

## SOBRE DINÁMICA ESTRUCTURAL Y CONSERVACIÓN DE RESIDUOS EN LA SUPERFAMILIA RAS

CLAUDIA CHICA

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia.

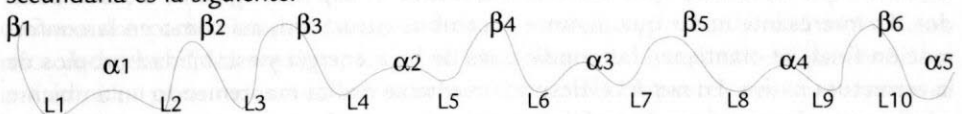
### SUPERFAMILIA RAS

Se estima que la superfamilia Ras contiene 60 - 100 miembros que cumplen diferentes funciones en el medio celular: transducción de señales (Ras), regulación del citoesqueleto (Rho), señalamiento vesicular (Rab) y regulación de la traducción (EF). Estas proteínas presentan una baja homología de secuencia, entre 35 y 55% (Quilliam *et al.*, 1995), pero comparten un mismo patrón estructural (dominio G) relacionado a la unión con GTP/GDP. La búsqueda de relaciones filogenéticas entre estas secuencias apunta a comprender si sus diferencias representan fenómenos de divergencia o convergencia evolutiva. Otro tipo de estudios, centrados en el fenotipo proteico, buscan definir el significado que los residuos conservados puedan tener en la definición de la estructura y la función de la proteína. El dominio G más estudiado corresponde al de la familia Ras en humanos, compuesta por tres proto-oncogenes: N-Ras, H-Ras y K-Ras. Éstas son proteínas de 170 a 189 residuos y 19 a 21 kDa, por lo cual se identifican con el nombre genérico de p21. Hay citosólicas y de membrana celular; las de membrana se unen a la hemicapa citosólica de la membrana celular, gracias al motivo Cis-A-A-X (A = residuo alifático, X = residuo no polar) que es agregado por modificación post-traduccional. La transformación celular inducida por Ras es causada por su activación prolongada ocasionada por:

- Sobre-expresión: debido a la concentración limitada de las proteínas reguladoras GAP (*GTPase activating protein*).
- Mutación puntual:
  - En residuos 12, 13, 59, 61, 63 porque conllevan un aumento de la actividad GTPasa. (Aquellas subrayadas corresponden a las mutaciones que ocurren naturalmente).
  - En residuos 116, 119, 146, 156 porque producen una disminución de la afinidad por el nucleótido fosfato y un aumento en el intercambio GDP/GTP, debido a la mayor concentración de este último en el citoplasma.

### TOPOLOGÍA DEL DOMINIO G

El dominio G presente en Ras está compuesto por 6 hebras  $\beta$  ( $\beta$ ) y 4 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ ) y los bucles (*loops*) que las separan (L). La sucesión de unidades de estructura secundaria es la siguiente:



La mitad C-terminal del dominio (desde  $\beta 4$ ) presenta una sucesión de hebras  $\beta$  y hélices  $\alpha$ , mientras que la mitad N-terminal presenta una hoja antiparalela ( $\beta 2$ - $L 3$ - $\beta 3$ ). Las regiones funcionales del dominio G se distribuyen como se muestra en la Tabla 1.

Función	Residuos	Unidad de estructura secundaria
unión GDP/GTP		
Fosfato $\beta$	10-16	L1
Fosfato $\gamma$	56-59	$\beta 3$
Guanina	116-119 y 152-165	L8 y $\alpha 5$
unión GAP/efectores	32-40	L2- $\beta 2$
unión GEF (?)		$\alpha 2$
unión membrana	186-189	Cis-A-A-X

Tabla 1. Distribución de las regiones funcionales del dominio G. Catálisis: unión GDP/GTP, GAP/efectores y GEF; localización: unión membrana. GDP: Guanosin difosfato; GTP: Guanosin trifosfato; GAP: GTPase activating protein; GEF: *Guanine nucleotide exchange factor*. (Datos tomados de Watzinger y Lion, 1999; Valencia *et al.*, 1991).

CAMBIO CONFORMACIONAL DEL DOMINIO G

La transición Ras.GTP/Ras.GDP se da gracias a un cambio conformacional en dos regiones del dominio G, las regiones de switch: *switch I* residuos 30-38, ubicados en L2; *switch II* residuos 60-76, ubicados en L4 y  $\alpha 2$ .

Dichos cambios estructurales (Fig. 1) producen:

- Desestabilización de la unión a los efectores. Por la rotación de los residuos Glu31 y Asp33 (del L2) que los aleja de su lugar de unión al efector, y el mantenimiento de Glu37 en una conformación no adecuada para la interacción.
- Preparación para la unión con GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*). Por rotación y desenrollamiento de  $\alpha 2$ .

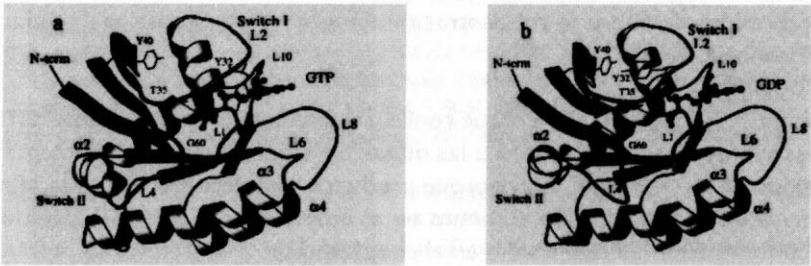


Figura 1. Cambio conformacional de las regiones de switch I y II: a) Ras.GTP b) Ras.GDP. (Modificado por Ma J. y Karplus M., 1997).

Los cambios estructurales descritos demuestran la existencia de una estructura nativa dinámica que no corresponde a una sola distribución espacial rígida de los aminoácidos. Es interesante notar que durante el cambio estructural, así como en la conformación final, se mantienen las condiciones de baja energía y estabilidad propios de la estructura nativa. En *switch I* el desplazamiento se realiza manteniendo un ambiente apolar para los residuos hidrofóbicos así como conformaciones energéticamente estables para los enlaces  $\phi$  y  $\psi$  de la cadena principal. Análogamente, en *switch II*, el desenrollamiento de  $\alpha 2$  es compensado energéticamente y entrópicamente por modificación del patrón de solvatación de los residuos (Ma y Karplus, 1997).

# CONSERVACIÓN DE RESIDUOS EN LA SUPERFAMILIA RAS

A pesar de poseer una baja homología de secuencia 35-55%, los miembros de la superfamilia Ras comparten un grupo de aminoácidos altamente conservados (Quilliam *et al.*, 1995):

- Los cuatro motivos de unión a GDP/GTP.
- Fen28 y Tre35 involucrados en la unión e hidrólisis del GTP.
- Val152 y Fen156 pertenecientes al corazón hidrofóbico del dominio G.

La Tre35 se encuentra en la región de *switch I* e influye en la dinámica de catálisis de H-Ras. En su conformación activa, es decir cuando Ras está unida a GTP, *switch I* presenta dos estados (llamados 1 y 2): en el estado 1 la molécula tiene baja afinidad por el efector, una vez éste se le une, pasa al estado 2 de alta afinidad por el efector (Spoerner *et al.*, 2001). A nivel estructural se observa que el estado 1 de *switch I* no está bien definido, pues el espectro de resonancia magnética observado no corresponde a una distribución tridimensional única y durable de los átomos; en pocas palabras, la región de *switch I* en el estado 1 es altamente flexible. El estado 2, en cambio, corresponde a una conformación definida en la cual la Tre35 se une al Mg<sup>2+</sup> estando su cadena lateral bien empaqueta al interior de L2, y la Tir32 se ubica cerca de los fosfatos. Cuando se realizan las mutaciones Tre35Ser o Tre35Ala, el *switch I* no presenta transición al estado 2 pues la pérdida del CH<sub>3</sub> de la Tre determina una distribución espacial desordenada de los átomos, semejante a aquella del estado 1. De esta manera disminuye la capacidad de unión de las proteínas Ras mutantes a los efectores.

La conservación del residuo Fen156 presenta connotaciones diferentes ya que mutaciones en esta posición tienen carácter transformador. Fen156 se encuentra ubicada en  $\alpha 5$  e interactúa con Lis23 ( $\alpha 1$ ) y con Iso55 ( $\beta 3$ ). La mutación Fen156Lis, aunque no afecta la estabilidad de la molécula, produce actividad transformadora más leve que la mutación Gln61Lis. Por espectroscopia de resonancia magnética (Quilliam *et al.*, 1995) se ha determinado que dicha mutación produce una "relajación" de la estructura secundaria alrededor de la posición 156: disrupción casi total de  $\alpha 1$  y de la red  $\beta 1$ - $\beta 4$ . Entrando en detalle, el cambio puede ser explicado por la alteración del empaquetamiento en cercanía al residuo 156; de hecho, las interacciones electrostáticas y de van der Waals que Fen156 establece con los residuos espacialmente relacionados, dan cuenta de la cohesión en esta región de la molécula. El resultado funcional de esta modificación es una disminución en la afinidad por el nucleótido fosfato, traducida en un aumento en el intercambio GDP/GTP.

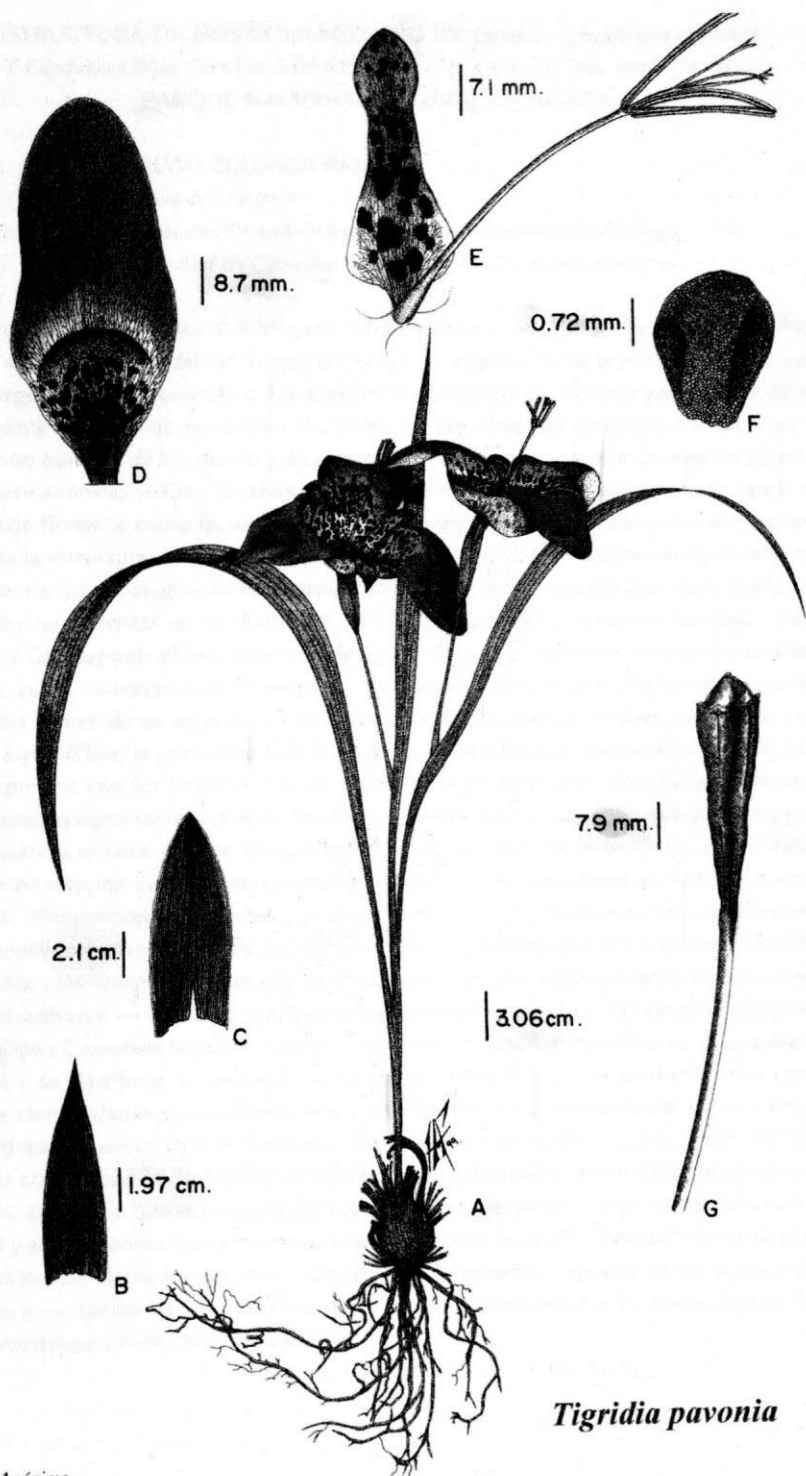
De acuerdo con la hipótesis de Conservación de la Conservación (Mirny y Shakhnovich, 1999; Mirny y Shakhnovich, 2000) en una superfamilia de proteínas los residuos son conservados para mantener la cinética de plegamiento y la estabilidad termodinámica de la estructura terciaria, así como para preservar la capacidad funcional. Los aminoácidos pertenecientes al corazón hidrofóbico de una proteína se conservan a lo largo de la evolución proteica porque son necesarios para la estabilización termodinámica de la estructura terciaria. Esta sería la causa de la conservación de los aminoácidos Val152 y Fen156 en la superfamilia Ras. Sin embargo, es necesario tener en cuenta el carácter local y específico que tienen las interacciones de Fen156 al interior

de la estructura; aunque Fen156 pertenece al interior hidrofóbico de Ras, su papel estructural no es exactamente estabilizador, ya que la proteína mutante tiene una estructura terciaria definida. Por lo tanto, Fen156 no definiría las interacciones del interior hidrofóbico de Ras, pero podría ser un actor en la especificidad de la estructura. Los aminoácidos que conforman el llamado núcleo de plegamiento, ubicados generalmente en el interior de la estructura tridimensional, son aquellos que se conservan por motivos cinéticos. Éstos permiten disminuir la barrera entrópica durante el proceso de plegamiento, pues realizan aquellos contactos claves que permiten reducir considerablemente el número de estructuras posibles para una secuencia que se está plegando.

Para una proteína catalítica, los residuos conservados debido a su significado funcional corresponden a los del sitio activo, así como los determinantes del mecanismo de reacción o los involucrados en la unión a cofactores. En la superfamilia Ras la Tre35, que a pesar de no entrar en contacto directo con el efector es importante para la transición estructural que favorece su unión; y los cuatro motivos de unión al nucleótido fosfato son ejemplos de residuos conservados debido a su importancia funcional. De acuerdo a las características de las proteínas es posible que la conservación estructural y funcional coincidan (Mirny *et al.*, 1998). Es el caso de las proteínas con cofactor, pues el mantener una región de la estructura que permita una unión estable al cofactor, coincide con preservar un núcleo de plegamiento. Es posible entonces que alguno de los motivos de unión al GDP/GTP pertenezca también al núcleo de plegamiento de Ras, que hasta el momento no ha sido identificado.

## BIBLIOGRAFÍA

- MA J. & KARPLUS M. 1997. Molecular switch in signal transduction: Reaction paths of the conformational changes in ras p21. PNAS 94: 11905-11910.
- MIRNY L., ABKEVICH V. & SHAKHNOVICH E. 1998. How evolution make proteins fold quickly. PNAS 95: 4976-4981.
- \_\_\_\_\_ & SHAKHNOVICH E. 1999. Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. JMB 00: 1-19.
- \_\_\_\_\_. 2000. Evolutionary conservation of the folding nucleus. Escrito pre-liminar para JMB (2001) 308: 123-129.
- QUILLIAM L., ZHONG S., RABUN K., CARPENTER J., SOUTH T., DER C. & CAMPBELL-BURK S. 1995. Biological and structural characterization of Ras transforming mutation at the phenylalanine-156 residue, wich is conserved in all members of the Ras superfamily. PNAS 92: 1272-1276.
- SPOERNER M., HERRMANN C., VETTER I., KALBITZER H. & WITTINGHOFFER A. 2001. Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. PNAS 98: 4944-4949.
- VALENCIA A., KJELDGAARD M., PAI E. & SANDER C. 199. GTPase domain of ras p21 oncogene protein and elongation factor Tu: analysis of the three-dimensional structures, sequence families and functional sites. PNAS 88: 5443-5447.
- WATZINGER F. & LION T. 1999. Ras Family. [www.molbio.uk.dk/MolBioPages/amc/PersonalPages](http://www.molbio.uk.dk/MolBioPages/amc/PersonalPages)



*Tigridia pavonia*