

Enzimática Informática

Objetivo:

La disciplina denominada 'enzyme informatics' involucra la aplicación de conceptos bioinformáticos aplicados al área de la enzimología. En esta actividad práctica Ud.

- Describirá el proceso de purificación de una enzima
- Investigará los distintos niveles de la comisión de enzimas, desde el punto de vista de las estructuras cristalinas que hay en cada una de ellas.
- En la base de datos KEGG, investigará reacciones químicas y vías metabólicas en las que participa una enzima
- Describirá un mecanismo enzimático complejo y la comparará con reacciones enzimática similares utilizando EC-BLAST
- Describirá la actividad enzimática a través de parámetros cinéticos y su relación con factores termotrópicos y liotrópicos, los cuales serán recopilados a través de la base de datos BRENDA.
- Utilizará los datos e información recopilada para plantear un experimento relacionado con la modificación de la actividad enzimática.

Actividades a Realizar

1. Reacción Enzimática. A partir de la información contenida en “Becker, M.A., Kredich, N.M. and Tomkins, G.M. The purification and characterization of O-acetylserine sulphydrylase-A from Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 244 (1969) 2418-2427”, haga una descripción resumida de:

- a) El contexto metabólico de la enzima de interés
- b) La reacción que esta cataliza.
- c) Cómo se purificó
- d) Cómo se mide su reacción enzimática

2. Nomenclatura de Enzimas. Las enzimas se clasifican de acuerdo a la nomenclatura asignada por el Nomenclature Committee de la International Union of Biochemistry (1984). La llamada enzyme commission asigna a cada enzima un nombre recomendado (Enzyme classification, EC) que contiene 4 partes distinguibles, diviendo las enzimas en 6 grupos o clases principales, **de acuerdo a la reacción que estas catalizan.**

- a) A partir de los datos de la página de la Enzyme commission (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcban/>) describa de manera general las clases en las cuales se agrupan las enzimas.
- b) Identifique y justifique cada clase, subclase y subsubclase hasta encontrar el EC de la enzima de interés. Recuerde que esta jerarquización esta realizada en base a la reacción catalizada por la enzima. (Para corroborar su respuesta identifique la reacción enzimática en el diagrama de reacción asociada a la subsubclase elegida.
- c) ¿Por qué la EC destaca que la subclase a la cuál pertenece CysK no es similar a las clases EC 2.5.1.51 (β -pyrazolylalanine synthase), EC 2.5.1.52 (L-mimosine synthase) y EC 2.5.1.53 (uracilylalanine synthase)? ¿Por qué antes esta subsubclase estaba descrita como EC 4.2.99.8?

3. En búsqueda de mayor información: La Enzyme commission se encarga de la nomenclatura de las enzimas, sin embargo, la información que es posible extraer es general. Una vez que identificamos el número EC podemos acceder a mayor información.

3.1 La base de datos **ExplorEnz — The Enzyme Database** (<http://www.enzyme-database.org/>) es la fuente oficial actual de la nomenclatura de enzimas. Aprobada por la Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), in consultation with the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (**JCBN**), contiene y muestra de una manera amigable y curada la información ya buscada y permite acceder a otras bases de datos vinculadas con las enzimas. A partir de la información de **ExplorEnz, EC y sus conocimientos de bioquímica:**

- a) “Algunas reacciones enzimáticas son reversibles”. ¿Que problemas plantea para la clasificación de enzimas? ¿Cómo se solucionan?. Entregue un ejemplo.

- b) Explique por qué los códigos EC 1.5.3.17, EC 1.5.3.16 y EC 1.5.3.13 fueron asignados a una misma enzima.
- c) ¿Identifique cuál es la clase enzimática mayoritaria?. ¿Sugiera una explicación?
- d) ¿Identifique cuál es la clase enzimática minoritaria?. ¿Sugiera una explicación?
- e) ¿Cuál es la abundancia, en términos porcentuales, de la clase, subclase a la cual pertenece CysK? Compárela con Lisosima. ¿Por qué compararla con esta última?
- f) Con respecto a la enzima de interés de este práctico ¿Qué otros nombres recibe CysK, ¿Por qué?

3.2 Otra fuente de datos sobre enzimas es ENZYMES (<http://enzyme.expasy.org/>). Este servidor nos permite buscar información de enzimas por otros elementos relacionados, como a su vez acceder a otras bases de datos relacionadas con enzimas.

- a) Utilice la búsqueda por cofactor para listar todos los cofactores disponibles. Para esto, no coloque términos en el cuadro de búsqueda. ¿Cuántos cofactores se encuentran descritos?
- b) Identifique el cofactor utilizado por, CysK. ¿Esta caracterizada esta enzima para este cofactor?
- c) Identifique la estructura y otras propiedades de este cofactor en la base de datos **Cofactor** (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CoFactor/>)
- d) A partir de sus conocimientos de bioquímica ¿Cuántas enzimas que utilicen NAD espera encontrar? Discuta el por qué del resultado obtenido utilizando ENZYME y Cofactor.

Enzyme nos da un acceso rápido a datos sobre la enzima de interés a través de otras bases de datos KEGG, BRENDA, MetaCyt, PROSITE, EC2PDB, PRIAM, MEDLINE y otras, sin embargo, accederemos a algunas de ellas a través de cada sitio para conocer cada una de estas plataformas.

4. KEGG

4.1 Ahora estudiaremos la reacción enzimática de CysK y las vías metabólicas en las que actúa. Para ello, vaya a la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>). En ella encontrará diferentes vías de acceso a diferentes fuentes de datos. En particular y relevante para este práctico es la sección Chemical Information o LIGAND.

- a) Describa esta base de datos y que se puede extraer de ella.
- b) Busque el código EC correspondiente a la enzima de interés (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?enzyme). Describa que datos puede obtener de esta página. Destaque cuales no se encuentran en las bases de datos ya visitadas.

En la sección a la "Reaction (KEGG)" se encuentra una descripción de la reacción catalítica realizada por la enzima de interés, estando cada una identificada de manera particular a través de un código.

- c) Identifique el código correspondiente a la reacción principal de la enzima de interés.
- d) ¿Coincide la información con lo obtenido en otras bases de datos?
- e) ¿Es esta la única enzima que cataliza esta reacción?

4.2 En esa página también encontrará información sobre las vías metabólicas ("Pathway") en que está involucrada la enzima. Incluya esa información en su informe.

- a) Identifique el código de la vía metabólica asociada a la lectura complementaria de este práctico.
- b) ¿Qué clases de la comisión de enzimas están presentes en esta vía? ¿Están distribuidas de manera homogénea en las vías mostradas? Sugiera una explicación.
- c) ¿Cuál es el sustrato acumulado si inhibe la enzima EC 1.13.11.20?
- d) ¿De qué manera la inhibición de esta enzima puede afectar el ciclo de Krebs?
- e) ¿Qué relación hay entre la respuesta a estrés oxidativo y la enzima de interés (CysK)?
- f) ¿Cuál es la clase principal asociada al metabolismo de sulfuro? Sugiera una explicación.
- g) ¿Qué estrategia utilizaría para aumentar la concentración de etileno a partir de la reacción catalizada por CysK?

5. EC-BLAST

Suponga que Ud. desea encontrar una reacción “similar” a la reacción de la "cisteina sintasa". Para esto podemos utilizar la herramienta EC-BLAST, la cual permite realizar búsquedas de reacciones que tienen elementos similares.

- 1) Ingrese a <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/rbl/>. Hemos utilizado el término “similar” explíquelo en términos de EC-Blast (ver documentación).
- 2) Realice una búsqueda con el código EC de la enzima de interés. La base de datos automáticamente identificará posibles reacciones en la base de datos KEGG que corresponden a ese código. Verifique a que reacciones pertenecen y de una primera explicación del por qué están relacionadas con la reacción catalizada por la enzima de interés
- 3) Seleccione la reacción R04859 y presione nuevamente "Submit". Mientras más cercano a un score de 1.00, las reacciones tendrán una mayor similitud a la reacción objetivo. Describa las 3 primeras reacciones en términos de la similitud que estas puedan tener con la enzima de interés.
- 4) ¿Cuáles son las clases y sub-subclases de la clasificación EC que se encuentran representadas en las 10 primeras reacciones, y cuál es la definición de cada uno de esas sub-subclases?
- 5) Si la clasificación de la comisión de enzimas fuera perfecta, todas las reacciones similares a la categorizada por el EC buscado debieran pertenecer a la misma sub-subclase. Sugiera una explicación al resultado encontrado.

6. BRENDA

6.1 En el punto anterior a Ud. identificó posibles resultados de modificar la actividad enzimática. Sin embargo, la mayoría de las veces no existe información disponible sobre aquello o simplemente no sabemos que esta existe. La base de datos Brenda contiene más de 40 tópicos de datos diferentes sobre enzimas que han sido descritas en la literatura (base de datos curadas) que le permiten al investigador generar información suficiente para orientar su investigación. En esta sección se buscará identificar las condiciones óptimas de funcionamiento y residuos claves para la reacción enzimática de interés.

Abra el portal de la base de datos Brenda www.brenda-enzymes.info e identifique los distintos tipos de búsqueda que se puede realizar.

- 1) Utilice el menu Enzyme Classification para encontrar la enzima de interés.
- 2) ¿Cuan presente esta la enzima de interes en términos de organismos que la poseen?¿Sugiera una explicación?
- 3) Para cada subclase de la EC, BRENDA entrega la reacción enzimática asociada (matraz coloreado, reaction diagram). ¿Coincide con lo entregado en otras bases de datos?¿Entrega nueva información?
- 4) En la página de reaction diagram es posible acceder a datos de la clase, subclase y subsubclase. Para esto haga click en la imagen con forma de flechas (superior derecha acceso a IntEnz). En la búsqueda puede realizar búsqueda avanzadas, por ejemplo buscar por la subclase 2.5 y calcular la proporción de la subsubclase.
- 5) Al seleccionar una subsubclase-enzima aparecerá una columna en el lado izquierdo con información relevante de esta clase. Algunos campos ya han sido descritos en otras bases de datos, sin embargo ¿A que corresponde el CAS NUMBER?¿Para que sirve?

6.2 Para acceder a mayor información sobre la subsubclase-enzima seleccionada debemos seleccionar en esta columna el campo **show Brenda entry**, que se encuentra en la parte superior de esta columna.

Una vez seleccionado se desplegará la información específica para el código EC seleccionado. A modo general Ud. encontrará los siguientes campos.

- Nomenclatura de Enzima
- Interacción Enzima-Ligando
- Parámetros Funcionales
- Información Organismo dependiente

- Estructura de la Enzima
- Propiedades Moleculares
- Bibliografía, enlaces y enfermedades.

Los cuales Ud. debe recorrer en busca de datos e información para contestar las siguientes preguntas en relación a la enzima de interés. **Utilice las opciones para restringir el espacio de búsqueda a *E. coli*, *Salmonella*.** Para el informe final compare con todos los miembros de todos los organismos. u otro organismo si es requerido.

Se sugiere recopilar y ordenar los datos en una tabla que permita ingresar los campos indicados, estos últimos en columnas. De esta forma podrá obtener una visión global de los datos y contestar las preguntas correspondientes.

a. Ordene en términos de su eficiencia catalítica (constante de segundo orden) las enzimas de los distintos organismos (indique el organismo y el valor de esta constante). ¿Son comparables estos resultados?

b.1 ¿Cómo afecta el pH a la actividad enzimática de la enzima de interés?

b.2 ¿Que relación tiene el organismo con el *pH* *optimo* observado?

c.1 ¿Cómo afecta la temperatura a la reacción?

c.2 Que relación tiene la "Temperatura Optima" y el "rango de temperatura" con el organismo?

d. ¿Que residuos influyen en la actividad catalítica?

e) ¿Qué son K_i , IC_{50} , Actividad específica? ¿Cómo se relacionan con la con I

f.1 ¿A qué corresponde los valores de K_m descritos para esta reacción?

f.2 ¿A qué corresponde el valor de número de recambio?

f.3 ¿Por qué el profesor solicitó ordenar por el valor de eficiencia catalítica y no por estos últimos valores?

g. Indique a lo menos tres aplicaciones biotecnológicas posibles de esta enzima. (Pista: La información que debe ingresar aparece en la columna titulada "comments")

h) A partir de la lectura complementaria, sus conocimientos e información obtenida en Branda, defina brevemente cada uno de los modelos cinéticos señalados a continuación, indicando claramente por qué representan o no el mecanismo cinético de CysK. Ordered Sequential Bi Bi mechanism (two on; two off); Note: A must bind first, Q is released last.

- Ping Pong Bi Bi (one on, one off; one on, one off); Note: have some sort of modified enzyme intermediate (often covalent intermediate)
- Random Sequential Bi Bi (two on; two off); Note: A or B may bind first, P or Q may be released last.

2. EC--> PDB y PDB-SUM

Ingresa al sitio de EC-->PDB. <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>

Esta base de datos nos permite recorrer las clases de la EC, pero esta vez con énfasis en las estructuras de proteínas que están resueltas en cada una de las subclasificaciones.

a. ¿Cuál es la clase de la Comisión de Enzimas para la cual hay más estructuras de proteínas conocidas?

b. ¿Cuántas estructuras de proteínas hay para el código EC de la enzima de interés?

c. ¿Cómo se comparará el número de estructuras para esta enzima con respecto a otras, por ejemplo, la enzima con mayor número de estructuras cristalográficas? (La enzima más caracterizada estructuralmente, corresponde a la primera enzima que fue cristalizada).

d. ¿Qué es una estructura cristalográfica, que la diferencia de una estructura obtenida por NMR?

d. Que información nueva, en relación a la estructura, le entrega esta base de datos?

Una vez identificados las distintas estructuras disponibles para el código EC de interés, podemos utilizarlos para obtener mayor información estructural de CysK. Para ello accederemos al sitio PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>)

- a. Realice una búsqueda y describa las estructuras **1oas** y **1o58**. **Baje sus estructura.**

Una vez seleccionado se desplegará la información específica para el código EC seleccionado. A modo general Ud. encontrará los siguientes campos.

Una vez seleccionados Ud. encontrará información acerca de la
Proteína
Estructura de la proteína
Ligandos
Elementos de estructura secundaria
Bibliografía

- b) A partir de los resultados anteriores, bases de datos, lectura complementaria y bibliografía mencionada en PDBSum, determine los residuos del sitio activo de la proteína de interés.
- c) ¿En que elementos de estructura secundaria se encuentran localizados?
- d) Diferentes fuentes de datos apuntan a residuos que afectarían la eficiencia catalítica. Identifíquelos y de una posible explicación considerando el mecanismo de reacción.
- e) ¿Cuán conservados se encuentra el sitio activo entre las estructuras 1oas y 1o58?
- f) ¿Donde se encuentran las mayores diferencias de secuencia entre las estructuras 1oas y 1o58?