

---

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y ENERGÉTICO DE LA INTERACCIÓN DE  
FOSFORILCOLINA CON LA MUTANTE E42A DE FOSFORILCOLINA  
FOSFATASA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*****DANIEL MATÍAS BUSTOS GUAJARDO  
INGENIERO EN BIOINFORMÁTICA****RESUMEN**

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, reconocida como un patógeno oportunista con alta resistencia a antibióticos. Está involucrada en una serie de complicaciones en el área médica y se caracteriza por atacar a pacientes con su sistema inmune comprometido, ya sea por fibrosis quística o quemaduras. Fosforilcolina fosfatasa (PchP) ha sido implicada en la patogénesis de esta bacteria, hidrolizando el sustrato fosforilcolina (Pch) para producir colina y fosfatos, nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. La enzima PchP pertenece a la superfamilia HAD debido a que posee motivos conservados, los cuales se pliegan para formar el sitio activo que se une a  $Mg^{+2}$  y la porción fosfato del sustrato Pch. Los residuos que interactúan con la región alquilamonio no son del todo conocidos; sin embargo, comparaciones con proteínas de unión a colinas y mutagénesis sitio-dirigida han demostrado que los residuos E42, E43 y el triple residuo de tirosinas 82YYY84 podrían estar implicados. Mutaciones en estos residuos afectan la afinidad de la enzima por Pch y disminuyen el efecto inhibitorio causado por altas concentraciones de este sustrato. Por lo tanto, se postula que dos sitios: uno activo y otro de inhibición están presentes en PchP compartiendo algunos residuos. En base a esta evidencia, se construyó un modelo molecular de PchP y se utilizaron simulaciones de dinámica molecular para analizar la unión de Pch a la proteína y caracterizar los distintos sitios de unión. Así también, se utilizó el método de Perturbación de Energía Libre para evaluar la energía libre de disociación de Pch frente a la mutante E42A. Los resultados mostraron la existencia de dos sitios adyacentes que comparten algunos residuos y permiten la unión de moléculas de Pch. Se obtuvo además, un buen acuerdo entre los valores de energía libre teóricos y experimentales, los cuales cuantitativamente confirman que el residuo E42 está implicado en la actividad de ambos sitios. Finalmente, las simulaciones revelaron las interacciones determinantes en la afinidad de Pch en

---

los sitios de unión y se logró obtener información clave para explicar el ingreso de los sustratos a los sitios activo y de inhibición.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a bacterium widely distributed in nature and is recognized as an opportunistic pathogen highly resistant to antibiotics. It is involved in several complications in the medical area and is characterized by infecting patients with weakened immune systems, either by cystic fibrosis or burns. *Phosphorylcholinephosphatase* (PchP) has been implicated in the pathogenesis of this bacterium, hydrolyzing the substrate phosphorylcholine (Pch) to produce choline and phosphate, nutrients required for bacterial growth. PchP enzyme belongs to the HAD superfamily because it contains conserved motifs, which are folded to form the active site, at which binds  $Mg^{+2}$  and the phosphate moiety of the Pch substrate. Residues interacting with alkylammonium region are not fully known; however, comparisons with choline-binding proteins and site-directed mutagenesis have demonstrated that the residues E42, E43 and the aromatic triplet 82YYY84 could be implicated. Mutations in these residues affect the affinity of the enzyme for Pch and decrease the inhibitory effect caused by high concentrations of this substrate. Therefore, it has been postulated the existence of two sites: one active and one of inhibition which are present in PchP and share some residues. On the basis of this evidence, a molecular model of PchP was built and molecular dynamics simulations were employed to analyze the binding of Pch to the protein and characterize the different binding sites. Moreover, the method of free energy perturbation was used to evaluate the free energy dissociation of Pch against the mutant E42A. The results showed the existence of two adjacent sites that share some residues and allow binding of Pch molecules. Also, it was obtained a good agreement between the experimental and theoretical energy values, which quantitatively confirms that the residue E42 is involved in the activity of both sites. Finally, the simulations revealed the interactions that determine the affinity of the Pch in the binding sites and it was possible to obtain key information that explains the access of the substrates to the both sites.