

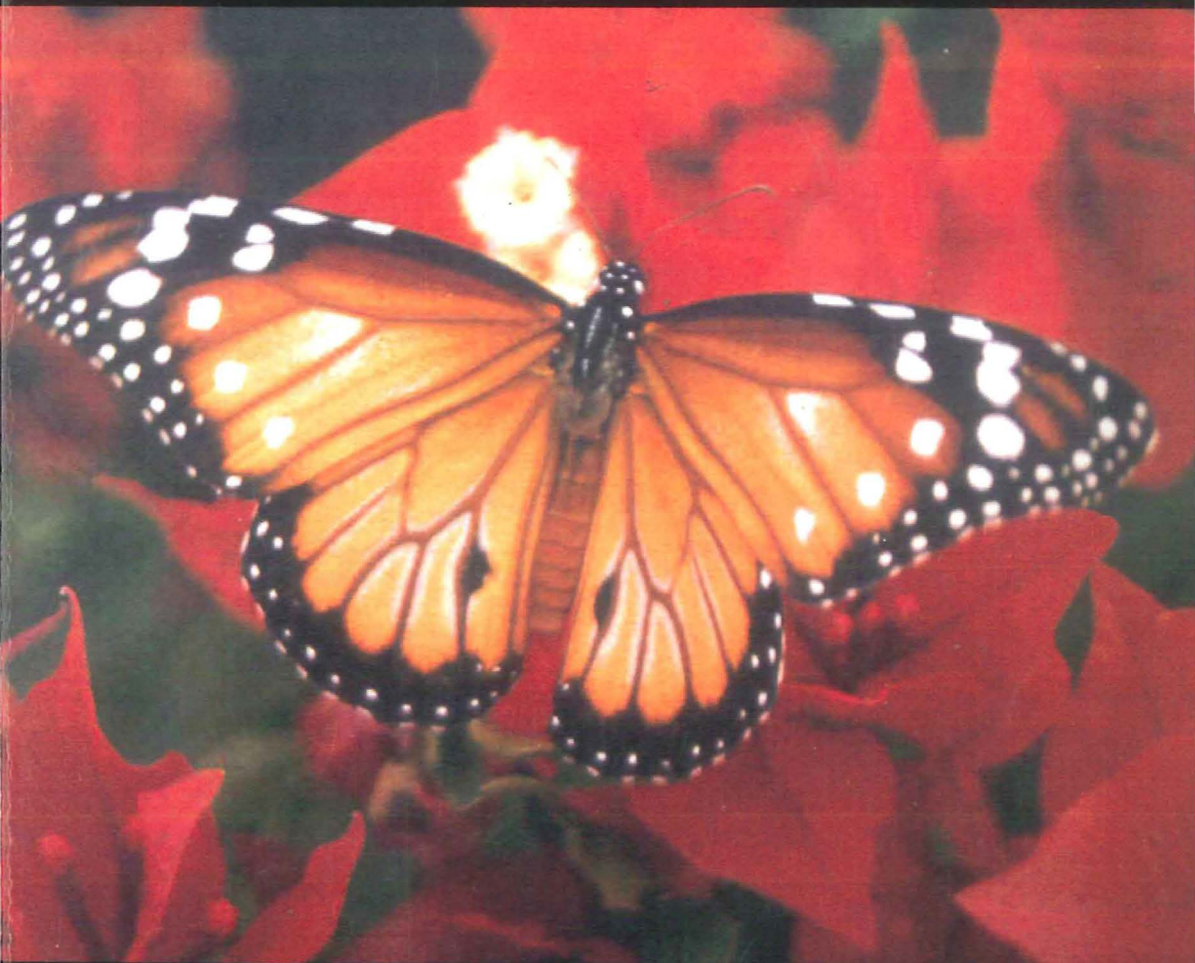
Universitas

ISSN 0122-7483

# Scientiarum

Vol 6 No. 2

Julio - Diciembre 2001



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
Revista de la Facultad de Ciencias



## PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA ACETATO TIOQUINASA

Jairo A. Tovar<sup>1</sup>, Sonia Luz Albarracín<sup>1</sup>, Leonardo R. Lareo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Neurobioquímica

<sup>2</sup> Bioquímica Computacional y Estructural, Departamento de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, carrera 7ª # 43-82, Edificio Jesús Emilio Ramírez, S.J., Lab. 201, Santa Fe de Bogotá, Colombia, S.A., Tel. 320 83 20 exts. 4059/4096, Fax 285 05 03, correo electrónico: [llareo@javeriana.edu.co](mailto:llareo@javeriana.edu.co)

### RESUMEN

Las actividades de las enzimas implicadas en el metabolismo de los cuerpos cetónicos están presentes tanto en neuronas, como en astrocitos y en oligodendroglía. La utilización de cultivos primarios ha puesto de manifiesto que estos cuerpos cetónicos pueden ser metabolizados en estas células.

La acetato tioquinasa reportada en tejido neural total es una enzima que reduce significativamente el costo energético de la utilización del acetato y por lo tanto se propone como una ruta de elección en metabolismo de esta sustancia.

Los datos de predicción para propiedades bioquímicas y estructurales de la enzima muestran una estructura estable, con segmentos conservados entre todas las secuencias existentes y una alta flexibilidad estructural, propia de la mayoría de las enzimas.

### SUMMARY

The activities of the enzymes implied in the metabolism of the ketonic bodies are present in neurons, like in astrocytes and in oligodendroglia. The use of primary cell cultures has shown that these ketonic bodies can be metabolized in these cells.

The acetate tiokinase reported in having in neural cells, is an enzyme that reduces the energy cost of the use of the acetate significantly and therefore it intends like an election route in metabolism of this substance.

The prediction data for biochemical and structural properties of the enzyme show a stable structure, with segments conserved between all the existent sequences and a high structural flexibility, characteristic of most of the enzymes.

### INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central de los mamíferos contiene dos clases principales de neuroglía, que se han clasificado teniendo en cuenta su tamaño y morfología celular: se distinguen las células macrogliales, es decir, los astrocitos y los oligodendrocitos, y las células microgliales.

Durante la última etapa de la gestación, el feto acumula glucógeno en el cerebro de una forma sustancial; este glucógeno puede dar cuenta del requerimiento urgente de energía que se

produce durante el nacimiento. Sin embargo, el glucógeno cerebral se consume rápidamente en las dos primeras horas de vida extrauterina. En la primera hora de vida extrauterina no hay glucosa en la sangre de la rata y en el humano en la primera media hora. Dado que la gluconeogénesis no es plenamente activa hasta las 12 horas de vida la normoglucemia no se alcanza sino entre el 3°-4° día de vida. En estas circunstancias, los requerimientos energéticos del cerebro son suplidos por los cuerpos cetónicos sintetizados por el propio feto a partir de los lípidos lácteos. Por consi-

guiente, el recién nacido pasa por un retraso en la llegada de nutrientes, que comprende desde el momento del parto hasta el establecimiento de la lactancia, período denominado de prelactancia.

Las actividades de las enzimas implicadas en el metabolismo de los cuerpos cetónicos están presentes tanto en neuronas, como en astrocitos y en oligodendroglía. Sorprendentemente, los astrocitos muestran las actividades máximas de 3-oxoácido-CoA transferasa y de acetoacetyl-CoA tiolasa durante el desarrollo. La utilización de cultivos primarios ha puesto de manifiesto que los cuerpos cetónicos pueden metabolizarse tanto en neuronas, como en astrocitos y en oligodendrocitos. [Checkick y col., 1987].

Una vez dentro de la célula cerebral, los cuerpos cetónicos tienen dos destinos fundamentales: la oxidación y la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Secundariamente, pueden ser precursores de acetilcolina y de aminoácidos [Thurston y col., 1985]. En condiciones normales, el 3-hidroxiacetato y la glucosa no son metabolizados en la misma proporción en todas las zonas del cerebro [Hawkins & Brebuyc, 1979].

La acetato tiolasa reportada en tejido neural total [Wanieski & Martin, 1986] es una enzima que reduce significativamente el costo energético de la utilización del acetato y por lo tanto se propone como una ruta de elección en metabolismo de esta sustancia. En la mayoría de las células el acetato se emplea a través de dos enzimas la acetato quinasa y una S-acil transferasa, en las células en las que uso del acetato para generar acetyl-CoA está mediado por la acetato tiolasa se cree que se logra en una reacción en cascada que emplea sólo esta enzima. A pesar de haber sido identificada y aislada en varios organismos se conoce poco de su secuencia, estructura y en general de su bioquímica. En este trabajo se presenta la predicción de esas características con el objetivo de poder identificar su función

y su localización en el astrocito en donde ha sido propuesta por el grupo de Neurobioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. Además, conociendo sus propiedades, basados en múltiples algoritmos predictivos será posible agilizar su extracción y aislamiento luego de comprobar su actividad en cultivos de astrocitos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

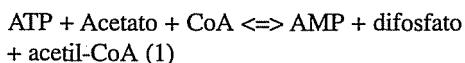
Como todo trabajo predictivo computacional las herramientas son esencialmente las bases de datos, los programas de comparación y los de predicción. Las secuencias de las acetato tiolinas reportadas se obtuvieron de la base de datos GenBank en National Center for Biotechnology Information-National Library of Medicine-National Institutes of Health empleando el programa ENTREZ. Las características de las enzimas reportadas en la literatura se obtuvieron de la base de datos ExPaSy/Enzyme, las predicciones de las propiedades bioquímicas se realizaron con un conjunto de programas integrados en Proteomics; las similitudes de secuencia se analizaron con los programas BLAST y FASTA. La predicción de la secuencia de la proteína madura se realizó empleando el programa SIGNALPEP. La identificación de motivos estructurales y funcionales se realizó con los programas Motifs, Prints y Blocks. La predicción de la estructura tridimensional se realizó con el programa spdbViewer3.6b3 con el soporte de la base de datos SwissProt y su soporte predictivo Swiss Model. Las representaciones que se presentan aquí se graficaron con el programa RASMOL y CHIME. Los cálculos de las energías potenciales y distribuciones de carga se realizaron empleando el programa GROMOS bajo la visualización del programa spdbViewer3.6b3.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La enzima está codificada como EC 6.2.1.1 y su nombre oficial es Acetato-CoA ligasa pero tiene varios nombres alternativos como son: Acetyl-CoA sintetasa, Acetyl-CoA sintasa, Enzima activadora del grupo acilo, Acetato

tioquinasas, Enzima activadora del grupo acetilo.

Cataliza, fundamentalmente, la reacción:



En general sus sustratos naturales son: Acetato, Propanoato, Acrilato, Isobutirato y Fluoroacetato. Para los cuales presenta las reacciones y productos que se presentan en la tabla 1.

Su actividad específica dependiendo del organismo y del órgano está en un rango entre los 0.002 y 66 micromol/min/mg. Los valores de Km (mM) según el sustrato, organismo y órgano oscilan entre 0.2 y 4.7 para el acetato, 10 para el propanoato y entre 0.38 y 6.8 para el butirato. El rango de pH para funcionamiento está entre 6.8 y 8.7 siendo el pH óptimo dependiente del organismo y órgano, 7.6 para corazón de bovino y algunos microorganismos. Es de 8.7 para *Methanobacterium thermoautotrophicum* y *Methanotherx soehngeni* entre otros datos. Ha sido identificada en los siguientes organismos entre otros: buey, conejo, rata, toro, oveja, cobayo, cabra, papa, *Pinus radiata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acetobacter aceti*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Methanotherx soehngeni*, *Euglena gracilis*, *Aspergillus Níger* y de los órganos: corazón, cerebro, hígado, epitelio ruminal, riñón, tejido adiposo, glándula mamaria, músculo y semillas. Pero

ha sido extraída y purificada sólo de buey, *Saccharomyces cerevisiae*, *Euglena gracilis*, *Aspergillus Níger* y *Acetobacter aceti*. Localizada tanto en mitocondria como en citoplasma, presenta un rango de pesos moleculares reportados tales como: 57-60 kD (por filtración en gel para la de toro y *Acetobacter aceti*); 77-83 kD (por electroforesis en SDS-PAGE para *Saccharomyces cerevisiae*, *Acetobacter aceti*); 151 kD (por ultracentrifugación analítica para la de *Saccharomyces cerevisiae*), 250 kD (por filtración en gel filtration y por ultracentrifugación analítica para la de *Saccharomyces cerevisiae*); 346 kD (por filtración en gel para la de *Saccharomyces cerevisiae*, en la isoforma no aeróbica). Con estos datos se ha podido precisar que existe en varias isoformas y con diferente número de subunidades, a saber: en forma dimérica (2 \* 78 kD, idénticas, por electroforesis de SDS-PAGE, para la de toro); una forma trimérica (3 \* 83 kD, idénticas, por electroforesis de SDS-PAGE, y equilibrio de sedimentación para las de epitelio ruminal de toro y la de *Saccharomyces cerevisiae*).

En la base de datos de secuencias se encontraron 212 reportes de los cuales luego de depuraciones por redundancias y secuencias fragmentarias se trabajó con 26 secuencias completas, como se presenta en la tabla 2. Para este análisis se consideró como referencia la secuencia identificada en ratón, que se presenta a continuación:

TABLA 1. Sustratos y productos de la reacción de la acetato tioquinasas

ATP + acetato + CoA	AMP + difosfato + acetil-CoA
ATP + propanoato + CoA	AMP + difosfato + propanoil-CoA
ATP + propenoato + CoA	AMP + difosfato + propenoil-CoA
ATP + acrilato + CoA	AMP + difosfato + acrilil-CoA
ATP + isobutirato + CoA	AMP + difosfato + isobutiril-CoA
ATP + butirato + CoA	AMP + difosfato + butiril-CoA
ATP + fluoroacetato + CoA	AMP + difosfato + fluoroacetil-CoA

MGLPEERRKSGSGSRAREETGAEGRVRGW  
SPPPEVRRSAHVPSLQRYRELHRRSVEEPREFW  
GNIAKEFYWKTACPGPFLQYNFDVTKGKIF  
TEWMKGATTNICYNVLDNRNVHEKKLGDKV  
AFYWEGNEPGETTKITYRELLVQVCQFSNV  
LRKQGIQKGDRAIYMPMILELVVAMLACA  
RLGALHSIVFAGFSAESLCERILDSSCCLLIT  
TDAFYRGEKLVNLKELADESLEKCREK  
GFPVRCIVVKHLGRAELGMNDSPSOSP  
PVKRPCPDVOICWNEGVDLWVHELMO  
OAGDECEPEWCDAEDPLFELYTSGSTGKPK  
GVVHTIGGYMILYVATIFKYVEFHPEDVFW  
CTADIGWITGHSYVTYGPLANGATSVLFE  
GIPTYPDEGRLWSIVDKYKVTKFYTAPTA  
IRMLMKFGDDPVTKHSRASLOVLGTVG  
EPINPEAWLWYHRVYGSORCPIVDTFW  
QTETGGHMLTPLPGATPMKPGSASFPPF  
GVALOSLNEGEELEGEAEGYLVFKOPW  
PGIMRTVYGNHTRFETTYFKKFGYYVTGDG  
CRRDQDGYWITGRIDDMLNVGHLLSTAEV  
ESALVEHEAVAEA AVVGHPPHVKGECLYCF  
VTLCDGHTFSPRTLTEELKKOIREKIGPIATP  
DYIONAPGLLKPRSGKIMRRVLKIAQNDHDLGD  
TSTVADPSVINHLFSHRCLTTO

Debido a que ésta es una secuencia obtenida por traducción conceptual se le estimó el tamaño del péptido señal, resultando ser de una longitud de 192 residuos, un poco largo para lo normal dentro de la mayoría de las proteínas según el programa SignalP pero aceptable con la representatividad de la calidad estadística de la predicción.

De esta forma la secuencia de la proteína madura aparece subrayada y es con esta secuencia que se realizarán todas las restantes predicciones. Del análisis de la tabla 2 con respecto a esta secuencia se identificó que el segmento 193-508 es el que presenta mayor puntaje de identidad y de positividad con todas las acetato tioquinasa de diferentes organismos desde bacterias hasta la de ratón, lo cual representa que es este el segmento conservado para esta enzima. Este segmento aparece resaltado en negrilla en la secuencia anterior. El segmento final desde la posición 508 hasta la 701 es altamente variable entre las especies estudiadas. La longitud de la cadena

entonces es de 509 residuos con un peso molecular estimado de: 56873.7 D y un pI teórico de: 5.48. Su composición porcentual de aminoácidos aparece en la tabla 3. El número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu) es 64 y de residuos cargados positivamente (Arg + Lys) es 47. Se le estima una vida media de 30 horas (en reticulocitos de mamífero, *in vitro*), > 20 horas (en levadura, *in vivo*) y > 10 horas (en *Escherichia coli*, *in vivo*). El índice de inestabilidad (II) se calcula en 34.14 lo cual la clasifica como una enzima estable. Presenta un índice de alifaticidad de 76.39 y promedio de hidropacidad (GRAVY) de -0.253.

La curva de titulación estimada considerando que todas las cisteínas forman parte de cistinas se presenta en la figura 1. La secuencia presenta sitios de glicosilación lo cual aún no permite asegurar que tendrá procesamiento postraslacional para convertirla en una glicoproteína ya que es necesario verificar si los sitios se encuentran en la parte expuesta de la proteína. Pero como era de esperarse por el mecanismo de acción que se le propone y que se presenta más adelante, presenta 18 sitios potenciales de fosforilación algunos de los cuales pueden no ser completamente funcionales por no encontrarse en la superficie de la proteína expuesta al solvente.

Con respecto a los motivos funcionales y estructurales se le encontró que esta proteína presenta los siguientes: ASN glicosilación (residuos 502, 532, 573 y 701); fosforilación CAMP (residuo 7); fosforilación PKC (residuos 133, 137, 320, 340, 456, 565, 659 y 694); fosforilación CK2 (residuos 20, 54, 137, 198, 387, 396, 437, 500 y 504); miristilización (residuos 98, 127, 156, 184, 325 y 524) y motivo de enlace al AMP (residuo 313).

Los análisis de similaridad estructural permitieron identificar que tiene zonas de alta homología con las proteínas oxidoreductasa (1BA3 y 1LCI) y la sintetasa de péptidos (1AMU).

**TABLA 2. Comparación de las secuencias de acetato tioquinasa seleccionadas para el estudio**

ID GenPept	Organismo	Largo	BLAST		FASTA	Sobrelapamiento
			Identidad (%)	Positividad (%)	Identidad (%)	
6691151	<i>Mus musculus</i>	701	95	95	100	1-701:1-701
Z46786	<i>Drosophila melanogaster</i>	581	61	72	65	124-696:14-576
X98506	<i>Solanum tuberosum</i>	631	54	67	58	50-694:1-627
AF036618	<i>Arabidopsis thaliana</i>	693	53	65	57	31-694:44-689
AF010496	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	656	51	65	54	33-696:17-652
U00006	<i>Escherichia coli</i>	652	47	63	51	45-696:22-645
M94729	<i>Phycomyces blakesleeianus</i>	672	46	60	49	38-694:30-659
D64003	<i>Synechocystis sp.</i>	653	45	60	48	27-692:13-650
U24082	<i>Cryptosporidium parvum</i>	649	47	59	47	30-694:45-686
Y15417	<i>Coprinus cinereus</i>	661	45	57	48	22-689:2-650
S54801	<i>Penicillium chrysogenum</i>	669	42	59	46	40-692:38-659
M97217	<i>Ralstonia eutropha</i>	660	44	59	46	16-692:3-656
AL049644	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	662	42	59	46	31-692:14-650
X16990	<i>Emericella nidulatus</i>	670	42	58	46	40-694:38-662
AL035636	<i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	651	43	58	46	27-690:14-638
S79456	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	683	42	58	45	40-694:33-671
AL022121	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	651	43	57	46	31-690:13-645
AF134491	<i>Kluyveromyces lactis</i>	684	42	56	46	45-694:39-672
AE00061	<i>Helicobacter pilory</i>	662	41	58	45	29-694:14-656
AL139078	<i>Campylobacter jejuni</i>	657	42	58	44	29-689:10-645
U94348	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	670	39	57	43	37-689:24-653
AE000808	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	558	42	59	45	27-608:13-558
AE001079	<i>Archeoglobus fulgidus</i>	681	38	56	41	32-683:18-656
M63968	<i>Mathanosaeta concilii</i>	672	38	53	42	10-690:5-666
AE000773	<i>Aquifex aeolicus</i>	510	44	60	44	31-548:18-495
U24215	<i>Pseudomonas putida</i>	649	36	53	38	46-692:18-637
	RANGO	501 -				
		701	36-61	53-72	38-65	127-508

**TABLA 3**  
**Composición porcentual de aminoácidos de la acetato tioquinasa madura de ratón**

Residuo	Porcentaje	Residuo	Porcentaje
Ala (A)	5.5%	Leu (L)	8.3%
Arg (R)	4.3%	Lys (K)	4.9%
Asn (N)	2.2%	Met (M)	2.0%
Asp (D)	5.5%	Phe (F)	4.3%
Cys (C)	3.3%	Pro (P)	6.7%
Gln (Q)	2.8%	Ser (S)	5.5%
Glu (E)	7.1%	Thr (T)	7.5%
Gly (G)	8.8%	Trp (W)	2.4%
His (H)	3.3%	Tyr (Y)	3.9%
Ile (I)	4.5%	Val (V)	7.3%

Los anteriores resultados predictivos permiten visualizar la presencia de una enzima que facilitaría la función de utilización del acetato en las células neurales, especialmente los astrocitos a un bajo costo de gasto de la energía metabólica lo que permitiría entender la rápida y eficiente utilización del mismo en dichas células. Las características químicas propuestas permiten diseñar procesos experimentales para aislarla e identificarla plenamente si su existencia es real, tal como parece.

La estructura tridimensional predicha para la acetato tioquinasa se presenta en la figura 2.

### CONCLUSIONES

Los datos predichos para la acetato tioquinasa permiten diseñar un sistema experimental que podrá emplearse para su extracción y purificación, una vez se confirme su actividad en el cultivo de astrocitos. La estructura tridimensional y en general todos los datos a pesar de provenir de diferentes sistemas y formas de predicción son altamente coherentes. Se predice, además, que es una proteína estable, lo cual permite diseñar experimentos de extracción y purificación que consideran esto como una ventaja, el conocer su punto

isoeléctrico teórico permite proponer sistemas de precipitación y el conocer su hidrofobicidad y exposición de residuos al solvente ayudará a seleccionar los solventes adecuados. Esta enzima en el citoplasma de los astrocitos es de esencial importancia dado su alto rendimiento a un bajo costo de energía metabólica. El conocimiento derivado de esto será, potencialmente, utilizable desde el punto de vista terapéutico para las enfermedades mentales en las que los procesos oxidativos reducen las fuentes de energía de la célula.

### LITERATURA CITADA

- CHECHICK T., ROEDER L.M., TILDON J.T. & PODUSLO S.E. (1987) *Ketone body enzyme activities in purified neurons, astrocytes and oligodendroglia*. Neurochem. Int. 10:95-99.
- THURSTON J.H., ROEDER L.M. & STEVENSON J.H. (1985) *Substrate oxidation by isolated rat brain mitochondria and synaptosomes*. J. Neuroscience Res., 14:207-215.
- HAWKINS R.A. & BREBUYCK J.F. (1979) *Ketone bodies are selectively used by individual brain regions*. Science, 205:325-327.

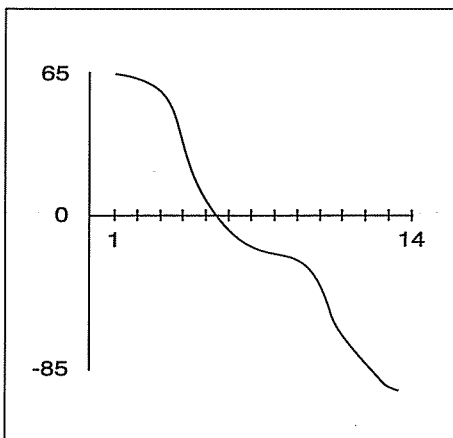


FIGURA 1. Curva de titulación estimada para la acetato tioquinasa madura de ratón

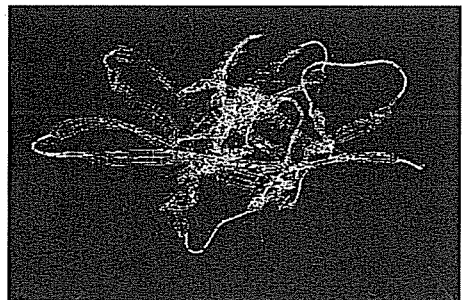


FIGURA 2. Representación de la estructura tridimensional de la acetato tioquinasa madura de ratón

WANIESKI R.A. & MARTIN D.E. (1986) *Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures*. J. Neurochem., 47:304-313

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

<http://Expasy.ch/enzyme>

<http://expasy.cbr.nrc.ca/tools/>

<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

[http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_prosite.html](http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html)

spdbViewer 3.6 beta3. (2000) Glaxo Wellcome Research.

RasWin Molecular Graphics Windows version 2.6beta. UCB.