

## INHIBICION ALOSTERICA DE BACE1 MEDIADA POR EXOSITIO

Gutiérrez L.J.<sup>a, b</sup>, Garro A.D.<sup>a, b</sup>, Tosso R.D. Enriz R.D.<sup>a, b</sup> y Baldoni H.A.<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> Area de Química General e Inorgánica, Universidad Nacional de San Luis (UNSL),

Chacabuco 917, 5700 San Luis, Argentina, lucasg@unsl.edu.ar.

<sup>b</sup> Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas de San Luis (UNSL, CONICET), Ejercito de Los Andes 950, 5700 San Luis, Argentina.

<sup>c</sup> Instituto de Matemática Aplicada San Luis (UNSL, CONICET), Ejercito de Los Andes 950, 5700 San Luis, Argentina.

### INTRODUCCION

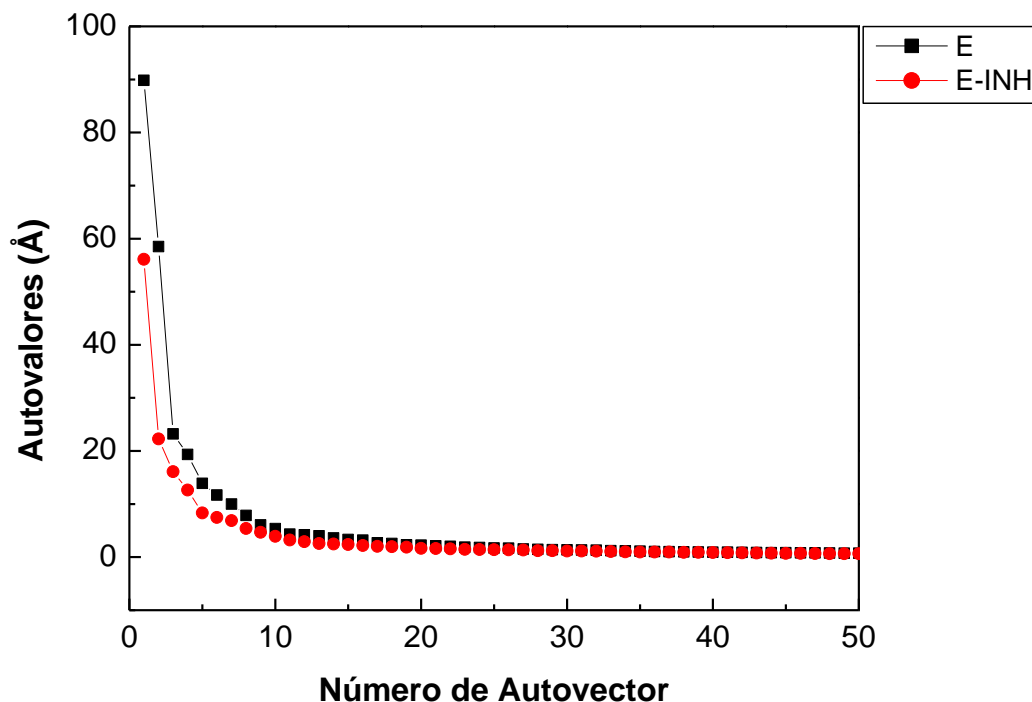
Las proteínas y las enzimas poseen una estructura tridimensional no covalente, la cual les permite tener una flexibilidad intrínseca que posibilita la existencia de un conjunto de conformeros separados por una baja barrera de energía. La distribución de estos conformeros es una función del grado de flexibilidad molecular y de las condiciones externas en las que residen <sup>[1]</sup>. Este rango de conformeros disponibles para las proteínas en solución se debe, muy frecuentemente, a los movimientos relativos entre los dominios que las componen. Estos movimientos entre dominios son muy importantes para una variedad de funciones de proteínas, incluyendo la catálisis, la regulación de actividad, el transporte de metabolitos y la locomoción celular <sup>[2]</sup>.

Considerando la importancia de estos cambios conformacionales, resulta evidente que las diferentes técnicas para evaluar estos comportamientos son muy importantes para comprender los efectos biológicos. Por lo tanto, en este trabajo se muestra la influencia de la ocupancia del exositio sobre el comportamiento dinámico de BACE1, empleando la técnica de Análisis de Componente Principal (ACP).

### RESULTADOS

Para realizar este estudio se utilizaron simulaciones de dinámica molecular (DM) de 20 ns de duración sobre los sistemas BACE1 libre (E) y BACE1-INH (E-INH), donde INH es un inhibidor polipeptídico que presenta la secuencia Ac-YPYFIPL-NH<sub>2</sub> reportado por Kornacker <sup>[3]</sup>. Las simulaciones de DM se llevaron a cabo utilizando el programa Amber <sup>[4]</sup> empleando el campo de fuerza FF99SBild <sup>[5]</sup>.

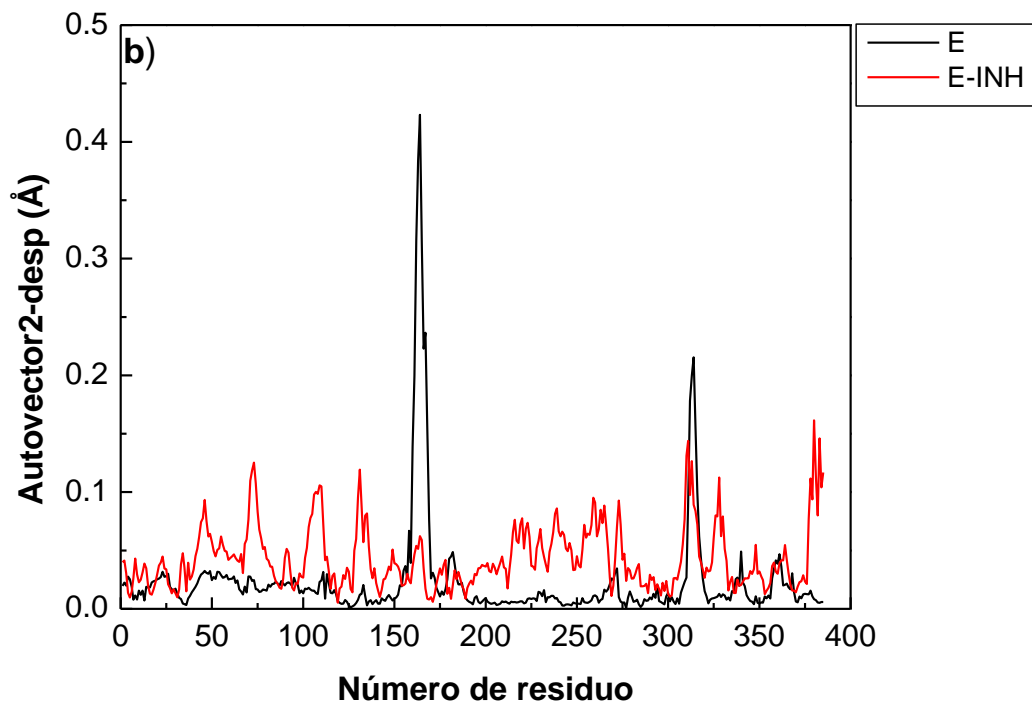
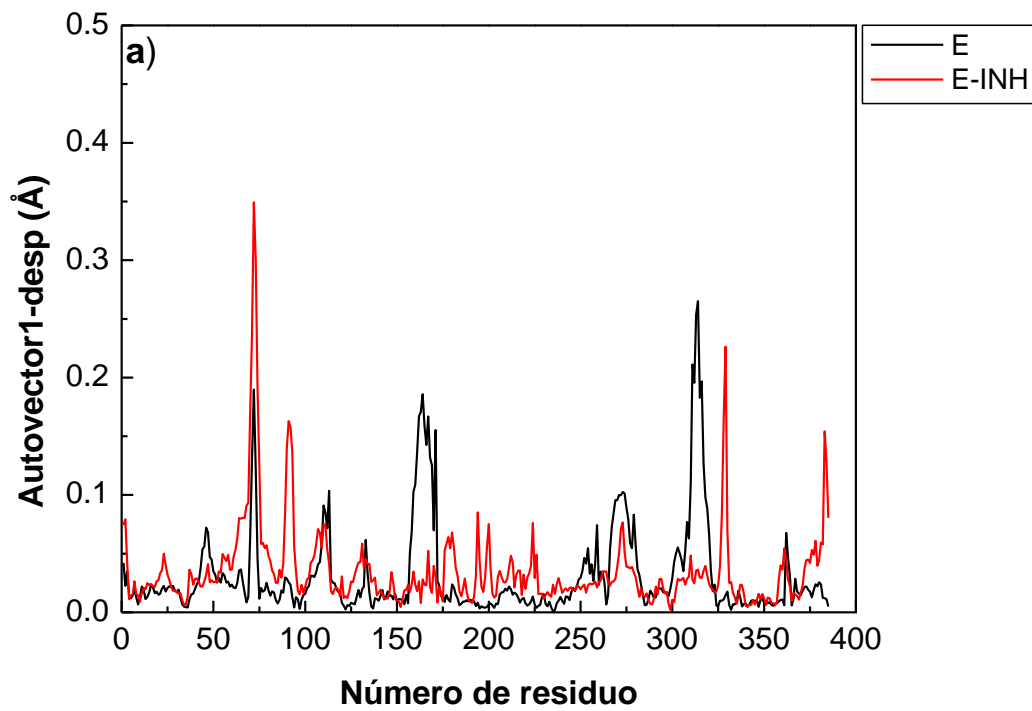
El análisis de componente principal se llevó a cabo empleando el paquete de programas PCAZIP <sup>[6]</sup> sobre los últimos 10 ns de simulación. Este análisis nos revela que los dos primeros autovectores representan el 56% y el 59% del movimiento global de la enzimas para los sistemas E y E-INH, respectivamente (**Figura 1**). Por este motivo, el estudio dinámico de la enzima se enfoco en los dos primeros autovectores.



**Figura 1:** Comparación de los autovalores (para los sistemas E y E-INH) obtenidos a partir de la diagonalización de la matriz de covarianza.

El movimiento a lo largo de un autovector puede ser visualizado proyectando toda la trayectoria sobre un determinado autovector generando una nueva trayectoria. Por lo tanto, a partir de esta “trayectoria esencial” se calculó el RMSF (Root-Mean-Square-Fluctuation) sobre los  $C_{\alpha}$  para los dos autovectores principales. En la proyección del primer autovector se observa que los residuos 150-158 (A-loop), 270-273 (D-loop) y 311-318 (F-loop) presentan una alta movilidad en E respecto a la forma E-INH de BACE1, mientras que los residuos 87-93 y 325-330 son altamente flexibles en E-INH comparados con la forma E de BACE1 (**Figura 2a**). Por otro lado, en la proyección del segundo autovector, se puede visualizar que las fluctuaciones son atenuadas con respecto al primer autovector (desplazamiento- $C_{\alpha} < 0.1 \text{ \AA}$ ), a excepción de los residuos 150-158 (A-loop) y 311-318 (F-loop) que muestran el mismo comportamiento que en el primer autovector (**Figura 2b**). Las diferencias de flexibilidad encontradas son las responsables del comportamiento conformacional diferencial para las formas E y E-INH de BACE1 aquí estudiadas.

El desplazamiento del F-loop en dirección opuesta al sitio catalítico implica la apertura de éste en BACE1 <sup>[7]</sup>. Este movimiento característico de BACE1 en su forma libre se ve significativamente alterado por la presencia del INH. Si bien son varios los segmentos de BACE1 afectados por la presencia del INH, debemos destacar la disminución en el movimiento del F-loop debido a que este cumple un rol muy importante en el movimiento de apertura de BACE1 <sup>[7]</sup>. Las interacciones de los residuos Asp311, Thr314 y Asp317 de BACE1 con Tyr1 y Tyr3 del INH reportados anteriormente por Gutiérrez et al <sup>[8]</sup>, son igualmente responsables de esta disminución en el movimiento del F-loop.



**Figura 2:** RMSF calculado sobre las trayectorias proyectadas sobre a) el primer autovector y b) el segundo autovector.

## CONCLUSION

En este estudio se realizaron 40ns de simulación en solvente explícito. El objetivo de este trabajo fue descubrir detalladamente como la presencia del INH en el exosito de BACE1 afecta el comportamiento conformacional de la enzima.

Las técnicas empleadas aquí, nos permitieron inferir que las interacciones entre BACE1 y el INH provocan una disminución en los movimientos de ciertos segmentos de BACE1. Es importante destacar, que la disminución en el movimiento del F-loop toma relevancia debido a su rol en los movimientos de cierre y apertura que regulan la actividad de la enzima comportándose como un verdadero inhibidor alostérico.

## REFERENCIAS

- [1] Sinha, N. et al. *Structure* 2001, 9, 1165-1181.
- [2] Kornacker, M.G. et al. *Biochemistry* 2005, 44, 11567-11573.
- [3] Gerstein, M. et al. *Biochemistry* 1994, 33, 6739-6749.
- [4] Case, D.A. et al. AMBER, University of California, San Francisco (2008).
- [5] Lindorff-Larsen, K. et al. *Proteins* 2010, 78, 1950-1958, ISSN 08873585.
- [6] PCAsuite, Molecular Modelling & Bioinformatics Group, <http://mmb.pcb.ub.es/software/pcasuite/>
- [7] Chakraborty, S. et al. *Neurochemistry International* 2011, 58, 914–923.
- [8] Gutiérrez, L.J. et al, *The Journal of Physical Chemistry A*. 2010, 114, 10261-10269.