcelona-Andres y cols., 2002), equivalente al

gen *EF0732* de la cepa V583, usando como molde DNA genómico de este microorganismo (Barcelona-Andres y cols., 2002), Deep-Vent DNA polimerasa (New England Biolabs), y los oligonucleótidos 5'AGGAGGAACACCATATGAAAAGAGATTAC3' y 5'AATCAGTGG AAGCTTGGCCGTTAAATGC3' (las bases subrayadas están mutadas y las en negrita pertenecen al marco abierto de lectura), que introducen un sitio NdeI en el codón de inicio ATG y uno HindIII seis nucleótidos más abajo del codón de parada del gen *agcB*. Los productos purificados de PCR (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de GE Healthcare) se digirieron con NdeI y HindIII y se insertaron direccionalmente en los sitios correspondientes de pET-22b tras el promotor reconocido por la polimerasa de T7. Se mutó el codón de parada en el plásmido portando el gel, usando el sistema de mutagénesis dirigida de QuikChange (Stratagene), Deep-Vent polimerasa, y los oligonucleótidos 5'CAAAGCATTTCAGCGGCC AAGCTTG3' y 5'CTTGGCCGCTGAAATGCTTTGAGTG3', que reemplazan dicho codón por otro para serina e introducen una G tras el codón mutado, poniendo en marco de lectura la secuencia que codifica para la etiqueta C-terminal de His-6 SAAKLAAALEH₆. El plásmido resultante, pET-22b/PTC se usó para la sobreexpresión del enzima.

Yo sí realicé la clonación del gen para la PTC sin la hélice 13 (codones 1-317) y con la etiqueta His-6 N-terminal MHHHHHSSGVDLGTENLYFQS, mediante una estrategia no dependiente de ligasa, usando pNIC28-Bsa4 (donado por el Dr. O. Gileadi, de Oxford University, UK) (Gileadi y col., 2008). Para ello amplifiqué los codones 1-317

de *agcB* a partir de pET-22b/PTC como se ha descrito para la forma silvestre, usando el par de cebadores 5'TACTTCCAATCCATGAAAAGAG ATTACGTTAC3' y 5'TATCCACCTTTACTGtcaAGGATTTTTT GCTTCATAATC3' (los caracteres en negrilla, subrayado y en minúscula indican, respectivamente, pertenencia al marco de lectura, codón para la metionina inicial y codón de parada). El producto de PCR purificado se trató 30 min a 22°C con 90 U ml⁻¹ de T4 polimerasa (New England Biolabs) en el tampón del fabricante (10 mM Tris-HCl a pH 7,9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotretitol) de dicho enzima suplementado con 1 mg ml⁻¹ BSA y 2,5 mM dCTP, para explotar la actividad 3'-5' exonucleasa de este enzima, hasta la primera C, generando extremos colgantes de 14 bases de simple cadena. Simultáneamente se linealizó pNIC28-Bsa4 con BsaI, y, tras purificarlo (kit Illustra, ver antes), se trató del mismo modo con T4 polimerasa excepto por la sustitución del dCTP por dGTP, generando extremos colgantes complementarios a los del inserto. Tras inactivar térmicamente (20 min, 80°C) la T4 polimerasa, se mezclaron vector e inserto en proporciones respectivas (en términos de masa) entre 1:1 y 4:1, dejando la mezcla a 23°C, 30 minutos. A continuación se transformaron células de *E. coli* One Shot Top10 (Invitrogen) por choque térmico (Ausubel, 1998) (5 µl de solución de DNA a 40 µl de suspensión celular), con siembra en placas de LB agar-kanamicina (0,04 mg ml⁻¹), aislando colonias resistentes al antibiótico, en las que se corroboró la presencia y posición correcta del inserto por técnicas de PCR y confirmación definitiva mediante secuenciación.

2.2 Mutagénesis del residuo Arg-54.

Se realizó sobre el plásmido pET-22b-PTC con el sistema Quickchange (Stratagene) como se ha descrito en la sección de clonación, utilizando los cebadores parcialmente solapantes para ambas hebras, 5'AATCTTCAACTGGCACACGAGTATCTTTGAAA3' y 5'GATACTCGTGTGCCAGTTGAAGATTGTTGGAAA3' (mutación R54G) y 5'ATCTTCAACTCTGACACGAGTATCTTTGAAAC3' y 5'GATACTCGTGTCAGAGTTGAAGATTGTTGGAAA3' (mutación R54L) (las bases subrayadas son las mutadas). Esta técnica se basa en la selección del plásmido generado in vitro en forma mutada, mediante digestión con DpnI (1 U μl^{-1} , 3 h, a 37°C) del DNA metilado, presente exclusivamente en el plásmido generado in vivo. Se corroboró la existencia de las mutaciones mediante PCR específica de secuencia mutada con los cebadores 5'TCCAACAATCTTCAACTGGC3' y 5'TTCCAACAATCTTCAACTCTG3' (bases mutadas subrayadas) para R54G y R54L, respectivamente, junto con el cebador reverso común 5'GTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGTGCGGCC3', seguida en caso de resultado positivo, de secuenciación.

2.3 Mutación ²³⁰YGLY>VSMG del lazo 230

Para la mutación de la secuencia ²³⁰YGLY a la secuencia VSMG se utilizó una estrategia similar a la usada previamente, aunque debido a que la secuencia no apareante con el plásmido de partida fue mayor (12 nucleótidos) que en el caso anterior (2 nucleótidos en cada mutante), los oligonucleótidos fueron más extensos, con secuencias 5'CGGATGTTTGGGTGCCATGGGT

GAAGCGGAATTATCTGAAGAA3' y 5'AATTCCGCTTCACCCATGG
ACACCCAAACATCCGTGTACAAC3'. La presencia de la mutación fue
corroborada por secuenciación.

3. Sobreexpresión y purificación de PTC y de sus variantes

Células de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) electrotransformadas con pET-22b-PTC y seleccionadas por su resistencia a ampicilina se hicieron crecer con aireación en 500 ml de medio LB con 0,1 mg ml⁻¹ de ampicilina a 37°C, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6-0,7, induciéndose entonces la expresión de PTC con 1 mM isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG), continuando el cultivo otras 3 h, tras lo que se aislaron las células por centrifugación. Los pasos subsiguientes se realizaron a 4°C. El precipitado celular, suspendido en 10 ml de tampón de 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 M NaCl, se sonicó (15 pulsos de 15 segundos a 14 μm de amplitud, con 45 segundos de separación entre pulsos; sonicador MSE, sonda mediana), se centrifugó a 18.000 x g 30 min, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana, para jeringa, de 0,22 μm, aplicando dicho sobrenadante a una columna Ni²⁺-HisTrap FF (GE Healthcare) de 1 ml, previamente equilibrada con tampón A (50 mM Tris HCl pH 7,4, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol). La PTC se eluyó con un gradiente lineal de 20 ml entre 20 mM y 0,5 M imidazol en el mismo tampón, recogiendo fracciones de 1 ml. Las fracciones que contenían la PTC (determinado mediante SDS-PAGE en geles al 12%) se juntaron, concentrando la proteína y liberándola de sal e imidazol mediante ultrafiltración centrífuga (Amicon-Ultra 30K, de Millipore) y lavado repetido

con 50 mM Tris-HCl pH 7,5, llevándola finalmente a una concentración final ≥ 10 mg ml⁻¹. Las muestras concentradas se utilizaron inmediatamente para ensayos enzimáticos o de cristalización, añadiendo glicerol (20%) al enzima sobrante para su almacenamiento en alícuotas a -80°C.

Para las formas mutantes excepto la truncada el procedimiento de sobreexpresión y de purificación fue el mismo, excepto porque cuando la densidad del cultivo preinducción alcanzó una OD₆₀₀ de 0,6-0,7, dicho cultivo se mantuvo 45 min a 4°C sin aireación, seguido de la adición de 1% etanol (v/v) y de 0,1 mM IPTG, continuando el cultivo con aireación durante 12 horas a 15°C. El resto del proceso fue como para la forma silvestre.

En el caso de la mutante truncada tras el codón 317, fue esencial su cotransformación en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) junto con el plásmido pGroESL [derivado de pACYC184, que codifica para las chaperoninas GroES y GroEL de *E. coli* (Goloubinoff y cols., 1989), donado por A. E. Gatenby (DuPont de Nemours, Wilmington, Delaware)], con selección para ambos plásmidos mediante medio LB con 40 µg ml⁻¹ de kanamicina y 40 µg ml⁻¹ de cloranfenicol. Cuando el valor de OD fue de 0,9-1, se añadió 0,1 mM IPTG y se continuó el cultivo 12 h a 20°C. Los demás pasos fueron como para la proteína silvestre.

4. Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos de actividad se realizaron a 37°C, por duplicado, en una solución de 50 mM de Tris-HCl a pH 7, 10 mM de putrescina (a menos que se indique otra cosa), 10 mM de carbamilsulfato y con 0,1 mg ml⁻¹ de albúmina sérica bovina. En aquellos ensayos en los que la putrescina fue reemplazada

por 10 mM ornitina, el ensayo se realizó a pH 8,5. Cuando se varió la concentración de uno de los sustratos, la del otro se mantuvo constante a 10 mM, ajustándose la cantidad de enzima para que en el tiempo de la reacción no se consumiera >20% del sustrato que se encontrara en el ensayo a menor concentración. La reacción se detuvo después de 10 min añadiendo ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 7%, determinándose la carbamilputrescina o citrulina colorimetricamente a 465 nm usando una modificación (Nuzum y Snodgrass, 1976) del procedimiento de Archibald (Archibald, 1944) para grupos ureido. En esta variante se añade a cada 0,35 ml de solución de ensayo parada con TCA, 1 ml de una mezcla extemporánea 2:1 de soluciones A (0,37% de antipirina y 0,25% de sulfato amónico-férrico en 25% de H₂SO₄ al 95% y 25% de H₃PO₄ al 85%) y B (0,4% de diacetilmonoxima en NaCl al 7,5%; guardada a 4°C), agitando enérgicamente inmediatamente y calentando a continuación 15 min a 95°C seguido de atemperamiento en aire, todo ello en oscuridad, antes de determinar la absorbancia. El coeficiente de extinción molar de la carbamilputrescina en esta reacción (24.320 M⁻¹cm⁻¹) se determinó tras la conversión completa de la agmatina en carbamilputrescina usando un gran exceso de agmatina deiminasa (Llácer y cols., 2007), encontrándose que era un 25% más alto que el rendimiento de color de la citrulina. Una unidad enzimática se corresponde con la producción de 1 μmol de producto carbamilado por minuto.

Los resultados a concentraciones variables de sustratos se ajustaron a hipérbolas usando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California).

5. Cristalización y determinación de estructuras mediante difracción de rayos X

5.1 Cristalización y determinación de la estructura de PTC con PAPU

Para la cristalización del complejo PTC-PAPU se utilizó una solución de PTC de 10 mg ml⁻¹ en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, con una concentración de PAPU de 0,43 mM. Se usó el método de difusión de vapor en gota colgante con placas de 24 pocillos (1 ml de reservorio y 1+1 µl de solución de proteína y solución de reservorio), las gotas fueron depositadas sobre un cubreobjetos de 22x22 mm previamente tratado con diclorometilsilano, sellados con grasa de alto vacío sobre cada uno de los pocillos. Se realizaron pruebas de cristalización con distintos kits comerciales de Hampton Research (Crystal Screen I y II), mezclándose 1µl de la solución de cada reservorio con 1µl de la solución de proteína a 10 mg ml⁻¹. Se realizó un seguimiento de la evolución de los cristales en las gotas conteniendo la mezcla de las soluciones de proteína y del reservorio de forma periódica con una lupa a 60 aumentos, iluminando la muestra con luz fría. Tras la aparición de los primeros cristales, éstos fueron optimizados variando las concentraciones de precipitantes, por ensayos de sembrado de microcristales, por adición de aditivos, etc. Se seleccionaron las condiciones donde

aparecieron los primeros cristales y se ampliaron usando el método de las matrices expandidas basado en el procedimiento descrito por Jancarik y Kim (1991). Los mejores cristales crecieron en una semana a 21°C, hasta un tamaño en que se estabilizaron y fueron aptos para ser utilizados en los ensayos de difracción (~0,3 mm). La solución de reservorio en que se obtuvieron los cristales usados para obtener los datos de difracción finales contuvo 125 mM de sulfato amónico, 17% de polietilenglicol 3,35K (PEG, Hampton Research), y 0,1 M de tampón bis-Tris, pH 5,5.

Como paso previo a la obtención de los datos de difracción, los cristales fueron embebidos en la misma solución de cristalización enriquecida con 0,43 mM PAPU y 15% glicerol, siendo inmediatamente después congelados rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido, donde se guardaron hasta el momento de la difracción.

Los datos de difracción de rayos X se obtuvieron a 100 K, mediante radiación sincrotrón, en la línea BM16 del ESRF (Grenoble, Francia), hasta una resolución de 2,5 Å, utilizando un detector CCD (QUANTUM 210R). El procedimiento habitual (Dauter, 2006), fue muy similar para la adquisición y tratamiento de los datos de todos los cristales. Inicialmente se tomaban varias imágenes de difracción para valorar la calidad y la resolución máxima alcanzada. El indexado, a través de la posición de las reflexiones encontradas en estas imágenes, permitió determinar el grupo espacial, la orientación del cristal y su celda unidad. Posteriormente, esta información fue utilizada para diseñar la estrategia de recogida, que incluyó la distancia del cristal al

detector, el ángulo de oscilación de cada imagen, el tiempo de exposición y la cantidad total de imágenes.

Los datos obtenidos de las imágenes de difracción del cristal de PTC-PAPU fueron reducidos e integrados utilizando el programa DENZO y escalados mediante el programa Scalepack del paquete HKL2000 (Otwinowski y Minor, 1997). Posteriormente se transformaron con SCALEPACK2MTZ (del paquete CCP4) al formato compatible con el resto de los programas del paquete CCP4 (Winn y cols., 2011) y pasados de intensidades a amplitudes con TRUNCATE (French y Wilson, 1978). El contenido de solvente de todos los cristales se estimó con el programa MATTHEWS_COEF del paquete de programas CCP4 (Kantardjieff y Rupp, 2003).

Las medidas de las intensidades de las reflexiones obtenidas previamente dan cuenta de la estructura de la proteína en el espacio recíproco, sin embargo, para determinar el modelo estructural de la proteína en el espacio real es necesario contar con los factores de estructura, que como todo vector, están compuestos de un modulo y una fase. La obtención de estas fases es uno de los puntos de mayor dificultad en la determinación de la estructura de las proteínas a través de la cristalografía de rayos X.

Aunque existen varios métodos (Adams y cols., 2009) para resolver este problema, durante el desarrollo de esta tesis se ha utilizado el reemplazo molecular. La técnica de reemplazo molecular es un método establecido para conseguir las fases de un patrón de difracción de rayos X y es usado en cristales compuestos de proteínas con una estructura o conformación conocida

(Rossmann y Blow, 1962). Para ello, se calcula un mapa de Patterson usando las coordenadas atómicas de un modelo estructural similar y se rota sobre el mapa de Patterson calculado a partir de las intensidades del cristal del que se quieren conocer las fases, obteniéndose la orientación del modelo, posteriormente usado como punto de inicio del trazado y afinado (Taylor, 2010).

Para determinar la estructura del complejo PTC-PAPU se calcularon unas fases iniciales mediante reemplazo molecular con el programa MolRep (Vagin y Teplyakov, 2010) del paquete CCP4 utilizando las coordenadas espaciales de la subunidad de la OTC de *P. furiosus* [pdb 1A1S, (Villeret y cols., 1998)]. Estas fases permitieron generar un mapa de densidad electrónica con el que se pudo construir de forma iterativa un modelo trazado manualmente en el espacio real usando el programa COOT (Emsley y Cowtan, 2004), en combinación con el afinamiento automático en el espacio recíproco utilizando el programa REFMAC5 (Murshudov y cols., 2011). A partir de la obtención de las fases iniciales, se calcularon los mapas de densidad electrónica que posteriormente fueron utilizados para construir los modelos moleculares. Se calcularon dos tipos de mapas para facilitar el trazado manual del modelo: por un lado, un mapa de densidad ($2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$) que indica la estructura del modelo, y, por otro, un mapa de diferencias ($F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$), que indica los errores o ausencias en la posición de los átomos del modelo.

Durante el afinamiento en el espacio recíproco se utilizaron restricciones geométricas sobre los enlaces, sobre los factores de temperatura (B-factors) y sobre la simetría no cristalográfica, que fueron liberados

paulatinamente conforme avanzaba el afinado de la estructura. En cada ciclo de afinamiento se calculó el factor estadístico de correlación R que indica las diferencias entre los factores de estructura experimentales (F_{obs}) y los calculados a partir del modelo (F_{calc}), además del factor R_{free} similar al factor R , pero calculado a partir de un 5% de las reflexiones, separado al azar al inicio del afinado y utilizado sólo como control del modelo (Brunger, 1992).

Se modeló el PAPU tomando la molécula de PALO del pdb 2OTC [OTC de *E. coli*, (Ha y cols., 1997)] quitándole el grupo carboxilato. El modelo utilizado para una molécula de Tris identificada en el exterior de la molécula formando parte del solvente, fue obtenido de la base de datos HIC-Up (Kleywegt, 2007). Las bibliotecas iniciales utilizadas durante la fase de afinamiento de todos los compuestos fueron generadas específicamente para REFMAC5 utilizando el servidor PRODGR (Schuttelkopf y van Aalten, 2004).

En las últimas etapas se hizo uso del afinado por TLS (Winn y cols., 2003), para lo que se definieron los dominios usando el servidor TLSMD [<http://skuld.bmsc.washington.edu/~tlsmd/>, (Painter y Merritt, 2006)]. Todos los datos de difracción se utilizaron durante el afinado, excepto un 5% de ellos, que fueron seleccionados de forma aleatoria y que se usaron para el cálculo del R_{free} .

5.2 Cristalización y determinación de la estructura de PTC con PALO

Para la cristalización del complejo PTC-PALO se utilizó una solución de PTC de $7,5 \text{ mg ml}^{-1}$ en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, con una concentración de 1 mM de PALO (cedido por el Dr. Shi, del Children's Research Institute, Washington DC). En este caso, el método usado fue el de difusión de vapor en gota asentada en placas multipocillo, de 96 reservorios y con capacidad para 2 gotas por reservorio. Se realizaron pruebas de cristalización con kits de diferentes casas comerciales (Crystal Screen HT, Crystal Index HT, PEG/Ion Screen, entre otros). Para cada ensayo de cristalización se mezclaron $0,4 \mu\text{l}$ de la solución de cada reservorio con $0,4 \mu\text{l}$ de la solución de proteína con PALO. Para dispensar las gotas de proteína y reservorio se utilizó un robot HoneyBee X8 (Genomics Solutions). Se seleccionaron aquellas condiciones con los mejores cristales y se ampliaron usando el método de las matrices expandidas (Jancarik y Kim, 1991). Para preparar las soluciones de los ensayos de ampliación se utilizó un dispensador de líquidos modelo Janus (PerkinElmer).

Los mejores cristales crecieron hasta un tamaño de $\sim 0,1 \text{ mm}$ en una solución de reservorio conteniendo 0,2 M acetato amónico, 25% PEG 3,35 K y 0,1 M bis-Tris, pH 5,5. Para la crioprotección se utilizó una solución de reservorio enriquecida con 20% glicerol y 1 mM PALO, tras lo cual, los cristales fueron congelados rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido y guardados para su posterior difracción.

Los datos de difracción de rayos X se obtuvieron a 100 K, mediante radiación sincrotrón, en la línea ID23-2 del ESRF (Grenoble, Francia), a una resolución de 2 Å, utilizando un detector CCD (MARRESEARCH). Los datos obtenidos de las imágenes de difracción de rayos X fueron reducidos e integrados utilizando el programa MOSFLM (Powell, 1999; Battye y cols., 2011) y escalados mediante el programa SCALA (Evans, 2006) del paquete CCP4, con los que además se determinó el contenido de solvente.

Para determinar la estructura del complejo PTC-PALO se calcularon unas fases iniciales mediante reemplazo molecular con el programa MolRep del paquete CCP4 utilizando las coordenadas espaciales del protómero A del cristal PTC-PAPU, las cuales permitieron generar un mapa de densidad electrónica con el que se pudo construir de forma iterativa un modelo.

La solución inicial de seis subunidades de PTC en la unidad asimétrica fue mejorada con sucesivos ciclos de afinado por movimiento en cuerpo rígido con REFMAC, y el modelo inicial fue utilizado para el trazado manual, en el espacio real, por medio del programa COOT. Durante el afinamiento en el espacio recíproco se utilizaron restricciones geométricas sobre los enlaces, sobre los factores de temperatura (B-factors) y sobre la simetría no cristalográfica, restricciones que fueron liberadas conforme avanzaba el afinado de la estructura. Para las últimas etapas del afinado se utilizó el TLS y los dominios fueron determinados con el servidor TLSMD.

El modelo de la molécula de PALO (Nδ-fosfonoacetil-L-ornitina) fue extraído del pdb 2OTC [OTC de *E. coli*, (Ha y cols., 1997)] y las bibliotecas

de datos necesarias para su afinamiento dentro de la densidad electrónica fueron generadas usando el servidor PRODGR.

5.3 Cristalización y determinación de la estructura de PTC sin sustratos

Para la cristalización de PTC sin sustratos se utilizó una solución de proteína con una concentración de 10 mg ml^{-1} en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Se usó el método de difusión de vapor en gota colgante con placas multipocillo de 24 pocillos. Se realizaron pruebas de cristalización con distintos kits comerciales de Hampton Research (Crystal Screen I y II), mezclándose $1 \mu\text{l}$ de la solución de cada reservorio con $1 \mu\text{l}$ de la solución de proteína a $7,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Los intentos iniciales de obtención de cristales de PTC fueron realizados en ausencia de sustratos o en presencia de cada uno de los sustratos naturales de la proteína, CP o putrescina, tanto a 4°C como a 21°C . El mejor cristal fue detectado en una placa de cristalización a 21°C un año después de su preparación. Tuvo forma de prisma hexagonal y una dimensión máxima de $\sim 0,5 \text{ mm}$. La solución de reservorio en que se obtuvo el cristal de PTC sin sustratos contenía 0,5 M de sulfato amónico, 30% (+/-)-2-metil-2,4-pentanodiol y 0,1M tampón HEPES pH 7,5. Tanto la solución que contenía el cristal como la del reservorio estaban altamente concentradas debido a la deshidratación, provocada porque la grasa de alto vacío usada para sellar los cubreobjetos en la parte superior del recipiente de cristalización normalmente sufre un proceso de desecación que acompaña al paso del tiempo y que permite la salida de vapores de agua y otros compuestos volátiles. Esta

deseccación hizo innecesario el uso de crioprotector, por lo que el cristal fue directamente recogido y congelado en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de rayos X fueron obtenidos a 100 K, mediante radiación sincrotrón, en la línea ID14-3 del ESRF (Grenoble, Francia), a una resolución de 2,6 Å, usando un detector CCD (MARRESEARCH). Los datos obtenidos de las imágenes de difracción de rayos X fueron reducidos, integrados y escalados utilizando los programas MOSFLM, SCALA y TRUNCATE (Powell, 1999; Evans, 2006; Winn y cols., 2011).

Para determinar las fases iniciales mediante reemplazo molecular se utilizaron las coordenadas espaciales del protómero A del cristal PTC-PAPU y el programa MolRep. La solución inicial rindió dos subunidades de PTC en la unidad asimétrica, que fue mejorada con sucesivos ciclos de afinamiento por movimientos de cuerpo rígido con REFMAC. Las fases se mejoraron mediante modificación de la densidad, usando el programa DM (Winn y cols., 2011) con aplanamiento de solvente y promediado de la densidad alrededor de la simetría 2 no cristalográfica, y fueron utilizadas para el trazado manual en el espacio real, por medio del programa COOT. Durante el afinamiento en el espacio recíproco se utilizaron restricciones geométricas sobre los enlaces, sobre los factores de temperatura (B-factors) y sobre la simetría no cristalográfica, que fueron liberados conforme avanzaba el afinado de la estructura.

5.4 Cristalización y determinación de la estructura de las variantes de la PTC R54G, sin la hélice 13 e YGLY>VSMG con PALO

Para la cristalización de los complejos de las variantes de PTC con PALO se utilizaron soluciones de entre 7,5 mg ml⁻¹ (PTC-R54G y PTC sin la hélice 13) y 9 mg ml⁻¹ (PTC-YGLY>VSMG), en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 con una concentración de PALO de 1 mM y, en el caso de la variante R54G, 50 mM cloruro de guanidinio. Se utilizó el método de difusión de vapor en gota asentada en placas multipocillo, de 96 reservorios y con capacidad para 2 gotas por reservorio, y se realizaron pruebas de cristalización con distintos kits de varias casas comerciales. Para cada ensayo de cristalización se mezclaron iguales cantidades de la solución de proteína con la solución del reservorio, que en el caso de las variantes PTC-R54G y PTC-YGLY>VSMG fueron de 0,4 µl + 0,4 µl y en el caso de la PTC sin la hélice 13 fueron de 0,6 µl + 0,6 µl. Para dispensar las gotas de proteína y de la solución de reservorio se utilizó un robot HoneyBee X8. Se seleccionaron las condiciones con los mejores cristales y se ampliaron usando el método de las matrices expandidas, cuyas soluciones fueron preparadas utilizando un dispensador automático de líquidos (Janus).

Los mejores cristales crecieron hasta un tamaño de entre 0,1 y 0,2 mm en soluciones de reservorio conteniendo: 1) variante R54G: 20 mM cloruro de magnesio, 30% PEG monometiléter 550 y 0,1M tampón Hepes pH 7,5; 2) variante YGLY>VSMG: 180 mM citrato tribásico de amonio, y 20% PEG 3,35K; y 3) variante sin hélice 13 (truncada): 200 mM cloruro de magnesio, 30% PEG 400 y 0,1M tampón Hepes pH 7,5. Debido al alto porcentaje de

PEG contenido en el reservorio de los cristales de las variantes PTC-R54G y PTC sin la hélice 13, éstos no fueron embebidos en solución crioprotectora, sino congelados directamente tras ser extraídos de la gota de cristalización. Sin embargo, en el caso de los cristales de la variante YGLY>VSMG se preparó una solución de reservorio enriquecida con 35% de PEG 400, que fue utilizada como solución crioprotectora. Posteriormente, los cristales fueron congelados y guardados en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de rayos X fueron obtenidos a 100 K, en las líneas ID23-2 (PTC-R54G), ID29 (YGLY>VSMG) e ID14-4 (PTC sin hélice 13) del ESRF, con los detectores CCD MarMOSAIC y Q315R ADSC para las dos últimas. Los datos obtenidos de las imágenes de difracción de rayos X fueron reducidos, integrados y escalados con los programas MOSFLM, SCALA y TRUNCATE, del paquete CCP4. En el caso particular del cristal PTC-R54G, los datos fueron reducidos considerando el grupo espacial como C2, aunque posteriormente se determinó el grupo espacial con POINTLESS (Evans, 2006) como I2, al que fueron transformados antes de escalarlos.

Para determinar las fases iniciales se utilizó la técnica de reemplazo molecular con el programa MolRep del paquete CCP4 utilizando como modelo las coordenadas espaciales del protómero A del cristal PTC-PALO, las cuales permitieron generar un mapa de densidad electrónica con el que se pudo construir de forma iterativa un modelo. La hélice 13 del protómero de PTC fue excluida del modelo para el reemplazo molecular del cristal de la PTC sin la hélice 13.

En los primeros ciclos de afinamiento de cada uno de los cristales, el modelo fue mejorado por movimientos en cuerpo rígido utilizando el programa REFMAC, tras lo que se utilizó, iterativamente, el trazado manual en el espacio real haciendo uso del programa COOT. Durante el afinamiento en el espacio recíproco (con REFMAC) se utilizaron restricciones geométricas sobre los enlaces, sobre los factores de temperatura (B-factors) y sobre la simetría no cristalográfica fueron liberados conforme avanzaba el afinado de la estructura.

El modelo de la molécula de PALO usado fue extraído del modelo final del protómero A del cristal PTC-PALO, y las librerías fueron las utilizadas para el afinado de ese mismo cristal. En las últimas etapas del afinado se utilizó el TLS con los dominios determinados con el servidor TLSMD.

6. Validación de las estructuras

La consistencia de los modelos finales se contrastó comprobando que la estereoquímica fuera correcta y que las distancias entre átomos y los enlaces presentaran valores adecuados. También se evaluó que no hubiera choques entre cadenas y que los factores de temperatura fuesen razonables. El modelo final fue afinado hasta obtener valores de R y $R_{\text{free}}-R$ menores a 25% y 5% (Wlodawer y cols., 2008), respectivamente. Los análisis para evaluar la geometría final del modelo se realizaron utilizando los programas de validación PROCHECK (Laskowski y cols., 1993), SFCHECK (del paquete

CCP4) y haciendo uso de las herramientas disponibles en el Protein Data Bank (www.pdb.org) para comprobar la calidad de los modelos depositados.

Algunos de los modelos finales se depositaron en la base de datos del Protein Data Bank, junto con la información relativa al cristal, el proceso de afinado, y diversos detalles relacionados con la recogida de datos, y un fichero con los factores de estructura experimentales. Los códigos asignados fueron 4A8H, 4A8P, 4A8T y 4AM8 para PTC-PAPU, PTC-PALO, la PTC sin la hélice 13 y PTC-R54G, respectivamente. Los modelos de los cristales PTC-YGLY>VSMG y PTC-apo no han sido depositados aun.

7. Otros materiales y métodos

La OTC recombinante de *E. faecalis* (Barcelona-Andres y cols., 2002) y purificada (Marshall y Cohen, 1972a) a una actividad específica de 4.021 U mg⁻¹, fue cedida por J. Selles cuando formaba parte de nuestro laboratorio.

Para la determinación de la masa molecular mediante cromatografía de exclusión molecular (gel filtración) se usó una columna de exclusión molecular Superdex 200HR(5/150) montada en un sistema ÅKTA FPLC (GE Healthcare), a temperatura ambiente, en la que se inyectaron 50 µg de la proteína purificada en hasta 100 µL de tampón 50 mM Hepes Na pH 7,5 con 250 mM NaCl, con flujo constante de 0,25 ml min⁻¹ en la columna pre-equilibrada con dicho tampón, eluyéndose la proteína con el mismo tampón, monitorizándose la densidad óptica del eluyente a 280 nm. En las figuras se indican las proteínas patrón de masa conocida utilizadas para la calibración de la columna.

Para la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) se usó el sistema de minigeles de Bio-Rad Mini-Protean II, con geles generalmente al 12% de poliacrilamida (gel de carga al 5%), un potencial de 180 V, y tinción de azul Coomassie. Los marcadores de proteínas utilizados fueron: Dalton Mark VII-L (rango de peso molecular de 14000-65000) de Sigma y Prestained Protein Molecular Weight (SM0441, rango de peso molecular de 20000-120000) de Fermentas International Inc.

Para la determinación de fósforo total (Leloir y Cardini, 1957), la muestra, de hasta 0,5 ml, se mezcló con 0,1 ml de ácido sulfúrico concentrado y se calentó la mezcla 30 min a 100°C y luego, tras taponarlo con una canica de vidrio, a 160°C durante 3 horas. Después de enfriar por debajo de 80°C, se añadieron 50 µl de peróxido de hidrógeno al 30% y se continuó la incubación a 160°C durante 1,5 horas. Tras dejar enfriar se agregaron 40 µl de hexamolibdato amónico (50 mg ml⁻¹), 820 µl de agua y 40 µl de reactivo de Fiske y Subbarow (160 mg ml⁻¹), determinando tras 30 min la absorbancia a 830 nm frente a una curva patrón de fosfato potásico.

Para determinar la presencia del grupo amino primario mediante la reacción de la ninhidrina (Spies, 1957), la muestra, llevada hasta un volumen de 0,33 ml con agua, se mezcló con 0,67 ml de una mezcla extemporánea a partes iguales de solución de 40 mg ml⁻¹ de ninhidrina en metilcelosolve y de 1,6 mg ml⁻¹ de SnCl₂·2H₂O en tampón citrato 0,2 M pH 5, calentando en tubos de vidrio tapados con canicas de vidrio, durante 20 min a 100°C,

dejando enfriar al aire 15 min y determinando la absorbancia a 570 nm, usándose arbitrariamente la leucina como patrón.

Se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) usando el reactivo comercial de Bio-Rad y seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

Los alineamientos de secuencia se realizaron con ClustalW (Thompson y cols., 1994) utilizando los valores por defecto del programa.

Para la superposición de estructuras se utilizaron los programas SSM (Krissinel y Henrick, 2004) y LSQKAB (Kabsch, 1976). Para el cálculo de las superficies enterradas y contactos entre diferentes subunidades se usaron los programas PISA (Krissinel y Henrick, 2007) y NACCESS (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/>)

La estructura de PTC se comparó con todas las contenidas en el PDB usando el servidor PDBeFold [<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/ssmstart.html>, (Krissinel y Henrick, 2004)].

Las figuras de estructuras de proteínas se generaron con Pymol (<http://pymol.sourceforge.net>).

Resultados y Discusión

1. El grupo de genes de catabolismo de agmatina en *E. faecalis*

Cuando se inició este trabajo, la base de datos TIGR (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/CmrHomePage.cgi>) incluía en el cromosoma de *E. faecalis* V583 un grupo de genes potenciales denominados EF0732, EF0733, EF0734, y EF0735, en la misma hebra de DNA, separados por distancias intergénicas relativamente cortas (66, 76 y 11 pares de bases) (Figura 14). Su anotación en la versión de entonces de dicha base de datos era la de una posible ornitina transcarbamilasa, una permeasa de aminoácidos, una proteína conservada hipotética y una posible carbamato quinasa, respectivamente. Por analogía con el operón para el catabolismo de arginina, en el que los genes para una arginina deiminasa (ADI), una ornitina transcarbamilasa (OTC), una carbamato quinasa (CK) y el transportador arginina/ornitina se designaron *arcABCD* (en donde *arc* significa catabolismo de arginina) designamos a los genes EF0734, EF0732, EF0735, y EF0733 tras determinar su función como se demuestra más adelante, como genes *agcABCD* (donde *agc* significa catabolismo de agmatina), respectivamente, usándose de aquí en adelante esta denominación excepto cuando convenga hacerlo de otro modo. Hay que señalar que en realidad su orden en el genoma es BCAD. Mientras que las distancias intergénicas en este grupo de genes son pequeñas o incluso nulas, 1143 bases separan a *agcB* del gen previo en la misma hebra de ADN y 197 bases a *agcC* del siguiente. El análisis de esta última región de 197 bases revela que contiene una horquilla terminadora de la transcripción independiente de proteína [terminador #851 del genoma de *E. faecalis* V583, predicha con el programa TransTerm v2,

<http://www.cbcb.umd.edu/software/TransTerm>, (Kingsford y cols., 2007)], de elevada estabilidad, que podría limitar la extensión de la unidad transcripcional. También se observó la predicción de una horquilla terminadora menos estable en la región intergénica de 66 bases entre *agcB* y *agcD* (terminador #850 del genoma de *E. faecalis* V583), pareciéndose, por tanto, a la observación realizada para el operón ADI, donde una horquilla interna de estabilidad subóptima ubicada tras el gen que codifica para la OTC causó la terminación parcial de la transcripción (Barcelona-Andres y cols., 2002).

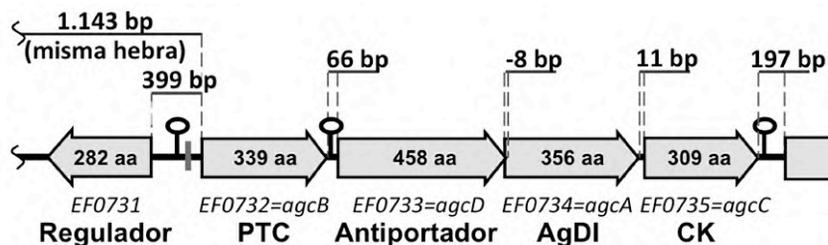


Figura 14. Grupo de genes del catabolismo de agmatina en *E. faecalis* V583. Organización génica de las dos hebras de la región que incluye los genes EF0731 a EF0735, mostrando el número de aminoácidos (aa) esperados para cada producto génico y la longitud en pares de bases (bp) de las regiones intergénicas. Los genes son identificados tanto con la denominación de la base de datos TIGR como la denominación *agc*. Se indican tres horquillas terminadoras, así como una posible caja *cre* que precede a *agcB* (rectángulo gris). El gen *EF0731* ubicado en la hebra opuesta, corresponde al regulador *luxR*.

La identificación en el genoma anotado de *E. faecalis* (base de datos TIGR) del primer codón de la pauta de lectura abierta para *agcA* es errónea: hay dos codones ATG previos en pauta a 12 y 28 tripletes del propuesto como comienzo de la traducción, de los que el que está ubicado más aguas arriba fue considerado el genuino por las siguientes razones:

1. Es el único al que le precede a 12 bases una buena secuencia Shine-Dalgarno (AGAAGG, se subraya la base que difiere de la secuencia canónica).
2. La proteína expresada por otros miembros del laboratorio a partir de este codón resultó ser una AgDI muy activa.
3. Existe correspondencia entre la secuencia de estos 28 aminoácidos y los 28 aminoácidos N-terminales de la agmatina deiminasa de *Pseudomonas aeruginosa* (Nakada y cols., 2001).
4. En la estructura cristalina de AgDI, determinada por otros miembros del grupo, ha sido posible observar e interpretar todos estos residuos ordenados, con excepción del residuo Met-1.

Así, como se refleja en la Figura 14, este codón ATG se encuentra 8 bases dentro del gen que lo procede, *agcD*, y por tanto *agcD* y *agcA* se solapan.

2. El producto del gen *agcB* es una putrescina transcarbamilasa genuina

La secuencia de aminoácidos codificada por el primer gen del grupo, *agcB* (nucleótidos 689526 a 690545 del genoma de *E. faecalis* V583), tiene la misma longitud (339 aminoácidos) y exhibe un 31% de identidad con la OTC codificada por el gen *arcB* del operon ADI de *E. faecalis* [(Barcelona-Andres y cols., 2002), Figura 15]. La identidad se extiende a la inclusión de las respectivas secuencias de unión a carbamilsfosfato y ornitina, ⁵²STRT y ²⁶⁸HCLP (el número de residuo corresponde a la posición en la proteína

codificada por *agcB*), y a 61 de los 85 residuos totalmente conservados en las OTCs anabólica y catabólica de *P. aeruginosa* y la OTC catabólica codificada por el gen *arcB* de *E. faecalis* (Figura 15). Sin embargo, tal como cabría esperar si el producto del gen *agcB* fuera una transcarbamilasa que carbamila un sustrato diferente de ornitina (aunque no muy diferente, dada la conservación de la secuencia firma para la ornitina) 10 de los 14 residuos que se mantienen invariantes entre las tres OTCs, pero no están conservados ni reemplazados conservadoramente en el producto del gen *agcB* se ubican en el dominio C-terminal de este producto, que se corresponde con el dominio de unión a ornitina de la OTC (Figura 15). Es más, la secuencia invariante SMG, que forma parte de un lazo móvil que rodea a los sustituyentes del C α de la ornitina (Shi y cols., 2001) no se ha conservado en el posible producto del gen *agcB*.

El gen *agcB* había sido clonado previamente en el plásmido de expresión pET-22b por otros miembros del laboratorio (Llácer y cols., 2007). A partir de dicho vector induje la sobreexpresión de este gen en células de *E. coli* BL21. La proteína con una cola C-terminal de seis residuos de histidinas se produjo en grandes cantidades en forma soluble tras la inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Tras la rotura de las células que la contenían por sonicación, se purificó la proteína por un procedimiento simple basado en el uso de cromatografía de afinidad mediante una columna de Ni²⁺ (Figuras 16 y 17), de la que fue eluída con un gradiente de imidazol (ver Metodología). El rendimiento de la purificación fue de alrededor de 25 mg de enzima de alta pureza por cada litro de cultivo de partida.

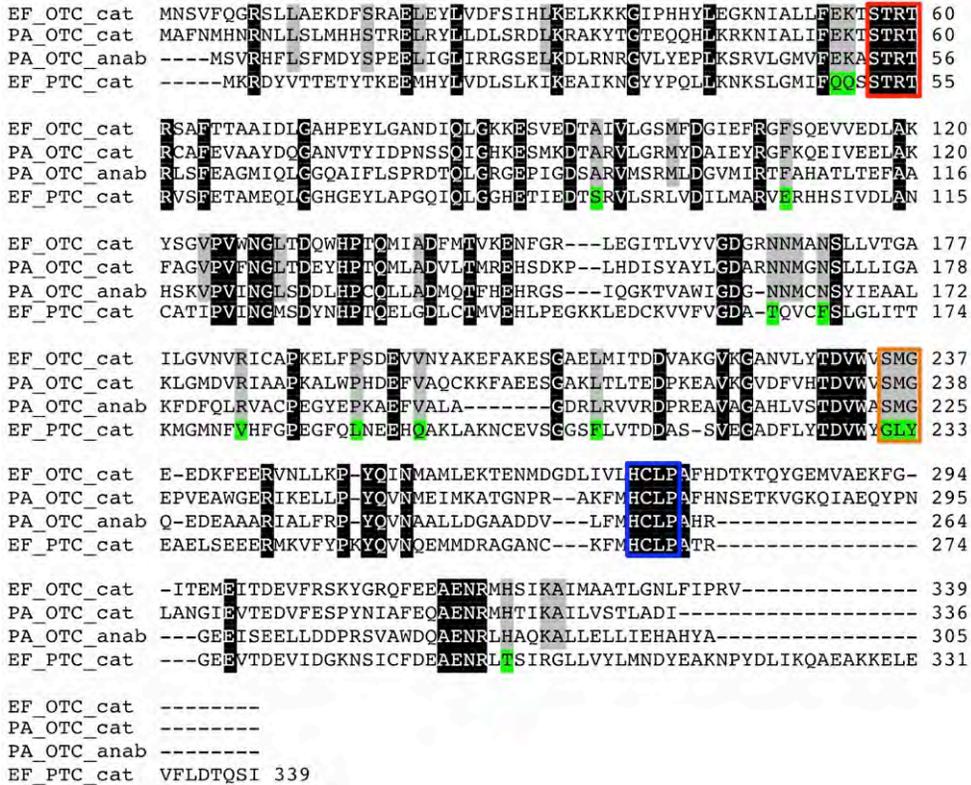


Figura 15. Alineamiento de la PTC y la OTC de *E. faecalis* con las dos OTC de *P. aeruginosa*

Los residuos blancos sobre fondo negro denotan identidad en todas las secuencias alineadas, mientras que los residuos negros sobre fondo gris muestran identidad entre las OTCs; en posiciones en que se han producido reemplazos conservados en PTC el fondo se muestra en verde. Los motivos STRT, SMG (de las OTCs) y HCLP, son recuadrados en rojo; anaranjado y azul, respectivamente. Se muestran las OTCs anabólica y catabólica de *P. aeruginosa* (PA), la OTC catabólica y la PTC de *E. faecalis* (EF).

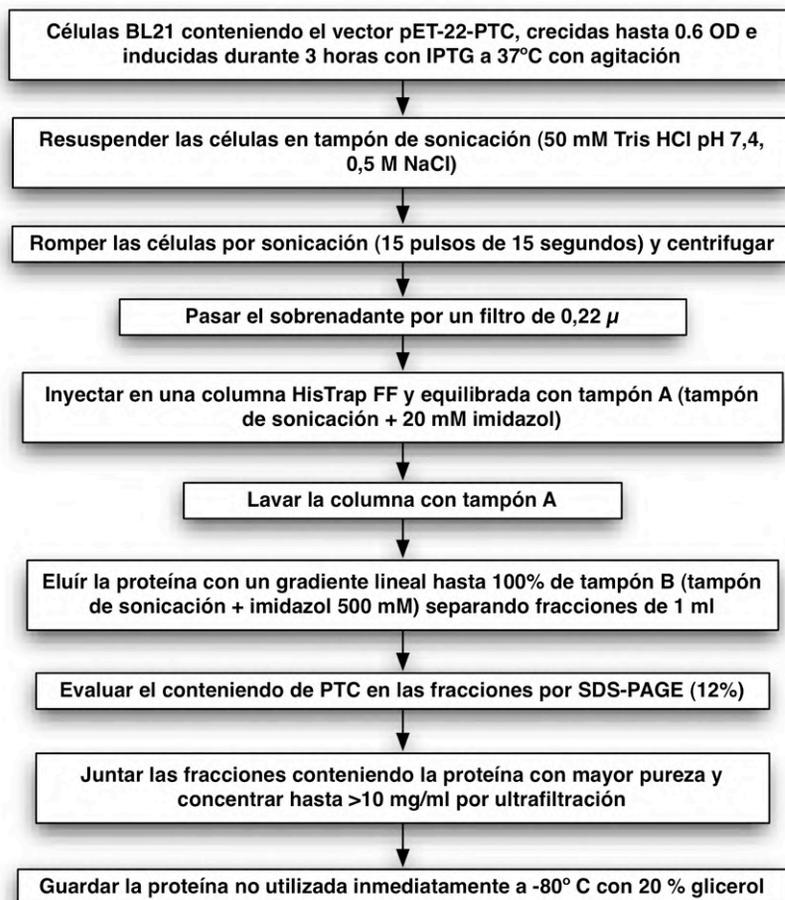


Figura 16. Esquema de la purificación de PTC

Representación esquemática de los pasos de purificación de la PTC de *E. faecalis* expresada en células de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el vector plasmídico pET22-PTC, codificando para la proteína con una cola que contiene seis residuos de histidina en el extremo C-terminal.

La movilidad electroforética (SDS-PAGE) de la proteína purificada concuerda con la masa deducida de la secuencia, que es de 40.091 Da (Figura 17). Para comprobar que la proteína purificada se correspondía con la secuencia aminoacídica esperada a partir del gen *agcB*, ésta fue analizada por 14 ciclos de secuenciación amino terminal de la proteína purificada (determinada por el Dr. Juan José Calvete, IBV-CSIC), rindiendo la secuencia

MKRDYVTETETYTE, que además de corroborar la identidad de la proteína demostró que incluye la metionina inicial.

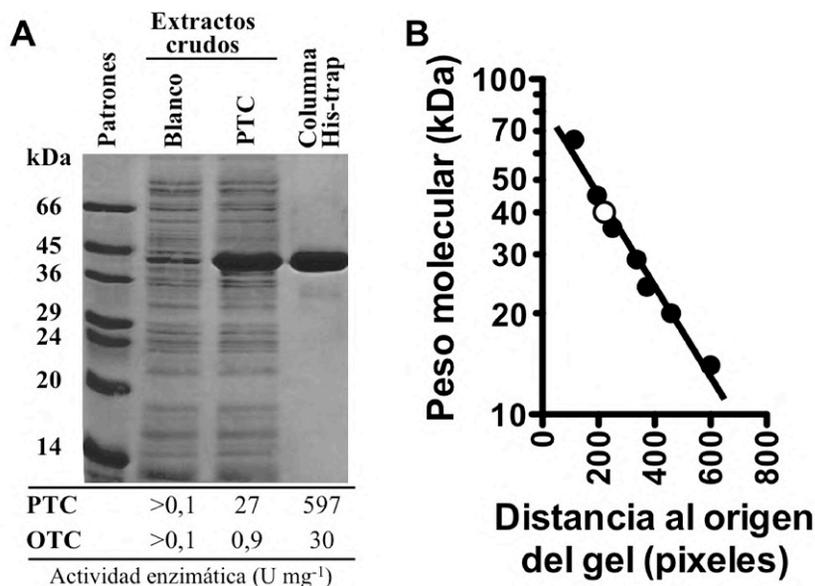


Figura 17. Purificación de PTC.

(A) SDS-PAGE (12%) teñido con azul Coomassie del extracto crudo (sobrenadante post-sonicación) y de la PTC purificada. Se incluye un blanco de células de *E. coli* BL21 transformado con pET-22b sin inserto. En el panel inferior se muestran los resultados de la medida de las actividades PTC y OTC ensayadas usando 10 mM putrescina (PTC) o 100 mM ornitina (OTC). (B) Representación de un gráfico semilogarítmico de la masa molecular frente a la movilidad electroforética de las proteínas de masa conocida (marcador de peso molecular de Sigma, Dalton Mark VII-L, círculos negros) y de la PTC (círculo vacío). La posición de la PTC se ha fijado dándole la masa exacta derivada de su secuencia (incluida la cola de poli-His) de 40.091 Da. La distancia al origen está medida en píxeles.

Los ensayos de actividad enzimática en presencia de 10 mM de putrescina y carbamilfosfato demostraron que la proteína recombinante cataliza la conversión de putrescina a carbamilputrescina con una actividad específica (~600 U mg⁻¹) similar a la descrita para esta enzima purificada previamente de la fuente natural, *E. faecalis* [460 U mg⁻¹, (Wargnies y cols., 1979)]. De acuerdo con los resultados previos con la enzima no recombinante,

la cinética de PTC para ambos sustratos, putrescina y carbamilfosfato (Figura 18), fue hiperbólica, con unos valores de K_m aparentes de $\sim 1,5$ mM y $\sim 0,06$ mM, respectivamente.

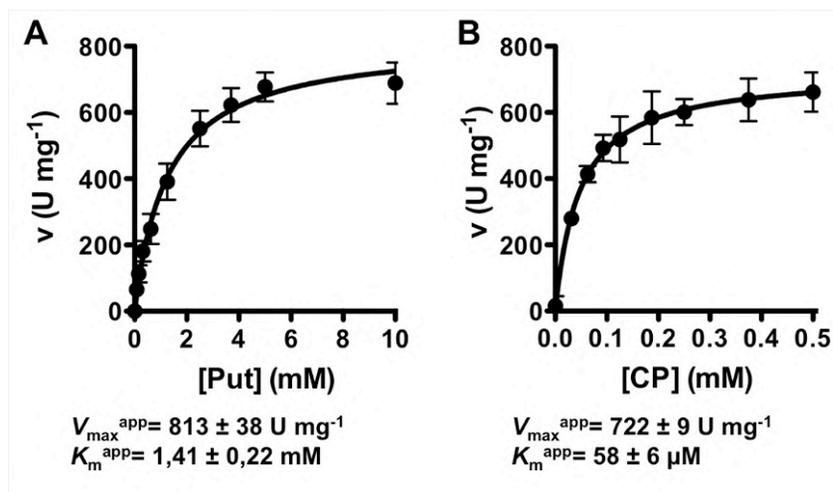


Figura 18. Determinación de los parámetros cinéticos para los sustratos de la PTC purificada.

En los ensayos, realizados como se indica en Metodología, se mantuvo constante a 10 mM la concentración de uno de los sustratos, variando uno u otro en el rango de concentración indicado. En la parte inferior de cada curva se dan los valores de K_m y V_{\max} aparentes (K_m^{app} y V_{\max}^{app}). Put, putrescina; CP, carbamilfosfato.

2.1 La PTC es un trímero estable en solución

La PTC purificada se comporta como un trímero estable en solución a juzgar por los resultados de cromatografía de exclusión molecular en columna de Superdex 200HR (Figura 19). Este comportamiento también ha sido descrito para la proteína obtenida desde *E. faecalis* (Wargnies y cols., 1979).

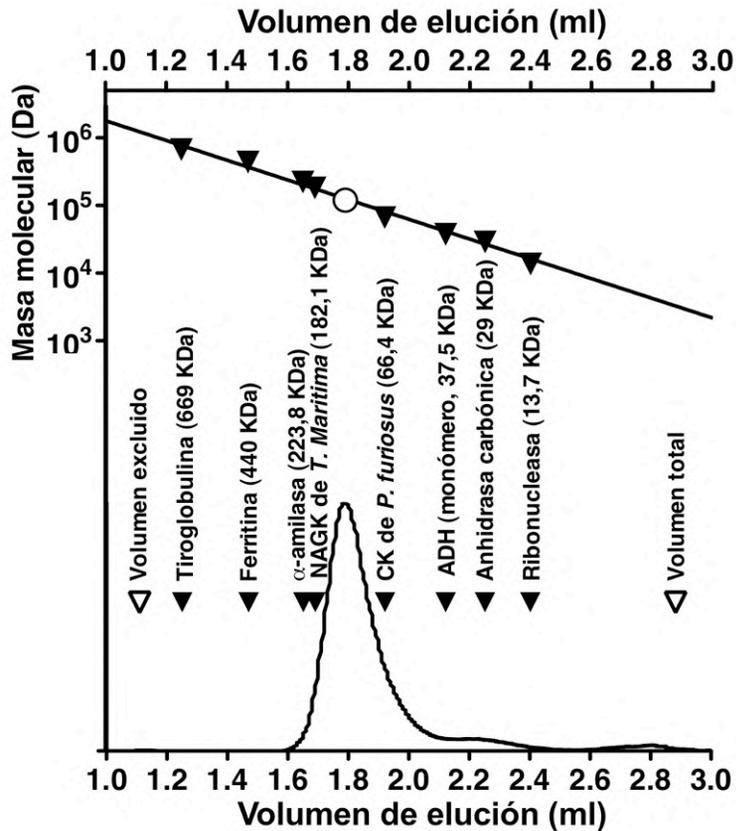


Figura 19. Investigación del estado oligomérico de la PTC recombinante usando filtración en gel.

Se muestra en un gráfico semilogarítmico la masa molecular frente al volumen de elución de una columna Superdex 200HR. Los triángulos corresponden a las proteínas estándar. El círculo denota la posición de elución de PTC asumiendo que formara un trímero (masa deducida de la secuencia, 120.273 Da). NAGK, N-acetil-L-glutamato quinasa; CK, carbamato quinasa; ADH, alcohol deshidrogenasa (equina).

3. PAPU inhibe específicamente PTC

Estudios previamente publicados con ATC y OTC demostraron que N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA) y N-fosfonoacetil-L-ornitina (PALO) son, respectivamente, inhibidores bisustrato inertes muy potentes de estas enzimas (Collins y Stark, 1971; Penninckx y Gigot, 1979). Dado que estos inhibidores han sido utilizados con éxito en ensayos de cristalización de las

enzimas a las que inhiben, llevando a la determinación de sus estructuras tridimensionales por difracción de rayos X (Ke y cols., 1988; Ha y cols., 1997), consideramos que la fosfonoacetilputrescina (PAPU, Figura 20), también podría ser un inhibidor bisustrato potente y muy específico de PTC y, de ser así, podría ayudar a la cristalización de la enzima. Se había publicado previamente la síntesis de PAPU (Penninckx y Gigot, 1979).

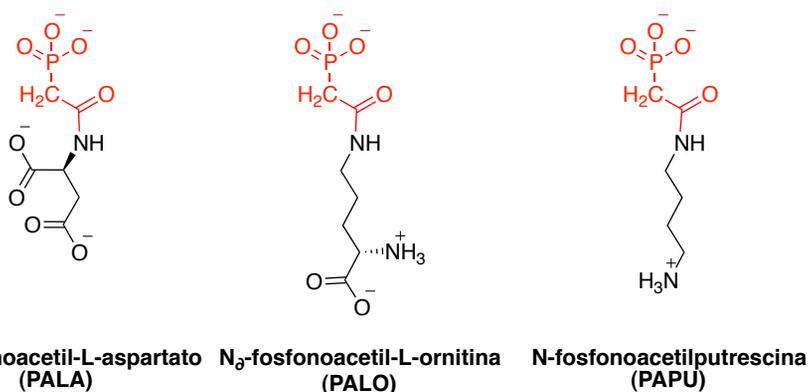


Figura 20. Inhibidores bisustratos de transcarbamilasas.

Se muestran las moléculas que han sido usadas como inhibidores bisustrato en la obtención de cristales de ATC, OTC y PTC. En rojo se indica el grupo fosfonoacetilo similar al CP.

Ante la imposibilidad de conseguir el compuesto PAPU comercialmente y debido a nuestro interés en realizar ensayos de inhibición y pruebas de cristalización de este compuesto con PTC, contamos con la colaboración de los Drs A. Cantín y M.A. Miranda (Instituto de Tecnología Química, CSIC-UPV), con los que sintetizamos y purificamos el PAPU basándonos en el protocolo previamente descrito por Penninckx y Gigot [ver Metodología y (Penninckx y Gigot, 1979)]. Para ello, primeramente sintetizamos, a partir de cloruro de tionilo y ácido fosfonoacético, el cloruro

de fosfonoacetilo, que es un electrófilo altamente reactivo que en ausencia de agua y en presencia de putrescina base reaccionó con esta última, produciendo un precipitado conteniendo el PAPU, que fue filtrado y lavado con dioxano seco. El precipitado, posteriormente, fue disuelto en agua y ajustado a pH 8 y el PAPU fue desalado con una columna de Dowex (50W-X8 forma H⁺) y purificado con una columna de Dowex (AG1-X8 forma Cl⁻) de la que se obtuvieron fracciones. Se seleccionaron aquellas que contenía cantidades equivalentes de fósforo [medidos tras digestión completa en ácido por el método de Fiske y Subbarow, (Leloir y Cardini, 1957)] y grupos amino libres [medidos por la reacción de ninhidrina y también por HPLC usando o-ftalaldehído (Spies, 1957; Alonso y Rubio, 1985)]. Finalmente se determinó que la solución contenía un compuesto que en espectrometría de masas genera un ion monopositivo acorde a la masa esperada, 212,2 Da (analizado por MALDI-TOF/TOF, en el CIPF, Valencia) (ver Metodología). Como veremos más adelante, con la estructura cristalina se confirma la correcta síntesis de esta molécula.

En la Figura 21 se muestra que el PAPU, en concentraciones micromolares, es un inhibidor muy potente de PTC, siendo capaz de producir una inhibición completa de la actividad enzimática. Por el contrario, este mismo compuesto, en idénticas concentraciones, no inhibe la OTC de *E. faecalis* (cedida por el Sr. Jorge Sellés, durante su etapa en el laboratorio), demostrando que es un inhibidor selectivo para PTC (Figura 21).

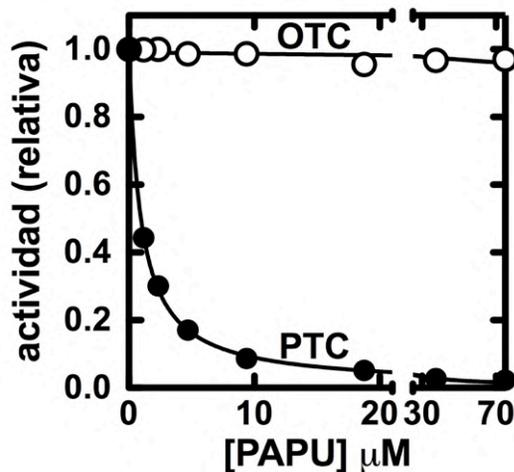


Figura 21. Inhibición específica de PTC por PAPU. Inhibición y carencia de inhibición de PTC y OTC de *E. faecalis* por PAPU. Las actividades son mostradas como fracciones de la actividad en ausencia del inhibidor. Los ensayos se realizaron como se muestra en Metodología.

3.1 La inhibición con PAPU aclara el orden de unión de los sustratos

Se ha descrito que el mecanismo cinético de PTC es secuencial con unión de los sustratos al azar (Wagnies y cols., 1979). Si bien otros han descrito este mecanismo cinético de unión de los sustratos a transcarbamilasas (Shi y cols., 2006b), en la mayoría de los casos el mecanismo se ha definido como un mecanismo secuencial ordenado (Stalon y cols., 1977; Parmentier y Kristensen, 1998; Wang y cols., 2008), donde el carbamilfosfato se une en primer lugar (Figura 22).

Los ensayos mostraron que la inhibición de PTC por PAPU es competitiva frente al carbamilfosfato y no competitiva frente a la putrescina (Figura 23), como es de esperar para una enzima en la que los sustratos se unen ordenadamente, y el carbamilfosfato lo hace en primer lugar (Figura 22).

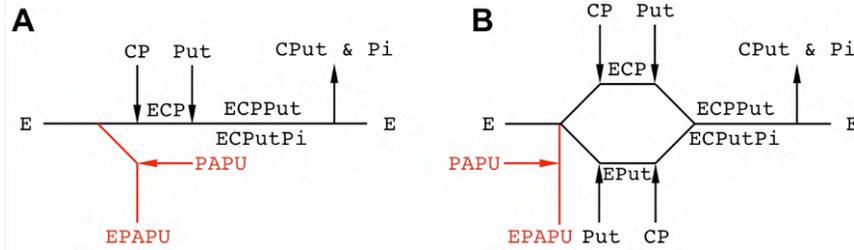


Figura 22. Posibles órdenes de unión de los sustratos a la PTC. Diagrama de Cleland mostrando un mecanismo secuencial ordenado (A) en comparación con uno secuencial al azar (B). E representa la enzima (PTC); CP y Put, carbamilfosfato y putrescina; CPut y Pi, carbamilputrescina y fosfato. En rojo se muestra la unión del inhibidor a la enzima libre.

A partir de la recta obtenida de la K_m aparente para carbamilfosfato a concentraciones crecientes de PAPI (Figura 23) se puede estimar un valor de K_i para PAPI de 10 nM. Un valor tan bajo para la K_i subraya la alta afinidad de la enzima por el inhibidor bisustrato PAPI, ofreciendo buenas oportunidades para la preparación de complejos cristalinos de PTC que pudieran arrojar luz sobre la unión de los sustratos, la especificidad de la enzima y el mecanismo catalítico.

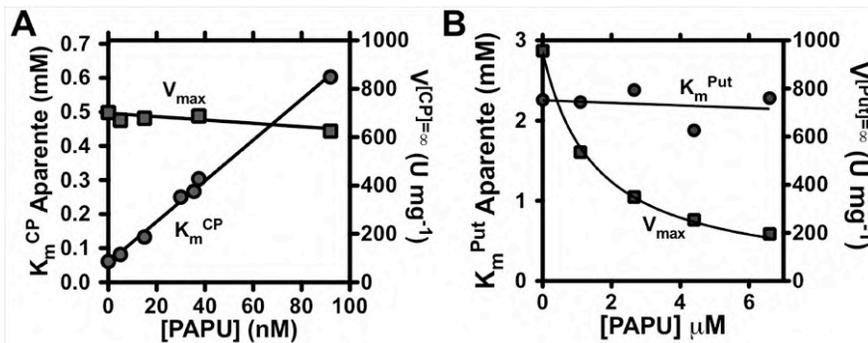


Figura 23. Efecto del inhibidor PAPI sobre la cinética para los sustratos de PTC. Influencia de PAPI sobre los parámetros cinéticos, V_{max} (cuadrados) y K_m (círculos), para CP (A) y putrescina (B, Put). Los ensayos se realizaron en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7 [ver Metodología], manteniendo la concentración constante de 10 mM de uno de los sustratos, mientras se varió la del otro.

4. La PTC usa ornitina como un sustrato genuino aunque pobre

Como se ha señalado previamente, los sustratos naturales de la PTC, putrescina, y de la OTC, ornitina, son moléculas similares, con una porción común que consiste en una cadena carbonada con un grupo amino en cada uno de sus extremos, pero con una característica diferencial, ya que la putrescina carece del grupo α -carboxilato presente en la ornitina. A pesar de la similitud entre estas dos moléculas, se ha descrito a las OTCs como enzimas específicas, incapaces de utilizar putrescina como sustrato (Burnett y Cohen, 1957; Barcelona-Andres y cols., 2002). En contraste con los resultados de especificidad obtenidos con OTC, ha sido previamente publicado que la enzima PTC de *E. faecalis*, purificada a partir del huésped natural, puede usar ornitina en lugar de putrescina (Wargnies y cols., 1979) aunque con una V_{\max} baja y una K_m alta. Sin embargo, dichos estudios no han excluido la posibilidad de que la ornitina utilizada estuviera contaminada con trazas de putrescina ni de que la enzima purificada tuviera trazas de OTC arrastrada durante los pasos de la purificación.

Para responder al interrogante que se plantea sobre si la falta de especificidad de la PTC fue o no un resultado artefactual, pudimos valernos de la enzima recombinante, purificada usando una cola de poli-His, que además de excluir casi completamente la posibilidad de arrastrar trazas de OTC nos ofreció la oportunidad de determinar sin lugar a dudas si la actividad observada era legítimamente de la PTC.

4.1 La actividad de PTC no corresponde a una contaminación de la ornitina con putrescina

En 1972 Marshall y Cohen demostraron que el equilibrio de la reacción de ornitina + CP = citrulina + Pi está fuertemente desplazado hacia la producción de citrulina (Marshall y Cohen, 1972b). Teniendo en cuenta que dicho equilibrio sólo depende de las concentraciones presentes en la solución de las especies involucradas (sustratos y productos) y no del catalizador usado para acelerar la reacción, se podría excluir que la aparente actividad OTC de la PTC se debiera a la presencia de trazas de putrescina en la solución de ornitina utilizando un ensayo en el que se llegara al equilibrio, ya que debido a la baja concentración de putrescina en la ornitina, el valor del punto de equilibrio debería ser mucho más bajo para putrescina que para ornitina. Para ésta aproximación, ornitina y carbamilsfosfato fueron mezclados en iguales concentraciones y se les agregó una gran concentración bien de OTC, bien de PTC recombinantes purificadas con el fin de permitir la reacción de transcarbamilación y alcanzar el equilibrio en un breve período de tiempo. Si PTC no pudiera catalizar la carbamilación de ornitina y la actividad descrita previamente con ornitina fuera el resultado de trazas de putrescina contaminante, la cantidad del producto carbamilado sería mucho menor con PTC que con OTC, ya que en el último caso correspondería a una gran cantidad de ornitina. El resultado obtenido fue acorde sólo con el uso genuino de ornitina en la reacción catalizada por la PTC (Figura 24): al llegar al equilibrio se obtuvo la misma cantidad de color para la reacciones catalizadas con OTC o con PTC. Como esperábamos para la reacción enunciada

previamente (ornitina + CP = citrulina + Pi), el color obtenido se correspondió con la cantidad de citrulina generada a partir de la ornitina inicialmente presente en la mezcla.

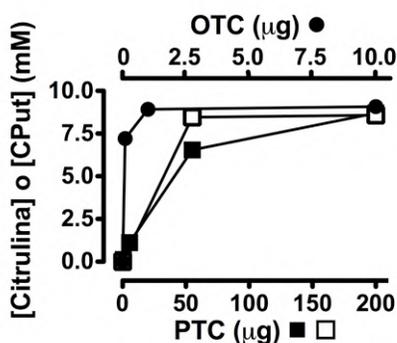


Figura 24. La PTC puede carbamilar ornitina además de putrescina. Acercamiento al equilibrio de ornitina (símbolos rellenos) usando PTC (cuadrados) u OTC (círculos) de *E. faecalis* como catalizador y comparación con el equilibrio alcanzado por PTC con putrescina (símbolos vacíos). Los tubos conteniendo las cantidades indicadas de OTC o PTC en 0,25 ml de Tris-HCl 0,1M pH 8,5, 0,4 mg ml⁻¹ de albúmina sérica bovina, 10 mM de CP y 10 mM de putrescina u ornitina, fueron incubados 10 min a 37°C. Posteriormente se añadió 0,1 ml de ácido tricloroacético frío y se determinó la cantidad de citrulina o carbamilputrescina (CPut). El resultado muestra la concentración final de grupos ureido.

4.2 La actividad observada con ornitina no se debe a una contaminación con OTC

Los resultados obtenidos en los experimentos de equilibrio sólo podrían atribuirse a la actividad de la PTC si la preparación enzimática no estuviera contaminada con trazas de OTC, contaminación que parece muy poco probable para nuestra preparación, que como ya se ha expuesto previamente, ha sido obtenida de manera recombinante y con una alta pureza. Así, hasta este punto sólo es posible asumir que la reacción observada es catalizada por una enzima con actividad ornitina transcarbamilasa, atribuible a PTC por las razones antes expuestas. Sin embargo, aprovechando el inhibidor

análogo bisustrato PAPU sintetizado, fue posible comprobar si la actividad con ornitina se debe genuinamente a PTC y no a una contaminación con OTC, ya que este inhibidor ha resultado muy potente y específico para PTC, mostrando una ausencia de inhibición de OTC. Así, si la actividad observada fuera catalizada por PTC, debería ser inhibida por diferentes concentraciones de PAPU en la misma medida que la actividad de la enzima con putrescina; pero, si la carbamilación de ornitina fuese catalizada por trazas de la proteína OTC arrastrada a través de las purificaciones no sería inhibida por PAPU, como ya se ha demostrado para OTC purificada (Figura 21A).

El resultado obtenido fue acorde a lo enunciado en la primera afirmación, de manera que el efecto de la inhibición con PAPU (Figura 25) es similar para las actividades con putrescina y con ornitina, revelando que ambas actividades son producidas por una enzima que se inhibe por PAPU, demostrando que PTC es la responsable de las dos actividades.

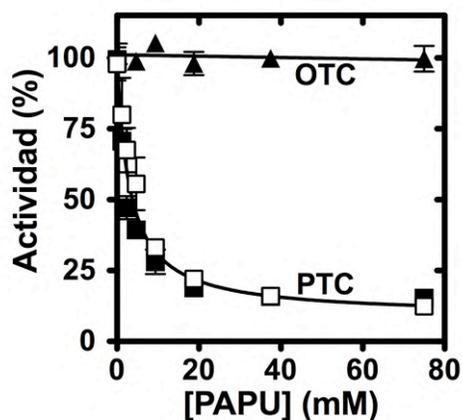


Figura 25. Efecto de PAPU sobre la actividad de PTC de *E. faecalis* con ornitina. Inhibición por concentraciones crecientes de PAPU de la actividad transcarbamilasa de PTC (cuadrados) usando putrescina (símbolos vacíos) u ornitina (símbolos rellenos) como sustratos, y carencia de inhibición de OTC de *E. faecalis*. Las actividades se dan como porcentaje de la actividad en ausencia de PAPU. Se ajustó una única curva a los resultados de actividad de PTC con ambos sustratos.

4.3 Una mutación inactivante de PTC confirma que la actividad observada con ornitina es genuinamente de la PTC

Una prueba definitiva para determinar la responsabilidad de PTC sobre la carbamilación de ornitina fue provista utilizando dos mutaciones inactivantes de un mismo residuo de PTC, R54G y R54L. Estas mutaciones afectan a un residuo de arginina clave de la secuencia invariable de unión a carbamifosfato, ⁵²SxRT, encontrada en todas las transcarbamilasas, volviendo la enzima inactiva (como se discute más adelante, Figura 50). El efecto de una mutación equivalente fue descrito previamente en otras transcarbamilasas, como ATC (Stebbins y cols., 1989) y OTC (Kuo y cols., 1988).

La enzima mutante fue preparada por mutagénesis dirigida, fue expresada en forma soluble y fue purificada hasta una homogeneidad similar a la de la enzima silvestre (Figura 50). La preparación de la enzima no mostró actividad transcarbamilasa con putrescina ni con ornitina (límite de detección del ensayo, 0,1% de la actividad de la proteína silvestre), demostrando que ambas actividades se deben a la PTC.

5. Cristalización de PTC en presencia de PAPU y PALO

Para intentar aclarar las diferencias entre PTC y OTC que conllevan las diferentes especificidades de estas enzimas decidimos determinar la estructura de PTC por difracción de rayos X a partir de cristales de la proteína. Los primeros ensayos de cristalización en ausencia de sustratos o inhibidores, o en presencia de putrescina, originaron cristales que, aunque eran pequeños, tenían un tamaño suficiente para realizar los estudios de difracción. Además,

mostraban algunas caras planas y vértices afilados. Sin embargo, estos primeros cristales no difractaron los rayos X hasta una resolución suficientemente alta que permitiera dilucidar los detalles en la estructura de la proteína ($> 4,5 \text{ \AA}$, Figura 26).

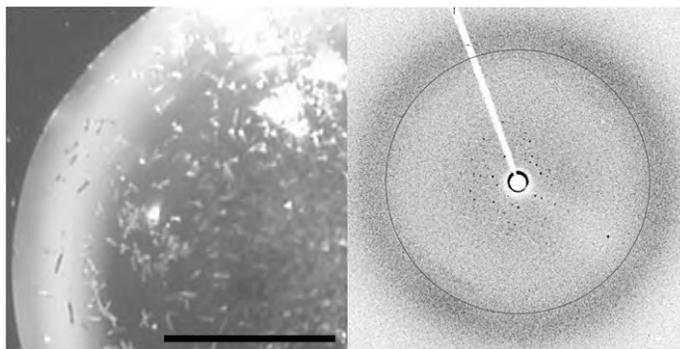


Figura 26. Cristales preliminares de PTC obtenidos en ausencia de sustratos. En el panel izquierdo se muestran los cristales preliminares de PTC obtenidos en ausencia de sustrato (la línea representa 0,5 mm). En el panel derecho se muestra una imagen de difracción de uno de los cristales del panel izquierdo. El círculo indica la resolución de 4 \AA .

A partir de la adición del inhibidor bisustrato PAPU a la gota de cristalización, la calidad de los cristales obtenidos mejoró radicalmente, obteniéndose cristales más grandes y con formas más definidas que los conseguidos previamente, lo que sugirió la posibilidad de que estos nuevos cristales estuvieran conformados por un complejo de PTC con PAPU. Los nuevos cristales tuvieron una forma prismática hexagonal y una dimensión máxima de $\sim 0,3 \text{ mm}$ (Figura 27), crecieron en alrededor de una semana a 21°C en presencia de $0,43 \text{ mM}$ de PAPU, 125 mM de sulfato amónico, 17% polietilenglicol 3,35K, y $0,1 \text{ M}$ tampón bis-Tris, pH 5,5. Los primeros cristales de PTC crecidos en presencia de PAPU (PTC-PAPU) difractaron rayos X hasta una resolución de 3 \AA y permitieron determinar el grupo

espacial del cristal, que fue de tipo hexagonal $P6_322$, con una celda unidad que admitía entre dos y tres subunidades de la enzima dentro de la unidad asimétrica, dependiendo de si el volumen del cristal estuviera ocupado por el disolvente en un 55% o un 33% (respectivamente). Tras varios ciclos de mejora, los cristales de PTC crecidos en presencia de PAPU llegaron a difractar los rayos X hasta una resolución máxima de 2,5 Å (Tabla 1).

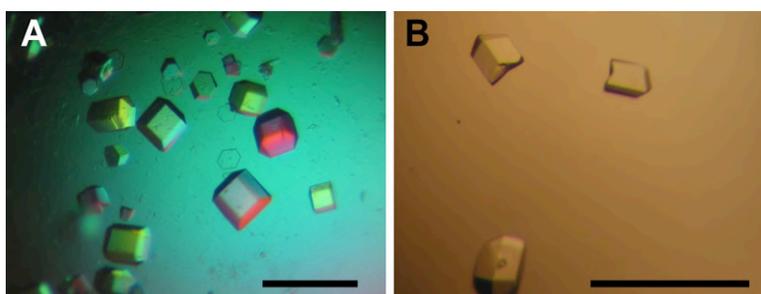


Figura 27. Cristales de PTC con los inhibidores análogos bisustrato. Se muestran los cristales de PTC obtenidos presencia de los inhibidores PAPU (A) y PALO (B). En ambos paneles, la línea representa 0,5 mm.

Dado que PTC es capaz de unir ornitina y catalizar su carbamilación, se emprendió la cristalización del complejo de PTC con el inhibidor análogo bisustrato de la reacción con ornitina, PALO (PTC-PALO), de la que se obtuvieron varios cristales de forma prismática pseudo-hexagonal, aunque con las caras menos definidas que en los cristales del complejo PTC-PAPU (Figura 27). Los cristales del complejo PTC-PALO tardaron aproximadamente 2 semanas en crecer. El mejor cristal difractó rayos X a resolución de 2 Å. El patrón de difracción correspondió al grupo espacial P1 y, según el análisis de las dimensiones de la celda unidad, contuvo 6 subunidades dentro de la unidad asimétrica (Tabla 1).

6. Estructura de la PTC

La elevada similitud de secuencia que PTC tiene con OTC de *Pyrococcus furiosus* (pfOTC; 43% de identidad y 74% identidad+similitud para los 315-residuos que alinean entre pfOTC y PTC de *E. faecalis*) permitió obtener las fases cristalográficas de los datos de difracción obtenidos a partir de los cristales de PTC-PAPU. Para ello se utilizó un modelo de polialaninas del protómero de pfOTC depositado en el PDB [código 1A1S, (Villeret y cols., 1998)].

De acuerdo con el resultado del análisis del contenido de solvente incluido dentro de la unidad asimétrica, el cristal de PTC-PAPU contuvo dos protómeros en la unidad asimétrica (Tabla 1), con un volumen del 55% ocupado por el solvente. En cada uno de los sitios esperados para el centro activo fue evidente una densidad electrónica tras varios ciclos de afinamiento de la estructura, que se correspondió con la forma esperada para una molécula de PAPU (Figura 28A). Debido a que el modelo estructural de PAPU no había sido depositado previamente en las bases de datos, fue necesario modelarla quitando el grupo carboxilato a la molécula de PALO (fosfonoacetil-L-ornitina, Figuras 20 y 28A), encontrada en la estructura de OTC de *E. coli* depositada en el PDB bajo el código 2OTC. Además de la molécula de PAPU, una molécula de Tris fue visualizada y modelada en una zona del exterior de la proteína, aunque cercana al centro activo. Para poder afinar la estructura de ambas moléculas junto con el modelo de la proteína fue necesario generar las correspondientes bibliotecas de restricciones, para lo que se utilizó el servidor PRODRG (Schuttelkopf y van Aalten, 2004).

Tabla 1. Estadísticas de la estructura y los datos de rayos X de los cristales de PTC silvestre.

	PTC Silvestre	
	+PAPU	+PALO
Recolección de datos		
Línea del sincrotrón ESRF	BM16	ID23-2
Longitud de onda (Å)	0,980	0,873
Grupo espacial	P6 ₃ 22	P1
Celda Unidad a, b, c (Å)	117,2, 117,2, 225,3	81,5, 81,7, 82,3
α, β, γ (°)	90, 90, 120	105, 103, 101
Rango de resolución (Å) ^a	30–2,50 (2,59–2,50)	30–2,00 (2,10–2,00)
Reflexiones, total/únicas	692.675/32.509	194.037/114.553
Completitud (%) ^a	100 (100)	87,5 (79,5)
I/σ ^a	35,1 (9,5)	10,9 (1,8)
R _{sym} ^b (%) ^a	11,5 (42,8)	5,5 (42,5)
Estadísticas de refinamiento		
Rango de resolución (Å)	23–2,50	30–2,00
R-factor/R _{free} ^c	18,7/21,6	19,6/23,7
Moléculas y átomos refinados		
Cadenas polipeptídicas	2	6
Átomos de proteína	5.422	15.480
PAPU o PALO	2	6
RMSD ^d enlaces(Å)/ángulos(°)	0,011/1,16	0,008/1,01
B-factor promedio (Å ²)		
Proteína	19,8	33,8
PAPU o PALO	11,1	30,2
Ramachandran (fav./all./gen.all./disall.)	93,3/6,1/0/0,7	92,2/7,1/0/0,7

^a Los valores entre paréntesis representan datos para la capa de mayor resolución.

^b $R_{\text{sym}} = \sum I - \langle I \rangle / \sum I$, donde I es la intensidad observada y $\langle I \rangle$ la intensidad promedio.

^c $R\text{-factor} = \sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$, donde $|F_{\text{obs}}|$ y $|F_{\text{calc}}|$ son las amplitudes de los factores de estructura observados y calculados para todas las reflexiones ($R\text{-factor}$), R_{free} , es R basado en el 5% de los datos, utilizado para el test de validación cruzada.

^d RMSD: la raíz cuadrada de la media de la desviación al cuadrado (root mean square deviation).

^e Usando PROCHECK: fav, favorecido; all, permitido; gen,all, generosamente permitido; disall, no permitido.

La estructura de uno de los protómeros encontrados en la unidad asimétrica de PTC-PAPU fue utilizado para conseguir las fases

crystalográficas iniciales del cristal de PTC-PALO. Los datos de difracción del cristal de este último mostraron que pertenecía al sistema cristalino triclínico, con 2 trímeros completos en la unidad asimétrica. En cada uno de los centros activos se encontró una densidad electrónica que correspondía con la forma esperada para una molécula de PALO (Figura 28B).

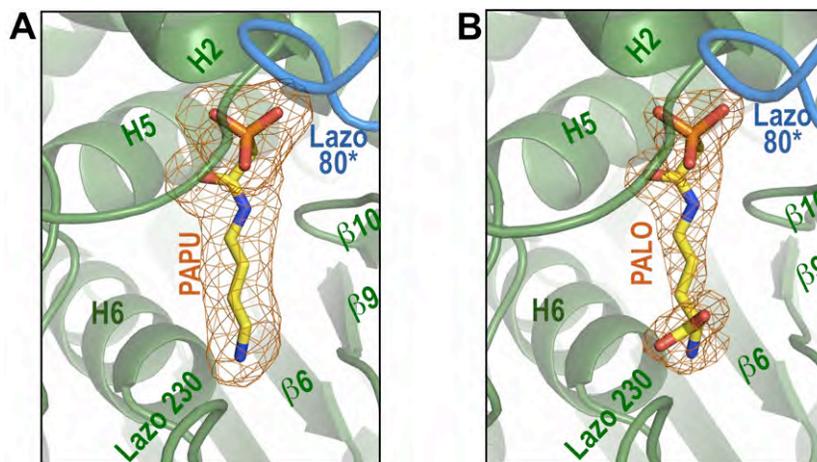


Figura 28. La densidad electrónica de PAPU y PALO unidos a PTC. Detalle del mapa de densidad electrónica (Fo-Fc mapa omit a 2.5σ) de los inhibidores bisustratos PAPU (A) y PALO (B) unidos al centro activo de PTC. El lazo azul y el asterisco denotan elementos de la subunidad vecina.

Tras el trazado y afinamiento, las dos estructuras presentaron excelentes valores para los indicadores de calidad (R_{free}) y buena estereoquímica. Dos residuos, Met-125 y Leu-270, son los únicos con ángulos que corresponden a zonas clasificadas como no permitidos en el gráfico de Ramachandran. Ambos son consistentes en PTC con los residuos correspondientes encontrados constantemente en OTC (Leu-163 y Leu-304 en la OTC humana, hOTC) que están en las mismas zonas del gráfico de Ramachandran de las estructuras de OTC con PALO (Ha y cols., 1997).

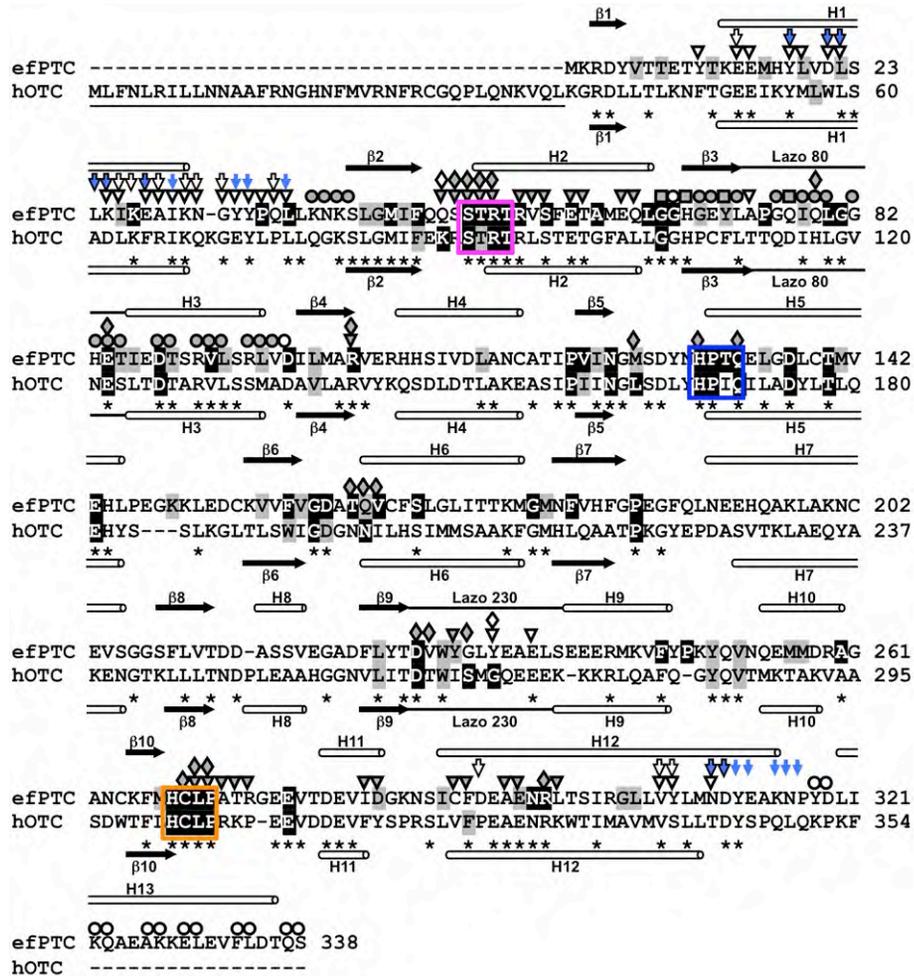


Figura 29. Resumen de rasgos estructurales y de secuencia de la PTC, comparándola con una OTC muy bien caracterizada estructuralmente.

Alineamiento de PTC de *E. faecalis* y OTC humana (efPTC y hOTC, números de acceso de swissprot, Q725C8 y P00480, respectivamente). En esta última se subraya el péptido señal de destino mitocondrial. Los cilindros y las flechas horizontales denotan, respectivamente, las hélices- α y las hebras- β . Los triángulos indican los residuos involucrados en las interacciones de la subunidad seleccionada con el protómero de un lado del trímero y los círculos con los del otro lado, mientras que los cuadrados denotan los residuos que interactúan con ambos protómeros adyacentes. Estos símbolos se muestran vacíos si se trata de interacciones exclusivas de PTC y rellenos si estas interacciones se dan también en la OTC. Los rombos rellenos denotan los residuos que interactúan con los inhibidores PAPU (en PTC) y PALO (en hOTC), mientras que los vacíos muestran interacciones que están presentes sólo en PTC. Las flechas verticales indican los residuos correspondientes a los involucrados

Los inusuales ángulos de torsión de los residuos Met-125 y Leu-270 reflejan una relación con la unión al sustrato, donde la Met-125 está en contacto con la porción hidrofóbica de la porción putrescina del PAPU y la Leu-270 corresponde al motivo HCLP, compartido con OTC (Figura 29), que está implicado en la unión de los sustratos putrescina/ornitina y que interactúa con CP. Los residuos Pro-248 y Pro-271, involucrados en la unión de putrescina, están en conformación cis. El segundo de estos residuos coincide con el residuo equivalente de OTC (Shi y cols., 2000), mientras que el primero de ellos es exclusivo de PTC. Su posición en cis podría resultar previsible dado que está precedido por dos residuos aromáticos [Figura 29, (Frömmel y Preissner, 1990; Yao y cols., 1994)].

en la formación de estructuras supratriméricas en el dodecamero de OTC de *P. aeruginosa* (código PDB 1DHX, flechas con borde negro) y en el hexámero de *L. hilgardii* (2W37, rellenas en azul). Los asteriscos denotan identidad entre las secuencias mostradas. Los residuos blancos sobre fondo negro muestran residuos invariantes entre las PTCs o entre las OTCs, mientras que aquellos con fondo gris son cambios conservadores (D-E, H-K-R, N-Q, S-T-C, L-I-V-M, F-Y-W, A-G) en una u otra familia de transcarbamilasas. Los motivos STRT, HPXQ y HCLP son recuadrados en rosa, verde y naranja, respectivamente. La secuencia del péptido señal de hOTC está subrayada. Los códigos de acceso de UniprotKB de las OTCs comparadas son: P08308, P44770, P21302, P04391, Q8XCB8, Q08016, Q8EVF5, P59779, P96108, P68746, P75473, Q59283, P0A5M9, Q55497, P11724, Q02047, Q43814, Q48296, P96172, P18186, Q51742, P96134, Q5829, P11066, Q00291, P11803, P14995, P05150, P31317, P31326, P11725, P00481 and P00480. Las secuencias de las PTCs alineadas corresponden a los códigos de UniprotKB: Q837U7, C8WMM1, Q8DW19, D2P024, Q03HM9, C0XJB3, E8M734, Q6MSR6, B7S4N1, C9QF99, D0AI19, Q03NG2, C0WN35, Q38ZL1, Q2SRJ4, F8K6E0, Q03HM9 y a los códigos de NCBI: YP_003143629.1, YP_133569.1, YP_001684585.1, YP_001412420.1, ZP_08712612.1, ZP_08723343.1, YP_001412420.1 and YP_003181041.1.

6.1 Estructura del protómero de PTC

Las ocho subunidades encontradas en las unidades asimétricas de los cristales de PTC-PAPU y PTC-PALO son muy similares (rmsd de 0,15-0,54 Å resultante de la superposición de sus C α). Los cambios en los centros activos asociados con la unión de los diferentes inhibidores análogos bisustrato PAPU y PALO fueron los responsables de las mayores diferencias, como veremos más adelante. Todas las subunidades tienen una forma característica y común, consistiendo en un cuerpo hemisférico y una cola que se proyecta a partir de él (Figuras 31 y 32), formada por una hélice C-terminal (hélice 13 o H13, Figuras 29, 30 y 31), que resulta un rasgo característico y exclusivo de las PTCs.

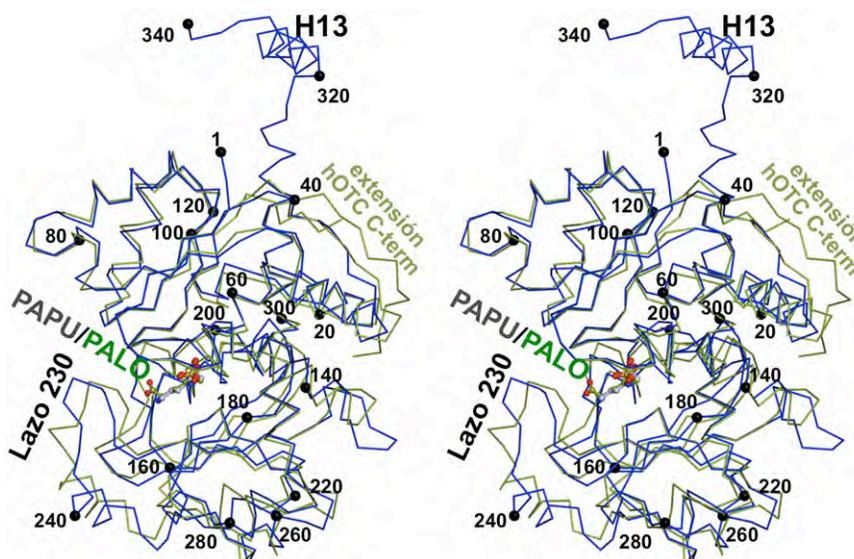


Figura 31. La estructura del protómero de PTC comparada a la de la OTC humana. Superposición (en estereo) del trazado de C α de la subunidad de PTC de *E. faecalis* (azul) con la de hOTC (verde, PDB 10TH). Las esferas negras representan marcas cada veinte residuos. PAPU (átomos de carbono coloreados de gris) y PALO (átomos de carbono coloreados de verde) están representados en bolas y palillos.

El cuerpo de cada protómero presenta el plegamiento característico de las transcarbamilasas, que consiste en dos dominios de tamaño y plegamiento similares: el dominio N-terminal (residuos 1-130 y 301-315) y el dominio C-terminal (residuos 131-296), que se corresponden respectivamente a los dominios polar y ecuatorial de ATC (Kantrowitz y Lipscomb, 1988) y a los dominios CP y ornitina de OTC (Villeret y cols., 1995). Los dominios N- y C-terminales de cada subunidad, conformados por plegamientos tipo emparejado $\alpha\beta\alpha$, tienen una composición $\alpha_3\beta_5\alpha_2$ (N-terminal) y $\alpha_3\beta_5\alpha_4$ (C-terminal) y topologías de hebras- β 1-5-4-2-3 y 8-7-6-9-10, respectivamente (Figura 32).

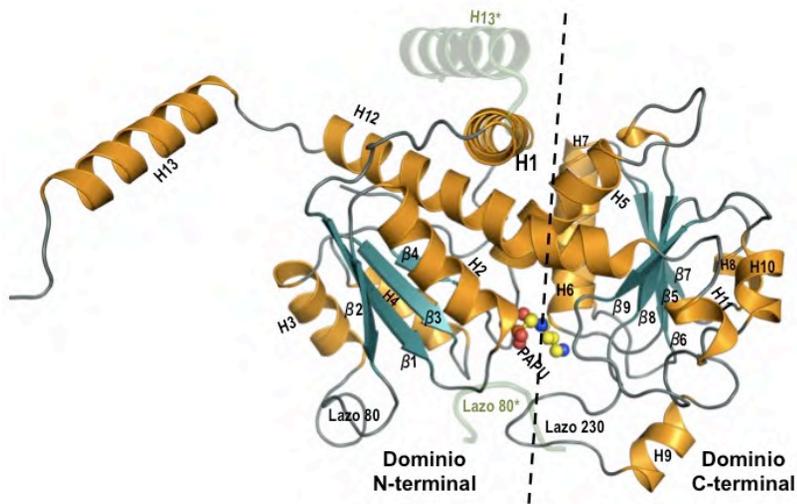


Figura 32. Estructura del protómero de PTC.

Representación de un protómero de PTC formando complejo con PAPU (representado en bolas y palillos) exhibiendo la hélice 13 y el lazo 80 de la subunidad adyacente (en verde semitransparente, marcados con asteriscos). Se señalan los elementos de estructura secundaria; hélices, hebras y lazos son coloreados respectivamente en naranja, turquesa y gris.

Además, están interconectados por las hélices 5 y 12 (Figura 32), que corren en direcciones opuestas entre ambos dominios, aunque la mayor parte

de la hélice 5 puede ser considerada parte del dominio C-terminal y la mayor parte de la hélice 12 del dominio N-terminal (Figura 32).

La cara plana del hemisferio que forma cada protómero aloja el inhibidor análogo bisustrato ubicado en la división entre sus dos dominios (Figura 32). Característicamente en las transcarbamilasas, el extremo C-terminal de las láminas β participa en la formación del centro activo (Figura 32), incluyendo los lazos $\beta 5-\alpha 5$ (residuos 124-130), el lazo 230 (residuos 227-253, que incluye la hélice 9), el lazo $\beta 10-\alpha 11$ (residuos 269-279), y el lazo 80* (residuos 74-85*) de la subunidad vecina (un asterisco indica un elemento de la subunidad adyacente). La aportación del lazo 80* al centro activo de una subunidad por parte de la subunidad vecina implica que las dos subunidades participan en la formación del centro activo, apoyando la observación hecha previamente con ATC, donde se mostraba que la arquitectura trimérica es esencial para la actividad enzimática (Robey y Schachman, 1985).

Aunque la composición, topología e incluso la longitud de los elementos de estructura secundaria de los protómeros de PTC son muy similares a los observados en pfOTC y hOTC (rmsd de 1.27-1.29 Å para 299-300 C α , resultante de la superposición de las subunidades de PTC-PAPU con hOTC-PALO, excluyendo la hélice C-terminal de PTC), es evidente que existen importantes diferencias entre estas enzimas (en la Figura 31 se ilustra la comparación con hOTC), especialmente aquellas que afectan al lazo 230, determinante de la especificidad, y al extremo C-terminal de la subunidad, donde la hélice 12 es 1,5 vueltas más larga en PTC que en cualquiera de las OTCs. La hélice 12 está conectada a través de un lazo de 4 residuos a la ya

mencionada hélice extra C-terminal de 5 vueltas (hélice 13; residuos 319-338, Figura 29). Esta hélice extra es prominente y se orienta formando un ángulo de $\sim 90^\circ$ con la hélice 12, que la precede (Figuras 31 y 32), alejándose de la subunidad de la que proviene y asentándose sobre el protómero vecino, lo que conlleva un aumento de las interacciones entre las subunidades que conforman el trímero. A pesar de que la hOTC también tiene una extensión C-terminal que no está presente en OTCs de bacterias y arqueas (Shi y cols., 1998) (Figura 31), dicha extensión sólo tiene 7 residuos, adopta una estructura de lazo y se asienta sobre la hélice 1 de la misma subunidad. Por el contrario, la extensión de la PTC tiene 25 residuos, forma una hélice y se asienta sobre la subunidad vecina. Sin embargo, estas dos extensiones quizá compartan una misma función, como discutiremos más adelante.

La comparación realizada utilizando PDBeFold [<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/cgi-bin/ssmserver>, (Krissinel y Henrick, 2004)] de la subunidad de PTC con todas las estructuras depositadas en el PDB (Protein Databank, <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>), permitió identificar a las subunidades de pfOTC, de OTC de *Thermotoga maritima* (tmOTC) y de hOTC, (PDBs: 1PVV, 1VLV y 1OTH, respectivamente) como las más similares al protómero de PTC. Esta cercanía con la estructura de las OTCs apoya la hipótesis de que la PTC puede haber evolucionado desde una OTC (Naumoff y cols., 2004a). Estas tres OTCs así como la PTC, carecen de una hélice extra (hélice 9a o 10⁷) que se encuentra en la mayoría de las OTCs bacterianas de tipo- α (Labedan y cols., 1999), como las OTC de *Escherichia coli* (Ha y cols., 1997) y *P. aeruginosa* (Villeret y cols., 1995), dos OTCs

cuyas estructuras están representadas por varios PDBs en la base de datos.

6.2 Estructura del trímero de PTC

Todos los protómeros encontrados en los cristales de PTC forman estructuras triméricas, ya sea con otros protómeros dentro de la unidad asimétrica (PTC-PALO) o generados por simetría cristalográfica (PTC-PAPU). Estos trímeros son esencialmente idénticos entre sí (rmsd para la superposición de sus $C\alpha$, 1.05-1.37 Å). Además, excepto por la presencia de la hélice extra C-terminal, el trímero de PTC se ensambla de una manera muy similar al trímero básico de OTC (Figura 33) (rmsd de 1,31-1,37 Å para 894-900 $C\alpha$ de PTC-PAPU superpuestos con hOTC-PALO, PDB 1OTH).

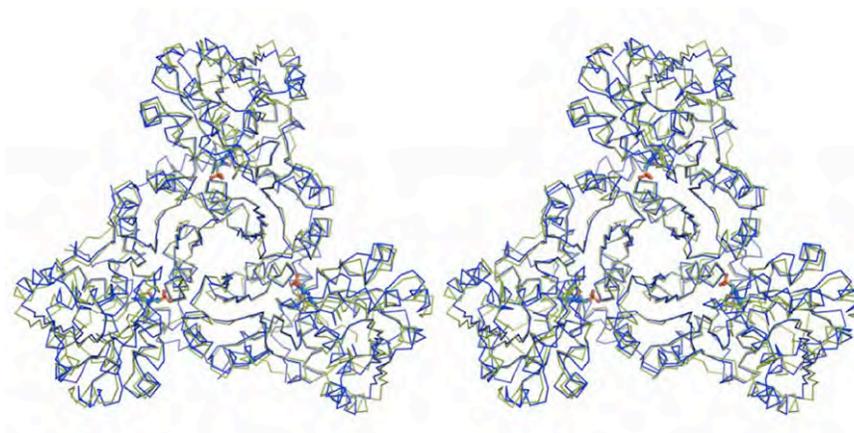


Figura 33. El trímero de la PTC y el de la OTC humana. Vista estéreo a través del eje 3 de la superposición de $C\alpha$ de los trímeros de PTC (azul) y de OTC humana (verde, PDB: 1OTH). PAPU y PALO están representados como bolas y palillos.

Como en el caso de las OTCs, el trímero de PTC tiene una forma similar a un cáliz triangular (Figura 34), con unas dimensiones de ~ 55 Å de profundidad y ~ 50 Å de radio hasta los vértices del triángulo (PTC-PAPU). El

dominio N-terminal está colocado cerca del eje ternario y provee la mayoría de las interacciones entre subunidades (Figuras 34 y 35), excepto las provistas por la hélice 13. El dominio C-terminal ocupa los 3 vértices y sobresale en la cara cóncava del cáliz, que es la que alberga la cara plana de las tres subunidades y por tanto sus centros activos (Figura 35).

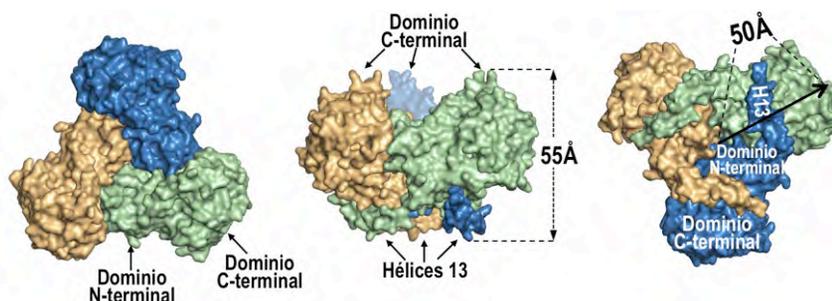


Figura 34. El trímero de PTC y sus dimensiones. Representación de superficie de la cara cóncava (izquierda), vista de lado (centro) y de la cara convexa (derecha) del trímero de PTC.

Las hebras β de los dominios N-terminales adoptan la disposición de una turbina de 3 aspas donde el extremo C-terminal de cada una de las láminas β está dirigido a la cara cóncava del trímero (Figura 35), exponiendo hacia esa cara los lazos conectores β - α , los cuales están involucrados en la unión de los sustratos. De estos lazos, los encontrados entre los elementos β 3- α 3 (residuos 74-85, denominado aquí lazo 80) y β 5- α 5 (residuos 124-130, denominado lazo 120) son particularmente largos frente al resto de los lazos del dominio N-terminal (Figura 32).

Como en el resto de las transcarbamilasas, el dominio C-terminal sobresale en la cara cóncava del trímero, en los vértices del triángulo, con sus láminas β ubicadas de manera paralela a las del dominio N-terminal y separados de ellas por un bastidor de hélices α . Los extremos C-terminales de

estas láminas β están orientadas, nuevamente, hacia la cara cóncava del trímero, exponiendo sus lazos conectores β - α de la misma manera que los elementos del dominio N-terminal. De estos lazos, los más destacados son el que sigue a β_9 (residuos 227-238, llamado aquí lazo 230) y el que sigue a β_{10} (residuos 269-279), ambos estrechamente involucrados en la unión de los sustratos.

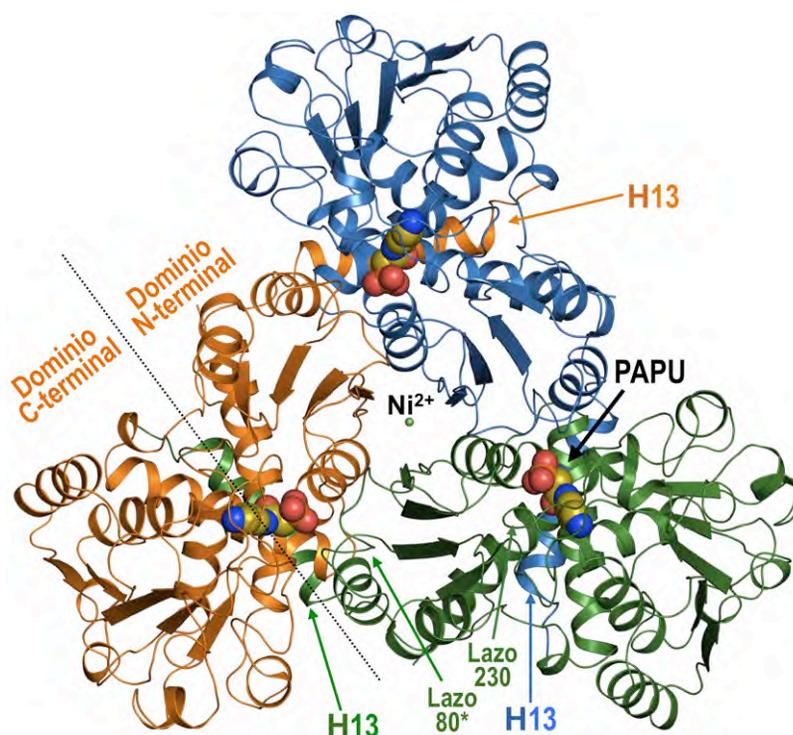


Figura 35. Estructura trimérica de la PTC. Representación del trímero de PTC visto a lo largo del eje 3. En complejo con la proteína se muestra el inhibidor PAPU en representación de esferas. En la subunidad anaranjada los dominios N- y C-terminales se delimitan con una línea discontinua. Se señalan las hélices 13, el ion Ni y los lazos 80 y 230 del protómero verde.

6.3 La unión de un ion metálico a la estructura de PTC

En todos los ejes 3 de los trímeros de los cristales de PTC estudiados en esta tesis fue posible identificar una masa de densidad electrónica compatible con un ion Ni que establece contactos con elementos de la proteína y del solvente (Figuras 35 y 36). Este ion está coordinado octahédricamente por los tres átomos de nitrógeno de His-69, provenientes de las diferentes subunidades que forman el trímero, y por tres átomos de oxígeno de moléculas de solvente fijadas en posiciones similares en las diferentes estructuras cristalinas (Figura 36). La presencia de este ion podría haber derivado de la columna de afinidad utilizada para la purificación de la PTC y que contiene Ni^{2+} . Además, un átomo de Ni^{2+} fue identificado en la posición equivalente del cristal de la OTC catabólica de *Lactobacillus hilgardii* (de Las Rivas y cols., 2009).

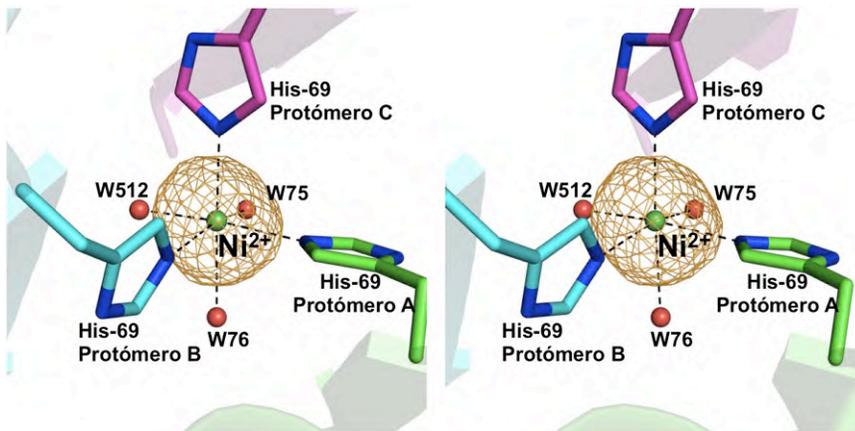


Figura 36. El sitio de coordinación de metales en PTC.

Vista estéreo del mapa de densidad electrónica para el ion de Ni (2.5σ) de uno de los trímeros del cristal PTC-PALO donde, además, se muestran los residuos de histidina y las moléculas de agua que coordinan al ion de Ni.

Dado que la coordinación mostrada por ese ion es octahédrica, y ésta es característica de los metales de transición del grupo II de la tabla periódica, incluyendo el Cd (Rulisek y Vondrasek, 1998), las observaciones de un sitio para un átomo de un metal podrían explicar la capacidad de unión de Cd demostrada previamente para la OTC hepática (Aoki y cols., 1988).

7. El sitio activo de PTC

Una masa alargada de una densidad electrónica no proteica con capacidad para alojar una molécula extendida de PAPU (Figura 28A) se encontró en el surco del centro activo de cada subunidad del complejo cristalino PTC-PAPU. Aunque esta molécula carece del grupo carboxilo del PALO, la molécula de PAPU unida a cada subunidad de PTC exhibe una conformación similar a la observada previamente en la molécula de PALO unida a OTC [código de PDB: 2OTC, (Ha y cols., 1997)]. La estructura de PTC-PAPU debe proveer una imagen cercana a la conformación de la enzima con los dos sustratos unidos en el centro activo (Figura 32). Como era de esperar, la parte de PAPU que imita al CP y la que imita a la putrescina se sitúan respectivamente en los dominios N- (también llamado dominio carbamilsfosfato) y C-terminal (llamado dominio putrescina) de la subunidad, con el grupo fosfonato unido sobre un motivo positivamente cargado que forma una estructura similar a una cúpula, compuesta por el principio de la hélice 2, particularmente por la secuencia invariante ⁵²STRT de unión a CP, y por el grupo guanidinio de la Arg-103 (Figura 37). El motivo ⁵²STRT (que corresponde al motivo ⁹⁰STRT en OTC humana) ha sido previamente

reconocido como el motivo característico de unión a CP en otras transcarbamilasas (Ke y cols., 1988; Shi y cols., 2001; Shi y cols., 2005; Shi y cols., 2006a) e incluye el principio de la hélice 2 y parte del lazo que la precede (Figura 29).

Las cadenas laterales de los residuos Ser-52, Arg-54 y Thr-55 están directamente involucradas en la formación de interacciones con la parte correspondiente al carbamilo fosfato (Figura 37). La disposición espacial específica de estos residuos y la presencia de la carga positiva de la arginina, junto con el dipolo originado por el principio de la hélice 2, hacen de éste un buen sitio para la unión del grupo fosfato del CP (Figura 37), negativamente cargado. El único contacto directo establecido entre la subunidad vecina y el PAPU es un puente de hidrógeno entre el átomo N_{γ} de la Gln-79 y uno de los átomos de oxígeno del grupo fosfonato.

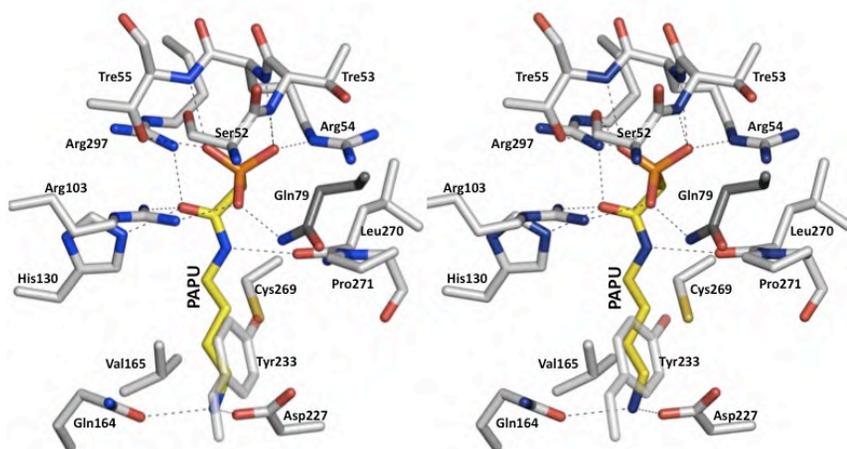


Figura 37. El centro activo de PTC en complejo con PAPU. Vista estéreo del centro activo de PTC (gris) con PAPU (amarillo) unido, representado como palillos. El lazo 80* que participa en la unión de los sustratos y que proviene del protómero vecino se muestra más oscuro.

Una densa red de puentes de hidrógeno conectan los átomos de oxígeno y nitrógeno amídicos de la porción carbamato del PAPU con la proteína, comprendiendo los residuos Arg-103, Arg-297, His-130 y Leu-270 (Figura 37). Estos enlaces parecen ser muy importantes en el proceso catalítico de transferencia del grupo carbamilo (como veremos más adelante).

La porción putrescina de PAPU está emparedada entre el residuo Met-125, el lazo conector de $\beta 5$ - $\alpha 5$ (que contiene el motivo ¹³⁰HPTQ), varios residuos que emergen del dominio C-terminal, particularmente del lazo que conecta $\beta 10$ - $\alpha 11$ (Cys-269, Leu-269 y Pro-270, que pertenecen a la secuencia firma invariante de unión a putrescina/ornitina, ²⁶⁸HCLP en PTC), la región al comienzo de la hélice 6 (Thr-163, Gln-164 y Val-165), y el lazo 230, que contiene la secuencia ²²⁷DVWYGLY (los residuos subrayados interactúan con putrescina).

7.1 La discriminación entre putrescina y ornitina

Las estructuras cristalinas de PTC-PAPU y PTC-PALO han aclarado el modo en que PTC puede discriminar entre ornitina y putrescina. Si bien es evidente que los centros activos de PTC y OTC son muy similares (Figura 38), una de las diferencias más significativas la podemos encontrar a sólo dos posiciones del inicio del motivo STRT, con el reemplazo del residuo de glutamina (Gln-50) en PTC por un residuo de lisina (Lys-88 en hOTC), positivamente cargado y constante en las OTCs (Figuras 38 y 29). Este reemplazo puede afectar la selectividad por el sustrato ya que sería concebible que la lisina encontrada en las OTCs ayude a neutralizar el grupo carboxilato de la ornitina, que está ausente en la putrescina (Figura 38).

Además, el átomo del oxígeno fenólico establece un puente de hidrógeno con el nitrógeno de la cadena lateral de Gln-79* del lazo 80* de la subunidad vecina (Figura 39).

En el complejo PTC-PALO el anillo fenólico de la cadena lateral de Tyr-233 esta alejado de la ornitina e interacciona principalmente con la cadena carbonada de Gln-50 (Figura 39), dejando la porción ornitina de la molécula de PALO expuesta al solvente. Esta pérdida de contactos con la porción hidrocarbonada del sustrato tras la unión de ornitina podría corresponderse con una disminución en la estabilidad del complejo enzima-ornitina y, por tanto, en una disminución de la afinidad por la ornitina, como se refleja en un valor mucho mayor de K_m de PTC para ornitina que para putrescina ($1,4 \pm 0,2$ mM para putrescina y $36,4 \pm 3,5$ mM para ornitina).

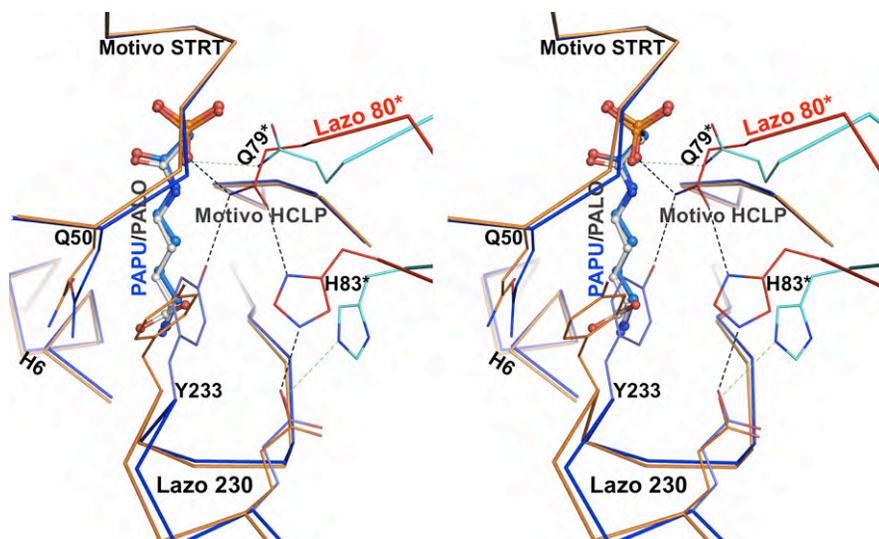


Figura 39. Cambios en el centro activo inducidos por la unión de PALO. Vista estéreo del centro activo de PTC-PAPU (azul) y PTC-PALO (anaranjado). El lazo 80* que participa en la unión de los sustratos y que proviene del protómero vecino se muestra en rojo (PTC-PAPU) y celeste (PTC-PALO). Se muestra la red de puentes de hidrógeno establecida entre el grupo fosfonato y los residuos Tyr-233, Gln-79, His-83 y Glu-236.

El cambio en la posición del residuo Tyr-233 del complejo PTC-PALO también puede explicar la importante disminución de la k_{cat} de la PTC para ornitina (Wargnies y cols., 1979), ya que se observa la ausencia del enlace de hidrógeno establecido entre el oxígeno fenólico de Tyr-233 y Gln-79* además de un cambio en la posición de Gln-79* y del lazo 80* (Figuras 39 y 40). El residuo Gln-79* es crucial para el establecimiento de la cúpula formada por los lazos 80* y 230 sobre el sitio activo (Figura 40), que cubre el sustrato unido y que debe abrirse y cerrarse en cada ciclo catalítico para permitir el acceso y la liberación de productos y sustratos. Los movimientos de apertura y cierre de esta cúpula posiblemente sean sincronizados por la formación del puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno de la cadena lateral de Gln-79* y un átomo de oxígeno del fosfato de PAPU y, por lo tanto, del CP (Figuras 39 y 40). De hecho, éste es el único puente de hidrógeno establecido entre una subunidad de PTC y el sustrato unido al centro activo de la subunidad vecina, centro activo que, como ocurre en otras transcarbamilasas, implica dos subunidades (Figura 38). Además, la rotura de este enlace resulta en la pérdida de un segundo puente de hidrógeno que une la Gln-79* con la His-83* (ambas del mismo lazo 80 de la subunidad vecina) (Figura 40), que deriva en la desaparición de la interacción entre el anillo imidazólico de His-83* y el grupo carboxilato de la cadena lateral de Glu-236, que pertenece al lazo 230 de la subunidad que contiene el centro activo (Figura 40).

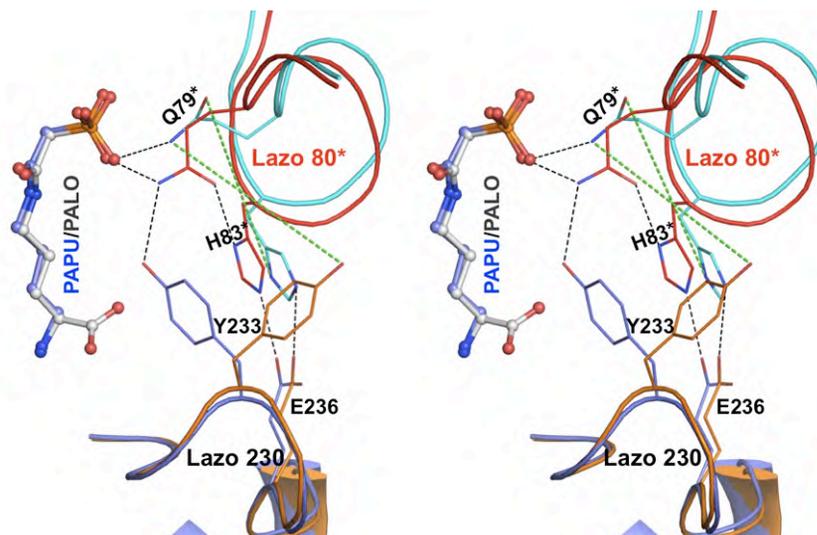


Figura 40. Los enlaces que estabilizan la formación de la cúpula del centro activo de la PTC.

Vista estéreo de la cúpula del centro activo de PTC-PAPU (azul) y PTC-PALO (anaranjado), con los lazos representados en cintas y los residuos que estabilizan la posición cerrada en representación de palillos. El lazo 80* que proviene del protómero vecino se muestran en rojo (PTC-PAPU) y celeste (PTC-PALO). En negro se muestran los enlaces de hidrógeno entre el grupo fosfonato y los residuos Tyr-233, Gln-79, His-83 y Glu-236. Los puentes de hidrógeno que están presentes en PTC-PAPU, pero no en PTC-PALO, han sido coloreados en verde. Los inhibidores PAPU y PALO se muestran en bolas y palillos.

La rotura de los contactos que estabilizan la cúpula que cubre el centro activo (Figura 40), podría ser perjudicial para la actividad enzimática si la catálisis requiere el confinamiento de los sustratos, dando lugar a que la molécula de ornitina escape antes de que ocurra la reacción. La rotura de esta extensa red de enlaces de hidrógeno podría ser la causa de que, de las seis subunidades encontradas en la unidad asimétrica del cristal del complejo PTC-PALO, la densidad electrónica del lazo 80* sea visible sólo en tres y la del lazo 230 sea invisible en dos, indicando la movilidad de estos lazos y reflejando el efecto destabilizador provocado por el establecimiento de un rotámero inadecuado de Tyr-233 aparejado a la unión de una molécula de

ornitina (Figura 39).

Por otro lado, ambas subunidades encontradas en la unidad asimétrica del cristal de PTC-PAPU tienen los lazos y la cúpula del centro activo bien conformados cubriendo al inhibidor bisustrato PAPU y aislándolo del solvente. En consecuencia, es posible que el tiempo de permanencia de los sustratos en el centro activo determine la probabilidad de que la reacción se lleve a cabo. La rotura o apertura de la cúpula en el complejo con ornitina acortaría el tiempo de residencia de los sustratos y reduciría la V_{\max} con ornitina, como se ha observado experimentalmente ($813 \pm 38 \text{ U mg}^{-1}$ para putrescina y $24 \pm 1 \text{ U mg}^{-1}$ para ornitina).

7.2 Ingeniería del lazo 230 de la PTC para favorecer el uso de ornitina

Como se explicó previamente, la estructura del complejo PTC-PALO en comparación con la de PTC-PAPU puso en evidencia la importancia del lazo 230 en la selección y unión del sustrato de la PTC, especialmente en relación con el residuo Tyr-233 (Figura 39). Sin embargo, en la comparación entre la PTC y la hOTC se hizo evidente que los cambios en este lazo no se limitan al residuo Met-268 de la hOTC que contacta con la misma porción del sustrato que Tyr-233 de la PTC (Figura 38), sino que gran parte de los lazos de ambas enzimas adoptan conformaciones diferentes en uno u otro caso (Figura 38).

Por ello decidimos comprobar la importancia de la secuencia ²³⁰YGLY en la selectividad para putrescina reemplazándola por la secuencia contraparte de la OTC de *E. faecalis*, VSMG. La variante modificada de la

enzima se produjo y purificó como la enzima silvestre. En los ensayos de actividad, la enzima modificada mostró una disminución drástica en su actividad con putrescina (Figura 41). Este descenso se debió a una fuerte reducción en la velocidad a saturación de putrescina (de $813 \pm 38 \text{ U mg}^{-1}$ a $1,13 \pm 0,13 \text{ U mg}^{-1}$, Figura 41) junto con un aumento de ~ 20 veces de la K_m aparente para putrescina (de $1,41 \pm 0,22 \text{ mM}$ a $32,9 \pm 8,8 \text{ mM}$, Figura 41), poniendo de manifiesto la importancia del lazo 230 para la unión de putrescina y como determinante de la velocidad de reacción. En contraste con este empeoramiento de la capacidad para utilizar putrescina, la enzima modificada fue más rápida en la catálisis de la carbamilación de ornitina en relación a la PTC silvestre, con un aumento de 3,5 veces en la velocidad a saturación de ornitina (desde $24 \pm 1 \text{ U mg}^{-1}$ para la PTC silvestre, a $82 \pm 3 \text{ U mg}^{-1}$ para la enzima modificada), aunque sin disminución significativa de la K_m aparente para ornitina (desde $36,4 \pm 3,5 \text{ mM}$ a $32,0 \pm 2,0 \text{ mM}$) (Figura 41). En resumen, este cambio en el lazo 230 disminuye la eficiencia catalítica (V_{\max}/K_m) de la enzima para putrescina desde un valor de $577 \text{ U mg}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ a $0,03 \text{ U mg}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, mientras que aumenta la eficiencia catalítica para ornitina desde un valor de $0,67 \text{ U mg}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ a $2,6 \text{ U mg}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, convirtiendo la enzima en una mejor ornitina transcarbamilasa que putrescina transcarbamilasa y confirmando la importancia del lazo 230 en la discriminación entre putrescina y ornitina.

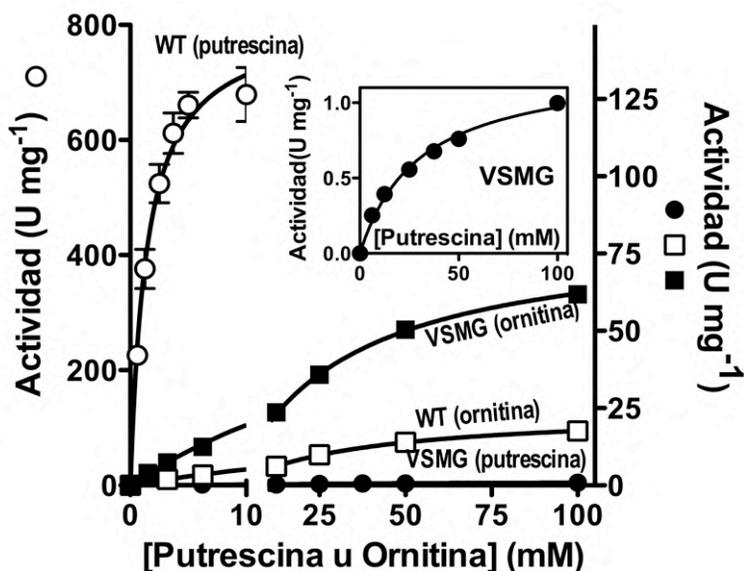


Figura 41. Efecto del reemplazo del lazo 230 de PTC por el de OTC en la actividad de PTC.

Se muestra la actividad de PTC silvestre (en el gráfico: WT, signos vacíos) y de la modificada en el lazo 230, mutante YGLY>VSMG (en el gráfico VSMG, signos rellenos) a diferentes concentraciones de putrescina (círculos) y ornitina (cuadrados). En el inserto se muestra nuevamente la actividad de la enzima modificada (YGLY>VSMG) con putrescina, con una escala que permite verificar la forma de la curva.

7.3 Estructura de PTC con el lazo 230 modificado (²³⁰YGLY>VSMG) formando un complejo con PALO

Para intentar comprender cómo ²³⁰YGLY>VSMG influye en la especificidad de sustrato de la enzima decidimos obtener la estructura cristalina de la variante ²³⁰YGLY>VSMG en complejo con el inhibidor análogo bisustrato de la reacción con ornitina, PALO. El cristal PTC-YGLY>VSMG-PALO que mejor difractó los rayos X lo hizo hasta una resolución de 3,1 Å, perteneciendo al grupo espacial C2, con 2 trímeros completos en la unidad asimétrica y con una molécula de PALO en cada uno de los centros activos (Tabla 2). El reemplazo molecular se realizó utilizando

un protómero del cristal PTC-PALO sin parte del lazo 230 (residuos 227 a 243). Tras el afinamiento y trazado se obtuvo un modelo con excelentes valores de geometría (Tabla 2), observándose, como en el resto de los casos, los dos residuos ubicados fuera de las zonas de aceptación del gráfico de Ramachandran, Met-125 y Leu-270.

Los protómeros del cristal PTC-YGLY>VSMG-PALO son esencialmente idénticos a los de PTC-PALO, lo que se refleja en valores de rmsd de 0,44-0,57 para 314-331 C α , donde las diferencias más importantes se observaron en los lazos 230, con distintas conformaciones (Figura 42A).

La comparación del protómero de PTC-²³⁰YGLY>VSMG-PALO con la estructura de la OTC humana reveló que el lazo 230 adopta una conformación que se asemeja a la del lazo SMG de esta enzima (Figura 42B), incluyendo el ajuste de la cadena carbonada de la porción ornitina de PALO por parte de la cadena lateral de la Met-232, la formación del puente de hidrógeno observado en OTC entre el grupo amino de la Met-232 con uno de los átomos de oxígeno del grupo carboxilo de la ornitina (Figura 42C), y el puente de hidrógeno de la cadena lateral de Ser-231 con el grupo amino de PALO que ancla el lazo SMG al sustrato (Figura 42C), lo que podría resultar en la ubicación correcta de ornitina explicando su uso más eficiente como sustrato en comparación con el de putrescina.

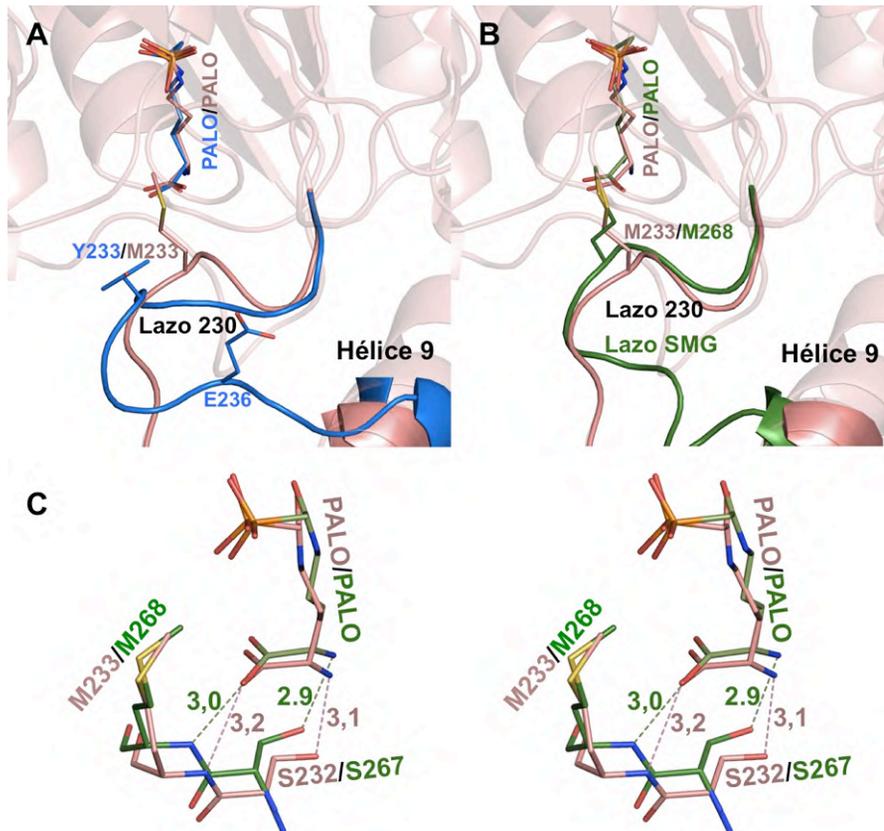


Figura 42. Conformación del lazo 230 del mutante de PTC YGLY>VSMG. Comparación de los lazos 230 de un protómero de PTC-PALO (azul) con uno del mutante YGLY>VSMG-PALO (rosa) en (A) y de uno de PTC-YGLY>VSMG-PALO con el lazo SMG de la OTC humana unida a PALO (10TH, verde) en (B). Se muestran las moléculas de PAPU, PALO y las cadenas laterales de Met-268 (OTC humana), Met-232 (YGLY>VSMG), Tyr-233 y Glu-236 (ambas en PTC silvestre) como palillos. (C) Vista estéreo de los residuos del lazo 230 del mutante PTC-YGLY>VSMG (rosa) o de la OTC humana (verde) que contactan con el inhibidor PALO. Las líneas discontinuas señalan los puentes de hidrógeno entre la proteína y el inhibidor, con la distancia en Å.

Tabla 2. Estadísticas de la estructura y los datos de rayos X del cristal de la mutante ²³⁰YGLY>VSMG de PTC.

²³⁰ YGLY>VSMG +PALO	
Recolección de datos	
Línea del sincrotrón ESRF	ID29
Longitud de onda (Å)	0,972
Grupo espacial	C2
Celda Unidad a, b, c (Å)	159,5, 128,5, 97,5
α, β, γ (°)	90, 108, 90
Rango de resolución (Å) ^a	30–3,10 (3,27–3,10)
Reflexiones, total/únicas	109.781/33.535
Complejitud (%) ^a	98,7 (97,8)
I/σ ^a	4,6 (1,7)
R _{sym} ^b (%) ^a	15,7 (43,6)
Estadísticas de refinamiento	
Rango de resolución (Å)	30–3,10
R-factor/R _{free} ^c	22,6/25,0
Moléculas y átomos refinados	
Cadenas polipeptídicas	6
Átomos de proteína	15.663
PALO	6
RMSD ^d enlaces(Å)/ángulos(°)	0,007/1,02
B-factor promedio (Å ²)	
Proteína	36,5
PALO	22,5
Ramachandran ^e (%) (fav./all./gen.all./disall.)	91,4/7,9/0/0,7

^a Los valores entre paréntesis representan datos para la capa de mayor resolución.

^b $R_{sym} = \sum I - \langle I \rangle / \sum I$, donde I es la intensidad observada y $\langle I \rangle$ la intensidad promedio.

^c $R\text{-factor} = \sum_h ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum_h |F_{obs}|$, donde $|F_{obs}|$ y $|F_{calc}|$ son las amplitudes de los factores de estructura observados y calculados para todas las reflexiones (R -factor), R_{free} , es R basado en el 5% de los datos, utilizado para el test de validación cruzada.

^d RMSD: la raíz cuadrada de la media de la desviación al cuadrado (root mean square deviation).

^e Usando PROCHECK: fav, favorecido; all, permitido; gen,all, generosamente permitido; disall, no permitido.

8. El papel de la hélice C-terminal exclusiva de PTC

En PTC, la hélice 1 no está expuesta en la superficie de la subunidad como en otras transcarbamilasas (Figura 43), sino que está cubierta por la ya mencionada hélice C-terminal (hélice 13, Figura 32). Esta hélice, que se proyecta desde una subunidad apoyándose sobre otra subunidad vecina en sentido anti-horario (mirando a los largo del eje 3 a la cara convexa del trímero, Figura 34, panel derecho), marca, en esta última subunidad, la división entre dominios, extendiéndose de forma casi-antiparalela a la hélice 1 sobre la que forma una cresta prominente que rodea el eje 3 y se ubica en la cara convexa del trímero (Figura 34, paneles central y derecho). En la superficie, esta hélice oculta $\sim 740 \text{ \AA}^2$ de la subunidad vecina.

La comparación con otras secuencias de PTC anotadas en las bases de datos (UniProt, <http://www.uniprot.org/>; NCBI Protein, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) revela la presencia de una hélice C-terminal equivalente a la hélice 13 encontrada en la PTC de *E. faecalis* (Figura 44), para las cuales los programas de predicción de estructura secundaria [Jpred3, <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>; SOPMA (Combet y cols., 2000); PredictProtein, <http://www.predictprotein.org/>; PSIPRED (Buchan y cols., 2010)] pronostican la formación de una hélice α (Figura 44). Además, esta extensión comparte una secuencia constante, aunque débilmente diagnóstica, ³³⁰(L/f/v/i/m)XX(F/Y/L/M/v)(L/i/m) (las letras mayúsculas indican predominancia, las minúsculas presencia con menor frecuencia; una X, cualquier residuo; la numeración corresponde a la secuencia de PTC de *E.*

faecalis) (Figura 44). De esta manera, la hélice 13 aparece como un rasgo prominente, constante, característico y exclusivo de las PTCs.

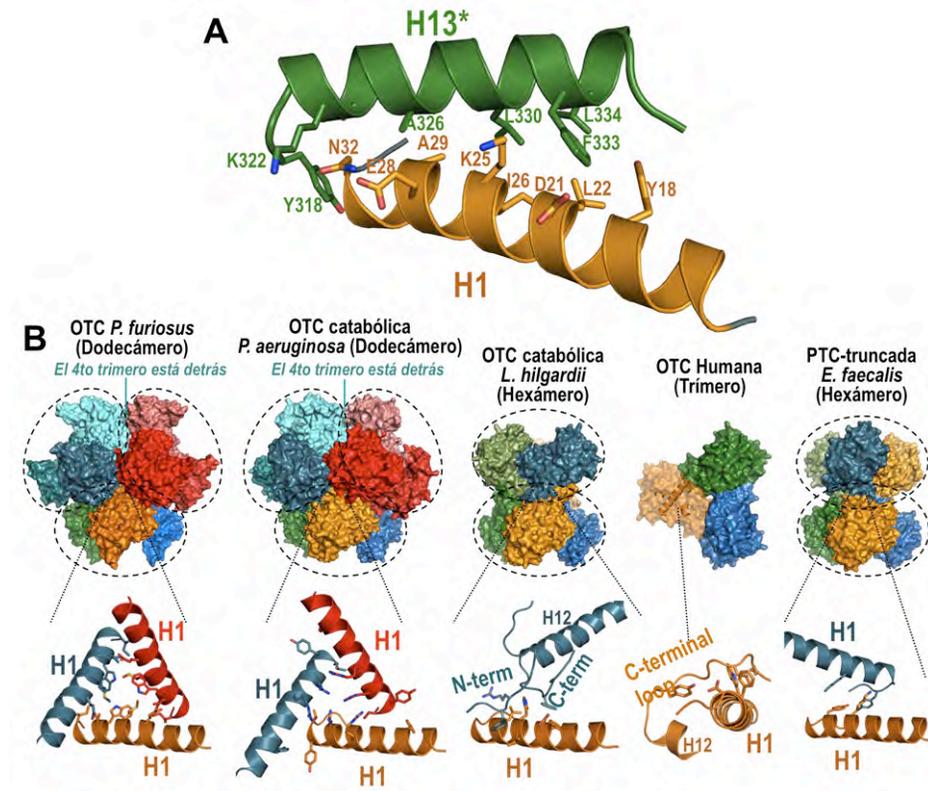


Figura 43. Estructura trimérica y supratrimérica de PTC y OTCs.

(A) Representación de cintas de las hélices 1 (en anaranjado) y 13* (en verde oscuro) mostrando los residuos involucrados en los contactos entre estas hélices. (B) Estructura oligoméricas de (de izquierda a derecha): pOTC (PDB file 1PVV), OTC de *Pseudomonas aeruginosa* (1DXH), OTC de *Lactobacillus hilgardii* (2W37), hOTC (2OTH) y PTC-truncada de *E. faecalis*. Para cada estructura se expone el ensamblaje biológico (arriba), con cada uno de los trímeros enmarcado con línea discontinua, y el detalle de los contactos involucrando la hélice 1 (abajo). La superficie de la subunidad anaranjada en hOTC y la hélice 1 es mostrada en cinta. El código de colores para las hélices mostradas en la parte inferior corresponde a las subunidades involucradas en las interacciones mostradas.

La falta de conservación de secuencia (Figura 44) apoya la idea de que la hélice 13 no está involucrada en la unión de los sustratos o en la catálisis, lo que además concuerda con la localización remota de esta hélice respecto al centro activo, que está ubicado en el lado opuesto del trímero. El hecho de que tres residuos identificados de la secuencia característica de esta hélice (Figura 44) tengan una cadena lateral hidrofóbica y estén implicados en la interacción con la hélice 1 de la subunidad adyacente (Figura 29), y las extensas interacciones de esta hélice con la subunidad vecina que representan una contribución de $\sim 740 \text{ \AA}^2$ por subunidad de superficie cubierta por la hélice, son indicadores importantes de que esta hélice debe colaborar en la estabilidad del trímero de PTC, a pesar que, sin la hélice 13, las OTCs forman trímeros estables que tienen interfases entre subunidades similares en extensión a la de la PTC cuando no se tiene en cuenta la contribución de la hélice 13 ($\sim 2300 \text{ \AA}^2$ y $\sim 2500 \text{ \AA}^2$ de superficie cubierta por monómero en hOTC y efPTC respectivamente sin incluir en la PTC la hélice C-terminal). Además, el servidor PISA [http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver, (Krissinel y Henrick, 2007)] calcula un coste energético mucho mayor para la disociación de los monómeros del trímero de PTC ($\Delta G = 59 \text{ kcal/mol}$) que del trímero de PTC sin la hélice 13 ($14,6 \text{ kcal/mol}$) o que el trímero de hOTC ($26,4 \text{ kcal/mol}$), que no tiene hélice C-terminal.



Figura 44. La extensión C-terminal exclusiva de PTC.

Alineamiento de secuencia de la porción C-terminal de algunas OTCs con estructura cristalina conocida y de PTCs conocidas o identificadas en las bases de datos (anotadas como tales en las UniProt y NCBI Protein). Las letras de color rojo representan la secuencia diagnóstica identificada en la hélice 13. Las secuencias subrayadas corresponden a las α -hélices observadas (OTCs y PTC de *E. faecalis*) o predichas (el resto de las PTCs). Las predicciones de estructura secundaria fueron realizadas con SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html). Los códigos de PDB para las OTCs son los siguientes: OTC humana, 1OTH; *Ovis aries*, 1FB5; *Coccidioides immitis*, 3SDS; *P. furiosus*, 1PVV; *Mycobacterium tuberculosis*, 2I6U; *Gloeobacter violaceus*, 3GD5; *Thermus thermophilus*, 2EF0; *Giardia lamblia*, 3GRF; *E. coli*, forma I, 2OTC; *P. aeruginosa*, 1DXH; *L. hildgardii*, 2W37; *Thermotoga maritima*, 1VLV; *Campylobacter jejuni*, 3TPF. Para las PTCs, los códigos de las bases de datos UniProt or NCBI son los siguientes: *E. faecalis*, Q837U7; *Eggerthella lenta*, C8WMM1; *S. mutans*, Q8DW19; *L. monocytogenes*, D2P024; *Pediococcus pentosaceus*, Q03HM9; *L. hildgardii*, C0XJB3; *Vibrio sinaloensis*, E8M734; *Mycoplasma mycoides*, Q6MSR6; *Slackia heliotrinireducens*, YP_003143629.1; *Photobacterium profundum*, YP_133569.1; *Caulobacter sp.*, YP_001684585.1; *Parvibaculum lavamentivorans*, YP_001412420.1.

8.1 Efecto de la supresión de la hélice 13

Para evaluar experimentalmente la importancia de la hélice 13 para la estabilidad del trímero, decidimos deletarla. Para poder prescindir de dicha hélice y mantener la facilidad de la purificación por afinidad a una columna de

Ni²⁺, la proteína fue re-clonada con una etiqueta de seis His en el extremo N-terminal, insertando el gen (aminoácidos 1 al 317) en el plásmido de expresión pNIC28-BSA4, de modo que resultara truncada en el aminoácido 318, ocupado por un codón de parada. La proteína truncada justo antes del comienzo de la hélice 13 de la proteína silvestre (Figura 43) fue co-expresada en forma soluble en *E. coli* gracias a la coexpresión de las chaperonas GroES/L [codificadas por el vector plasmídico pGroESL (Goloubinoff y cols., 1989), provisto por A. E. Gatenby, de DuPont de Nemours, Wilmington, Delaware] y fue purificada por afinidad a una columna de Ni²⁺ en un solo paso (Figura 45).

La actividad de la PTC truncada (llamada aquí PTC truncada) fue muy similar a la de la PTC silvestre ($619 \pm 42 \text{ U mg}^{-1}$, comparado con $670 \pm 68 \text{ U mg}^{-1}$ para PTC silvestre), lo que demuestra que la enzima purificada no disocia masivamente en monómeros, ya que los monómeros no son activos, estando de acuerdo con la observación de que la hélice 13 no está implicada en la unión a los sustratos ni en la catálisis. Los resultados de los estudios de filtración en gel mostraron que una pequeña fracción de la enzima es monomérica en solución (Figura 45), confirmando una disminución en la estabilidad de los trímeros, mientras que la mayoría de la proteína purificada mostró, sorprendentemente, una masa que excedía la observada con PTC silvestre (trimérica), y que se correspondía con la posición esperada para un hexámero (Figura 45).

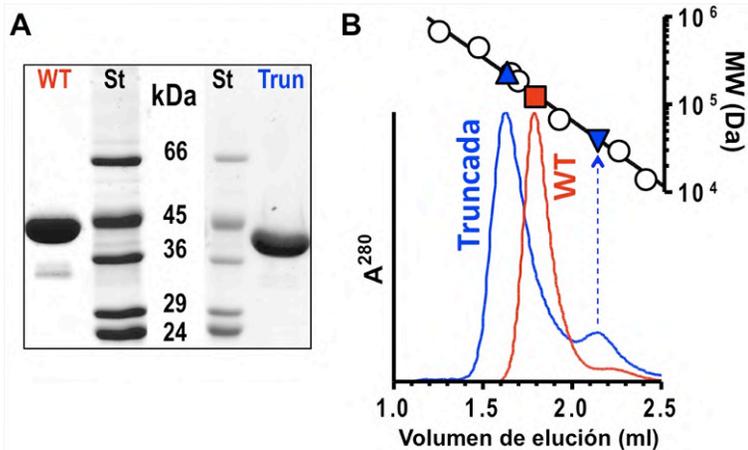


Figura 45. Preparación y estudios de agregación supratrimérica de la PTC-truncada. (A) SDS-PAGE (12%) teñido con Coomassie de PTC silvestre (WT) y PTC-truncada (Trun), junto con marcadores de proteínas (St, dando su masa en kDa). (B) Investigación del estado oligomérico de PTC de *E. faecalis* silvestre y truncada usando filtración en gel. En la parte inferior se representa el perfil de elución de la PTC silvestre (WT, rojo) o truncada (azul), como absorbancia a 280 nm en cromatografía de filtración en gel con una columna Superdex 200HR 5/150. Arriba se muestra un gráfico semilogarítmico de la masa molecular (MW) frente al volumen de elución. Se representan los picos observados de: PTC silvestre como un cuadrado rojo, ubicado para la masa exacta del trímero (120,3 kDa); de los picos mayor (triángulo azul) y menor (triángulo invertido azul) de la PTC-truncada correspondiendo a la masa exacta su hexámero (230 kDa) y su monómero (38,3 kDa). Los triángulos abiertos corresponden a las siguientes proteínas estándar (masas en kDa entre paréntesis): tiroglobulina (669), ferritina (440), β -amilasa (224), acetilglutamato quinasa de *Thermotoga maritima* (182), seralbúmina bovina (66), anhidrasa carbónica (29) y ribonucleasa (13,7).

Por tanto, esta hélice extra parece estar involucrada en prevenir la asociación de trímeros a arquitecturas supratriméricas. Es interesante notar que tal asociación sucede en muchas OTCs (Figura 43) que se asocian en arquitecturas supratriméricas, donde la hélice 1, la misma hélice que es ocultada por la hélice 13, está involucrada centralmente en los contactos que median la formación de estas estructuras supratriméricas (Villeret y cols., 1998). Representan algunos ejemplo claros de este mecanismo de asociación entre trímeros la pOTC, la cual tiene una estructura dodecamérica formada

por un tetrámero de trímeros (Figura 43B, panel izquierdo), y las OTCs catabólicas de *Pseudomonas aeruginosa* [también un dodecámero, Figura 43B, segundo panel desde la izquierda, (Villeret y cols., 1995)] y de *L. hilgardii* [un hexámero, Figura 43B, panel central, (de Las Rivas y cols., 2009)]. Aunque el significado de la arquitectura de las estructuras supratriméricas no está claro, éstas son usuales entre las OTCs implicadas en vías catabólicas como la que contiene a la PTC. De este modo, si PTC evolucionó de una OTC catabólica que tenía una arquitectura supratrimérica, la hélice 13 podría haber sido reclutada para prevenir las interacciones intertriméricas, previniendo la interacción con un trímero adyacente.

8.2 Estructura de la PTC truncada

Para comprobar el papel que podría tener la hélice 13 en la prevención de la supratrimerización, determinamos la estructura cristalina de la enzima truncada. Se obtuvo un cristal de la enzima truncada, en una solución conteniendo PALO, que difractó rayos X hasta 1.6 Å, perteneciente al grupo espacial P6₃22 (Tabla 3). Las fases fueron obtenidas por la técnica de reemplazo molecular, que se llevó a cabo usando como modelo el monómero de PTC-PALO al que se le quitó la hélice 13. Sólo se encontró un protómero en la unidad asimétrica, que generó un hexámero al aplicar la simetría cristalográfica. Desde las primeras etapas del trazado y afinamiento se hizo evidente que el centro activo del protómero contenía una molécula de PALO que estaba unida como en los centros activos de los protómeros del cristal PTC-PALO. La estructura final se obtuvo a 1,6 Å de resolución.

Tabla 3. Estadísticas de la estructura y datos de rayos X de PTC carente de la hélice C-terminal.

	PTC-truncada +PALO
Recolección de datos	
Línea del sincrotrón ESRF	ID14-4
Longitud de onda (Å)	0,979
Grupo espacial	P6 ₃ 22
Celda Unidad a, b, c (Å)	90,0, 90,0, 184,3
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Rango de resolución (Å) ^a	40-1,59 (1,67-1,59)
Reflexiones, total/únicas	611,850/60,518
Compleitud (%) ^a	100 (99,8)
I/σ ^a	5,7 (2,1)
R _{sym} ^b (%) ^a	8,2 (36,6)
Estadísticas de refinamiento	
Rango de resolución (Å)	30-1,59
R-factor/R _{free} ^c	16,2/18,0
Moléculas y átomos refinados	
Cadenas polipeptídicas	1
Átomos de proteína	2,446
PALO	1
RMSD ^d enlaces(Å)/ángulos(°)	0,007/1,13
B-factor promedio (Å ²)	
Proteína	12,7
PALO	8,5
Ramachandran (fav./all./gen.all./disall.)	92,9/6,4/0/0,7

^a Los valores entre paréntesis representan datos para la capa de mayor resolución.

^b $R_{sym} = \Sigma I - \langle I \rangle / \Sigma I$, donde I es la intensidad observada y $\langle I \rangle$ la intensidad promedio.

^c $R\text{-factor} = \Sigma_h ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \Sigma_h |F_{obs}|$, donde $|F_{obs}|$ y $|F_{calc}|$ son las amplitudes de los factores de estructura observados y calculados para todas las reflexiones ($R\text{-factor}$), R_{free} , es R basado en el 5% de los datos, utilizado para el test de validación cruzada.

^d RMSD: la raíz cuadrada de la media de la desviación al cuadrado (root mean square deviation).

^e Usando PROCHECK: fav, favorecido; all, permitido; gen,all, generosamente permitido; disall, no permitido.

El hexámero está formado por la dimerización de dos trímeros (Figura 43B, panel derecho y Figura 46), cada uno de los cuales es muy similar a los encontrados en cualquiera de los otros cristales de PTC. Esta dimerización sucede como resultado de interacciones intertriméricas que involucran la región que sería inaccesible en presencia de la hélice 13 (Figura 46B), lo que confirma el papel de la hélice extra C-terminal de PTC silvestre en la prevención de estructuras supratriméricas.

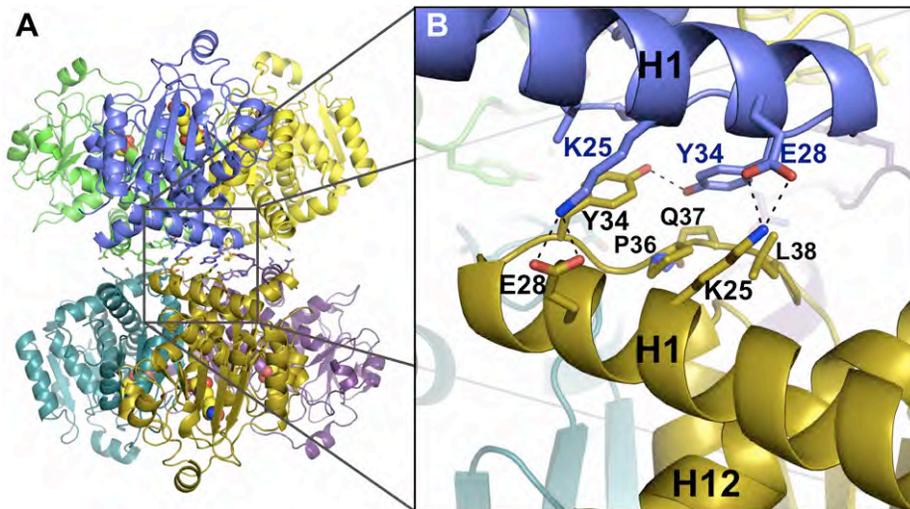


Figura 46. Estructura hexamérica de la PTC truncada.

(A) Representación de cintas del hexámero de la PTC truncada, con un trímero arriba y otro abajo, y cada subunidad en un color diferente. La parte cóncava de los trímeros mira afuera, mediándose la interacción entre ambos trímeros por la parte convexa, y en particular entre las hélices 1 de ambos. (B) Detalle de las hélices 1 de dos protómeros (en amarillo y azul) involucrados en la dimerización de los trímeros en el hexámero de la PTC truncada mostrando los residuos que participan en la interacción. El código de colores para las hélices corresponde a las subunidades involucradas en las interacciones señaladas. Las líneas discontinuas denotan puentes de hidrógeno.

9. Una firma diagnóstica simple para la identificación de PTCs por secuencia

Durante muchos años los genes para PTC no podían ser diferenciados de los genes de las OTCs en las bases de datos genómicos. Sin embargo, una revisión de los datos bibliográficos llevó al redescubrimiento (Naumoff y cols., 2004a) de la secuencia N-terminal de la PTC de *E. faecalis* (Tricot y cols., 1989), permitiendo la identificación del gen de PTC en ese organismo y, por alineamiento de secuencia, el de otros organismos (Naumoff y cols., 2004a; Naumoff y cols., 2004b). A partir de la comparación de estas secuencias se identificaron 5 largos motivos propuestos como característicos de las PTCs (Naumoff y cols., 2004a). Usando la información estructural nosotros hemos podido aportar secuencias firma simplificadas. Las secuencias de PTC pueden ser reconocidas inicialmente en base a que poseen dos motivos invariantes, ⁵²STRT y ²⁶⁸HCLP, respectivamente, de unión a CP y ornitina/putrescina, que son compartidas con las OTCs. Además, con la comparación de las secuencias se hace evidente la ausencia en la PTC de un residuo de lisina que es constante en las OTCs, dos posiciones antes del motivo ⁵²STRT, y que parece estar involucrado en las OTCs en la formación de un par iónico con el grupo carboxilato de ornitina, grupo ausente en la putrescina.

Por otro lado, aproximadamente 40 residuos antes de la secuencia invariante HCLP se encuentra en las OTCs la secuencia XSMG, que es característica e invariante y que da nombre al lazo SMG de estas enzimas, pero que es reemplazada en las PTCs por la secuencia del lazo 230,

determinante de la especificidad, con secuencia ²³⁰(Y/W)(G/W)(V/L/I)X. Además, un rasgo característico de las PTCs que permite diferenciarlas de las OTCs ha sido aportado por el descubrimiento de la extensión de ~20 residuos encontrada en el extremo C-terminal cuando la secuencia es alineada con una OTC, y por el hallazgo en esta extensión de la secuencia mencionada más arriba, encontrada en la hélice C-terminal, ³³⁰(L/f/v/i)XX(F/Y/L/ M/v)(L/i/m).

10. Mecanismo catalítico de la PTC

El mecanismo catalítico de otras transcarbamilasas ha sido estudiado en detalle (Shi y cols., 2006b; Sankaranarayanan y cols., 2008; Lipscomb y Kantrowitz, 2012) y parece común para todas ellas. Sin embargo, aunque la reacción catalizada por la PTC es equivalente a las reacciones catalizadas por esas enzimas, al momento de comenzar esta tesis la ausencia de evidencias enzimáticas y de conocimientos estructurales impedían corroborar si el mecanismo catalítico de la PTC era el mismo que el observado en otras transcarbamilasas.

La disponibilidad de las estructuras de PTC con los inhibidores análogos bisustrato unidos, PAPU y PALO, nos permitieron modelar una molécula de carbamifosfato (CP) superponiendo el motivo ⁵⁰STRT de la OTC de *Mycobacterium tuberculosis* [código de PDB: 2I6U, (Sankaranarayanan y cols., 2008)], estructura que incluye el CP unido al motivo ⁵²STRT, sobre el modelo del protómero A del cristal de PTC-PAPU, dejando la porción putrescina del PAPU, simulando así los dos sustratos presentes en el sitio activo (Figura 47). La molécula de CP modelada está localizada de modo que no hay impedimentos estéricos con la proteína y las interacciones observadas

en la porción que rodea al carbamato podrían estabilizar la unión de CP (Figura 47). El átomo de oxígeno del enlace peptídico entre la Leu-270 y Pro-271 interacciona con uno de los hidrógenos del grupo amino ($N\epsilon$) de la putrescina (Figura 47), mientras que el otro hidrógeno lo hace con uno de los oxígenos del grupo fosfato (Figura 47).

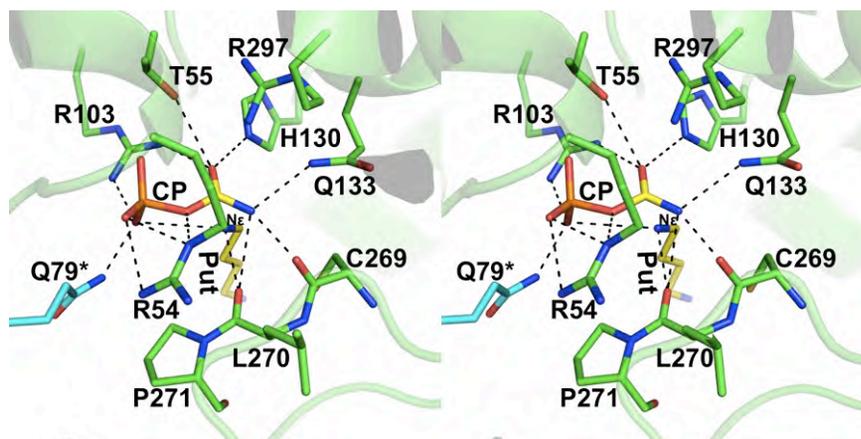


Figura 47. Carbamilfosfato y putrescina en el centro activo de la PTC. Vista estereo de las moléculas de carbamilfosfato (CP) y putrescina (Put) modeladas mostrando (en línea interrumpida) los enlaces de hidrógeno establecidos por el CP y el átomo $N\epsilon$ de putrescina con los residuos de su entorno.

En este mecanismo, el par electrónico de un grupo amino desprotonado, en este caso el $N\epsilon$ de la putrescina, ataca nucleofílicamente al átomo de carbono del CP (Figura 48). Para que esto ocurra, el CP debe encontrarse en estado dianiónico (Figura 48), de modo que puede utilizar uno de los dos átomos de oxígeno del grupo fosfato con una carga negativa neta como base para coordinar y posteriormente abstraer un protón de la amina atacante, formando un intermediario en el que un carbono planar se convierte en tetrahédrico y queda unido a un átomo de oxígeno cargado negativamente

(el oxígeno carbonílico del CP); esta estructura es altamente inestable y finalmente colapsa, dando lugar a la formación de los productos (Figura 48).

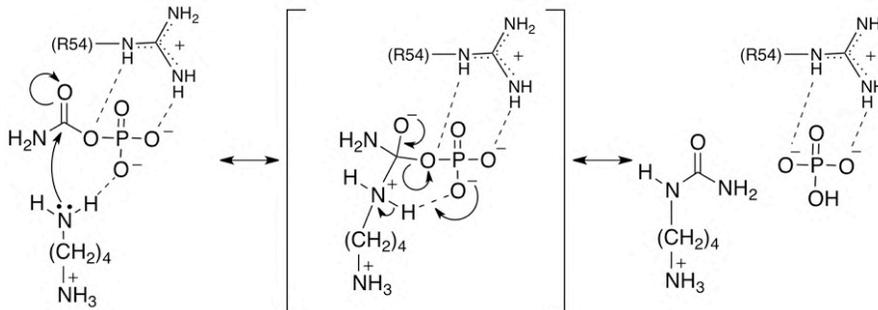


Figura 48. Mecanismo propuesto de la reacción catalizada por la PTC, acorde con el de otras transcarbamilasas.

Las líneas discontinuas indican enlaces de hidrógeno. El papel propuesto para la Arg-54 (R54) se infiere a partir de las interacciones observadas de este residuo con PAPU y PALO, y del papel de los residuos equivalentes en ATC y OTC.

Un paso clave en la catálisis sería la estabilización del intermediario de reacción (Figura 48) por el ambiente electropositivo constituido por Arg-54, Arg-103, His-130 y Arg-297 (Figura 37). El equilibrio de la reacción, desplazado hacia la formación del producto carbamilo y el ion fosfato (Burnett y Cohen, 1957), se explica por la diferencia de polaridad entre los enlaces C-O(HPO₃⁻) [$\Delta\chi_{\text{spec}}=1,07$ unidades de Pauling (Allen, 1989)] y C-Ne^{pu} ($\Delta\chi_{\text{spec}}=0,52$ unidades de Pauling) que forman parte del intermediario tetraédrico inestable, haciendo que el primero de estos enlaces por estar más polarizado sea el más lábil y derivando en la liberación del ion fosfato.

Estudios de mutagénesis del motivo SxRT, llevados a cabo en ATC por Xu y Kantrowitz, mostraron que los residuos de serina y treonina (Ser-52 y Thr-55 respectivamente en PTC) están involucrados en la unión de CP (Xu y Kantrowitz, 1989, 1991), mientras que el residuo de arginina (Arg-54 en PTC) es responsable de la selección para el dianión en el grupo fosfato del CP

(Stebbins y cols., 1992). Éstas mutantes no cambiaron la afinidad de la proteína por la molécula de CP, pero fueron capaces de unir la forma monoaniónica, que no es capaz de activar el grupo amino atacante (Stebbins y cols., 1992).

En las estructuras de los complejos PTC-PAPU y PTC-PALO, el grupo guanidinio del residuo constante Arg-54 que es parte del motivo SxRT, presente en todas las transcarbamilasas, establece un puente de hidrógeno con uno de los átomos de oxígeno del grupo fosfonato y está a una distancia de aproximadamente 3 Å del átomo de carbono que reemplaza al oxígeno puente del CP en el análogo bisustrato (Figura 49). Ello sugiere fuertemente que la Arg-54 tiene un papel catalítico, ayudando también en la PTC a seleccionar el CP dianiónico que es necesario para la desprotonación de la amina atacante, y un papel estabilizador durante el desarrollo de la carga negativa generado sobre el oxígeno puente del CP en el proceso de generación de los productos. Para comprobar la importancia de la Arg-54, se decidió sustituir este residuo por glicina o leucina, lo que se describe en la sección siguiente.

10.1 Sustitución de la arginina 54 del centro activo por glicina o leucina. Efecto de guanidinio exógeno

Las formas variantes R54G y R54L de la PTC preparados mediante mutagénesis dirigida (ver Metodología), se purificaron en forma soluble del mismo modo que la enzima silvestre (Figura 50A), pero a diferencia de ésta, resultaron inactivas a pesar de haber sido probadas en cantidades >2000 veces superiores en los ensayos enzimáticos respecto a la enzima silvestre (Figura

aumento de la concentración de GdnCl. La actividad a 120 mM de GdnCl representa aproximadamente el 6% de la correspondiente actividad enzimática de la forma silvestre en presencia de esa concentración de GdnCl, y el ajuste de la sigmoidea sugiere una actividad a concentración infinita de GdnCl que representaría el 7,3% de la proteína silvestre (Figura 50C). Así, la presencia de GdnCl activa la variante R54G en un grado que puede estimarse como de al menos 3 órdenes de magnitud.

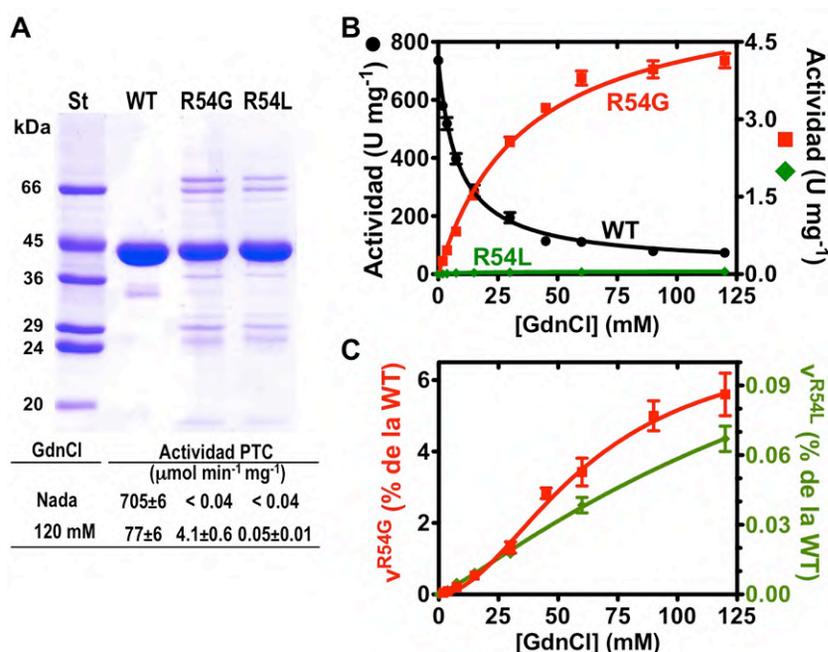


Figura 50. Purificación y actividad enzimática de las variantes de la Arg-54 (A) SDS-PAGE teñido con Coomassie de las PTC de *E. faecalis* silvestre y variantes R54G y R54L purificadas. Las masas de los estándares de peso molecular (St) están dadas en kDa. En la parte inferior se muestra la actividad enzimática de la proteína silvestre (0,016 $\mu\text{g/ml}$) y de las variantes R54G y R54L (50 $\mu\text{g/ml}$ sin GdnCl; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ para R54G y 28 $\mu\text{g/ml}$ para R54L con GdnCl). Cuando se indica se añadió al ensayo 120 mM de GdnCl. El signo < denota el límite de detección. (B) Dependencia de la actividad de la proteína silvestre (círculos negros, eje izquierdo de ordenadas) y de sus variantes R54G y R54L (respectivamente, símbolos rojos y verdes, eje derecho de ordenadas) de la concentración de GdnCl. (C) Resultados para las formas mutantes, expresadas como porcentaje de la actividad de la forma silvestre a idéntica concentración de GdnCl. Se usan los mismos colores y símbolos que en (B).

En el caso de la variante R54L de PTC (Figura 50), la actividad inducida por GdnCl fue mucho menor, ~100 menos que la alcanzada con la variante R54G, indicando que el GdnCl es mucho más efectivo en la activación de la variante R54G que de la R54L.

10.2 La estructura de PTC-R54G con PALO y Gdn

Con la finalidad de tratar de establecer el mecanismo de la activación por GdnCl, determinamos la estructura de la variante PTC R54G a una resolución de 2 Å utilizando cristales crecidos en presencia de 50 mM de GdnCl y 0,2 mM de PALO. Como en el caso del cristal PTC-PALO, se encontraron seis protómeros en la unidad asimétrica conformando dos trímeros, con una molécula de PALO unida al centro activo de cada protómero (Tabla 4). La estructura de cada uno de los trímeros de la variante R54G es muy similar a la de los trímeros de PTC-PALO (rmsd 0,47-0,85 Å para la superposición de 981-1000 C α), como así también la estructura de los centros activos de la enzima (Figura 51), excluyendo un mal plegamiento general como la causa de la ausencia de actividad detectable de la variante.

La molécula de PALO unida a cada uno de los centros activos interacciona con la enzima del mismo modo que lo hace con la proteína silvestre (Figura 51), indicando que la sustitución de la Arg-54 por un residuo de glicina no evita la unión de los sustratos. El lazo 230 que confiere la especificidad para putrescina se encuentra en idéntica conformación que en la PTC silvestre. La secuencia ⁵²STRT, a la cual pertenece el residuo Arg-54, y que contiene la sustitución R54G en la variante enzimática, está situada en una conformación virtualmente idéntica a la encontrada en la proteína silvestre

(Figura 51), demostrando que la pérdida de actividad de esta variante no es causada por un cambio en la zona del centro activo que une el CP.

Tabla 4. Estadísticas de la estructura y los datos de rayos X del cristal de la mutante R54G de la PTC.

	R54G +PALO
Recolección de datos	
Línea del sincrotrón ESRF	ID23-2
Longitud de onda (Å)	0,873
Grupo espacial	I2
Celda Unidad a, b, c (Å)	103,7, 130,6, 164,6
α, β, γ (°)	90, 114, 90
Rango de resolución (Å) ^a	41–1,99 (2,10–1,99)
Reflexiones, total/únicas	489.435/130.385
Completitud (%) ^a	90,0 (82,0)
I/σ ^a	8,6 (2,0)
R_{sym}^b (%) ^a	6,6 (34,5)
Estadísticas de refinamiento	
Rango de resolución (Å)	30–2,00
R -factor/ R_{free}^c	17,7/20,9
Moléculas y átomos refinados	
Cadenas polipeptídicas	6
Átomos de proteína	15.571
PALO	6
RMSD ^d enlaces(Å)/ángulos(°)	0,006/0,95
B -factor promedio (Å ²)	
Proteína	24,7
PALO	18,2
Ramachandran ^e (%)	92,2/7,1/0/0,7
(fav./all./gen.all./disall.)	

^a Los valores entre paréntesis representan datos para la capa de mayor resolución.

^b $R_{\text{sym}} = \sum I - \langle I \rangle / \sum I$, donde I es la intensidad observada y $\langle I \rangle$ la intensidad promedio.

^c R -factor = $\sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$, donde $|F_{\text{obs}}|$ y $|F_{\text{calc}}|$ son las amplitudes de los factores de estructura observados y calculados para todas las reflexiones (R -factor), R_{free} , es R basado en el 5% de los datos, utilizado para el test de validación cruzada.

^d RMSD: la raíz cuadrada de la media de la desviación al cuadrado (root mean square deviation).

^e Usando PROCHECK: fav, favorecido; all, permitido; gen.all, generosamente permitido; disall, no permitido.

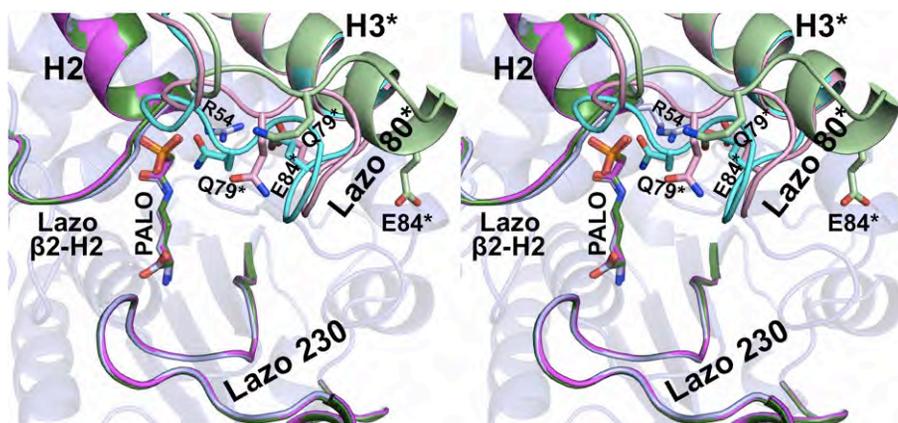
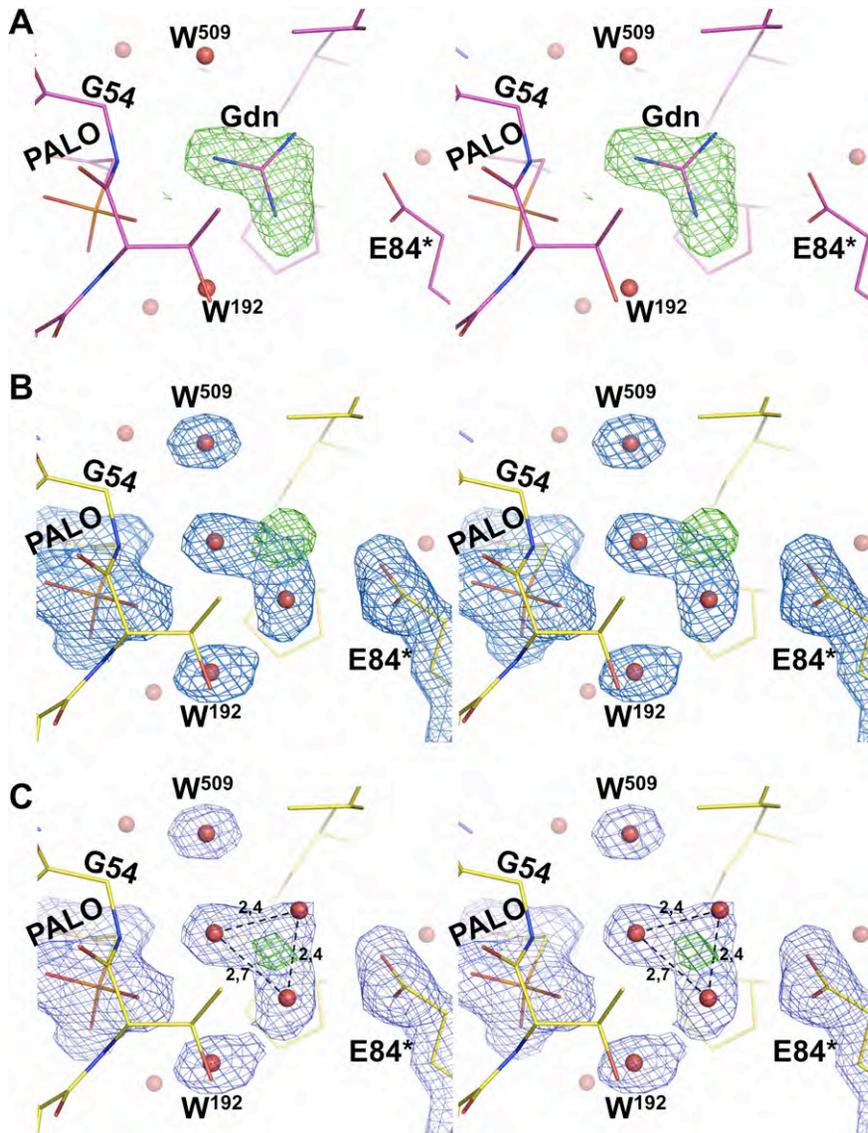


Figura 51. Los centros activos de PTC silvestre y R54G.

Vista estéreo de la superposición de los centros activos de los protómeros A de PTC silvestre (azul) y los protómeros F y C (respectivamente coloreados de magenta y verde) de la variante R54G, todos con el inhibidor PALO unido (los átomos de carbono de PALO están coloreados como su correspondiente protómero). En cada caso, el lazo 80* y la hélice 3*, provistos por la subunidad vecina, están coloreados en tonos diferentes del mismo color que la subunidad que contiene el centro activo. Se muestra el resto del protómero A de la enzima silvestre semitransparente. Se ilustran las cadenas laterales de Arg-54 (sólo presente en la forma silvestre), Glu-84* y Gln-79*. El lazo 80* es el único elemento con diferencias sustanciales entre las conformaciones de la proteína silvestre y de la variante, particularmente en la variante que no tiene Gdn en el centro activo reemplazando la cadena lateral de Arg-54, como es el caso del protómero C (en verde).

Como era de esperar con la sustitución de la arginina por glicina, no se observó ninguna densidad electrónica en la región correspondiente a la cadena lateral de Arg-54 en cinco de los seis protómeros encontrados en la unidad asimétrica. Sin embargo, en el protómero restante se pudo observar una masa de densidad electrónica que ajusta muy bien un ion Gdn (evidencias en la Figura 52) en la posición correspondiente al grupo guanidinio de la cadena lateral de Arg-54 (Figura 53). Este ajuste queda bien ilustrado en la Figura 52, en la que el afinado con dos o tres moléculas de agua en la densidad problema resultan en densidad no explicada y, en el caso de las tres moléculas de agua, en distancias inadecuadamente cortas entre aguas. En

cambio, el afinamiento con Gdn explica toda la densidad y se corresponde con razonables factores de temperatura para todos los átomos trazados dentro de esta densidad.



(Continúa en la página siguiente)

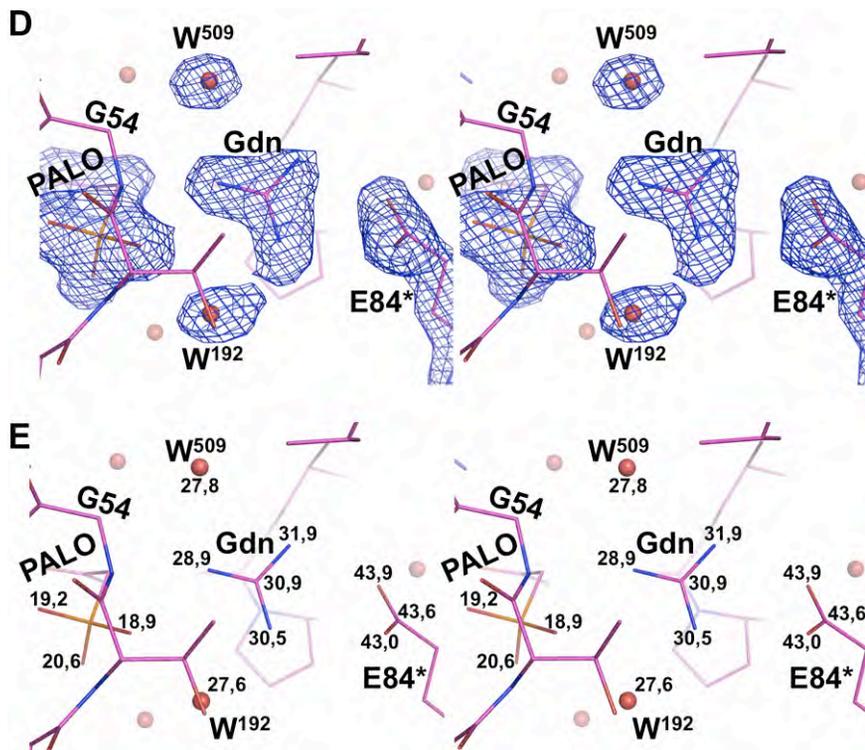


Figura 52. La densidad electrónica atribuida al ion Gdn.

Todos los paneles son vistas estereo del protómero F de la variante R54G. (A) Mapa omit de la densidad electrónica (en verde, F_o-F_c contorneado a 2.5σ) que atribuyo a Gdn. Se muestran los elementos circundantes. (B) Mapa de densidad electrónica (en azul, mapa $2F_o-F_c$ contorneado a 1σ) resultante del trazado y afinado de dos moléculas de agua dentro de la densidad electrónica mostrada en el panel A, junto con los elementos circundantes, incluyendo PALO y el residuo Glu-84* del protómero D. El mapa residual F_o-F_c , contorneado a 2.5σ , se muestra en verde. (C) Mapa de densidad electrónica (en azul, $2F_o-F_c$ contorneado a 1σ) para tres moléculas de agua trazadas y afinadas dentro de la densidad electrónica mostrada en el panel A y B, y los elementos circundantes. El mapa residual F_o-F_c , contorneado a 2.5σ , se ilustra en verde y está ubicado en la posición del átomo de carbono si se hubiese colocado el Gdn. Las líneas discontinuas muestran la distancia entre los átomos de oxígeno de las tres moléculas de agua. (D) Mapa de densidad electrónica (en azul, mapa $2F_o-F_c$ contorneado a 1σ) del ion Gdn refinado y de los elementos circundantes. (E) Se dan los factores de temperatura para el ion Gdn y sus elementos más próximos.

Por tanto, parece probable que el rescate parcial de la actividad de la variante R54G se explique por la unión de un ion Gdn en algún protómero en la posición que sería ocupada por el grupo guanidinio de la cadena lateral de

Arg-54. La similitud de las interacciones de este ion Gdn y del grupo Gdn de Arg-54 con el PALO (Tabla 5) apoyan esta idea.

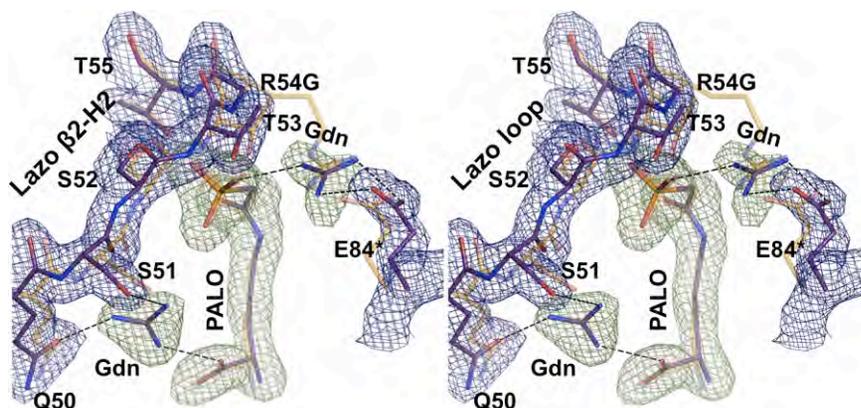


Figura 53. Dos iones Gdn y el inhibidor PALO unidos al centro activo del protómero F de la variante R54G.

Mapa omit de densidad electrónica de los ligandos (en verde, F_o-F_c contorneado a 2.5σ) unidos al centro activo y mapa afinado sin ligandos (en azul, mapa $2F_o-F_c$ contorneado a 1σ) del lazo β - α 2 y del residuo Glu-84* del lazo 80* del protómero vecino (protómero D). Se puede observar la ausencia de densidad electrónica para la cadena lateral de Arg-54 al haberse reemplazado por una glicina, y la localización de un ion Gdn en el sitio ocupado por el grupo Gdn de la cadena lateral de la Arg-54. Dentro de los mapas, se muestran los modelos estructurales para los residuos de proteína y para los ligandos, con los átomos de carbono en magenta, los de oxígeno en rojo y los de nitrógeno en azul. Las líneas discontinuas representan los enlaces de hidrógeno que unen los iones Gdn con la proteína. Con objeto comparativo se ha superpuesto el modelo del protómero A del cristal PTC-PALO (silvestre), en presentación semitransparente con sus átomos de carbono coloreados en naranja.

Así, la distancia de este Gdn unido al átomo de carbono que reemplaza en el PALO al oxígeno puente del CP es similar al del grupo guanidinio de la Arg-54 en la enzima silvestre (Tabla 5). Además, el Gdn del mutante R54G establece tres de los cuatro puentes de hidrógeno con la proteína y el PALO que forma normalmente el grupo guanidinio de la cadena lateral de la Arg-54, pudiendo así el ion Gdn desempeñar el papel esperado para la cadena lateral de la Arg-54, principalmente la selección del CP

dianiónico y la estabilización de las cargas negativas en los átomos de oxígeno en el estado de transición de sustratos a productos (Figura 48). Al igual que el grupo guanidinio de la Arg-54, el ion Gdn interacciona, en el mutante, a través de puentes de hidrógeno, con el grupo carboxilato de Glu-84* perteneciente al lazo 80* de la subunidad vecina (Figura 54 y Tabla 5), lazo que adopta una posición y una conformación similar, aunque no idéntica, a la encontrada en los complejos de la enzima silvestre con los inhibidores análogos bisustrato PAPU y PALO. Sin embargo, las diferencias en la conformación de este lazo con el de la enzima silvestre conllevan un alejamiento del residuo Gln-79*, involucrado en la unión al CP, de hasta 6 Å respecto a la posición observada en los cristales de PTC-PAPU y PTC-PALO (Figura 51).

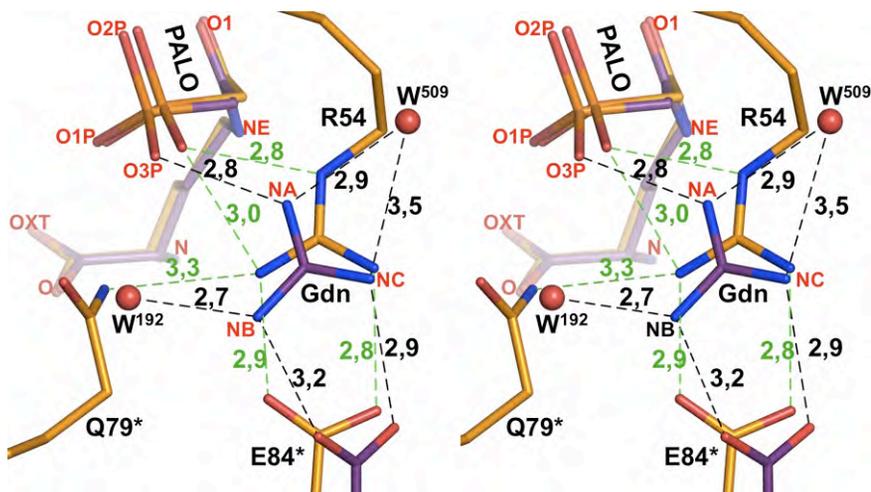


Figura 54. Las interacciones del ion Gdn imitan las del grupo Gdn de la Arg-54. Vista estéreo de las interacciones del grupo Gdn de la proteína silvestre (protómero A) y del ion Gdn que se asienta en la misma posición del protómero F de la variante R54G, con el inhibidor PALO y los elementos circundantes. La figura es una ampliación de la superposición de estos dos protómeros mostrada en la Figura 53. Las líneas discontinuas muestran los enlaces de hidrógeno (en negro para R54G y en verde para la silvestre), con la distancia en Å. Dos moléculas de agua fijadas en la estructura de la variante se muestran como esferas rojas y se marcan con la letra W.

Tabla 5. Comparación de las interacciones del ion Gdn en la variante R54G, la cadena lateral de Arg-54 en la PTC silvestre a la que imita y del inhibidor PALO.

Ligando	Átomo de ligando (Figura 54)	Contacto	Distancia [Å]	
			Variante R54G	PTC-PALO
Gdn/Arg-54	NA/NE	O3P PALO	2.81	2.79
		C1P PALO	3.42	3.42
		W ⁵⁰⁹	2.94	-
	NB/NH1	OE1 Glu-84 *	3.22	2.89
		W ¹⁹²	2.73	3.35
		O3P PALO	-	2.99
	NC/NH2	OE2 Glu-84 *	2.91	2.80
		W ⁵⁰⁹	3.46	-
	PALO	O1P	W ⁴³⁴	2.85
NH1 Arg-103			2.78	2.80
NE Gln-79*			-	3.23
O2P		N Thr-55	2.86	2.94
		OG1 Thr-55	2.72	2.77
		OG Ser-52	2.64	2.61
O3P		W ¹⁹²	2.79	3.21
		NA Gdn	2.81	2.79
		N Gly-54/Arg-54	2.83	2.88
		NH1 Arg-54	-	2.99
O1		NE2 His-130	2.82	2.71
		NH2 Arg-103	2.93	2.78
NE		O Leu-270	2.93	2.90
OXT		NE Gln-164	2.99	3.06
		W ¹¹⁰	2.88	2.69
O		W ⁵⁴⁴	3.00	2.67
		W ⁴⁴⁴	2.79	2.59
		NA Gdn-2	2.74	-
N		OE Gln-164	2.87	2.88
		OD1 Asp-227	2.69	2.78
		W ²⁶²	2.87	2.91

W indica una molécula de agua. Los asteriscos indican que los residuos pertenecen al protómero adyacente.

Así, de la comparación de la estructura del centro activo del protómero F de R54G y de la enzima silvestre, ambas unidas a PALO (Figuras 51 y 54), se pone en evidencia que en el mutante, el ion Gdn que ocupa el sitio

de la cadena lateral de la Arg-54 no parece fijar completamente el lazo 80* provisto por la subunidad vecina. Como este lazo participa en la formación de la cúpula que aísla, selecciona y secuestra los sustratos unidos al centro activo en cada ciclo catalítico, es posible esta diferencia con la enzima silvestre que explique que la actividad observada con el mutante a 50 mM GdnCl sea del 3% de la actividad de la enzima silvestre a la misma concentración de GdnCl, en lugar del 17% esperable si uno de cada seis protómeros del mutante une el Gdn en esta posición, de acuerdo con los resultados de la estructura del mutante con el GdnCl.

En contraste con lo que sucede en el protómero que tiene el Gdn unido en el lugar de la Arg-54, en cuatro de los otros cinco protómeros encontrados en la unidad asimétrica que no contienen el Gdn en esta posición, el lazo 80* estuvo desordenado, no pudiendo trazarse. En la subunidad C, que tampoco contiene el Gdn en esta posición, el lazo 80* sí se observa, al estar fijado en otra posición estabilizada por contactos cristalográficos (Figura 51). En esta última conformación, parte del lazo 80* se integra en la α -hélice precedente, hélice que aumenta así su extensión y resultando en una reorientación del lazo y en un alejamiento del residuo Glu-84* del centro activo de la proteína (Figura 51).

10.3 Un segundo ion Gdn neutraliza al grupo carboxilato de PALO en cada subunidad

Además del ion Gdn unido al sitio activo de la proteína que normalmente está ocupado por la cadena lateral de Arg-54, se encontró un

segundo Gdn unido a todos los protómeros de la unidad asimétrica de la forma R54G (Figura 53), donde no parece tener relación con la ausencia de la cadena lateral de Arg-54, pero pudiendo estar relacionado con la unión de PALO, ya que interacciona fuertemente con el grupo α -carboxilato de la porción ornitina de este inhibidor bisustrato (Figura 53). Como se mostró previamente, la ornitina es un sustrato pobre para la PTC, principalmente a causa de la presencia del grupo α -carboxilato de la ornitina, del que carece la putrescina, y no establece interacciones directas con la proteína. El ion Gdn encontrado junto al α -carboxilato del PALO parece desempeñar un papel en la neutralización de dicho grupo carboxilato. Quizás podría ser equivalente a algunas densidades electrónicas encontradas alrededor del α -carboxilato de ornitina en la estructura del complejo de la PTC silvestre con PALO, que atribuimos a moléculas de agua, pero que dieron valores de factores de temperatura (B-factors) algo más bajos que los átomos que los circundan, pudiendo corresponder alguna de ellas a iones amonio o litio procedentes del medio de cristalización. En las OTCs, se encuentra próximo a esta posición un residuo de lisina conservado (Lys-88 en OTC humana), que ha sido reemplazado en las PTCs por glutamina, como ya se ha mencionado.

10.4 El modelado de la cadena lateral de leucina en el mutante R54L explica la menor reactivación de dicho mutante por GdnCl

El menor grado de reactivación de la variante R54L con la adición de GdnCl al medio de reacción (Figura 50), en comparación con los valores alcanzados con la variante R54G, podría deberse al impedimento provocado

por la cadena lateral de la leucina sobre la unión del ion Gdn. Con el fin de comprobar esta hipótesis he modelado la cadena lateral de la leucina sobre la estructura del protómero F del cristal PTC-R54G, usando el único rotámero de la leucina que no colisiona ni encuentra impedimentos estéricos con los elementos de la proteína. Dicho rotámero es el más comúnmente encontrado en el PDB, con una prevalencia del 59% (Lovell y cols., 2000). El modelo resultante muestra que la cadena lateral de la leucina choca con el ion Gdn unido al grupo fosfonato del inhibidor PALO en la estructura del mutante, dificultando la entrada de este en el sitio del Gdn de la proteína silvestre y explicando la pobreza de la reactivación de esta mutante en presencia de GdnCl (Figura 55).

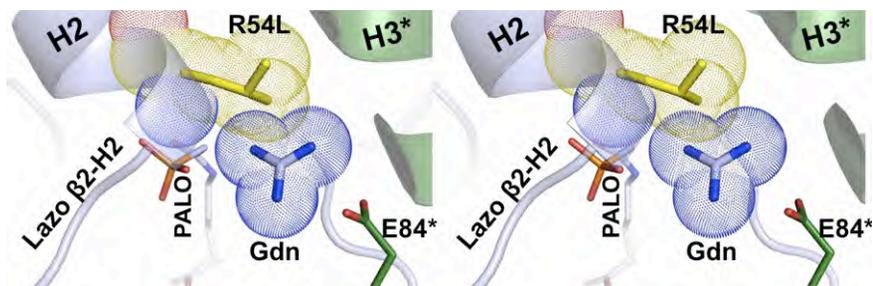


Figura 55. Impedimento estérico causado por la sustitución R54L sobre la unión de Gdn.

La cadena lateral de leucina (con los átomos de carbono en amarillo) ha sido modelada sobre la estructura del protómero F de la variante R54G (en cintas grises, la subunidad vecina se muestra en verde) unida a PALO y Gdn (ambos en representación de palillos). Se muestran como esferas de puntos las esferas de Van der Waals de todos los átomos que forman el residuo de leucina y el del ion Gdn.

11. Cambios conformacionales asociados a la unión de los inhibidores bisustrato

Con el objetivo de analizar si la PTC experimenta cambios conformacionales asociados a la unión de los sustratos era necesario obtener cristales de PTC que permitieran resolver la estructura sin los sustratos o analogos de éstos unidos a la proteína. Obtuvimos este cristal alrededor de un año y medio después de poner una placa de cristalización sin PALO, PAPU o sustrato. Se observó un prisma de forma hexagonal que difractó rayos X hasta una resolución de 2,6 Å (PTC-apo, Tabla 6), perteneciendo al grupo espacial P6, con celda 117,5 x 117,5 x 104,8 Å. Las fases se obtuvieron por reemplazo molecular utilizando el protómero A de la estructura de PTC-PAPU libre de ligandos. La geometría del modelo final fue similar a la encontrada en el resto de los modelos de PTC, con dos residuos fuera de las regiones permitidas del gráfico de Ramachandran, Met-125 y Leu-270, aunque en este caso, el primero de ellos está en una zona considerada generosamente permitida.

La unidad asimétrica del cristal PTC-apo contuvo dos protómeros muy similares entre sí (rmsd de 0,46 Å para 312 C α), que dan dos trímeros independientes entre sí al aplicar las operaciones de simetría para el cristal y que también resultaron muy similares entre sí (rmsd de 0,99 Å para 933 C α). La densidad electrónica está bien definida para toda la subunidad, excepto para los lazos 80 y 230, confirmando la movilidad de estos lazos, observada ya en los otros cristales de PTC-PALO y PTC-R54G-PALO.

Tabla 6. Estadísticas de la estructura y los datos de rayos X del cristal PTC-apo.

	PTC-apo
Recolección de datos	
Línea del ESRF	ID14-3
Longitud de onda (Å)	0,931
Grupo espacial	P6
Celda Unidad a, b, c (Å)	117,5, 117,5, 104,8
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Rango de resolución (Å) ^a	104–2,60 (2,74–2,60)
Reflexiones, total/únicas	187.173/25.352
Completitud (%) ^a	99,9 (100)
I/σ ^a	7,2 (2,0)
R_{sym} ^b (%) ^a	7,6 (34,6)
Estadísticas de refinamiento	
Rango de resolución (Å)	30–2,60
R -factor/ R_{free} ^c	19,0/22,4
Moléculas y átomos refinados	
Cadenas polipeptídicas	2
Átomos de proteína	4.973
Iones sulfato	3
RMSD ^d enlaces(Å)/ángulos(°)	0,005/0,97
B -factor promedio (Å ²)	
Proteína	50,9
Iones sulfato	37,5
Ramachandran ^e (%)	91,7/7,6/0,4/0,4
	(fav./all./gen.all./disall.)

^a Los valores entre paréntesis representan datos para la capa de mayor resolución.

^b $R_{\text{sym}} = \sum I - \langle I \rangle / \sum I$, donde I es la intensidad observada y $\langle I \rangle$ la intensidad promedio.

^c R -factor = $\sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$, donde $|F_{\text{obs}}|$ y $|F_{\text{calc}}|$ son las amplitudes de los factores de estructura observados y calculados para todas las reflexiones (R -factor), R_{free} , es R basado en el 5% de los datos, utilizado para el test de validación cruzada.

^d RMSD: la raíz cuadrada de la media de la desviación al cuadrado (root mean square deviation).

^e Usando PROCHECK: fav, favorecido; all, permitido; gen,all, generosamente permitido; disall, no permitido.

En una de las dos subunidades del cristal PTC-apo la ausencia de densidad electrónica del lazo 230 incluyó a la hélice 9 que la sigue, mientras que en la otra subunidad pudieron modelarse algunos de los residuos de esta

hélice sin que formaran una estructura secundaria definida. Hay que recordar que el lazo correspondiente de las ATCs y de las OTCs también experimenta cambios muy importantes, que en el caso de la OTC representando movimientos de casi 10 Å.

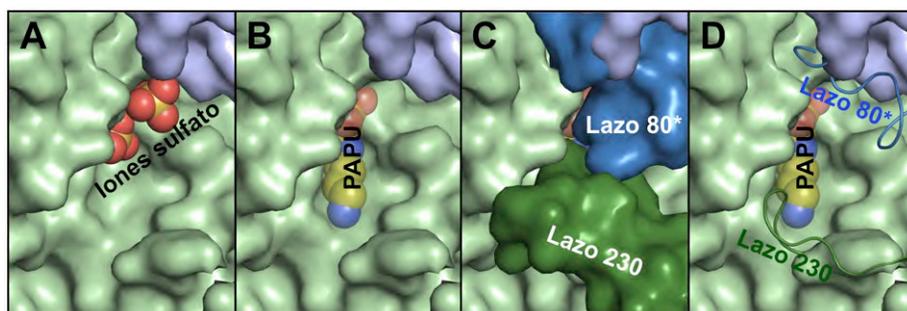


Figura 56. Acercamiento al centro activo de PTC-apo.

La superficie del protómero que contiene el centro activo está coloreada en verde claro, y el lazo 80* de la subunidad vecina en azul celeste. Los paneles (A) y (B) muestran, respectivamente, los iones sulfato unidos o una molécula de PAPU modelada (semitransparente). Con la finalidad de comparar, se muestra en los paneles (C) y (D) el centro activo de PTC-PAPU, que éste está cubierto por los lazos 80* y 230, como se demuestra cuando dichos lazos se representan como cordeles.

En contribución a lo observado en los protómeros de los cristales de PTC-PAPU y PTC-PALO en que estos lazos forman una cúpula que cubre a los sustratos en el centro activo, el centro activo de cada uno de los protómeros de PTC-apo está expuesto al solvente (Figura 56). En el mismo se observa una densidad electrónica atribuida a un ion sulfato, en un sitio próximo al del fosfonato del inhibidor PAPU en el cristal PTC-PAPU, que contacta con algunos de los elementos del motivo STRT de unión a CP (Figura 57). Existe, respecto del fosfonato del PAPU, cierto desplazamiento del sulfato hacia el interior de la cavidad del sitio activo (Figura 57), dando lugar a la unión de un segundo ion sulfato, encontrado en la parte externa del sitio activo aunque también muy cerca del motivo STRT (Figura 57),

revelando una alta tendencia de esta zona a atraer iones negativamente cargados.

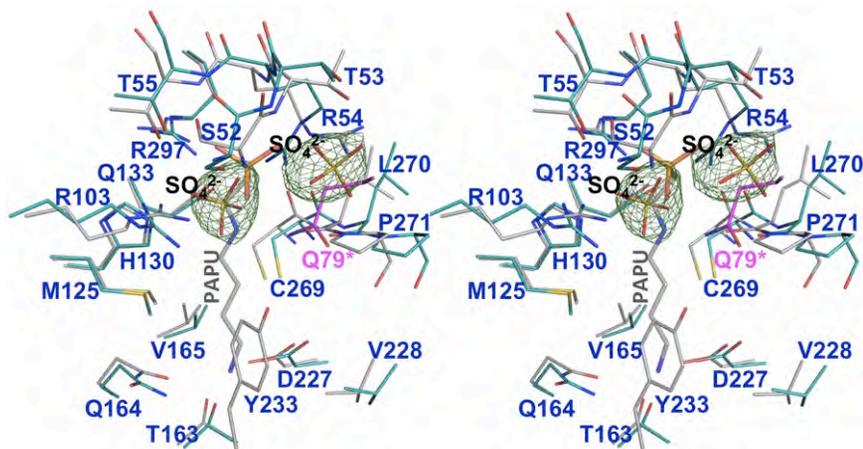


Figura 57. Movimientos en el centro activo de PTC asociados a la unión de los sustratos.

Vista estéreo de los centros activos de PTC-apo (turquesa) y PTC-PAPU (gris) con los iones sulfato y el inhibidor PAPU unidos, respectivamente. El residuo Gln-79* del lazo 80* de la subunidad vecina se muestra con los átomos de carbono de color magenta (sólo ha sido trazado en PTC-PAPU). El mapa de densidad electrónica omit, $F_o - F_c$ ($2,5\sigma$), para los iones sulfato observados en el centro activo de PTC-apo.

Como se detalló en la introducción, la unión de los sustratos a otras transcarbamilasas se ha asociado a movimientos de cierre de ambos dominios. Nuestros resultados replican también los de otros, pudiendo definirse un acercamiento del dominio C-terminal al N-terminal que, definido como rotación del mismo modo que se hizo para ATC, representa un cierre de $4,3 \pm 0,2^\circ$ (Figura 58).

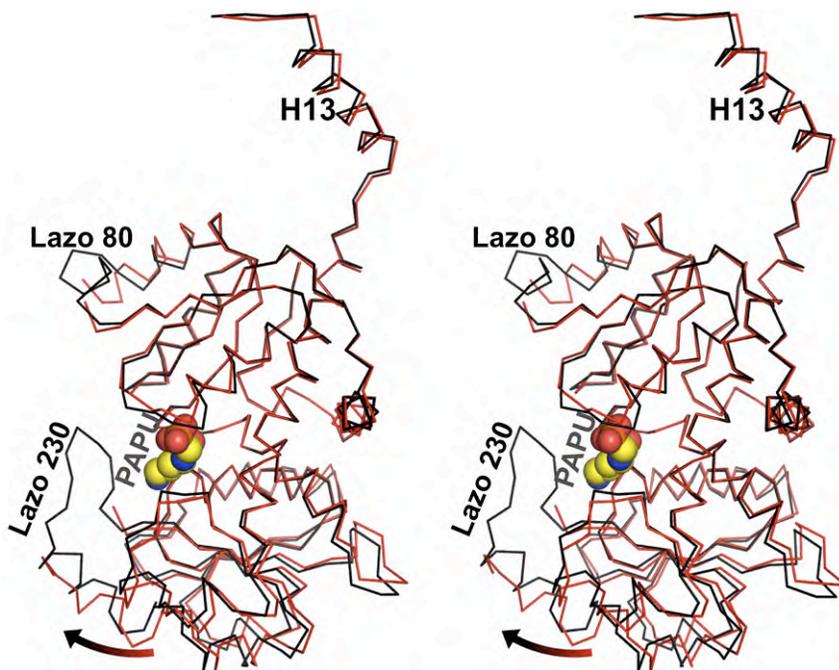


Figura 58. El movimiento de los dominios de la PTC asociado a la unión de los sustratos.

Vista estéreo de la superposición de los dominios N-terminales (residuos 1-138) del protómero de PTC-apo (en rojo) y de PTC-PAPU (en negro). La molécula de PAPU está representada en esferas con los átomos de carbono en amarillo. La dirección del movimiento asociado al cierre del centro activo con la unión del PAPU se indica con una flecha en la parte inferior de la imagen.

El acercamiento de los dominios, está estabilizado por una red de puentes de hidrógeno con la molécula de PAPU que incluyen tres residuos del centro activo, Arg-103 y His-130 del dominio N-terminal y Leu-270 del dominio C-terminal, con la porción amídica del PAPU (Figura 59). Además, en la forma con PAPU la Arg-297, del dominio para putrescina, establece puentes de hidrógeno con la cadena lateral de la Thr-55 y la Thr-132 (Figura 59), del dominio CP, y a través de una molécula de agua, con la cadena principal de la Cys-269, de su mismo dominio, reforzando y estabilizando la forma cerrada del protómero.

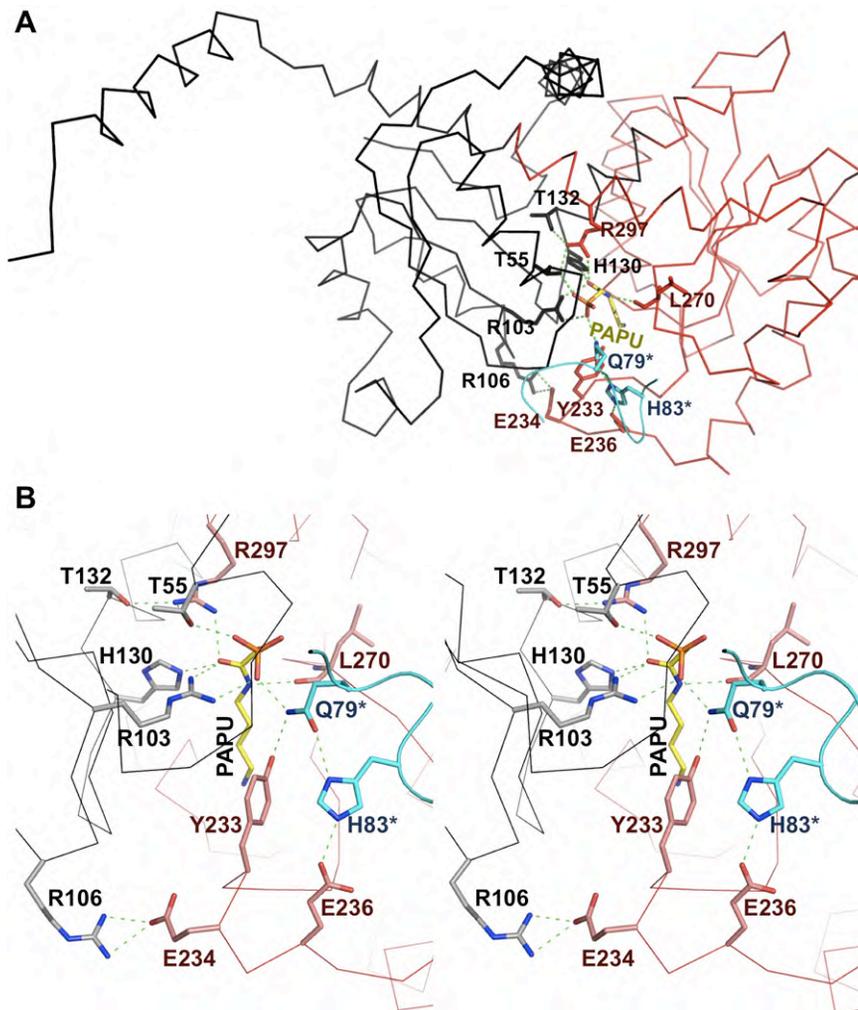


Figura 59. Elementos que estabilizan el cierre de los dominios en la PTC. (A) Se representa en cordel el protómero de la PTC con los dominios N- y C-terminales en negro y rojo. El PTPU (amarillo) y los demás elementos (coloreados como los dominios) involucrados en la estabilización de la forma cerrada se muestran en palillos. Los elementos del protómero vecino se muestran en celeste. (B) Vista estéreo de los elementos (en palillos) que establecen puentes de hidrógeno (líneas discontinuas verdes) sólo en presencia de PTPU, coloreados como en (A).

Como se mencionó previamente, en el cristal de PTC-*apo* el residuo Met-125 está en la región generosamente permitida del gráfico de Ramachandran, mientras que en el cristal de PTC-PTPU dicho residuo, que está en contacto con la porción hidrofóbica de la parte putrescina del PTPU,

está forzado, cayendo sus ángulos en la región prohibida del gráfico de Ramachandran. El cambio a la posición forzada se traduce también en el establecimiento de un contacto diferente entre el átomo de oxígeno de la Gly-124 (adyacente a la Met-125) con la cadena lateral de la Arg-103, directamente involucrada en la unión del CP (Figura 60). De este modo, la unión del PAPU conlleva una rotación de $\sim 30^\circ$ entre el enlace peptídico de Gly-124 y la Met-125 (ángulo ϕ , Figura 60), asumiendo la Met-125 ángulos prohibidos. En ausencia de sustratos, la Arg-103 adopta un rotámero levemente diferente que, aunque continúa contactando con el residuo Gly-124 (Figura 60), permite que éste último y a la Met-125 adopten posiciones menos forzadas.

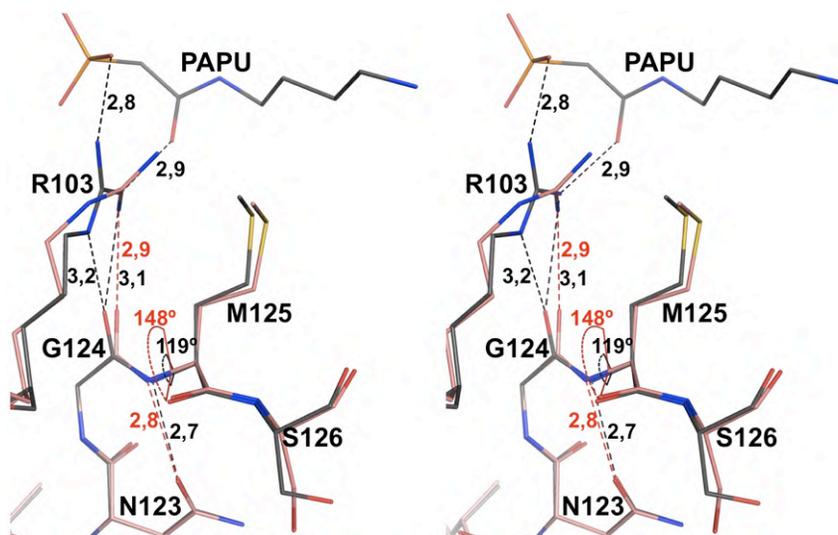


Figura 60. Los cambios de la Met-125 con la unión del sustrato. Vista estéreo de los elementos que rodean a la Met-125 en PTC-apo (rojo) y PTC-PAPU (negro). Se muestra el ángulo ϕ de Met-125 en grados, en rojo para PTC-apo y negro para PTC-PAPU, así como los puentes de hidrógeno, con la distancia en Å.

Con la unión del análogo bisustrato, y por tanto de los sustratos, algunos residuos se mueven particularmente más que el resto del protómero (Figura 61), especialmente los de la primera vuelta de la hélice 2 y los del lazo que precede a ésta, que contienen el motivo de unión a carbamilsfosfato STRT, y también los del lazo previo a la hélice 11, con el motivo HCLP (Figura 61). Además, se observa que las cadenas laterales de los residuos Ser-51, Ser-52, Thr-53 y Arg-54 en el motivo ⁵²STRT experimentan importantes cambios en el rotámero observado con respecto a la forma sin inhibidor.

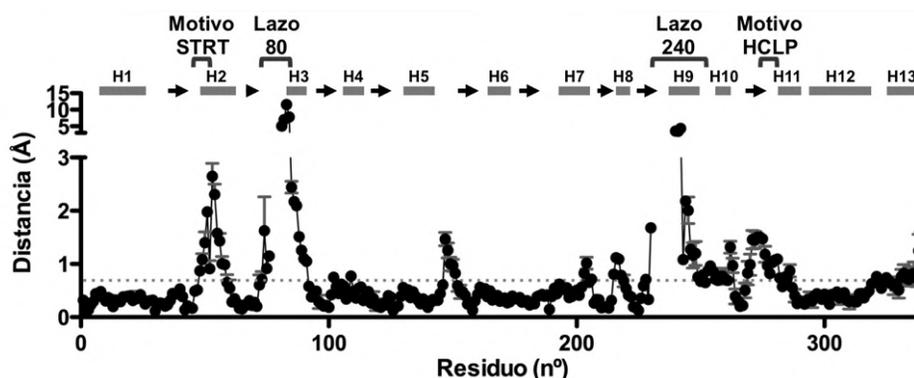


Figura 61. Desplazamiento de los C α asociado a la unión de los sustratos. Dimensión del módulo (Å) de desplazamiento entre los átomos C α de PTC-*apo* y de PTC-*PAPU* tras superposición por ajuste de las estructuras secundarias de los protómeros. Sobre el gráfico de desplazamiento se indican los elementos de estructura secundaria y los motivos de unión a sustrato, que coinciden con algunas de las áreas de mayor movimiento.

La movilidad del lazo 230 ha puesto de manifiesto los mecanismos a través de los que la posición cerrada de este lazo se estabiliza en presencia de los sustratos. Como se ha indicado ya, se forma una red de puentes de hidrógeno que involucra a los residuos Tyr-233, Gln-79*, His-83*, Glu-236 y al grupo fosfonato del inhibidor (Figuras 39 y 59). A su vez, el Glu-234

establece un puente salino con la Arg-106, que además se conecta a través de una molécula de agua a la cadena lateral de Gln-50, fijando el lazo que contiene el motivo STRT, cerca del CP (Figura 59).

12. Una estructura de PTC-apo ha sido publicada por un grupo competidor.

Aproximadamente después de un año de la exposición de estos resultados en un pequeño congreso organizado en Washington DC, y mientras estábamos preparando este trabajo de tesis, uno de los integrantes del comité organizador que guardó nuestra presentación de PowerPoint, publicó simultáneamente con nosotros la estructura de la PTC de *E. faecalis*, incluso realizando idénticos experimentos de delección de la hélice C-terminal, sin dar noticia previa alguna. Esta estructura fue obtenida en ausencia de sustratos a menor resolución que la estructura expuesta en esta tesis (3,2 Å; PDB 3TXX) nos referiremos a esta estructura como de menor resolución. El modelo estructural muestra algunas imperfecciones, probablemente debidas a la baja resolución y a un trazado apresurado.

Uno de los problemas de esta estructura es que un 3% de los residuos del modelo están en zonas generosamente permitidas, mientras que un 2% están en las prohibidas del gráfico de Ramachandran (Figura 62), a comparar con los 0,4% en zonas generosamente permitidas y 0,4% en las prohibidas de nuestra estructura. Además, se pueden observar en dicha estructura a baja resolución factores de temperatura de hasta 142 Å² (Cα del residuo Val-211 cadena D) en residuos adyacente a otros con factores de temperatura de 59 Å²

(Ca del residuo Leu-210 cadena D), que sugieren fuertemente algunos errores en el trazado del modelo.

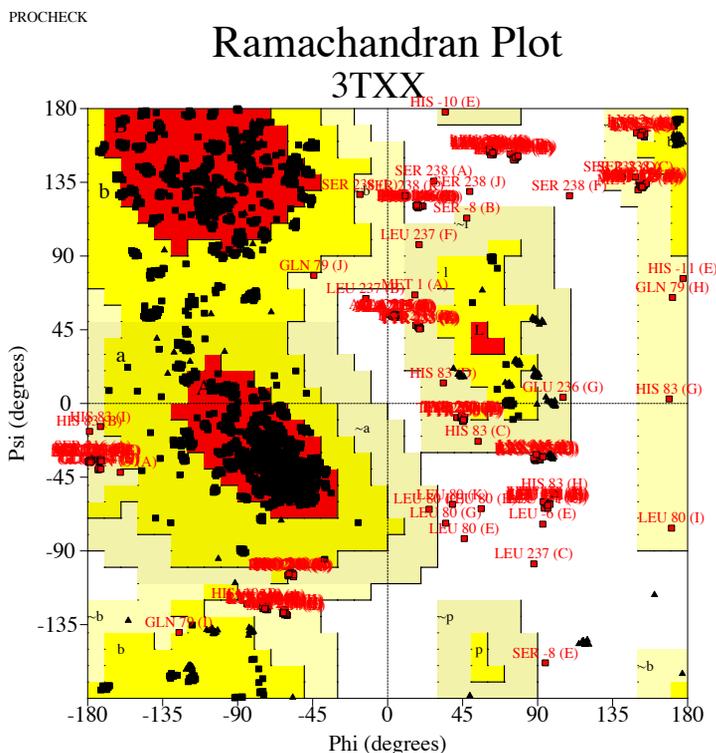


Figura 62. Gráfico de Ramachandran del modelo de PTC de baja resolución de Shi y cols. (2012)

El gráfico ha sido generado con Procheck a partir del modelo depositado bajo el código PDB 3TXX. Las regiones rojas, amarillas oscuras, amarillas claras y blancas representan las zonas favorecidas, permitidas, generosamente permitidas y no permitidas, respectivamente. Con cuadrados rojos se muestran los residuos ubicados en las regiones generosamente permitidas y no permitidas.

Una diferencia entre dicha estructura y la nuestra es que en algunos de los protómeros se han trazado los lazos 80 y 230 que no vemos nosotros. Resulta difícil asegurar que dicho trazado sea correcto dada la naturaleza interrumpida del mapa para dichos lazos (Figura 63), así como los valores de los factores de temperatura, muy elevados para los residuos que forman dichos

lazos (por ejemplo, de 177, 210, 173 y 176 Å² para la Tyr-233 de las cadenas A, B, C y D, respectivamente).

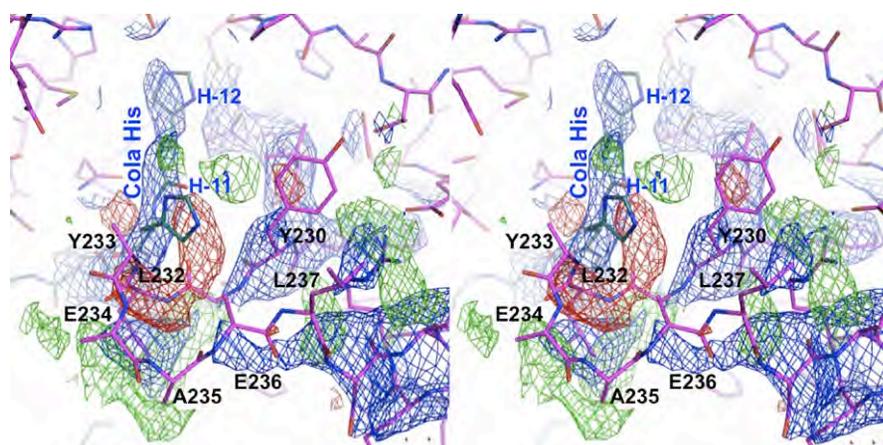


Figura 63. El trazado del lazo 230 de la PTC de baja resolución. Vista estéreo de la zona que rodea al lazo 230 del protómero B (en celeste) y a la cola de poli His del protómero E (en rosa) del modelo depositado bajo el código de PDB 3TXX. Se muestran los mapas 2Fo-Fc (contorneado a 1σ, en azul) y Fo-Fc (contorneado a 2.5σ y -2.5σ, en verde y rojo, respectivamente).

Asumimos que dicho trazado es correcto, la superposición de un protómero de ese modelo con uno de nuestra forma PTC-PAPU da un movimiento del lazo 230 de hasta ~4 Å, y otro del lazo 80 de hasta ~6 Å (Figura 64), ambos en dirección centrífuga con respecto al punto de unión de los sustratos, lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados ya comentados que muestran que el centro activo está abierto sin putrescina y cerrado por ambos lazos en presencia de los dos sustratos. En otros aspectos el modelo es muy similar al nuestro para la PTC-apo (valores de rmsd para la superposición de Ca de los protómeros de $0,575 \pm 0,025$ Å para 311-321 Ca).

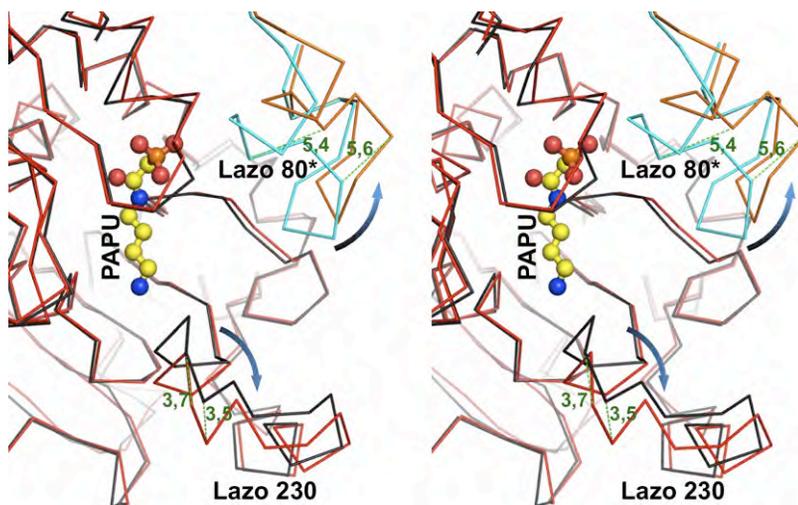


Figura 64. Apertura de los lazos que cubren al centro activo de la PTC. Vista estéreo del movimiento de los lazos que cubren el centro activo de la PTC apo de baja resolución (en rojo, PDB 3TXX) y de la PTC-PAPU (en negro). Se muestran en cian (PTC-PAPU) y naranja (PTC apo) los lazos 80* de la subunidad vecina. El PAPU se representa en bolas y palillos. El sentido del movimiento se denota con una flecha azul y la distancia (en Å) con líneas discontinuas verdes .

13. Reflexiones finales

13.1 El origen del operón AgDI

La clonación de los genes y el estudio de las proteínas expresadas bien por mí o por otros miembros del grupo con mi colaboración (Llácer y cols., 2007) han proporcionado una prueba absolutamente concluyente de que los genes *agcB* y *agcA* de *E. faecalis* codifican dos enzimas clave del catabolismo de la agmatina, la PTC y la AgDI, respectivamente, confirmando y extendiendo evidencias previas pero indirectas en apoyo de esa misma identificación génica (Griswold y cols., 2004; Naumoff y cols., 2004a). Cuando se purificó inicialmente de *E. faecalis*, la PTC exhibió cierta (aunque baja) actividad con ornitina (Wargnies y cols., 1979), lo que se confirma en esta tesis de forma absoluta, dando varias pruebas independientes y definitivas

de que dicha actividad con ornitina, aunque pobre, es genuina. No obstante, la actividad específica relativamente baja de la PTC en comparación con la de la OTC purificada (~5 veces mayor) [la baja actividad PTC no se debe a la cola poli-His, puesto que la enzima silvestre aislada de *E. faecalis* tiene incluso menos actividad (Wagnies y cols., 1979)] también hacía esencial la confirmación de que esta enzima es una PTC genuina, lo que he hecho demostrando que se inhibe potentemente por concentraciones muy bajas ($K_i = 10$ nM) del inhibidor bisustrato específico de PTC, PAPU, un compuesto que no inhibe la OTC a concentraciones similarmente bajas; y también al demostrar la estructura del complejo con PAPU y la excelente adecuación del lazo 240 para la unión de putrescina.

La semejanza entre las vías catabólicas ADI y AgDI incluye la similitud en el número de pasos (cuatro), las reacciones catalizadas (deiminasa, transcarbamilasa, carbamato quinasa, antiportador), el orden de estas reacciones en la ruta reaccional y la identidad de secuencia de algunas de las proteínas que las conforman, como por ejemplo la encontrada entre las CKs de ambas vías en el genoma de *E. faecalis*, que es de casi el 50% (Figura 65), la más alta entre los genes de ambos operones, sugiriendo que ambas CKs han sido producto de una duplicación de un ancestro reciente de ambas. Puesto que la OTC y la PTC de *E. faecalis* comparten un 31% de identidad de secuencia y carbamilan sustratos muy similares, ambas enzimas podrían derivar también de un ancestro común de escasa especificidad (promiscuidad enzimática) o, alternativamente, la PTC podría haber derivado tardíamente de la OTC, sin que haya tenido tiempo todavía de perfeccionar la discriminación

entre putrescina y ornitina, pero habiendo comprometido la eficacia catalítica en el proceso de cambio de especificidad. Nuestros estudios estructurales demuestran que ambas transcarbamilasas son muy parecidas, difiriendo importantemente sólo en cuanto al lazo SMG/240 que se asocia directamente con la especificidad OTC/PTC, y en que la PTC tiene un hélice extra C-terminal. Las evidencias filogenéticas revelan la existencia de dos genes ancestrales diferentes para OTCs (Labadan y cols., 1999) pero sugieran un origen para el grupo de las PTCs (que parece ser monofilético) anterior a la división de las OTCs en dichos dos grupos (Naumoff y cols., 2004a).

En el contexto de las relaciones filogenéticas del operón ADI y del grupo génico AgDI, son de interés los datos obtenidos cuando en mi grupo se caracterizó como AgDI (Llácer y cols., 2007), tanto en términos funcionales como estructurales, el producto proteico del gen *agcA*, demostrando: 1) que la estructura de esa enzima está muy próxima a la de la ADI, la enzima que cataliza la reacción equivalente pero con arginina en vez de agmatina; 2) que la AgDI, también de forma similar a la ADI, forma un aducto covalente de tipo amidino con un grupo tiol catalítico que pertenece a una cisteína conservada que está próxima al extremo C-terminal tanto de ADI como de AgDI. Por tanto, ADI y AgDI son enzimas homólogas, aunque la ausencia de una identidad de secuencia significativa indica un período muy largo de divergencia entre ambas. La incapacidad de ADI y AgDI de usar cada una en forma cruzada el sustrato de la otra (Llácer y cols., 2007) apoya la visión de que la separación entre los genes para ambas tuvo lugar hace mucho tiempo,

permitiendo, en un proceso de gran extensión temporal, la optimización de la especificidad para el sustrato respectivo.

Por otro lado, la AgDI del grupo de genes estudiado aquí, que está dedicada a la producción fermentativa de ATP a partir de agmatina, presenta ~50% de identidad de secuencia (no ilustrado) con las AgDIs más comunes, que pertenecen a la ruta de la agmatina decarboxilasa (ADC) que se utiliza para la producción de poliaminas (Nakada e Itoh, 2003) (aunque dicha ruta puede servir también para la utilización de agmatina como fuente de carbono y nitrógeno, tal como se ha descrito en *P. aeruginosa*) (Stalon y Mercenier, 1984). También de interés en el contexto evolutivo es el hecho de que no hay dudas de que el producto del gen *agcC* es una verdadera carbamato quinasa, pues su secuencia es sólo un aminoácido más corta que la de la CK del operón ADI de *E. faecalis* (Marina y cols., 1998; Barcelona-Andres y cols., 2002) y comparte 49% de identidad de secuencia (datos no ilustrados) con dicha enzima de función y estructura tridimensional determinadas por nuestro grupo (Marina y cols., 1999). Puesto que las CKs involucradas en los catabolismos de arginina y agmatina son similares y no hay evidencia de que la CK se regule por efectores (Marina y cols., 1998), la necesidad de facilitar la expresión concertada de todos los genes de una u otra ruta podría ser la razón principal para que estas dos rutas tengan isoenzimas CKs diferentes. La importante identidad de secuencia entre ambas CKs indica que su separación no tuvo lugar en un tiempo remoto. En contraste con esta proximidad evolutiva entre las CKs de ambas vías, la falta de identidad de secuencia significativa (14%) entre los antiportadores de estas dos rutas de *E. faecalis*,

codificados por *arcD* and *agcD*, indica que su divergencia es muy antigua, si bien la homología entre dichos antiportadores está apoyada por la similitud de la longitud de sus cadenas peptídicas (483 y 458 residuos, respectivamente) y por la predicción de hélices transmembrana (11 a 12 hélices) (Barcelona-Andres y cols., 2002; Llácer y cols., 2007) y también por las funciones equivalentes de ambos con sustratos análogos.

Por todo ello, la comparación de los genes y proteínas de las rutas ADI y AgDI contradice la visión simplista de que ambas rutas surgieron por un proceso de duplicación en bloque de un grupo ancestral de cuatro genes. Tal como se ha indicado, los componentes de iminasa y antiportador de ambas rutas han evolucionado separadamente durante mucho más tiempo que los componentes transcarbamilasa y carbamato quinasa, en claro contraste con lo que cabría esperar si hubiera tenido lugar un único evento simultáneo de duplicación para todos los elementos del grupo de genes, seguido de coevolución. Los genes de la transcarbamilasa y de la CK sí podrían haberse duplicado simultáneamente, dado su similar grado de conservación en ambos grupo de genes. Puesto que la utilización de la agmatina no puede preceder a la formación de la agmatina, la relación muy estrecha entre las AgDIs de las rutas ADC y AgDI sugiere que esta última deriva del gen AgDI de una ruta ADC. La evolución de la AgDI podría haberse iniciado con su divergencia de la ADI para servir a la función de sintetizar poliaminas. Mucho más recientemente la AgDI pudo haberse reutilizado en una nueva ruta de catabolismo de agmatina, ruta construida mediante recombinación de la transcarbamilasa y la CK de la ruta ADI con el elemento AgDI de la ruta

arginina decarboxilasa y con un antiportador de agmatina de origen no aclarado. La composición genética y organización esencialmente idéntica del grupo de genes AgDI en los organismos en que se ha anotado una PTC (Griswold y cols., 2004; Naumoff y cols., 2004a; Naumoff y cols., 2004b; Landete y cols., 2010) indica que este grupo de genes se ha originado sólo una vez en un evento único no muy lejano en el tiempo, lo que ha resultado en que este grupo génico se haya difundido poco en relación con el operón ADI, habiendo pocos organismos que lo posean (ver por ejemplo la Comprehensive Microbial Resource de JCVI, <http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR>). Esta distribución más restringida quizá refleja no sólo la existencia de menos tiempo para difundir, por un origen reciente, sino también la distribución más restringida de la agmatina que de la arginina en los entornos bacterianos [ver por ejemplo (Griswold y cols., 2006)].

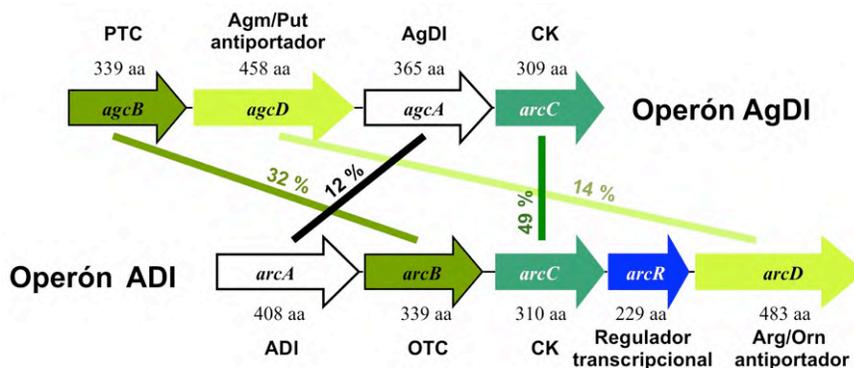


Figura 65. Comparación de la organización génica de los operones ADI y AgDI de *E. faecalis*.

Los diferentes marcos abiertos de lectura se muestran como flechas de colores, siendo blancas y verdes con borde negro los genes para las deaminasas y transcarbamilasas respectivamente, las flechas sin bordes, verdes oscuro y claro representan a los genes para las carbamato quinazas y los transportadores. Las líneas que conectan dos genes con funciones equivalentes en los operones tienen el mismo color que estos genes. Se muestra el número de aminoácidos codificado por cada marco de lectura y el porcentaje de identidad entre genes con funciones equivalentes (sobre las líneas conectoras).

13.2 La PTC en el universo de las transcarbamilasas

La elevada similitud entre las secuencias y estructuras de la OTC de *P. furiosus* (pfOTC) y la PTC de *E. faecalis* apoya la hipótesis de que ambas comparten un ancestro común, hipertermofílico, lo que podría ser respaldado por la baja actividad de PTC a 37°C ($\sim 700 \text{ U mg}^{-1}$) en comparación con la actividad de las OTCs características [$\sim 4000 \text{ U mg}^{-1}$, (Marshall y Cohen, 1972b; Kuo y cols., 1988)], lo cual podría ser una reminiscencia de un origen hipertermofílico de la PTC, ya que característicamente las enzimas hipertermofílicas exhiben baja actividad a temperaturas mesofílicas (Ramon-Maiques y cols., 2002; Legrain y cols., 1997).

La existencia de la hélice extra C-terminal encontrada en las PTCs (hélice 13) podría concordar con la idea de un origen hipertermofílico de la PTC desde un ancestro cercano a la pfOTC. En la pfOTC, que tiene una arquitectura dodecamérica, esencial en la resistencia a las altas temperaturas (Villeret y cols., 1998; Clantin y cols., 2001) cada uno de los trímeros que forman el dodecámero tiene una estabilidad relativamente baja (ΔG de disociación de $12,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, calculado con el servidor PISA) en comparación con los trímeros típicos de las OTCs mesofílicas (por ejemplo, ΔG de disociación calculado de $26,4 \text{ kcal mol}^{-1}$). En la estructura dodecamérica, el trímero está estabilizado por las conexiones entre las subunidades de los trímeros vecinos a través de contactos hidrofóbicos y enlaces iónicos que involucran principalmente a las hélices 1 de cada uno de estos trímeros. Por eso, para hacer posible la existencia de un trímero aislado, el ancestro de las PTCs podría haber reemplazado los contactos entre las

hélices 1 de las subunidades de distintos trímeros con contactos entre subunidades del mismo trímero, a través de la hélice extra C-terminal. Así, la hélice 13 podría cumplir un control dual, de estabilizar el trímero y de prevenir la asociación de los trímeros en una forma supratrimérica.

Si la PTC derivase de una enzima hipertermofílica ancestral, similar a la pfOTC, podría haber existido una presión selectiva para eliminar la organización supratrimérica que hiciese necesaria la incorporación de una hélice C-terminal para compensar la pérdida de estabilidad. Así, es posible pensar que la forma dodecamérica tuviera aparejada una restricción en los cambios conformacionales del protómero. Sin embargo, en pfOTC no parece que la forma supratrimérica esté negativamente asociada con la catálisis (Clantin y cols., 2001) y nuestras comparaciones con la PTC entre formas sin sustratos y con PAPU no revelan un grado de movimiento superior al que es típico en otras transcarbamilasas. Otra desventaja de una organización supratrimérica estable podría ser la tendencia a la degradación conjunta del oligómero completo cuando uno de los trímeros sufre daño oxidativo o por daño proteolítico. Sin embargo, la razón que puede resultar más atractiva contra la organización supratrimérica sería que ésta no fuera compatible con la formación de un metabolón que involucrara a la enzima AgDI, PTC y el antiportador agmatina/putrescina anclado a la membrana bacteriana, metabolón que tendría sentido para aumentar la eficiencia de la fermentación de agmatina del medio, la cual sería utilizada tan pronto como fuera internalizada. Teniendo en cuenta que la agmatina es un precursor de poliaminas (Tabor y Tabor, 1985), la restricción del uso fermentativo de

agmatina podría prevenir la modificación de los niveles de poliaminas intracelulares y el consumo fermentativo de la agmatina generada endógenamente. La participación de PTC en un complejo supramolecular no parece imposible. En algunas bacterias, la aspartato transcarbamilasa forma un complejo con la dihidroorotasa (Zhang y cols., 2009), y en animales forma una gran proteína multifuncional (CAD) que cataliza el paso inicial en la síntesis de pirimidinas (Evans y cols., 1993).

De cualquier modo, la presencia de un nuevo elemento de estructura secundaria como la hélice C-terminal previniendo la oligomerización de los trímeros es similar a lo descrito para la enzima aspartoquinasa III (Kotaka y cols., 2006), que incorpora una nueva horquilla de alfa hélices que cubre una superficie usada para establecer interacciones entre protómeros en todos los otros miembros de la familia aminoácido quinasa. Aunque la hélice C-terminal parece exclusiva de las PTCs, en la estructura de la OTC humana es posible observar un lazo C-terminal (Shi y cols., 1998), aunque mucho más corto que la hélice 13 de las PTCs y sin una estructura secundaria definida, que cubre en parte la hélice 1 de la misma subunidad, de modo que no permitiría la formación de estructuras supratriméricas. Este hallazgo, y el de la hélice C-terminal en la PTC que previene la oligomerización supratrimérica, inducen a pensar que sería importante examinar en mayor profundidad el papel de la organización supratrimérica entre las transcarbamilasas.

13.3 El significado biológico de la especificidad parcial de la PTC

Como ya se ha dicho, si la PTC proviniera de una OTC, quizá su aparición podría haber sido lo bastante reciente como para no haber dado tiempo a perfeccionar completamente una alta especificidad para putrescina. Sin embargo, también cabría considerar que la especificidad parcial pudiese haberse mantenido como una ventaja evolutiva al conferirle la posibilidad de cumplir una doble función, bien con putrescina, bien con ornitina. En línea con esta última hipótesis se ha demostrado recientemente que en el genoma de *L. monocytogenes* un mismo grupo de genes codifica para las vías AgDI y ADI (Chen y cols., 2011). Este grupo está compuesto por genes para dos deaminasas diferentes, una CK, un transportador y sólo una transcarbamilasa, la PTC. De ese modo, ambas vías parecen estar involucradas en la resistencia al ambiente ácido y pueden hacer uso de la capacidad doble de PTC para catalizar la fosforólisis de carbamilputrescina y citrulina (Chen y cols., 2011). Sin embargo, es interesante notar que aunque es posible identificar todos los genes del operón AgDI (incluyendo dos genes AgDI con identidad de 69% entre ellos), no es posible identificar un antiportador arginina/ornitina en el genoma de *L. monocytogenes* usando como modelos la secuencia del gen *arcD* de *E. faecalis* (EF0104 del genoma de *E. faecalis* V583) o de la proteína codificada por éste, lo que plantea interrogantes sobre la fuente de arginina para alimentar esta vía y el destino de la ornitina producida.

13.4 La reacción catalizada por la PTC

A la luz de los conocimientos existentes y de nuestros conocimientos estructurales es posible visualizar como sería el proceso completo de la

reacción catalizada por la PTC. Así, en un escenario donde los dominios de cada protómero vacío se encontraran en la posición abierta, los lazos móviles no estarían fijados en su posición cerrada y cada centro activo quedaría expuesto al solvente, haciendo posible la unión primero de la molécula de CP con su grupo fosfato en forma dianiónica, seleccionado principalmente por el residuo de Arg-54. El CP se anclaría en el centro activo con su grupo carbamilo estableciendo puentes de hidrógeno con los residuos de His-130 y Gln-133 del fondo de la cavidad, obligando al motivo STRT, y especialmente a la cadena lateral de Arg-54, a adoptar una conformación más cerrada, amoldándose al sustrato unido y permitiendo el establecimiento de los correspondientes enlaces con el lazo 80* del protómero vecino.

Una vez unido el primero de los sustratos, el centro activo de la proteína estaría preparado para unir a la putrescina. Tiempo atrás, Kuo y col. demostraron para OTC, que la ornitina sólo es capaz de unirse a la enzima en la forma zwitteriónica (Kuo y cols., 1985), lo que nos permite pensar que en la PTC la putrescina debería estar en una forma iónica monopositiva. Así, el grupo amino descargado, con un par electrónico libre (que denominamos $N\epsilon$), sería el que se une en las proximidades del carbono del CP, de manera que el otro grupo amino, cargado, pudiera establecer un puente salino con el residuo Asp-227, en la parte del centro activo más alejada del CP. Los dos sustratos unidos al centro activo participarían de una red de enlaces de hidrógeno entre los dos dominios del protómero que induciría y estabilizarían la conformación cerrada. Posteriormente, el lazo 80* estabilizado tras la unión del CP

contribuiría al anclaje del lazo 230 en su posición de cierre del centro activo, a través de la red de enlaces de hidrógeno descrita antes.

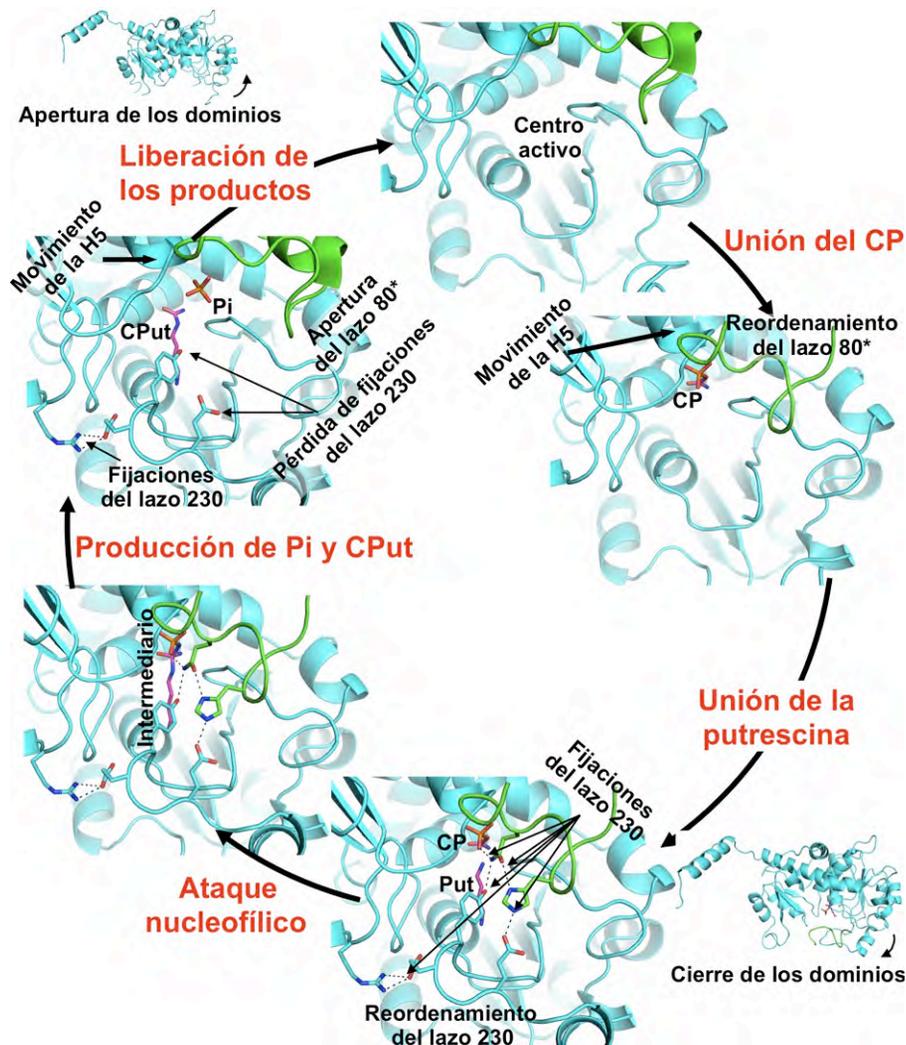


Figura 66. La reacción catalizada por la PTC.

Se muestran los posibles pasos involucrados en la reacción catalizada por la PTC. El protómero que aloja el centro activo se muestra en cian y el protómero vecino que aporta el lazo 80* (modelado a partir del PDB 3TXX), en verde. Se ilustran en palillos los sustratos, los productos y el intermediario de la reacción, así como también los residuos involucrados en la fijación del lazo 230. Carbamilputrescina (CPut) y el intermediario de la reacción fueron modelados a partir de las moléculas de acetilcitrulina del PDB 3KZK y ácido N δ -L-ornitina-diaminofosfinil-N-sulfónico del PDB 1DUV, respectivamente. El ion fosfato (Pi) fue modelada a partir del ion sulfato de PTC-apo. CP, carbamilfosfato; Put, putrescina.

El confinamiento y la ubicación de los sustratos permitiría que los dos átomos de hidrógeno unidos al grupo Nε de putrescina establecieran enlaces de hidrógenos con el grupo carbonilo de Leu-270 y con uno de los átomos de oxígeno negativamente cargado del grupo fosfato del CP. De ese modo, el par electrónico libre de Nε sería capaz de atacar nucleofílicamente al CP, generando un intermediario inestable, que derivaría en la producción de carbamilputrescina y fosfato libre. Este último ión ya no estaría anclado al fondo de la cavidad (como lo estuvo previamente por medio del grupo carbamilo) y se podría desplazar a una posición más externa, como la que tiene uno de los sulfatos en el cristal PTC-apo, permitiendo al motivo STRT volver a la posición más abierta, desestabilizando el anclaje de los lazos, que finalmente provocaría la apertura del sitio y liberaría a los productos.

Como se ha demostrado aquí mediante el desarrollo de mutantes, un residuo muy importante en el proceso catalítico es la Arg-54. La presencia constante entre las diferentes transcarbamilasas de una arginina equivalente (Labedan y cols., 1999), la existencia de pacientes humanos con deficiencia clínica de OTC llevando la mutación equivalente a la R54G descrita en esta tesis (R92 según la numeración de la OTC humana) (Yamaguchi y cols., 2006), y la observación de que el cloruro de guanidinio (GdnCl) también rescata parcialmente la actividad de la OTC de *E. coli* con la misma mutación (R57G) (Rynkiewicz y Seaton, 1996), sugieren la posibilidad de tratar la mutación de OTC in vivo con GdnCl o con análogos de Gdn. El uso de este compuesto en humanos podría ser tenido en cuenta, pues ha sido usado en el tratamiento del síndrome de Lambert-Eaton (Oh y cols., 1998). Sin embargo,

su elevada toxicidad haría deseable el desarrollo de análogos menos tóxicos que pudieran desempeñar la misma función. Nuestra estructura del complejo del mutante de PTC R54G unido a Gdn y nuestros conocimientos sobre la estructura de la PTC y de otras transcarbamilasas podría ser la base para sugerir análogos apropiados, que deberán ser el fruto de trabajos ulteriores al de esta tesis.

Conclusiones

1. El gen *agcB* codifica para la putrescina transcarbamilasa (PTC) y forma parte de un grupo de genes que codifican para los cuatro catalizadores proteicos de la ruta catabólica de la agmatina de la agmatina deiminasa (vía AgDI).
2. La PTC usa genuinamente como sustrato no sólo la putrescina, sino también la ornitina, aunque menos eficientemente.
3. La N-fosfonoacetilputrescina es un potente inhibidor bisustrato de la PTC, pero no de la ornitina transcarbamilasa (OTC).
4. La estructura cristalina de la PTC prueba que es un homotrímero muy similar al de la OTC.
5. La estructura de la PTC se diferencia de la de la OTC principalmente por un lazo de unión a sustrato (lazo 230) que confiere la preferencia por la putrescina y por una hélice extra C-terminal que enlaza subunidades adyacentes en el mismo trímero y que es un rasgo único y exclusivo de la PTC.
6. Las interacciones mediadas por el lazo 230 con el sustrato que se carbamila explican la pobreza de la ornitina como sustrato de la PTC.
7. La hélice C-terminal aumenta la estabilidad del trímero de PTC y evita la formación de estructuras supratriméricas que son comunes entre las OTCs.
8. La arginina 54 desempeña un papel clave en la catálisis y sus mutaciones inactivan la PTC. El ión guanidinio "cura" parcialmente los efectos de la mutación Arg54Gly por asentarse en el sitio de la arginina que falta en este mutante.

9. El reemplazo de la secuencia de parte del lazo 230 por la de parte del lazo equivalente SMG de las OTCs invierte la especificidad del enzima hacia la de una OTC.
10. La unión de PAPU fija los lazos del centro activo en una posición cerrada que lo recubre e induce un cierre de los dos dominios de cada subunidad describable como una rotación de unos 4° de un dominio hacia el otro dominio
11. La PTC une Ni^{2+} aproximadamente a mitad del eje ternario de la enzima.
12. Puede identificarse la PTC por su secuencia gracias a la presencia de los motivos STRT y HCLP, a la ausencia de una K y de la secuencia XSMG dos y unos 40 residuos antes de las secuencia STRT y HCLP, respectivamente, a la sustitución de la secuencia XSMG por la (Y/W)(G/W)(V/L/I)X, y a la extensión C-terminal de unos 20 residuos que incluye la secuencia (L/f/v/i)XX(F/Y/L/M/v)(L/i/m).
13. A pesar de sus similitudes con la ruta catabólica de la arginina de la arginina deiminasa (vía ADI), la vía AgDI no surgió por duplicación de la primera y coevolución posterior conjunta de todos sus elementos, siendo probable que surgiera una sola vez en un horizonte temporal no lejano por el reclutamiento de los componentes transcarbamilasa y carbamato quinasa de la vía ADI y de una agmatina deiminasa independiente derivada de una ruta de generación de poliaminas.

Bibliografía

Abdelal, A.T. (1979). Arginine catabolism by microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 33, 139-168.

Adams, P.D., Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Read, R.J., Richardson, J.S., Richardson, D.C., y Terwilliger, T.C. (2009). Recent developments in phasing and structure refinement for macromolecular crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 19, 566-572.

Akhter, S., Asna, Z.H., y Rahman, M.M. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of enterococcus species isolated from clinical specimens. *Mymensingh Med J* 20, 694-699.

Alberto, M., Arena, M., y Manca de Nadra, M. (2007). Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. *Food Control* 18, 898-903.

Allen, L. (1989). Electronegativity is the average one-electron energy of the valence-shell electrons in ground-state free atoms. *J Am Chem Soc*, 111, 9003–9014

Alonso, E., y Rubio, V. (1985). Determination of N-acetyl-L-glutamate using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 146, 252-259.

Anónimo-OMS (2004). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. En: Serie de evaluación de riesgos microbiológicos, O.M.Salud, ed. (Roma, Italia, Organización Mundial de la Salud).

Aoki, Y., Sunaga, H., y Suzuki, K.T. (1988). A cadmium-binding protein in rat liver identified as ornithine carbamoyltransferase. *Biochem J* 250, 735-742.

Archibald, R.M. (1944). Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J Biol Chem* 156, 121-142.

Arena, M., Russo, P., Capozzi, V., Beneduce, L., y Spano, G. (2011a). Effect of abiotic stress conditions on expression of the *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 tyrosine decarboxylase and agmatine deiminase genes. *Lett Appl Microbiol* 61, 179-183.

Arena, M.E., Landete, J.M., Manca de Nadra, M.C., Pardo, I., y Ferrer, S. (2008). Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* XB isolated from wine. *J Appl Microbiol* 105, 158-165.

Arena, M.P., Romano, A., Capozzi, V., Beneduce, L., Ghariani, M., Grieco, F., Lucas, P., y Spano, G. (2011b). Expression of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 tyrosine decarboxylase and agmatine deiminase genes in wine correlates with substrate availability. *Lett Appl Microbiol* 53, 395-402.

Audia, J.P., Webb, C.C., y Foster, J.W. (2001). Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol* 291, 97-106.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K., eds. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J.

Azevedo, Z., Couto, J.A., y Hogg, T. (2002). Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Lett Appl Microbiol* 34, 32-36.

Bagni, N., y Tassoni, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20, 301-317.

Barcelona-Andres, B., Marina, A., y Rubio, V. (2002). Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 184, 6289-6300.

Battye, T.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R., y Leslie, A.G. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 271-281.

Baur, H., Stalon, V., Falmagne, P., Luethi, E., y Haas, D. (1987). Primary and quaternary structure of the catabolic ornithine carbamoyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. Extensive sequence homology with the anabolic ornithine carbamoyltransferases of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 166, 111-117.

Baur, H., Luethi, E., Stalon, V., Mercenier, A., y Haas, D. (1989). Sequence analysis and expression of the arginine-deiminase and carbamate-kinase genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem* 179, 53-60.

Bojanowski, R., Gaudy, E., Valentine, R.C., y Wolfe, R.S. (1964). Oxamic Transcarbamylase of *Streptococcus Allantoicus*. J Bacteriol 87, 75-80.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.

Brunger, A.T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. Nature 355, 472-475.

Buchan, D.W., Ward, S.M., Lobley, A.E., Nugent, T.C., Bryson, K., y Jones, D.T. (2010). Protein annotation and modelling servers at University College London. Nucleic Acids Res 38, W563-568.

Burnett, G.H., y Cohen, P.P. (1957). Study of carbamyl phosphate-ornithine transcarbamylase. J Biol Chem 229, 337-344.

Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., y Boor, K.J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. Trends Microbiol 16, 388-396.

Chen, J., Jiang, L., Chen, Q., Zhao, H., Luo, X., Chen, X., y Fang, W. (2009). lmo0038 is involved in acid and heat stress responses and specific for *Listeria monocytogenes* lineages I and II, and *Listeria ivanovii*. Foodborne Pathog Dis 6, 365-376.

Chen, J., Cheng, C., Xia, Y., Zhao, H., Fang, C., Shan, Y., Wu, B., y Fang, W. (2011). Lmo0036, an ornithine and putrescine carbamoyltransferase

in *Listeria monocytogenes*, participates in arginine deiminase and agmatine deiminase pathways and mediates acid tolerance. *Microbiology* 157, 3150-61

Clantin, B., Tricot, C., Lonhienne, T., Stalon, V., y Villeret, V. (2001). Probing the role of oligomerization in the high thermal stability of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase by site-specific mutants. *Eur J Biochem* 268, 3937-3942.

Cohen, P.P., y Grisolia, S. (1948). The intermediate role of carbamyl-L-glutamic acid in citrulline synthesis. *J Biol Chem* 174, 389.

Collins, K.D., y Stark, G.R. (1971). Aspartate transcarbamylase. Interaction with the transition state analogue N-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *J Biol Chem* 246, 6599-6605.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., y Deleage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25, 147-150.

Coque, J.J., Perez-Llarena, F.J., Enguita, F.J., Fuente, J.L., Martin, J.F., y Liras, P. (1995). Characterization of the cmcH genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. *Gene* 162, 21-27.

Cotter, P.D., y Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 429-453, table of contents.

Crow, V.L., y Thomas, T.D. (1982). Arginine metabolism in lactic streptococci. *J Bacteriol* 150, 1024-1032.

Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A., y Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* 50, 314-352.

D'Hooghe, I., Vander Wauven, C., Michiels, J., Tricot, C., de Wilde, P., Vanderleyden, J., y Stalon, V. (1997). The arginine deiminase pathway in *Rhizobium etli*: DNA sequence analysis and functional study of the *arcABC* genes. *J Bacteriol* 179, 7403-7409.

Das, K., Butler, G.H., Kwiatkowski, V., Clark, A.D., Jr., Yadav, P., y Arnold, E. (2004). Crystal structures of arginine deiminase with covalent reaction intermediates; implications for catalytic mechanism. *Structure* 12, 657-667.

Dauter, Z. (2006). Current state and prospects of macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 1-11.

de Las Rivas, B., Rodriguez, H., Angulo, I., Munoz, R., y Mancheno, J.M. (2007). Overexpression, purification, crystallization and preliminary structural studies of catabolic ornithine transcarbamylase from *Lactobacillus hilgardii*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63, 563-567.

de Las Rivas, B., Fox, G.C., Angulo, I., Ripoll, M.M., Rodriguez, H., Munoz, R., y Mancheno, J.M. (2009). Crystal structure of the hexameric catabolic ornithine transcarbamylase from *Lactobacillus hilgardii*: Structural insights into the oligomeric assembly and metal binding. *J Mol Biol* 393, 425-434.

Deibel, R.H. (1964). Utilization of arginine as an energy source for the growth of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 87, 988-992.

Driessen, A.J., Smid, E.J., y Konings, W.N. (1988). Transport of diamines by *Enterococcus faecalis* is mediated by an agmatine-putrescine antiporter. *J Bacteriol* 170, 4522-4527.

Emsley, P., y Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

Endrizzi, J.A., Beernink, P.T., Alber, T., y Schachman, H.K. (2000). Binding of bisubstrate analog promotes large structural changes in the unregulated catalytic trimer of aspartate transcarbamoylase: implications for allosteric regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5077-5082.

Engel, H.W., Soedirman, N., Rost, J.A., van Leeuwen, W.J., y van Embden, J.D. (1980). Transferability of macrolide, lincomycin, and streptogramin resistances between group A, B, and D streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 142, 407-413.

Evans, D.R., Bein, K., Guy, H.I., Liu, X., Molina, J.A., y Zimmermann, B.H. (1993). CAD gene sequence and the domain structure of the mammalian multifunctional protein CAD. *Biochem Soc Trans* 21, 186-191.

Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 72-82.

Falmagne, P., Portetelle, D., y Stalon, V. (1985). Immunological and structural relatedness of catabolic ornithine carbamoyltransferases and the anabolic enzymes of enterobacteria. *J Bacteriol* 161, 714-719.

Fernández, M., y Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol* 32, 155-183.

French, S., y Wilson, K. (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr A* 34, 517-525.

Frömmel, C., y Preissner, R. (1990). Prediction of prolyl residues in cis-conformation in protein structures on the basis of the amino acid sequence. *FEBS Lett* 277, 159-163.

Galgano, F., Caruso, M., Condelli, N., y Favati, F. (2012). Focused review: agmatine in fermented foods. *Front Microbiol* 3, 199.

Galkin, A., Kulakova, L., Sarikaya, E., Lim, K., Howard, A., y Herzberg, O. (2004). Structural insight into arginine degradation by arginine deiminase, an antibacterial and parasite drug target. *J Biol Chem* 279, 14001-14008.

Galkin, A., Kulakova, L., Wu, R., Gong, M., Dunaway-Mariano, D., y Herzberg, O. (2009). X-ray structure and kinetic properties of ornithine transcarbamoylase from the human parasite *Giardia lamblia*. *Proteins* 76, 1049-1053.

Galloway-Pena, J.R., Nallapareddy, S.R., Arias, C.A., Eliopoulos, G.M., y Murray, B.E. (2009). Analysis of clonality and antibiotic resistance

among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. J Infect Dis 200, 1566-1573.

Gerhart, J.C., y Pardee, A.B. (1962). The enzymology of control by feedback inhibition. J Biol Chem 237, 891-896.

Gerhart, J.C., y Pardee, A.B. (1964). Aspartate Transcarbamylase, an Enzyme Designed for Feedback Inhibition. Fed Proc 23, 727-735.

Gerhart, J.C., y Schachman, H.K. (1968). Allosteric interactions in aspartate transcarbamylase. II. Evidence for different conformational states of the protein in the presence and absence of specific ligands. Biochemistry 7, 538-552.

Glasziou, K.T. (1956). The Metabolism of arginine in *Serratia Marcescens* II. Carbamyl-Adenosine Diphosphate Phosphoferase. Australian J Biol Sci 9, 253-262.

Glória, M.B.A., e Izquierdo-Pulido, M. (1999). Levels and Significance of Biogenic Amines in Brazilian Beers. J Food Compost Anal 12, 129-136.

Goloubinoff, P., Gatenby, A.A., y Lorimer, G.H. (1989). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. Nature 337, 44-47.

Grisolia, S., y Cohen, P.P. (1951). Study of citrulline synthesis with soluble enzyme preparations. J Biol Chem 191, 189-202.

Grisolia, S., y Cohen, P.P. (1952). The catalytic role of carbamyl glutamate in citrulline biosynthesis. J Biol Chem 198, 561-571.

Griswold, A.R., Chen, Y.Y., y Burne, R.A. (2004). Analysis of an agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol* 186, 1902-1904.

Griswold, A.R., Jameson-Lee, M., y Burne, R.A. (2006). Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol* 188, 834-841.

Griswold, A.R., Nascimento, M.M., y Burne, R.A. (2009). Distribution, regulation and role of the agmatine deiminase system in mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 24, 79-82.

Gruening, P., Fulde, M., Valentin-Weigand, P., y Goethe, R. (2006). Structure, regulation, and putative function of the arginine deiminase system of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* 188, 361-369.

Ha, Y., McCann, M.T., Tuchman, M., y Allewell, N.M. (1997). Substrate-induced conformational change in a trimeric ornithine transcarbamoylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9550-9555.

Heresztyn, T. (1986). Formation of Substituted Tetrahydropyridines by Species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* Isolated from Mousy Wines. *Am J Enol Vitic* 37, 127-132.

Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., y Fridkin, S.K. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the

Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29, 996-1011.

Hills, G.M. (1940). Ammonia production by pathogenic bacteria. *Biochem J* 34, 1057-1069.

Hommel, F.A., Eller, A.G., Scott, D.F., y Carter, A.L. (1983). Separation of ornithine and lysine activities of the ornithine-transcarbamylase-catalyzed reaction. *Enzyme* 29, 271-277.

Houghton, J.E., Bencini, D.A., O'Donovan, G.A., y Wild, J.R. (1984). Protein differentiation: a comparison of aspartate transcarbamoylase and ornithine transcarbamoylase from *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4864-4868.

Jacobson, G.R., y Stark, G.R. (1973). Aspartate transcarbamylase. A study of possible roles for the sulfhydryl group at the active site. *J Biol Chem* 248, 8003-8014.

Jancarik, J., y Kim, S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Crystallogr* 24, 409-411.

Jett, B.D., Huycke, M.M., y Gilmore, M.S. (1994). Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7, 462-478.

Jin, L., Seaton, B.A., y Head, J.F. (1997). Crystal structure at 2.8 Å resolution of anabolic ornithine transcarbamylase from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* 4, 622-625.

Jin, L., Stec, B., Lipscomb, W.N., y Kantrowitz, E.R. (1999). Insights into the mechanisms of catalysis and heterotropic regulation of *Escherichia*

coli aspartate transcarbamoylase based upon a structure of the enzyme complexed with the bisubstrate analogue N-phosphonacetyl-L-aspartate at 2.1 Å. *Proteins* 37, 729-742.

Jones, M.E., Spector, L., y Lipmann, F. (1955). Carbamyl phosphate, the carbamyl donor in enzymatic citrulline synthesis. *J Am Chem Soc* 77, 819-820.

Jones, M.E. (1963). Carbamyl Phosphate: Many forms of life use this molecule to synthesize arginine, uracil, and adenosine triphosphate. *Science* 140, 1373-1379.

Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Karlowsky, J.A., Sahm, D.F., y Wenzel, R.P. (2004). Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit -- a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 3, 14.

Kabsch, W. (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallogr A* 32, 922-923.

Kantardjieff, K.A., y Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* 12, 1865-1871.

Kantrowitz, E.R., y Lipscomb, W.N. (1988). *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase: the relation between structure and function. *Science* 241, 669-674.

Ke, H.M., Honzatko, R.B., y Lipscomb, W.N. (1984). Structure of unligated aspartate carbamoyltransferase of *Escherichia coli* at 2.6-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4037-4040.

Ke, H.M., Lipscomb, W.N., Cho, Y.J., y Honzatko, R.B. (1988). Complex of N-phosphonacetyl-L-aspartate with aspartate carbamoyltransferase. X-ray refinement, analysis of conformational changes and catalytic and allosteric mechanisms. *J Mol Biol* 204, 725-747.

Keefe, A.D., y Miller, S.L. (1995). Are polyphosphates or phosphate esters prebiotic reagents? *J Mol Evol* 41, 693-702.

Kingsford, C.L., Ayanbule, K., y Salzberg, S.L. (2007). Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome Biol* 8, R22.

Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol* 88, 123-131.

Kleywegt, G.J. (2007). Crystallographic refinement of ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 94-100.

Knivett, V.A. (1954). The anaerobic interconversion of ornithine and citrulline by *Streptococcus faecalis*. *Biochem J* 58, 480-486.

Kotaka, M., Ren, J., Lockyer, M., Hawkins, A.R., y Stammers, D.K. (2006). Structures of R- and T-state *Escherichia coli* aspartokinase III.

Mechanisms of the allosteric transition and inhibition by lysine. *J Biol Chem* 281, 31544-31552.

Krause, K.L., Volz, K.W., y Lipscomb, W.N. (1985). Structure at 2.9-Å resolution of aspartate carbamoyltransferase complexed with the bisubstrate analogue N-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1643–1647.

Krebs, H.A., y Henseleit, K. (1932). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z physiol Chem*, 210, 33-66.

Krissinel, E., y Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2256-2268.

Krissinel, E., y Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797.

Kuo, L.C., Herzberg, W., y Lipscomb, W.N. (1985). Substrate specificity and protonation state of ornithine transcarbamoylase as determined by pH studies. *Biochemistry* 24, 4754-4761.

Kuo, L.C., Miller, A.W., Lee, S., y Kozuma, C. (1988). Site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* ornithine transcarbamoylase: role of arginine-57 in substrate binding and catalysis. *Biochemistry* 27, 8823-8832.

Labeledan, B., Boyen, A., Baetens, M., Charlier, D., Chen, P., Cunin, R., Durbeco, V., Glansdorff, N., Herve, G., Legrain, C., y col. (1999). The evolutionary history of carbamoyltransferases: A complex set of paralogous

genes was already present in the last universal common ancestor. *J Mol Evol* 49, 461-473.

Ladero, V., Rattray, F.P., Mayo, B., Martin, M.C., Fernández, M., y Alvarez, M.A. (2011). Sequencing and transcriptional analysis of the biosynthesis gene cluster of putrescine-producing *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 77, 6409-6418.

Ladner, J.E., Kitchell, J.P., Honzatko, R.B., Ke, H.M., Volz, K.W., Kalb, A.J., Ladner, R.C., y Lipscomb, W.N. (1982). Gross quaternary changes in aspartate carbamoyltransferase are induced by the binding of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate: A 3.5-Å resolution study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3125-3128.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laishley, E.J., y Bernlohr, R.W. (1968). The regulation and kinetics of the two ornithine transcarbamylase enzymes of *Bacillus licheniformis*. *Biochim Biophys Acta* 167, 547-554.

Landete, J.M., Arena, M.E., Pardo, I., Manca de Nadra, M.C., y Ferrer, S. (2010). The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase. *Int Microbiol* 13, 169-177.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., y Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J App Crystallogr* 26, 283-291.

Leavis, H.L., Bonten, M.J., y Willems, R.J. (2006). Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 9, 454-460.

Lee, Y., y Kwon, Y.M. (2000). Identification of an isoform of ornithine carbamoyltransferase that can effectively utilize canaline as a substrate from the leaves of *Canavalia lineata*. *Plant Sci* 151, 145-151.

Lee, Y., Choi, Y.A., Hwang, I.D., Kim, S.G., y Kwon, Y.M. (2001). cDNA cloning of two isoforms of ornithine carbamoyltransferase from *Canavalia lineata* leaves and the effect of site-directed mutagenesis of the carbamoyl phosphate binding site. *Plant Mol Biol* 46, 651-660.

Legrain, C., Stalon, V., Noullez, J.P., Mercenier, A., Simon, J.P., Broman, K., y Wiame, J.M. (1977). Structure and function of ornithine carbamoyltransferases. *Eur J Biochem* 80, 401-409.

Legrain, C., Villeret, V., Roovers, M., Gigot, D., Dideberg, O., Pierard, A., y Glansdorff, N. (1997). Biochemical characterisation of ornithine carbamoyltransferase from *Pyrococcus furiosus*. *Eur J Biochem* 247, 1046-1055.

Leloir, L.F., y Cardini, C.E. (1957). [115] Characterization of phosphorus compounds by acid lability. *Methods Enzymol* 3, 840-850.

Lester, C.H., Sandvang, D., Olsen, S.S., Schonheyder, H.C., Jarlov, J.O., Bangsborg, J., Hansen, D.S., Jensen, T.G., Frimodt-Moller, N., y Hammerum, A.M. (2008). Emergence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in Danish hospitals. *J Antimicrob Chemother* 62, 1203-1206.

Li, Y., Yu, X., Ho, J., Fushman, D., Allewell, N.M., Tuchman, M., y Shi, D. (2010). Reversible post-translational carboxylation modulates the enzymatic activity of N-acetyl-L-ornithine transcarbamylase. *Biochemistry* 49, 6887-6895.

Lipscomb, W.N., y Kantrowitz, E.R. (2012). Structure and mechanisms of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Acc Chem Res* 45, 444-453.

Liu, Y., y Burne, R.A. (2009). Multiple two-component systems of *Streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance. *J Bacteriol* 191, 7363-7366.

Llácer, J.L., Polo, L.M., Tavarez, S., Alarcon, B., Hilario, R., y Rubio, V. (2007). The gene cluster for agmatine catabolism of *Enterococcus faecalis*: study of recombinant putrescine transcarbamylase and agmatine deiminase and a snapshot of agmatine deiminase catalyzing its reaction. *J Bacteriol* 189, 1254-1265.

Loesche, W.J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50, 353-380.

Lovell, S.C., Word, J.M., Richardson, J.S., y Richardson, D.C. (2000). The penultimate rotamer library. *Proteins* 40, 389-408.

Lowenstein, J.M., y Cohen, P.P. (1956). Studies on the biosynthesis of carbamylaspartic acid. *J Biol Chem* 220, 57-70.

Lucas, P., Blancato, V., Claisse, O., Magni, C., Lolkema, J., y Lonvaud-Funel, A. (2007). Agmatine deiminase pathway genes in

Lactobacillus brevis are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology* 153, 2221-2230.

Luthi, E., Mercenier, A., y Haas, D. (1986). The *arcABC* operon required for fermentative growth of *Pseudomonas aeruginosa* on arginine: Tn5-751-assisted cloning and localization of structural genes. *J Gen Microbiol* 132, 2667-2675.

Maghnouj, A., de Sousa Cabral, T.F., Stalon, V., y Vander Wauven, C. (1998). The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor *argR*. *J Bacteriol* 180, 6468-6475.

Manca de Nadra, M.C., y Strasser de Saad, A.M. (1995). Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Int J Food Microbiol* 27, 101-106.

Marina, A., Uriarte, M., Barcelona, B., Fresquet, V., Cervera, J., y Rubio, V. (1998). Carbamate kinase from *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*--cloning of the genes, studies on the enzyme expressed in *Escherichia coli*, and sequence similarity with N-acetyl-L-glutamate kinase. *Eur J Biochem* 253, 280-291.

Marina, A., Alzari, P.M., Bravo, J., Uriarte, M., Barcelona, B., Fita, I., y Rubio, V. (1999). Carbamate kinase: New structural machinery for making carbamoyl phosphate, the common precursor of pyrimidines and arginine. *Protein Sci* 8, 934-940.

Marshall, M., y Cohen, P.P. (1972a). Ornithine transcarbamylase from *Streptococcus faecalis* and bovine liver. I. Isolation and subunit structure. *J Biol Chem* 247, 1641-1653.

Marshall, M., y Cohen, P.P. (1972b). Ornithine transcarbamylase from *Streptococcus faecalis* and bovine liver. II. Multiple binding sites for carbamyl-P and L-norvaline, correlation with steady state kinetics. *J Biol Chem* 247, 1654-1668.

McBride, S.M., Fischetti, V.A., Leblanc, D.J., Moellering, R.C., Jr., y Gilmore, M.S. (2007). Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *Plos One* 2, e582.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., y Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607-625.

Mercenier, A., Simon, J.P., Haas, D., y Stalon, V. (1980). Catabolism of L-arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 116, 381-389.

Mokrasch, L.C., Caravaca, J., y Grisolia, S. (1960). A highly active carbamate kinase and its application to the regeneration and preparation of [32P] adenine nucleotides. *Biochim Biophys Acta* 37, 442-447.

Møller, V. (1955). Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 36, 158-172.

Monaco, H.L., Crawford, J.L., y Lipscomb, W.N. (1978). Three-dimensional structures of aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia*

coli and of its complex with cytidine triphosphate. Proc Natl Acad Sci U S A 75, 5276-5280.

Morada, M., Smid, O., Hampl, V., Sutak, R., Lam, B., Rappelli, P., Dessi, D., Fiori, P.L., Tachezy, J., y Yarlett, N. (2011). Hydrogenosome-localization of arginine deiminase in *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 176, 51-54.

Mori, M., Aoyagi, K., Tatibana, M., Ishikawa, T., e Ishii, H. (1977). Nδ-(phosphonacetyl)-L-ornithine, a potent transition state analogue inhibitor of ornithine carbamoyltransferase. Biochem Biophys Res Commun 76, 900-904.

Morizono, H., Cabrera-Luque, J., Shi, D., Gallegos, R., Yamaguchi, S., Yu, X., Allewell, N.M., Malamy, M.H., y Tuchman, M. (2006). Acetylornithine transcarbamylase: a novel enzyme in arginine biosynthesis. J Bacteriol 188, 2974-2982.

Murshudov, G.N., Skubak, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., y Vagin, A.A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 67, 355-367.

Nakada, Y., Jiang, Y., Nishijyo, T., Itoh, Y., y Lu, C.D. (2001). Molecular characterization and regulation of the aguBA operon, responsible for agmatine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 183, 6517-6524.

Nakada, Y., e Itoh, Y. (2003). Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology* 149, 707-714.

Nakamura, M., y Jones, M.E. (1970). [32] Ornithine carbamyltransferase (*Streptococcus faecalis*). *Methods Enzymol* 17, 286-294.

Naumoff, D.G., Xu, Y., Glansdorff, N., y Labedan, B. (2004a). Retrieving sequences of enzymes experimentally characterized but erroneously annotated: the case of the putrescine carbamoyltransferase. *BMC Genomics* 5, 52.

Naumoff, D.G., Xu, Y., Stalon, V., Glansdorff, N., y Labedan, B. (2004b). The difficulty of annotating genes: the case of putrescine carbamoyltransferase. *Microbiology* 150, 3908-3911.

Nuzum, C.T., y Snodgrass, P.J. (1976). Multiple assays of the five urea cycle enzymes in human liver homogenates. En: *Urea Cycle*, S. Grisolia, R. Bagnena, y F. Mayor, eds. (New York, N.Y, John Wiley & Sons), p. 325.

Oginsky, E.L., y Gehrig, R.F. (1952). The arginine dihydrolase system of *Streptococcus faecalis*. II. Properties of arginine desimidase. *J Biol Chem* 198, 799-805.

Oginsky, E.L., y Gehrig, R.F. (1953). The arginine dihydrolase system of *Streptococcus faecalis*. III. The decomposition of citruline. *J Biol Chem* 204, 721-729.

Oh, S.J., Kim, D.S., Kwon, K.H., Tseng, A., Mussell, H., y Claussen, G.C. (1998). Wide spectrum of symptomatic treatment in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 841, 827-831.

Otwinowski, Z., y Minor, W. (1997). [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 276, 307-326.

Painter, J., y Merritt, E.A. (2006). TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *J Appl Crystallogr* 39, 109-111.

Park, S.M., Lu, C.D., y Abdelal, A.T. (1997). Cloning and characterization of *argR*, a gene that participates in regulation of arginine biosynthesis and catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 179, 5300-5308.

Parmentier, L.E., y Kristensen, J.S. (1998). Studies on the urea cycle enzyme ornithine transcarbamylase using heavy atom isotope effects. *Biochim Biophys Acta* 1382, 333-338.

Paulsen, I.T., Banerjee, L., Myers, G.S., Nelson, K.E., Seshadri, R., Read, T.D., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., y col. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299, 2071-2074.

Penninckx, M., y Gigot, D. (1978). Synthesis and interaction with *Escherichia coli* L-ornithine carbamoyltransferase of two potential transition-state analogues. *FEBS Lett* 88, 94-96.

Penninckx, M., y Gigot, D. (1979). Synthesis of a peptide form of N δ -(phosphonoacetyl)-L-ornithine. Its antibacterial effect through the specific inhibition of *Escherichia coli* L-ornithine carbamoyltransferase. *J Biol Chem* 254, 6392-6396.

Petrack, B., Sullivan, L., y Ratner, S. (1957). Behavior of purified arginine desiminase from *S. faecalis*. *Arch Biochem Biophys* 69, 186-197.

Polo, L.M., Gil-Ortiz, F., Cantin, A., y Rubio, V. (2012). New insight into the transcarbamylase family: the structure of putrescine transcarbamylase, a key catalyst for fermentative utilization of agmatine. *Plos One* 7, e31528.

Poolman, B., Driessen, A.J., y Konings, W.N. (1987). Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol* 169, 5597-5604.

Powell, H.R. (1999). The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1690-1695.

Rahman, M., Laverack, P.D., y Clarke, P.H. (1980). The catabolism of arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 116, 371-380.

Ramon-Maiques, S., Britton, H.G., y Rubio, V. (2002). Molecular physiology of phosphoryl group transfer from carbamoyl phosphate by a hyperthermophilic enzyme at low temperature. *Biochemistry* 41, 3916-3924.

Ramos, F., Stalon, V., Pierard, A., y Wiame, J.M. (1967). The specialization of the two ornithine carbamoyltransferases of *Pseudomonas*. *Biochim Biophys Acta* 139, 98-106.

Rice, L.B. (2001). Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 7, 183-187.

Rimmaux, T., Riviere, A., Illegheems, K., Weckx, S., De Vuyst, L., y Leroy, F. (2012). Expression of the Arginine Deiminase Pathway Genes in *Lactobacillus sakei* Is Strain Dependent and Is Affected by the Environmental pH. *Appl Environ Microbiol* 78, 4874-4883.

Roberts, M.F., Opella, S.J., Schaffer, M.H., Phillips, H.M., y Stark, G.R. (1976). Evidence from ¹³C NMR for protonation of carbamyl-P and N-(phosphonacetyl)-L-aspartate in the active site of aspartate transcarbamylase. *J Biol Chem* 251, 5976-5985.

Robey, E.A., y Schachman, H.K. (1985). Regeneration of active enzyme by formation of hybrids from inactive derivatives: implications for active sites shared between polypeptide chains of aspartate transcarbamoylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 361-365.

Roon, R.J., y Barker, H.A. (1972). Fermentation of agmatine in *Streptococcus faecalis*: occurrence of putrescine transcarbamoylase. *J Bacteriol* 109, 44-50.

Rosenbusch, J.P., y Weber, K. (1971). Subunit structure of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 246, 1644-1657.

Rossmann, M.G., y Blow, D.M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica* 15, 24-31.

Ruepp, A., y Soppa, J. (1996). Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarium* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene

products, and transcripts of the *arcRACB* gene cluster. *J Bacteriol* *178*, 4942-4947.

Rulisek, L., y Vondrasek, J. (1998). Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺) in metalloproteins. *J Inorg Biochem* *71*, 115-127.

Rynkiewicz, M.J., y Seaton, B.A. (1996). Chemical rescue by guanidine derivatives of an arginine-substituted site-directed mutant of *Escherichia coli* ornithine transcarbamylase. *Biochemistry* *35*, 16174-16179.

Sachsenheimer, W., y Schulz, G.E. (1977). Two conformations of crystalline adenylate kinase. *J Mol Biol* *114*, 23-36.

Salah, R., Dar-Odeh, N., Abu Hammad, O., y Shehabi, A.A. (2008). Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental Diseases. *BMC Oral Health* *8*, 17.

Sankaranarayanan, R., Cherney, M.M., Cherney, L.T., Garen, C.R., Moradian, F., y James, M.N. (2008). The crystal structures of ornithine carbamoyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* and its ternary complex with carbamoyl phosphate and L-norvaline reveal the enzyme's catalytic mechanism. *J Mol Biol* *375*, 1052-1063.

Santos, W.C., Souza, M.R., Cerqueira, M.M.O.P., y Glória, M.B.A. (2003). Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32° C. *Food Chemistry* *81*, 595-606.

Schlech, W.F., 3rd, Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., y col. (1983). Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 308, 203-206.

Schofield, P.J., Edwards, M.R., Matthews, J., y Wilson, J.R. (1992). The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol* 51, 29-36.

Schuttelkopf, A.W., y van Aalten, D.M. (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 1355-1363.

Sedgley, C., Nagel, A., Dahlen, G., Reit, C., y Molander, A. (2006). Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 32, 173-177.

Sherman, J.M. (1937). The Streptococci. *Bacteriol Rev* 1, 3-97.

Shi, D., Morizono, H., Ha, Y., Aoyagi, M., Tuchman, M., y Allewell, N.M. (1998). 1.85-Å resolution crystal structure of human ornithine transcarbamoylase complexed with N-phosphonacetyl-L-ornithine. Catalytic mechanism and correlation with inherited deficiency. *J Biol Chem* 273, 34247-34254.

Shi, D., Morizono, H., Aoyagi, M., Tuchman, M., y Allewell, N.M. (2000). Crystal structure of human ornithine transcarbamylase complexed with carbamoyl phosphate and L-norvaline at 1.9 Å resolution. *Proteins* 39, 271-277.

Shi, D., Morizono, H., Yu, X., Tong, L., Allewell, N.M., y Tuchman, M. (2001). Human ornithine transcarbamylase: crystallographic insights into substrate recognition and conformational changes. *Biochem J* 354, 501-509.

Shi, D., Morizono, H., Yu, X., Roth, L., Caldovic, L., Allewell, N.M., Malamy, M.H., y Tuchman, M. (2005). Crystal structure of N-acetylornithine transcarbamylase from *Xanthomonas campestris*: a novel enzyme in a new arginine biosynthetic pathway found in several eubacteria. *J Biol Chem* 280, 14366-14369.

Shi, D., Morizono, H., Cabrera-Luque, J., Yu, X., Roth, L., Malamy, M.H., Allewell, N.M., y Tuchman, M. (2006a). Structure and catalytic mechanism of a novel N-succinyl-L-ornithine transcarbamylase in arginine biosynthesis of *Bacteroides fragilis*. *J Biol Chem* 281, 20623-20631.

Shi, D., Yu, X., Roth, L., Morizono, H., Tuchman, M., y Allewell, N.M. (2006b). Structures of N-acetylornithine transcarbamoylase from *Xanthomonas campestris* complexed with substrates and substrate analogs imply mechanisms for substrate binding and catalysis. *Proteins* 64, 532-542.

Shi, D., Yu, X., Zhao, G., Ho, J., Lu, S., Allewell, N.M., Tuchman, M. (2012) Crystal structure and biochemical properties of putrescine carbamoyltransferase from *Enterococcus faecalis*: Assembly, active site, and allosteric regulation. *Proteins* 80, 1436-1447

Simon, J.P., y Stalon, V. (1982). Enzymes of agmatine degradation and the control of their synthesis in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 152, 676-681.

Siqueira, J.F., Jr., y Rocas, I.N. (2004). Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97, 85-94.

Siqueira, J.F., Jr., y Rocas, I.N. (2009). Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol I*.

Slade, H.D., y Slamp, W.C. (1952). The formation of arginine dihydrolase by streptococci and some properties of the enzyme system. *J Bacteriol* 64, 455-466.

Sood, S., Malhotra, M., Das, B.K., y Kapil, A. (2008). Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res* 128, 111-121.

Spies, J.R. (1957). [76] Colorimetric procedures for amino acids. *Methods Enzymol* 3, 467-477.

Stalon, V., Ramos, F., Pierard, A., y Wiame, J.M. (1967). The occurrence of a catabolic and an anabolic ornithine carbamoyltransferase in *Pseudomonas*. *Biochim Biophys Acta* 139, 91-97.

Stalon, V., Legrain, C., y Wiame, J.M. (1977). Anabolic ornithine carbamoyltransferase of *Pseudomonas*. The bases of its functional specialization. *Eur J Biochem* 74, 319-327.

Stalon, V., y Mercenier, A. (1984). L-arginine utilization by *Pseudomonas* species. *J Gen Microbiol* 130, 69-76.

Stebbins, J.W., Xu, W., y Kantrowitz, E.R. (1989). Three residues involved in binding and catalysis in the carbamyl phosphate binding site of *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase. *Biochemistry* 28, 2592-2600.

Stebbins, J.W., Robertson, D.E., Roberts, M.F., Stevens, R.C., Lipscomb, W.N., y Kantrowitz, E.R. (1992). Arginine 54 in the active site of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase is critical for catalysis: a site-specific mutagenesis, NMR, and X-ray crystallographic study. *Protein Sci* 1, 1435-1446.

Sulkowska, J.I., Sulkowski, P., Szymczak, P., y Cieplak, M. (2008). Stabilizing effect of knots on proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19714-19719.

Swyryd, E.A., Seaver, S.S., y Stark, G.R. (1974). N-(phosphonacetyl)-L-aspartate, a potent transition state analog inhibitor of aspartate transcarbamylase, blocks proliferation of mammalian cells in culture. *J Biol Chem* 249, 6945-6950.

Tabor, C.W., y Tabor, H. (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* 49, 81-99.

Taylor, G.L. (2010). Introduction to phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 325-338.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Tigier, H., y Grisolia, S. (1965). Induction of Carbamyl-P Specific Oxamate Transcarbamylase by Parabanic Acid in a *Streptococcus*. *Biochem Biophys Res Commun* 19, 209-214.

Tonon, T., y Lonvaud-Funel, A. (2002). Arginine metabolism by wine Lactobacilli isolated from wine. *Food Microbiology* 19, 451-461.

Tricot, C., De Coen, J.L., Momin, P., Falmagne, P., y Stalon, V. (1989). Evolutionary relationships among bacterial carbamoyltransferases. *J Gen Microbiol* 135, 2453-2464.

Tuchman, M., Morizono, H., Reish, O., Yuan, X., y Allewell, N.M. (1995). The molecular basis of ornithine transcarbamylase deficiency: modelling the human enzyme and the effects of mutations. *J Med Genet* 32, 680-688.

Vagin, A., y Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 22-25.

Van Vliet, F., Cunin, R., Jacobs, A., Piette, J., Gigot, D., Lauwereys, M., Pierard, A., y Glansdorff, N. (1984). Evolutionary divergence of genes for ornithine and aspartate carbamoyl-transferases--complete sequence and mode of regulation of the *Escherichia coli* argF gene; comparison of argF with argI and pyrB. *Nucleic Acids Res* 12, 6277-6289.

Vander Wauven, C., Simon, J.P., Slos, P., y Stalon, V. (1986). Control of enzyme synthesis in the oxalurate catabolic pathway of *Streptococcus faecalis* ATCC 11700: evidence for the existence of a third carbamate kinase. *Arch Microbiol* 145, 386-390.

Verhoogt, H.J., Smit, H., Abee, T., Gamper, M., Driessen, A.J., Haas, D., y Konings, W.N. (1992). *arcD*, the first gene of the *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, encodes an arginine-ornithine exchanger. *J Bacteriol* *174*, 1568-1573.

Villeret, V., Tricot, C., Stalon, V., y Dideberg, O. (1995). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* catabolic ornithine transcarbamoylase at 3.0-Å resolution: a different oligomeric organization in the transcarbamoylase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 10762-10766.

Villeret, V., Clantin, B., Tricot, C., Legrain, C., Roovers, M., Stalon, V., Glansdorff, N., y Van Beeumen, J. (1998). The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2801-2806.

Virnau, P., Mirny, L.A., y Kardar, M. (2006). Intricate knots in proteins: Function and evolution. *PLoS computational biology* *2*, e122.

Wang, J., Stieglitz, K.A., Cardia, J.P., y Kantrowitz, E.R. (2005). Structural basis for ordered substrate binding and cooperativity in aspartate transcarbamoylase *Proc Natl Acad Sci USA* *102*, 8881–8886

Wang, Q., Xia, J., Guallar, V., Krilov, G., y Kantrowitz, E.R. (2008). Mechanism of thermal decomposition of carbamoyl phosphate and its stabilization by aspartate and ornithine transcarbamoylases. *Proc Natl Acad Sci USA* *105*, 16918-16923.

Wargnies, B., Lauwers, N., y Stalon, V. (1979). Structure and properties of the putrescine carbamoyltransferase of *Streptococcus faecalis*. Eur J Biochem 101, 143-152.

Weber, K. (1968a). New structural model of *E. coli* aspartate transcarbamylase and the amino-acid sequence of the regulatory polypeptide chain. Nature 218, 1116-1119.

Weber, K. (1968b). Aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. Characterization of the polypeptide chains by molecular weight, amino acid composition, and amino-terminal residues. J Biol Chem 243, 543-546.

Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., y Tenover, F.C. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science 302, 1569-1571.

Wild, J.R., y Wales, M.E. (1990). Molecular evolution and genetic engineering of protein domains involving aspartate transcarbamoylase. Annu Rev Microbiol 44, 193-218.

Wimmer, F., Oberwinkler, T., Bisle, B., Tittor, J., y Oesterhelt, D. (2008). Identification of the arginine/ornithine antiporter *ArcD* from *Halobacterium salinarum*. FEBS letters 582, 3771-3775.

Winn, M.D., Murshudov, G.N., y Papiz, M.Z. (2003). Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions. Meth Enzymol 374, 300-321.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., *y col.* (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 235-242.

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., *y* Jaskolski, M. (2008). Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J* 275, 1-21.

Xu, H., Heide, L., *y* Li, S.M. (2004). New aminocoumarin antibiotics formed by a combined mutational and chemoenzymatic approach utilizing the carbamoyltransferase NovN. *Chem Biol* 11, 655-662.

Xu, W., *y* Kantrowitz, E.R. (1989). Function of threonine-55 in the carbamoyl phosphate binding site of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 28, 9937-9943.

Xu, W., *y* Kantrowitz, E.R. (1991). Function of serine-52 and serine-80 in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 30, 2535-2542.

Yamaguchi, S., Brailey, L.L., Morizono, H., Bale, A.E., *y* Tuchman, M. (2006). Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase (OTC) gene. *Hum Mutat* 27, 626-632.

Yao, J., Feher, V.A., Espejo, B.F., Reymond, M.T., Wright, P.E., *y* Dyson, H.J. (1994). Stabilization of a type VI turn in a family of linear peptides in water solution. *J Mol Biol* 243, 736-753.

Yuan, X., LiCata, V.J., y Allewell, N.M. (1996). Effects of assembly and mutations outside the active site on the functional pH dependence of *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase. *J Biol Chem* 271, 1285-1294.

Zhang, P., Martin, P.D., Purcarea, C., Vaishnav, A., Brunzelle, J.S., Fernando, R., Guy-Evans, H.I., Evans, D.R., y Edwards, B.F. (2009). Dihydroorotase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* is activated by stoichiometric association with aspartate transcarbamoylase and forms a one-pot reactor for pyrimidine biosynthesis. *Biochemistry* 48, 766-778.

Anexo

Parte del trabajo realizado que presento en esta tesis, se ha reflejado en dos artículos de los cuales soy primer autor. Además y aunque no directamente relacionados con esta tesis, un artículo en que han contado con mi participación, se han publicado durante mi estancia en el laboratorio en el cual he realizado mi formación predoctoral. Estas son las referencias de estos artículos publicados:

A) Publicaciones de este trabajo de tesis:

- Llácer, J.L.*, **Polo, L.M.***, Tavares, S.*, Alarcon, B., Hilario, R., y Rubio, V. (2007). The gene cluster for agmatine catabolism of *Enterococcus faecalis*: study of recombinant putrescine transcarbamylase and agmatine deiminase and a snapshot of agmatine deiminase catalyzing its reaction. *J Bacteriol* 189, 1254-1265. (*contribuyeron de igual manera a este trabajo)
- **Polo, L.M.**, Gil-Ortiz, F., Cantin, A., y Rubio, V. (2012). New insight into the transcarbamylase family: the structure of putrescine transcarbamylase, a key catalyst for fermentative utilization of agmatine. *Plos One* 7, e31528.

B) Otra publicación en la que ha participado el autor de esta tesis:

- Montoro-García, S., Gil-Ortiz, F., García-Carmona, F., **Polo, L.M.**, Rubio, V. y Sánchez-Ferrer, Á. (2011) The crystal structure of the cephalosporin deacetylating enzyme acetyl xylan esterase bound to paraoxon explains the low sensitivity of this serine hydrolase to organophosphate inactivation. *Biochem J* 436, 321-30.

