

Caracterización Bioquímica de TheA de *Thermocrispum agreste*: Una Enzima N-Hidroxilante Dependiente de Flavina

Nombre completo del investigador

Didier Mena Aguilar

Breve descripción de su formación académica

Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología
en el Instituto Tecnológico de Costa Rica
Master en Bioquímica en Virginia
Polytechnic Institute and State University

Investigadores asociados.

Dr. Pablo Sobrado

Centro de investigación.

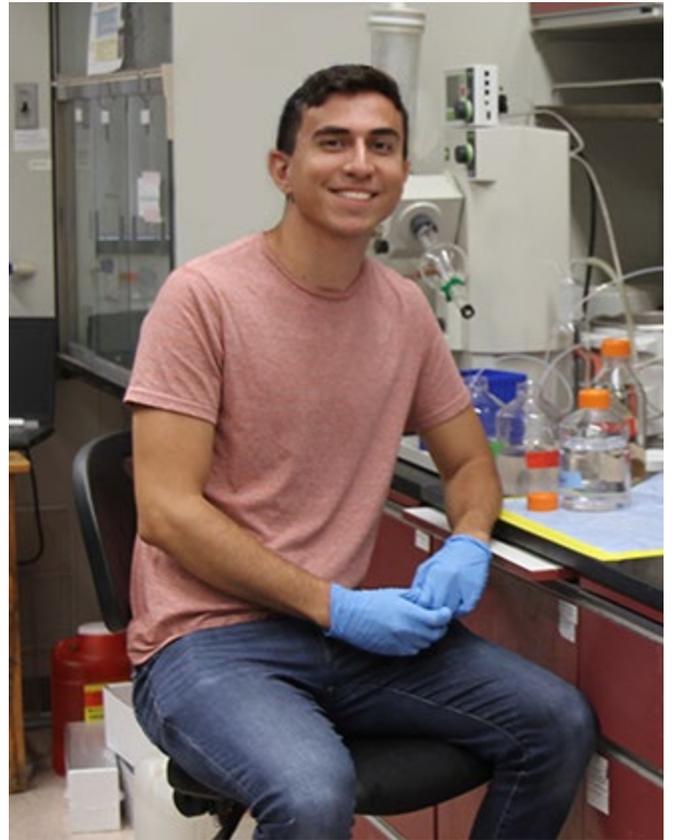
Fralin Life Sciences Institute at Virginia
Tech

Debido al amplio y creciente uso indiscriminado de antibióticos, ha habido un incremento en la presencia de microorganismos resistentes a los antibióticos. Algunos de estos microorganismos son agentes patógenos, y

están evolucionando para ser más potentes, prevalentes y difíciles de tratar. La resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de las mayores amenazas para la salud mundial y representa un alto costo económico para todos los países en el mundo.

Como parte de la lucha incesante para tratar a microorganismos resistentes a los antibióticos, existe una búsqueda constante de medicamentos nuevos y más específicos. Un enfoque usado en el campo del descubrimiento de medicamentos es el de identificar enzimas que son clave para el crecimiento de estos patógenos y desarrollar tácticas para inhibirlas.

Un ejemplo de tales enzimas es un grupo llamado monoxigenasas N-hidroxilantes (NMO por sus siglas en inglés). Estas enzimas son clave para la producción de sideróforos, pequeños compuestos quelantes que permiten la supervivencia de algunos hongos y bacterias en condiciones limitantes de hierro. Previamente, se ha demostrado que las NMO involucradas en la biosíntesis de sideróforos son esenciales para la patogénesis en organismos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo tanto, las NMO son consideradas



novedosas moléculas diana para el desarrollo y producción de inhibidores que puedan ser usados para tratar infecciones producidas por estos microorganismos.

Para desarrollar inhibidores específicos de NMO que puedan usarse como medicamentos para tratar estas infecciones, primero debemos entender cómo funcionan estas enzimas.

En el pasado, ejemplares de NMOs han sido caracterizados ampliamente, incluyendo la descripción detallada de la función, la cinética enzimática, el mecanismo químico y la estructura. Sin embargo, aún tenemos preguntas que no han sido respondidas por el estado actual de la enzimología. Por ejemplo, la literatura aun no logra explicar contradicciones entre la evidencia química y la evidencia espacial del rol del cofactor NADPH en el mecanismo enzimático de este grupo de hidroxilasas.

Durante mi investigación de maestría en el laboratorio del Dr Pablo Sobrado, nos enfocamos en generar recursos y conocimiento base que nos llevará más cerca de poder resolver preguntas como esta y resolver el mecanismo de NMOs.

Una estrategia utilizada para estudiar enzimas, es la cristalización de proteínas en presencia de compuestos que "congelaran" la enzima en conformaciones intermedias del mecanismo de acción. Basados en el rol inconcluso del cofactor NADPH en el funcionamiento de NMOs, nosotros hipotetizamos que, si cristalizamos ejemplares de NMOs en presencia de análogos deuterados de NADPH, podríamos observar pasos intermedios que completen el mecanismo de acción.

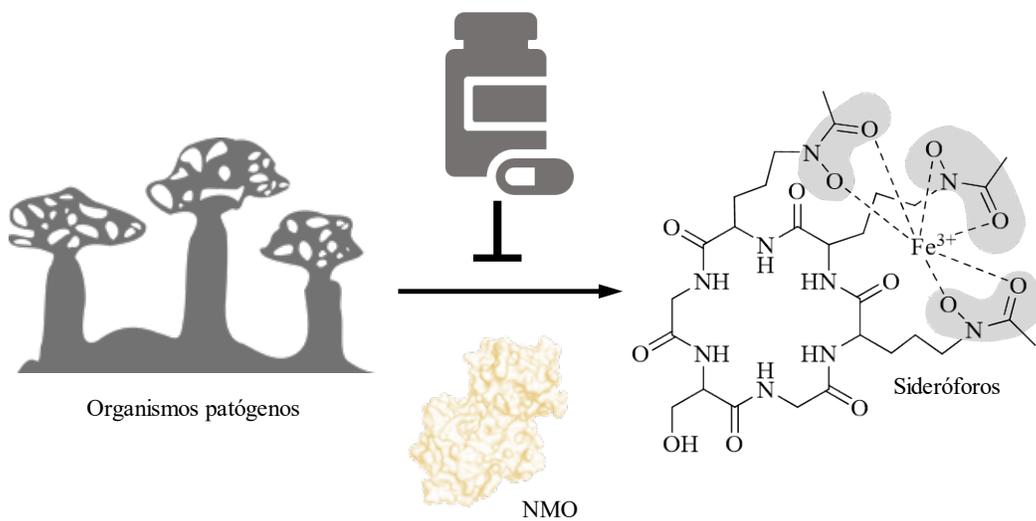
En nuestra investigación desarrollamos un protocolo para la producción de análogos deuterados de NADPH. Usando una reducción química no específica, produjimos y aislamos tres distintos análogos de NADPH. Estos compuestos fueron caracterizados y validados utilizando técnicas como espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear, entre otros. Los compuestos producidos y validados se utilizarán en futuros estudios para comprender el mecanismo de enzimas pertenecientes a este grupo de monooxigenasas.

Una práctica común en el campo de la enzimología y la biología estructural, es la caracterización de proteínas ortólogas para entender el mecanismo de otras enzimas de interés. Durante mi investigación de maestría, caracterizamos una nueva NMO denominada TheA, proveniente de *Thermocrispum agrestre*, un organismo capaz de crecer en temperaturas hasta 60 °C. Nuestro objetivo, es utilizar la información producida al investigar TheA, para ser extrapoladas a otras NMOs y así elucidar su mecanismo.

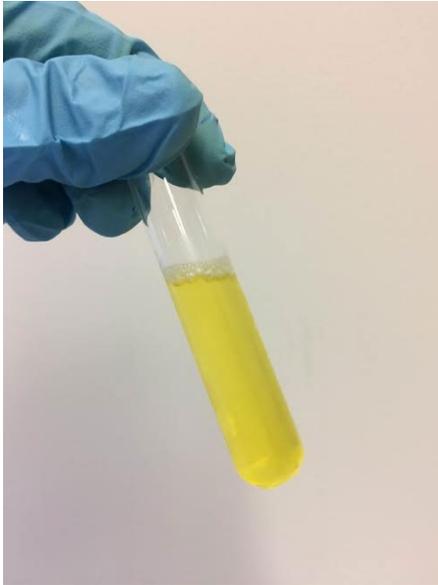
Para obtener la cantidad y calidad de proteína necesaria para caracterizar TheA, el protocolo de expresión y purificación fue optimizado usando diferentes sistemas de expresión heteróloga. Una vez la enzima fue purificada, distintos métodos de caracterización fueron utilizados, incluyendo ensayos de actividad enzimática, Thermo-FAD, cinética de flujo detenido, entre otros. Utilizando estas técnicas, logramos determinar y describir velocidades catalíticas, afinidades de unión al sustrato, estabilidad térmica y especificidades de coenzima.

Basado en los resultados obtenidos, podemos concluir que TheA es similar a otras monoxigenasa del amino ácido ornitina, en términos de preferencia de sustrato y mecanismo de acción. Sin embargo, esta enzima exhibió mecanismos de reducción únicos que se asimilan a otro grupo de enzimas, con mecanismos únicos especificados para procesar otro tipo de moléculas. En general, nuestros resultados resaltan las similitudes y diferencias de las NMO previamente caracterizadas.

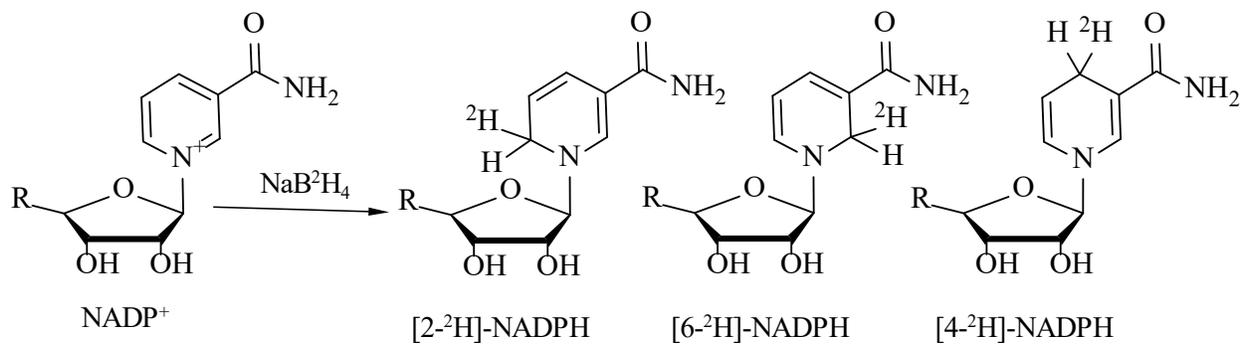
Conjuntamente, estos resultados mejorarán el conocimiento general y la comprensión de las NMO y sus mecanismos asociados, y sentarán las bases para futuros estudios sobre la identificación de medicamentos que pueden usarse para tratar estas enfermedades.



Descripción de figura: Algunos organismos patógenos producen sideróforos utilizando monoxigenasas N-hidroxilantes. Drogas que inhiben estas enzimas pueden ser usadas para tratar infecciones de estos patógenos.



Descripción de figura: TheA de *Thermocristpum agreste* expresada y purificada de forma heteróloga.



Descripción de figura: Producción de análogos deuterados de NADPH por reducción química no específica.