



**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Doctorado en Ciencias con Mención en Química**

**DIFUSIÓN Y UNIÓN DE CO<sub>2</sub> EN LA ENZIMA CROTONIL-COA  
CARBOXILASA-REDUCTASA MEDIANTE SIMULACIONES DE  
DINÁMICA MOLECULAR**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Química

Por: Aharon Ignacio Gomez Llanos

Profesor Guía: Dr. Esteban Vöhringer-Martinez

Agosto 2023  
Concepción, Chile

©Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

*"There are two possible outcomes:  
if the result confirms the hypothesis,  
then you've made a measurement.  
If the result is contrary to the hypothesis,  
then you've made a discovery."*

**Enrico Fermi**

# Agradecimientos

En primer lugar le agradezco a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por apoyarme en mis estudios a través de la Beca de Doctorado Nacional y a la Facultad de Ciencias Químicas por entregarme las herramientas necesarias para desarrollar mis estudios de doctorado a través de su excelente y estricta formación en los fundamentos de la química.

Agradezco a todos los miembros actuales y pasados del grupo de Química Cuántica y Modelamiento Molecular (QCMM) por la compañía y el apoyo que me han brindado a lo largo de estos casi seis años, desde mi ingreso como estudiante de pregrado. Agradezco la guía y apoyo del Dr. Esteban Vöhringer-Martinez en este largo proceso de formación académica y profesional.

Finalmente agradezco a mi familia que siempre me ha estado motivando y dando su apoyo incondicional a la distancia. A mis amigos más cercanos, a quienes conocí desde mi llegada a Concepción, quienes también me han acompañado en este largo proceso.

# Contenido

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Lista de Figuras</b>  | <b>VI</b>   |
| <b>Lista de Tablas</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>Resumen</b>   | <b>XIII</b> |
| <b>Abstract</b>  | <b>XVII</b> |
| <b>1. Introducción</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1. Marco Teórico . . . . .   | 12          |
| 1.2. Hipótesis y Objetivos . . . . .                                 | 27          |
| <b>2. Metodología</b>  | <b>29</b>   |
| 2.1. Mecánica molecular . . . . .                                    | 29          |
| 2.2. Dinámica molecular . . . . .                                    | 31          |
| 2.3. Cálculos de energía libre . . . . .                             | 36          |
| 2.3.1. Método de Zwanzig . . . . .                                   | 36          |
| 2.3.2. Integración termodinámica . . . . .                           | 38          |
| 2.3.3. Bennett Acceptance Ratio (BAR) . . . . .                      | 39          |
| 2.3.4. Estimación de $\Delta pK_a$ desde cálculos de energía libre . | 40          |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.      | Análisis de componentes principales (PCA) . . . . .   | 43        |
| 2.5.      | Sitios de unión y tiempos de residencia de CO <sub>2</sub> . . . . .  | 46        |
| 2.5.1.    | Distribución de CO <sub>2</sub> . . . . .   | 46        |
| 2.5.2.    | Sitios de unión y tiempo de residencia . . . . .  | 52        |
| <b>3.</b> | <b>Resultados y Discusión</b>   | <b>60</b> |
| 3.1.      | Determinación del pK <sub>a</sub> de Histidina 365 para distintas confi-<br>guraciones del sitio activo de Ccr . . . . .    | 62        |
| 3.2.      | Cambios conformacionales en Ccr asociados a su función ca-<br>talítica . . . . .  | 70        |
| 3.3.      | Unión de dióxido de carbono para pasos elementales del ciclo<br>catalítico . . . . .  | 84        |
| 3.3.1.    | Validación de parámetros para CO <sub>2</sub> . . . . .   | 87        |
| 3.3.2.    | Definición de conformaciones representativas para la<br>unión de CO <sub>2</sub> en etapas elementales del ciclo catalítico | 88        |
| 3.3.3.    | Dependencia conformacional en la unión de CO <sub>2</sub> al<br>sitio activo . . . . .                                      | 93        |
| 3.3.4.    | Descubrimiento y análisis de la actividad de anhídri-<br>sa carbónica de Ccr . . . . .                                      | 96        |
| 3.3.5.    | Efecto del sustrato sobre la unión de CO <sub>2</sub> . . . . .   | 103       |
| 3.3.6.    | Análisis cinético de la unión de CO <sub>2</sub> . . . . .  | 105       |
| 3.3.7.    | Análisis de la pérdida de reactividad para variante N81L111   |           |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3.8. Mecanismo de unión de CO <sub>2</sub> y sustrato para Ccr . . . | 113        |
| <b>4. Conclusiones</b>   | <b>115</b> |
| 4.1. Propuesta de ciclo catalítico . . . . .                           | 124        |
| 4.1.1. Proyecciones . . . . .  | 128        |
| <b>Bibliografía</b>  | <b>130</b> |
| <b>A. Análisis conformacional</b>                                      | <b>137</b> |
| <b>B. Unión de CO<sub>2</sub> para los sistemas de estudio</b>         | <b>142</b> |
| <b>C. Parámetros de simulación</b>                                     | <b>147</b> |
| <b>D. Presentaciones en congresos y publicaciones</b>                  | <b>159</b> |
| D.1. Congresos . . . . .   | 159        |
| D.2. Publicaciones . . . . .   | 160        |

# Lista de Figuras

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 1.1.  | Reacción catalizada por Ccr . . . . .  | 5   |
| 1.2.  | Representación del sistema . . . . .   | 9   |
| 1.3.  | Estructura cristalina de Ccr . . . . .   | 23  |
| 2.1.  | Representación del volumen del sitio activo . . . . .  | 49  |
| 2.2.  | Distribución de exceso/reducción en la concentración de CO <sub>2</sub> para el sistema ternario . . . . .     | 52  |
| 2.3.  | Isosuperficies de densidad de CO <sub>2</sub> . . . . .  | 54  |
| 3.1.  | Efecto de la protonación de H365 sobre distancia de iones K <sup>+</sup> al sitio activo . . . . .             | 67  |
| 3.2.  | Zonas de comunicación intra e interdímero . . . . .  | 72  |
| 3.3.  | Cambios conformacionales en Ccr . . . . .  | 77  |
| 3.4.  | Bosquejo de la superficie de energía libre de los cambios conformacionales . . . . .                           | 81  |
| 3.5.  | Esquema de unión de CO <sub>2</sub> . . . . .  | 86  |
| 3.6.  | Representación de sistemas de simulación . . . . .   | 89  |
| 3.7.  | Representación del volumen del sitio activo . . . . .  | 92  |
| 3.8.  | Dependencia conformacional en la distribución de CO <sub>2</sub> . . . . .                                     | 94  |
| 3.9.  | Actividad de formación de bicarbonato para Ccr silvestre y mutantes . . . . .                                  | 98  |
| 3.10. | Energía libre de unión de CO <sub>2</sub> en sitios de activos de Ccr . . . . .                                | 100 |
| 3.11. | Comparación de sitios de unión de CO <sub>2</sub> para sistemas ternario y ternario <i>in silico</i> . . . . . | 104 |
| 3.12. | Comparación de energía libre de unión para los distintos sistemas. . . . .                                     | 106 |
| 3.13. | Ajuste de modelo cinético para la apertura del sitio activo del sistema ternario . . . . .                     | 108 |
| 3.14. | Comparación ternario <i>in silico</i> silvestre y mutante . . . . .  | 112 |



|   |     |
|---|-----|
| 3.15. Esquema propuesto para la unión de CO <sub>2</sub> . . . . .  | 114 |
| 4.1. Ciclo catalítico propuesto para la fijación de CO <sub>2</sub> en la enzima Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa . . . . .       | 126 |
| A.1. Dependencia temporal del cambio conformacional . . . . .   | 138 |
| A.2. Análisis de componentes principales para los sistemas de simulación . . . . .  | 140 |
| A.3. Ajuste de modelo cinético para la apertura del sitio activo . . . . .  | 141 |
| B.1. Distribución de exceso/reducción en la concentración de CO <sub>2</sub> para el sistema binario <i>WT</i> . . . . .            | 143 |
| B.2. Distribución de exceso/reducción en la concentración de CO <sub>2</sub> para el sistema ternario <i>WT</i> . . . . .           | 144 |
| B.3. Distribución de exceso/reducción en la concentración de CO <sub>2</sub> para el sistema ternario <i>in silico WT</i> . . . . . | 145 |
| B.4. Distribución de exceso/reducción en la concentración de CO <sub>2</sub> para el sistema <i>in silico N81L</i> . . . . .        | 146 |

# Lista de Tablas

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 1.1. | Información cinética para variantes de Ccr . . . . .   | 10  |
| 3.1. | Valores de $\Delta pK_a$ para el residuo H365 . . . . .  | 66  |
| 3.2. | Energía libre de solvatación de CO <sub>2</sub> . . . . .                                      | 88  |
| 3.3. | Tiempos de residencia promedio ( $\tau$ ) para sitios de unión de<br>CO <sub>2</sub> . . . . . | 107 |
| 3.4. | Estimación para las constantes de cerrado del sitio activo . . .                               | 110 |
| C.1. | Ejecución de simulaciones. . . . .   | 147 |
| C.2. | Parámetros de minimización con el integrador <i>steep</i> . . . . .                            | 148 |
| C.3. | Parámetros de equilibración colectivo canónico NVT . . . . .                                   | 149 |
| C.4. | Parámetros de equilibración colectivo isobárico-isotérmico NPT                                 | 150 |
| C.5. | Parámetros de producción . . . . .   | 152 |
| C.6. | Parámetros de transformaciones alquímicas . . . . .  | 156 |
| C.7. | Obtención de mapas de densidad de CO <sub>2</sub> . . . . .                                    | 158 |

# Resumen

El CO<sub>2</sub> es uno de los gases de invernadero más importantes y su acumulación en la atmósfera se asocia con el cambio climático. La fijación de este gas mediante enzimas para la generación de compuestos orgánicos de valor agregado presenta un desafío actual en la biocatálisis. La Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa (Ccr) es una de las enzimas más eficientes en la fijación de CO<sub>2</sub> presentando la mayor constante de velocidad catalítica y siendo además insensible a la presencia de oxígeno, a diferencia de RuBisCO, que es la enzima responsable de la fijación de CO<sub>2</sub> para la generación de biomasa.

En esta tesis se estudiaron los cambios conformacionales de Ccr para comprender la alta eficiencia de esta enzima. Ccr es un homo tetrámero que en presencia de NADPH y análogos de sustrato (sustrato, producto de carboxilación o reducción), modifica su conformación diferenciándose desde una estructura completamente simétrica a un dímero de dímeros. Cada uno de estos dímeros posee una subunidad abierta sin sustrato y una cerrada con sustrato donde ocurre la reacción. Su gran eficiencia catalítica estaría asociada a los cambios conformacionales dando origen a una reactividad parcial de sitios.

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para estudiar cambios

conformacionales de Ccr y la unión de CO<sub>2</sub> sobre ella. Se desarrolló un método para analizar el efecto de la conformación de la subunidad sobre la concentración de CO<sub>2</sub> en el sitio activo y así, definir sitios de unión para esta molécula. Adicionalmente se desarrolló un procedimiento que permite cuantificar el tiempo de residencia promedio de la molécula de CO<sub>2</sub> en los sitios de unión definidos previamente. Con la información conjunta de cambios conformacionales, unión y residencia de CO<sub>2</sub> en el sitio activo, se propuso un mecanismo catalítico para la enzima.

En primer instancia se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular para determinar las conformaciones de equilibrio del sistema, así como posibles cambios de estas en solución acuosa. Estas simulaciones mostraron que la presencia del sustrato, en su posición reactiva, mantiene la conformación cerrada del sitio activo. En ausencia del sustrato la subunidad presenta un cambio conformacional de apertura en la escala de decenas de nanosegundos.

Se ha encontrado que existen tres residuos conservados (E151, N218 y N157) en enoil-CoA carboxilasas-reductasas (ECRs) del metabolismo primario presentes en Ccr. Al comparar con ECRs de metabolismo secundario, estos residuos no se encuentran presentes y su actividad catalítica es en promedio 20 veces más lenta. Estos residuos están en la interfaz entre ambos dímeros y se encuentran muy alejados del sitio activo. Al perturbar la interacción de estos residuos a través de mutaciones puntuales en Ccr, su eficiencia catalítica disminuye en tres órdenes de magnitud. El análisis de componen-

tes principales del sistema mutante muestra que la apertura del sitio activo se vuelve más lenta y sugiere que los cambios conformacionales están directamente relacionados con la eficiencia catalítica.

Para estudiar el efecto de la conformación sobre la concentración de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo, se utilizaron simulaciones en presencia explícita de moléculas de  $\text{CO}_2$  en conformaciones representativas de la Ccr definidas anteriormente. Se analizaron las distribuciones de moléculas de  $\text{CO}_2$  junto con la concentración relativa en el sitio activo para las enzimas Ccr silvestre y su variante N81L no reactiva. Se generó un método computacional para definir los sitios de unión, que puede utilizarse como una primera aproximación a un modelo de estados de Markov. La estimación de la concentración relativa y la definición de sitios de unión fue validada relacionándola con información experimental.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una dependencia conformacional de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo con el estado de la subunidad. En ausencia de sustrato la mayor afinidad se encuentra en el sitio activo cerrado. La presencia de sustrato en el sitio activo cerrado invierte la afinidad sobre las subunidades del dímero, siendo la conformación abierta la que presenta una mayor afinidad en su sitio activo. La presencia de sustrato en la subunidad abierta disminuye su afinidad en un tercio sin alterar la afinidad del sitio cerrado con sustrato. Al comparar el sistema silvestre con la variante N81L, la afinidad de las subunidades no se vio modificada. Sin em-

bargo, no se detectaron los sitios de unión del sitio activo abierto cercanos a los residuos de interés, el sustrato y el cofactor, asociados a la reacción química. Con esta información fue posible explicar la pérdida de actividad para la carboxilación de esta mutante observada experimentalmente.

Los sitios de unión definidos previamente, fueron utilizados para estudiar la cinética de unión de  $\text{CO}_2$  en los pasos elementales de la catálisis y modelar la difusión de las moléculas de  $\text{CO}_2$  al sitio activo de la proteína. La conformación cerrada de la subunidad con sustrato no presentó un camino de acceso para el  $\text{CO}_2$  hacia el sitio activo. En la subunidad abierta existen sitios de unión asociados a residuos importantes para la reacción de carboxilación. Estos sitios están conservados para la conformación abierta de la subunidad sin depender de la presencia de sustrato y poseen tiempos de residencia promedio en la escala de los nanosegundos. Los tiempos de residencia en estos sitios de unión se ven modificados por la presencia de sustrato favoreciendo aquellos que facilitan la carboxilación, lo que permitiría la permanencia del  $\text{CO}_2$  unido a lo largo del cambio conformacional de cerrado del sitio activo y posterior reacción.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis permitieron proponer un mecanismo para la catálisis de esta enzima. En un primer paso el  $\text{CO}_2$  se une a la subunidad abierta sin sustrato. Posteriormente ocurre la unión de sustrato posicionando el  $\text{CO}_2$  para la reacción, lo que gatilla el cambio conformacional. Finalmente, se da paso a la reacción química.

Este trabajo entrego una visión atómico-molecular del funcionamiento de la Ccr para la catálisis de la fijación de CO<sub>2</sub>, lo que permitirá proponer mutaciones capaces de mejorar la disponibilidad de CO<sub>2</sub> en el sitio activo. Además, en base a los resultados obtenidos, se propuso un ciclo catalítico que permite explicar la alta eficiencia de este enzima. Para ello, cada una de las subunidades en la estructura tetramérica cumple una función distinta de manera paralela para maximizar la eficiencia de las distintas etapas del ciclo.

# Abstract

Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) is one of the most important greenhouse gases, and its accumulation in the atmosphere is associated with climate change. The fixation of this gas using enzymes for the generation of value-added organic compounds presents a current challenge in biocatalysis. Crotonyl-CoA Carboxylase-Reductase (Ccr) is one of the most efficient enzymes in CO<sub>2</sub> fixation, showing the highest catalytic rate constant and being insensitive to the presence of oxygen, unlike RuBisCO, which is the enzyme responsible for CO<sub>2</sub> fixation in nature.

This thesis studied the conformational changes of Ccr to understand its high efficiency. Ccr is a homo-tetramer that, in the presence of NADPH and substrate analogs (substrate, carboxylation or reduction product), undergoes conformational changes, transitioning from a completely symmetric structure to a dimer of dimers configuration. Each of these dimers has an open subunit without substrate and a closed one with substrate where the reaction occurs. Its high catalytic efficiency is believed to be associated with these conformational changes leading to half site reactivity.

Molecular dynamics simulations were performed to study the conformational changes of Ccr and CO<sub>2</sub> binding. A method was developed to analyze



the effect of subunit conformation on CO<sub>2</sub> concentration at the active site, thus defining CO<sub>2</sub> binding sites. Additionally, a procedure was developed to quantify the average residence time of CO<sub>2</sub> molecules in the previously defined binding sites. With the combined information on conformational changes, binding, and residence of CO<sub>2</sub> at the active site, a catalytic mechanism for the enzyme was proposed.

Initially, molecular dynamics simulations were conducted to determine the equilibrium conformations of the system and possible changes in these conformations in aqueous solution. These simulations showed that the presence of the substrate, in its reactive position, maintains the closed conformation of the active site. In the absence of the substrate, the subunit undergoes an opening conformational change on the scale of tens of nanoseconds.

Three residues in enoyl carboxylase-reductase (ECR) enzymes from primary metabolism (E151, N218 y N157) are conserved in Ccr. Compared to ECRs from the secondary metabolism, where these residues are not conserved, the catalytic activity is reduced, on average, 20 times. These residues are at the interface between both dimers and are far from the active site. Disrupting the interaction of these residues through point mutations in Ccr decreases its catalytic efficiency by three orders of magnitude. Principal component analysis of the mutant simulations indicates that the opening of the active site becomes slower, suggesting a direct relationship between conformational changes and catalytic efficiency.

To study the effect of conformation on CO<sub>2</sub> concentration at the active site, simulations were performed with explicit CO<sub>2</sub> molecules in representative Ccr conformations. The distributions of CO<sub>2</sub> molecules and their relative concentrations at the active site were analyzed for wild-type Ccr and its non-reactive variant N81L. A computational method was developed to define the binding sites, which can serve as an initial approximation to a Markov state model. The estimation of relative concentration and the definition of binding sites were validated comparing with experimental information.

The results demonstrate a conformational dependence of CO<sub>2</sub> concentration at the active site. In the absence of substrate, the highest affinity is found in the closed active site. The presence of substrate in the closed active site reverses the affinity of the subunits of the dimer, with the open conformation presenting a higher affinity at its active site. Substrate presence in the open subunit reduces its affinity by one-third without altering the closed site's affinity with substrate. When comparing the wild-type system with the N81L variant, the subunits' affinity remained unmodified. However, binding sites were not detected in the open active site close to the residues, the substrate and cofactor associated with the chemical reaction. This findings explained the experimentally observed loss of activity for the carboxylation of this mutant.

The previously defined binding sites were used to study the kinetics of CO<sub>2</sub> binding in the elementary steps of catalysis and model the diffusion of

CO<sub>2</sub> molecules to the protein's active site. The closed conformation of the subunit with substrate does not present an access pathway for CO<sub>2</sub> to reach the active site. In the open subunit, there are binding sites associated with residues important for the carboxylation reaction. These sites are conserved for the open conformation of the subunit, regardless of the substrate's presence, and have average residence times on the nanosecond scale. The residence times in these binding sites are modified by the presence of substrate, favoring those that facilitate carboxylation, allowing CO<sub>2</sub> to remain bound during the conformational change for closing active site and subsequent reaction.

In summary, the results obtained in this thesis allowed proposing a mechanism for the enzyme's catalysis. In the first step, CO<sub>2</sub> binds to the open subunit without substrate. Subsequently, substrate binding occurs, positioning CO<sub>2</sub> for the reaction and triggering the conformational change. Finally, the chemical reaction takes place.

This work provides an atomic-molecular view of Ccr's function in CO<sub>2</sub> fixation catalysis, enabling the proposal of mutations capable of improving CO<sub>2</sub> availability at the active site. Additionally, based on the results obtained, a catalytic cycle was proposed to explain the enzyme's high efficiency. Each subunit in the tetrameric structure fulfills a distinct function maximizing the efficiency of the different stages of the cycle.

# 1. Introducción

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es un gas atmosférico invernadero que posee un rol preponderante en el calentamiento global. Desde los inicios de la industrialización, la concentración atmosférica de  $\text{CO}_2$  se ha incrementado en más de un 40%, desde 280 ppm de concentración preindustrial, hasta alcanzar el límite de 400 ppm.<sup>1</sup> El incremento de este gas invernadero por efectos antropogénicos se ha relacionado directamente con el calentamiento global, generando diversas medidas tanto sociales como políticas para reducir las emisiones de dióxido de carbono producidas por el uso de combustibles fósiles.

Al mismo tiempo, el  $\text{CO}_2$  es también una rica y económica fuente de carbono que podría ser utilizada en la síntesis de compuestos de mayor valor agregado o biocombustibles. Actualmente el  $\text{CO}_2$  es utilizado industrialmente para la generación de ácido salicílico, úrea, metanol, carbonatos cíclicos, policarbonatos y polieter-carbonatos.<sup>2</sup> Sin embargo, la industria química carece de métodos y catalizadores eficientes y de bajo costo para funcionalizar el  $\text{CO}_2$  atmosférico. Debido a su alto estado de oxidación y su estabilidad termodinámica, los procesos catalíticos heterogéneos, de gran interés a nivel industrial, deben ser llevados a cabo en elevadas temperaturas y bajo alta

presión de CO<sub>2</sub>.<sup>2-4</sup> Como consecuencia solo 0.1Gt de CO<sub>2</sub><sup>5</sup> son convertidas en productos de mayor valor agregado anualmente por la industria química. Este hecho demuestra la necesidad de generar y aplicar nuevos mecanismos catalíticos en la fijación de dióxido de carbono a través de procesos químicos y biotecnológicos. En efecto, el estudio de las enzimas capaces de fijar CO<sub>2</sub> ha ido en creciente aumento durante los últimos años con el fin de poder diseñar rutas sintéticas eficientes para la fijación de CO<sub>2</sub> capaces de generar compuestos de mayor valor agregado.<sup>6,7</sup>

La naturaleza convierte alrededor 100 Gt por año de CO<sub>2</sub> en materia orgánica.<sup>8</sup> Enzimas específicas llamadas carboxilasas fijan más del 95 % de esta cantidad a través de diversos mecanismos.<sup>8</sup> El ejemplo más significativo de las carboxilasas es la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa denominada RuBisCO, la cual representa cuantitativamente a la enzima más abundante en la tierra y es clave dentro del ciclo de Calvin-Benson-Basshan para la fijación autotrófica de carbono.<sup>9</sup>

Más del 90 % del carbono inorgánico que es convertido en biomasa es fijado por la enzima RuBisCO.<sup>9</sup> Esta enzima cataliza la carboxilación y separación de la ribulosa-1,5-bifosfato en 2 moléculas de 3-fosfo-glicerato.<sup>9</sup> Esta enzima comprende entre un 30-50 % de la proteína soluble en plantas, haciendo a la RuBisCO una de las enzimas más abundantes en el ciclo del carbono. Debido a su relevancia, su mecanismo de fijación de CO<sub>2</sub> ha sido estudiado extensamente, tanto experimental como teóricamente, en las déca-

das pasadas por Tcherkez *et al.*<sup>10</sup> y Gready *et al.*<sup>11,12</sup> respectivamente. De manera complementaria, simulaciones de dinámica molecular han provisto de información relevante en la distribución de las moléculas de dióxido de carbono y su principal competidor, las moléculas de oxígeno, alrededor del complejo de RuBisCO.<sup>13</sup>

Sin embargo, la aplicación de estas enzimas fijadoras de CO<sub>2</sub>, con un fin práctico, continúa estando limitada por sus características. Esto se debe a que muchas carboxilasas son altamente específicas a ciertos sustratos, son muy sensibles a la presencia de oxígeno y/o requieren de cofactores complejos para su reacción. Esta aparente complejidad bioquímica aún limita la aplicación biotecnológica de la fijación enzimática de CO<sub>2</sub>.

Esta tesis se centró en una clase distinta de carboxilasas, las enoil-CoA carboxilasas-reductasas. Una de sus principales representantes es la familia Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa (Ccr). El grupo del Prof. Dr. Tobias Erb descubrió esta clase de carboxilasas recientemente.<sup>14</sup> La Crotonil-CoA Carboxilasa-Redutasa es clave en la fijación de CO<sub>2</sub> para la ruta del etilmalonil-CoA del metabolismo de carbono central para múltiples  $\alpha$ -bacteria, tales como *rhodobacter sphaeroides* y *methylobacterium extorquens* y en algunos actinomicetos<sup>15</sup>, como la *kitasatospora setae* (KsCcr), organismo utilizado para obtener las estructuras cristalinas pertinentes a esta tesis<sup>16</sup>. La función de esta ruta es utilizar el acetyl-CoA, un intermediario del metabolismo central de carbono, como precursor de otros metabolitos para la

biosíntesis celular de carbono<sup>15</sup>. A diferencia del ciclo de glioxilato, otra estrategia común para la asimilación de acetil-CoA, el ciclo de etilmalonil-CoA contiene múltiples intermediarios únicos de ésteres-CoA tales como el (2*R*)- y (2*S*)-etilmalonil-CoA, (2*S*)-metilsuccinil-CoA, mesaconil-(*CI*)-CoA y el (2*R*,3*S*)-metilmalil-CoA. Las implicaciones biotecnológicas de la ruta del etilmalonil-CoA son tremendas, ya que se busca aprovechar el potencial del uso de estos nuevos intermediarios y catalizadores para producir compuestos orgánicos estereoespecíficos de alto valor agregado.<sup>6,15</sup> A diferencia de RuBisCO, Ccr es completamente insensible hacia el oxígeno molecular, requiere solo de NADPH como cofactor para su reacción (Figura 1.1A) y son, a la fecha, las carboxilasas más eficientes en la biología en equivalentes de ATP por molécula de CO<sub>2</sub> fijada.<sup>8</sup>

Existen estructuras reportadas para diferentes enoil-CoA carboxilasas-reductasas. Ellas tienen especificidad para diversos sustratos, desde cadenas alifáticas cortas (PDB ID 3HZZ, 3KRT) a cadenas largas (PDB ID 4A0S<sup>17</sup>) y sustratos aromáticos (PDB ID 4Y0K<sup>18</sup>). Además corresponden a diferentes funciones biológicas, incluyendo las de metabolismo primario (PDB ID 4GI2) y de metabolismo secundario (PDB ID 4A0S, 4Y0K). El metabolismo primario o metabolismo central del carbono, se refiere a la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) de la glucólisis, la ruta de la pentosa fosfato y el ciclo del ácido cítrico y está directamente relacionado con el normal crecimiento, desarrollo y reproducción de los organismos. Por otro lado, el me-

tabolismo secundario o metabolismo especializado, engloba distintas rutas metabólicas para la síntesis de moléculas pequeñas asociadas a la interacción con el medio y no están relacionadas a la supervivencia del organismo. Ejemplos de ellas corresponden a antibióticos, pigmentos y esencias.<sup>19,20</sup>

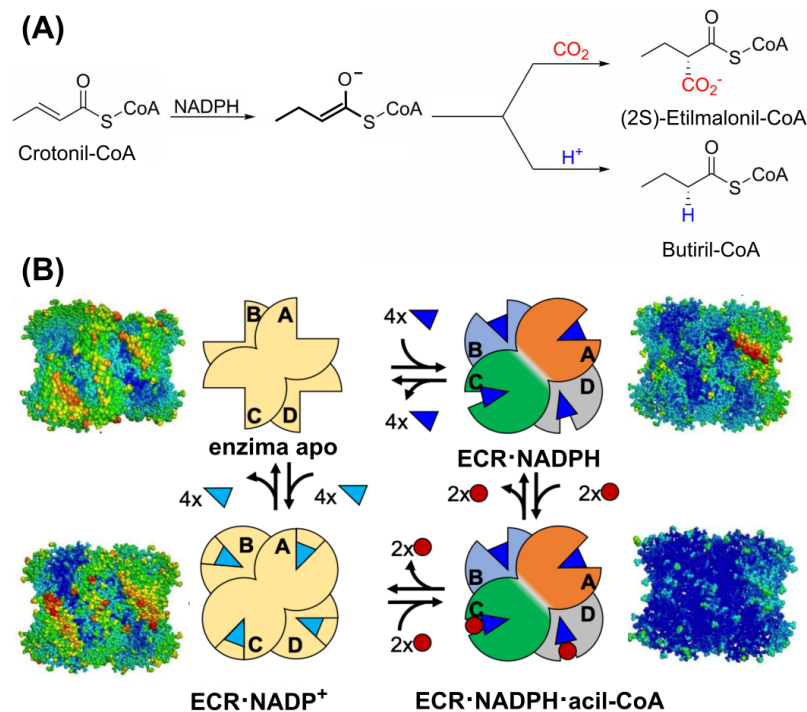


Figura 1.1: (A) Reacción catalizada por Ccr. (B) Ciclo catalítico propuesto para Ccr desde estructuras cristalinas del sistema. Los triángulos azules representan las moléculas de NADPH, triángulos celestes representan el NADP<sup>+</sup> y los círculos rojos representan las moléculas de enoil-CoA. La enzima APO y con NADP<sup>+</sup> unido en sus cuatro subunidades poseen estructuras tetraédricas representadas por el mismo color de las subunidades, mientras que los estados con NADPH y NADPH junto acil-CoA unidos se diferencian en un dímero de dímeros con sus subunidades coloreadas. La estructura cristalina de los distintos complejos tetraméricos resueltos<sup>16</sup> está coloreada según sus factores B (azul para valores bajos 12 [Å<sup>2</sup>] y rojo para valores altos 122 [Å<sup>2</sup>]).



Las características sobresalientes de Ccr hacen a esta enzima única comparada a su homólogo más abundante RuBisCO, la cual es muy ineficiente y sensible a la presencia de moléculas de oxígeno. La frecuencia de conversión (*Turnover frequency*) de la RuBisCO es de 1 a  $10 \text{ s}^{-1}$ , convirtiéndolo en el factor limitante para la fijación fotosintética de dióxido de carbono. Además, su reacción lateral con el oxígeno, demandante de energía, reduce su eficiencia considerablemente. Debido a estas características recientemente nuestro colaborador Prof. Erb, en el instituto Max Planck de Marburgo, introdujo nuevas rutas de fijación de  $\text{CO}_2$  basados en Ccr.<sup>6</sup> Las enzimas carboxilasas-reductasas, que han sido estudiadas en colaboración entre nuestro grupo de investigación y el grupo del Prof. Erb,<sup>21,22</sup> son 10-100 veces más rápidas que las enzimas fijadoras de  $\text{CO}_2$  presentes en plantas y requieren menos equivalentes de ATP.

Sin embargo, previamente a esta tesis, no existía información reportada respecto a la difusión y unión de  $\text{CO}_2$  en Ccr. Esta corresponde al paso previo a la reacción química de unión de  $\text{CO}_2$  al sustrato crotonil-CoA en la enzima. El transporte de ligandos desde y hacia el sitio activo de proteínas es un proceso muy común en la biología, la bioquímica y la biofísica.<sup>23</sup> Además juega un rol preponderante en los pasos iniciales y finales de la catálisis enzimática, la cual consta de la unión de los sustratos previo a la reacción química y la posterior liberación de los productos desde el sitio activo. Estudios de esta naturaleza han ido en creciente aumento dentro de la industria farma-

céutica debido a la relevante información entregada para el diseño de nuevos fármacos.<sup>24</sup>

Para llevar a cabo la fijación de CO<sub>2</sub>, este debe estar presente en el sitio activo de la enzima. La determinación de los pasos limitantes de la difusión del CO<sub>2</sub> desde el solvente hacia su sitio activo, corresponde a información clave para la mutación guiada con miras al mejoramiento de sus características fijadoras de este gas. En un esfuerzo conjunto entre el Instituto Max Planck Marburgo, el grupo de investigación del Profesor Dr. Soichi Wakatsuki en el SLAC Stanford y el grupo QCMM en nuestra Universidad, estructuras cristalinas de la enzima en presencia de distintos estados del cofactor y homólogos de sustrato han sido resueltas<sup>16</sup> (ver Figura 1.1B). A través de ellas se propuso un ciclo catalítico donde se plantea que la enzima en ausencia de cofactor y sustratos se presenta como un homotetrámero con subunidades abiertas. En una primera etapa se unirían cuatro moléculas de NADPH modificando su estructura a un dímero de dímeros. En un siguiente paso, ocurre la unión de moléculas de sustrato en dos subunidades a la vez, dando paso a la reacción. Finalmente, la presencia de cofactor oxidado NADP<sup>+</sup> promovería la formación del complejo simétrico abierto para la liberación del producto carboxilado.

La especie mínima necesaria para realizar la catálisis es el dímero de la proteína (ver Figura 1.2). Esta enzima se organiza como un tetrámero el cual, en presencia de sustrato y sus homólogos, se configura como un dímero

de dímeros (PDB ID 6NA4, 6OWE). Este tetrámero adopta diversas conformaciones dependiendo de la unión del sustrato crotonil-CoA y el cofactor NADPH. Ccr en ausencia de cofactores, se presenta como un tetrámero completamente simétrico. Cuando se añade NADPH y el producto de reacción butiril-CoA, el tetrámero modifica su simetría hacia un dímero de dímeros, donde cada subunidad se compone por una cadena abierta y una cerrada (ver Figura 1.1B). Desde estas estructuras se ha propuesto que el mecanismo para la catálisis de esta enzima se lleva a cabo gracias a estos cambios conformacionales, lo que sugiere la presencia de cooperatividad dentro de sus subunidades. Sin embargo, esta propuesta se base solo en las estructuras cristalinas y no se tomó en cuenta la unión de CO<sub>2</sub> ni los cambios conformacionales de la enzima en disolución acuosa.

Nuestro grupo de investigación estudió la reacción química utilizando estructuras cristalinas del sistema con cofactor y producto carboxilado (PDB ID 6OWE). A través de estudios cinéticos y simulaciones computacionales se determinó la existencia de cuatro residuos clave para la reacción química, Asn81, Phe170, Glu171 y His365<sup>22</sup>. La mutación de ellos modifica la actividad enzimática de manera significativa como se muestra en la Tabla 1.1.

Reemplazar la asparagina 81 por leucina (N81L) disminuye la actividad catalítica casi en su totalidad. Simulaciones computacionales demostraron que este residuo esta asociado a la orientación de la molécula de dióxido de carbono dentro del sitio activo cerrado<sup>22</sup>. Los residuos de ácido glutámico

171 e histidina 365 coordinan una molécula de agua en la entrada del sitio activo además de estabilizar la posición del sustrato y cofactor. La actividad catalítica de las variantes, E171A y H365N respectivamente, se ve disminuída en dos órdenes de magnitud. Sin embargo, la formación de producto carboxilado es mayor al 90% para ambas variantes. La fenilalanina 170 funciona como un escudo que protege la entrada de moléculas de agua al sitio activo lo que se confirma por su variante de alanina (F170A) que forma mayoritariamente el producto de reducción.

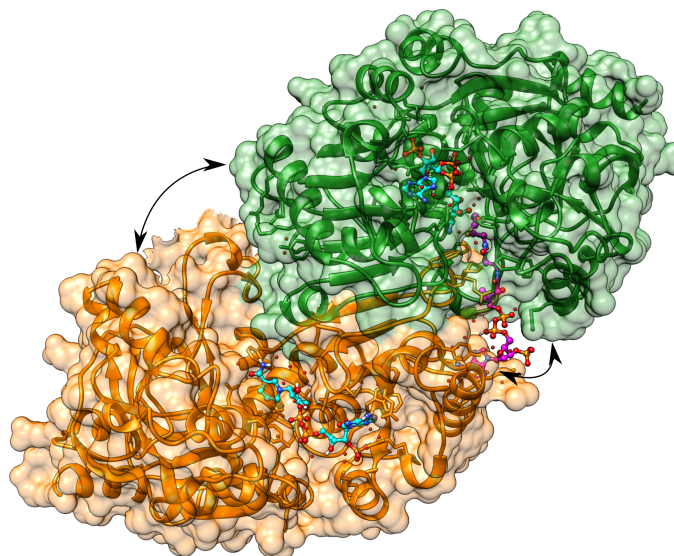


Figura 1.2: Dímero activo de la Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa (Ccr), en verde la unidad cerrada, en anaranjado la unidad abierta, en magenta el producto reducido y en cian las moléculas de NADPH.

Para realizar el estudio de la reacción química la molécula de  $\text{CO}_2$  se posiciono en el sitio activo cerrado con sustrato sin tener conocimiento de su afinidad por el sitio activo o su sitio de unión. La forma en la que el dióxido

de carbono se distribuye y una alrededor de la enzima no ha sido accesible experimentalmente debido a la baja concentración de CO<sub>2</sub> presente en ella. En otros sistemas, siendo el de la hemoglobina el más destacable, la distribución de pequeños átomos o moléculas como xenón u oxígeno han sido accesibles experimentalmente a través de difracción de rayos X para altas presiones del gas o a través de RMN en el caso del oxígeno.<sup>25,26</sup> En el caso de la hemoglobina se pudo establecer que la unión y distribución es dependiente a la estructura terciaria y cuaternaria que adopta la proteína incluyendo efectos de alostería.<sup>27</sup> Cabe destacar que los sitios de unión experimentales concor-daron perfectamente con las simulaciones de dinámica molecular, que fueron capaces de identificar sitios de unión junto a canales que conectan el exterior de la proteína con su sitio catalítico.<sup>28</sup> Estudios similares han sido llevados a cabo parcialmente en carboxilasas, principalmente RuBisCO la cual es menos eficiente que la Ccr.<sup>13</sup>

Tabla 1.1: Constantes cinéticas de crotonil-CoA en Ccr y sus variantes expresadas como promedio  $\pm$  error estándar.<sup>22</sup> \* Porcentaje de etilmalonil-CoA (EMC) sobre productos totales. # No detectado (ND).

| Variante | $K_M$ [ $\mu$ M] | $k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ] | %EMC |
|----------|------------------|------------------------|------|
| WT       | $21 \pm 2$       | $103 \pm 3$            | 100  |
| N81L     | ND#              | ND                     | 19   |
| F170A    | $31 \pm 6$       | $8.3 \pm 0.4$          | 17   |
| E171A    | $500 \pm 62$     | $5.1 \pm 0.2$          | 97   |
| H365N    | $29.8 \pm 4.2$   | $5.0 \pm 0.2$          | 93   |

El conocimiento de la distribución y la unión de dióxido de carbono en el interior del sitio activo de la proteína para distintas conformaciones del ciclo catalítico aportará nuevos conocimientos para entender la gran eficiencia de esta enzima y mejorar su actividad catalítica mediante el diseño racional y la propuesta de mutaciones sitio-dirigidas.

## 1.1. Marco Teórico

La unión de moléculas pequeñas en proteínas ha sido de particular interés para el entendimiento de la función de diversos de estos sistemas. Las primeras estructuras de sistemas proteicos fueron resueltas utilizando cristalografía de rayos X de alta resolución y corresponden a la mioglobina de cachalote y la hemoglobina de caballo.<sup>29,30</sup>

Desde la caracterización de estas estructuras, se han desarrollado un sin fin de estudios<sup>28,31,32</sup> para comprender la interacción de estas macromoléculas con diversos sustratos tales como O<sub>2</sub>, NO, CO entre otros. Comúnmente estas moléculas se unen en cavidades hidrofóbicas de las proteínas. Dado el carácter apolar de estas cavidades, técnicas centradas en su interacción con átomos de gas noble, se han expandido fuertemente para su caracterización.<sup>26,28,32-36</sup>

Debido a la importancia en el transporte y la unión de oxígeno, se ha buscado entender a cabalidad como la hemoglobina y la mioglobina llevan a cabo su función biológica. Desde la formación del complejo entre el grupo hemo con moléculas pequeñas, principalmente oxígeno, hasta el por qué otros sustratos poseen afinidades similares a estas proteínas. Se ha demostrado incluso que el xenón es un ligando válido para la unión sobre estos sistemas.

Diversos estudios han demostrado la existencia de cooperatividad en es-

tas proteínas.<sup>37</sup> La cooperatividad es un fenómeno que ocurre en proteínas con múltiples subunidades o sitios de unión activos y que relaciona la modificación de la constante de unión proteína-ligando debido a la unión previa de una o más moléculas de ligando con la proteína. Generalmente, esta propiedad está relacionada al acoplamiento entre subunidades específicas y su comportamiento fue caracterizado matemáticamente por Hill en el 1910 a través del coeficiente de Hill.<sup>37</sup> Este concepto ha ido evolucionando con el paso del tiempo desde un desarrollo netamente fenomenológico hacia el entendimiento de la fisicoquímica que se encuentra detrás de este comportamiento. Su principal sistema de estudio fue la hemoglobina. Incluso a día de hoy, esta proteína se continúa utilizando como sistema modelo debido a la gran cantidad de información experimental y estudios realizados previamente.<sup>27</sup>

Los primeros estudios sobre la forma oxidada de la mioglobina<sup>32</sup> con estructuras obtenidas en presencia de altas presiones de xenón, mostraron que algunos átomos de xenón se unen prácticamente sin alterar la conformación de la proteína en solución, lo que sustenta la idea de que estas cavidades existen de forma nativa en la proteína. Simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas utilizando la misma estructura cristalina,<sup>28</sup> siendo uno de los primeros antecedentes en el estudio de los sitios de unión sobre proteínas a través de la dinámica molecular. Este estudio fue concordante con los sitios presentes en la estructura cristalina y postuló un quinto sitio de unión que podría aparecer en solución.<sup>28</sup>



Estudios posteriores realizados sobre una variada cantidad de proteínas utilizando presiones parciales de distintos gases,<sup>34,35</sup> demostraron la capacidad de la técnica de difracción de rayos X en presencia de xenón para la caracterización de interacciones de diversa naturalezas. Por ejemplo, la penetración de átomos de xenón en cavidades hidrofóbicas o la unión de moléculas como el oxígeno sobre bolsillos hidrofóbicos y canales de transportes.<sup>34,35</sup> Se concluyó que el xenón es una de las mejores alternativas para el estudio de cavidades y sitios de unión debido a su mayor polarizabilidad respecto al resto de gases nobles.<sup>35</sup> Estos estudios obtuvieron información relevante en el diseño de enzimas, mostrando que al realizar mutaciones puntuales reemplazando residuos hidrofóbicos voluminosos con alanina, se genera un sitio de unión bien definido para moléculas apolares.

Con el avance de los métodos experimentales, los estudios de difracción de rayos X se empezaron a complementar con información de los sistemas en solución a través de diversas técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN).<sup>36</sup> En general ambas técnicas entregan los mismos resultados siendo complementarias en ciertos casos donde la difracción de rayos X no es capaz de resolver la posición del átomo de xenón o, de forma inversa, en situaciones cuando los experimentos de RMN presentan una baja proporción de señal-ruido. Uno de los resultados más importantes extraídos desde los experimentos en solución, indica que la unión de átomos de xenón no está necesariamente correlacionada con cambios conformacionales, demostrando

así la existencia de sitios de unión que se encuentran presentes de manera nativa en la proteína.

Estudios recientes han demostrado la importancia que tienen los sitios hidrofóbicos dentro de proteínas, dando la primera evidencia experimental a través de RMN, que el oxígeno molecular se une en estas cavidades y no en cavidades hidrofílicas.<sup>25</sup> Es de gran importancia destacar que estos resultados experimentales se correlacionan directamente con los resultados obtenidos desde simulaciones de dinámica molecular. Las simulaciones entregaron evidencia a nivel atómico-molecular de la difusión de moléculas pequeñas dentro de los sitios de unión de la proteína de estudio.

Un método espectroscópico utilizado para el estudio de la interacción de moléculas pequeñas reactivas con sistemas proteicos ha sido diseñado recientemente por Stripp y colaboradores.<sup>38</sup> Este diseño experimental se basa en espectroscopía infraroja (FTIR) de diferencia utilizando una fina capa de proteína formada en la superficie del cristal de silicio de una celda óptica de reflectancia total atenuada (ATR). En esta celda se hace pasar un flujo de gas que cambia desde no reactivo hacia una mezcla con el gas reactivo. Debido a la gran intensidad de las señales asociadas a la cadena peptídica de la proteína, se realiza un espectro de diferencia entre el sistema en ausencia de la mezcla reactiva de gases y su posterior espectro en reacción. Este procedimiento ha sido utilizado para estudiar principalmente metaloenzimas procesadoras de moléculas pequeñas. En los espectros de diferencia se realzan bandas aso-

ciadas a los grupos químicos de las especies que participan de la reacción, aumentando o disminuyendo los picos asociados a estos sistemas. Gracias a este efecto, se puede seguir cualitativamente la reacción y cuantificar de manera aparente la cinética de la misma con el fin de caracterizar la conversión de los diferentes grupos participantes.

Se ha puesto particular énfasis a la unión de estas moléculas sobre estructuras rígidas de los sistemas proteicos. Sin embargo, los sitios de unión que posee una proteína no son la única variable que se debe considerar a la hora de estudiar la difusión de moléculas pequeñas sobre estos sistemas. Tanto canales de transporte formados en la estructura cristalina como caminos que se generan dinámicamente a través de cambios conformacionales de la proteína en solución, son parte importante para el estudio del paso previo a una reacción enzimática.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la hemoglobina es un sistema modelo que ha sido estudiado de manera sistemática, tanto teórica como experimentalmente. Este sistema es un transportador eficiente de oxígeno que posee regulación alostérica, en el cual la dependencia conformacional de  $O_2$  gaseoso ha sido estudiada extensamente. En los últimos 50 años, la adición alostérica de  $O_2$  al grupo hemo de las dos unidades idénticas de dímeros  $\alpha\beta$  ha sido entendida a través de dos modelos: una constante de unión dependiente de la conformación para los estados T y R o por cambios conformacionales secuenciales de las subunidades.<sup>39</sup> En un comienzo, múltiples estructuras

cristalinas de hemoglobina para las formas libre (*deoxy*) y completamente unida fueron asignadas al estado T o el estado R.

Sin embargo, recientemente se han resuelto estructuras con conformaciones intermedias que evidencian transiciones conformacionales en respuesta a cambios ambientales.<sup>39</sup> Estos estados intermedios presentan un rango de afinidades, que no son compatibles con el modelo simple de dos estados propuesto inicialmente. En estas conformaciones, el sitio activo está parcialmente cerrado y estaría asociada al transporte eficiente y controlado de moléculas pequeñas gatillado por factores ambientales. En consecuencia, la hemoglobina es un sistema modelo que demuestra la dependencia conformacional en la afinidad para moléculas pequeñas a proteínas. Su afinidad variable está directamente relacionada con su función de transportador de oxígeno y demuestra la importancia del estudio de la unión de moléculas pequeñas y las distintas conformaciones que puede alcanzar una proteína en solución.

Es posible complementar la información experimental a través de una mirada atómico-molecular provista por el modelado de los sistemas utilizando simulaciones computacionales. Diversas estrategias se han desarrollado para modelar la difusión de moléculas pequeñas hacia el sitio activo en enzimas, como la difusión de moléculas orgánicas hacia los sitios de unión proteína-ligando<sup>40-42</sup> a través de Modelos de Estado de Markov (MSM del inglés *Markov State Models*). Los modelos de estado de Markov representan un formalismo de ecuaciones maestras, es decir, usando solamente el MSM es

posible describir el comportamiento dinámico del sistema completamente.<sup>43</sup> Las ecuaciones maestras se utilizan para modelar la evolución temporal de un sistema que puede ser descrito probabilísticamente como una combinación de estados para cualquier tiempo dado. Las transiciones entre estos estados deben ser markovianas o "sin memoria". Es decir, que solo dependan del estado actual del sistema y no de sus estados anteriores, quedando determinadas solamente por la matriz de velocidad de transición. Las ecuaciones utilizadas para construir el modelo son ecuaciones diferenciales del tiempo sobre la probabilidad de población de los diversos estados.

Utilizando este formalismo, se planteó un procedimiento para estudiar y modelar la difusión de moléculas pequeñas en sistemas proteicos.<sup>40</sup> A través de simulaciones de dinámica molecular y el modelado con MSM, se lograron identificar múltiples caminos para el transporte de moléculas de pocos átomos. Por un lado, se definieron estructuras asociadas a los diversos sitios de unión para las moléculas y por otro, se encontraron caminos que podrían transportar las moléculas desde la solución hacia el sitio activo. El uso de MSM en este sistema a través de la definición de los sitios de unión sobre la proteína, permitió proponer sitios de unión que no fueron detectados en la estructura cristalina. Además fue posible encontrar canales transportadores que son formados dinámicamente por el sistema en solución.

Este trabajo fue uno de los primeros en formular un procedimiento generalizado para el estudio de la difusión de moléculas pequeñas en proteínas

a través de MSM. Se demostró que al modelar la difusión de esta forma, se puede relacionar la disminución de la velocidad de la reacción con la modificación estructural de ciertos mutantes reportados.<sup>40,44,45</sup> Este trabajo dio paso a otros estudios relacionado al modelado de la difusión de moléculas pequeñas en proteínas a través de MSM<sup>41</sup>, los que buscaron predecir el efecto de mutaciones a través de información obtenida solo desde simulaciones computacionales. Sin embargo, no fueron capaces de predecir la modificación en la difusión, debido a las mutaciones, completamente. Además, los sistemas de estudio no presentan cambios conformacionales que implican el movimiento relativo entre subunidades asociadas a la catálisis del sistema. Enzimas con intermediarios altamente reactivos, promueven la orientación de los sustratos dentro del sitio activo junto a la restricción de acceso al solvente para llevar a cabo la reacción.<sup>46,47</sup> En este tipo de sistemas la difusión de la molécula pequeña podría estar limitada por el cambio conformacional.

El desarrollo de estas herramientas da cuenta de la complejidad del estudio de los sitios de unión y la difusión de moléculas pequeñas en proteínas. Para realizar este tipo de estudios se necesita una gran cantidad de información, lo que representa un desafío incluso para el equipamiento de cómputo en la época actual. Además, el mayor desafío a la hora de modelar el sistema como un MSM es la forma de seleccionar y contabilizar los estados del sistema que definen a cada uno de los diversos sitios de unión. Sobre estas dos cuestiones se desarrolló este trabajo de investigación utilizando como sistema

de estudio la Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa (Ccr), la cual corresponde a una de las enzimas más eficientes en la captación de CO<sub>2</sub> conocida en la actualidad.<sup>9,21</sup>

Recientemente estudios en colaboración entre nuestro grupo de investigación, y los grupos de los profesores Erb en Alemania y Wakatsuki en Estados Unidos, han propuesto que esta enzima modifica su conformación en cada etapa del ciclo de fijación de CO<sub>2</sub>, siendo la presencia de las moléculas de cofactor reducido (NADPH) en conjunto a las de sustrato o productos de la reacción ((2S)-etilmalonil-CoA, butiril-CoA) sobre los sitios activos de Ccr, quienes inducen la modificación en la simetría de los complejos observados en las estructuras cristalinas.<sup>16</sup> Esta enzima posee 4 sitios activos y utiliza como cofactor para la reacción de carboxilación, o de reducción, moléculas de NADPH (Figura 1.1a), obteniendo el producto reducido o carboxilado y NADP<sup>+</sup>. En las estructuras cristalinas de este sistema, solo en dos de sus cuatro sitios activos se pudo resolver la posición de un análogo de sustrato, lo que sugiere una reactividad parcial de sitios (*half site reactivity*).<sup>48-50</sup> Se propuso como mecanismo que solo la mitad de los sitios activos son utilizados en un paso catalítico y el movimiento de los sitios vacíos esta acoplado con la liberación de los productos formados en este paso.<sup>16</sup>

Las estructuras cristalinas asociadas a la proteína Ccr de *Kitasatospora setae* en diversas etapas del ciclo de fijación de CO<sub>2</sub>, presentan diferentes conformaciones. Estas conformaciones se diferencian debido a la unión del

cofactor oxidado o reducido y la presencia del producto de reducción.<sup>16</sup> La enzima APO sin sustratos ni cofactores presenta una unidad asimétrica que contiene un homotetrámero compuesto por cuatro subunidades arregladas en una geometría de par de dímeros, similar a las estructuras previamente reportadas.<sup>17,18,22</sup> En general, el tetrámero de Ccr de *K. setae* muestra un arreglo con cuatro subunidades conformacionalmente idénticas. Cada subunidad de Ccr consiste en dos dominios, el dominio catalítico más grande formado por los residuos 1-212 y 364-445 y el dominio de oligomerización más pequeño formado por los residuos 212-363 (Figura 1.3B). El dominio catalítico de la Ccr está localizado en la periferia del complejo tetraédrico. Las cavidades del sitio activo en la forma APO están abiertas y accesibles para ambas moléculas de cofactor y de sustrato. Nuestros colaboradores también determinaron la estructura de un complejo con NADP<sup>+</sup> unido a Ccr, descubriendo que es bastante similar a la estructura de la forma APO, con la diferencia de que las moléculas de NADP<sup>+</sup> están unidas a las 4 subunidades del complejo. Las subunidades con NADP<sup>+</sup> unido son menos rígidas en comparación a la APO de acuerdo a los factores B obtenidos para las estructuras cristalinas.<sup>16</sup>

Para entender el efecto de la unión de NADPH, el cofactor que es utilizado en la reacción, se determinó la estructura cristalina del complejo binario Ccr-NADPH para *K. setae* (Figura 1.3B). En las cuatro subunidades NADPH se une a través de su fracción de adenina en el dominio de oligomerización y se extiende hacia el dominio catalítico donde su fracción de nicotinamida está



localizada. La unión del cofactor de NADPH rompe la simetría tetraédrica e induce la formación de un dímero de dímeros. En el complejo binario, cada uno de los dos dímeros, A/C y B/D, pierden su simetría dando paso a subunidades cerradas (A y B) y subunidades abiertas (C y D). En las subunidades A y B, el bolsillo de unión del cofactor es comprimido hacia dentro, lo que sella el cofactor de NADPH dentro del dominio catalítico, resultando en una forma cerrada de la subunidad. Por otro lado, las subunidades C y D muestran un bolsillo de unión abierto para el cofactor, referido de aquí en adelante como la forma abierta de la subunidad. El bolsillo de unión del sustrato en las formas abiertas de las subunidades C y D es más de 5 Å más amplio que en las forma cerrada de las subunidades A y B, distancia referencial entre los C $\alpha$  de F96 y K296. Cuando se analizan ambas estructuras en conjunto, se observa que durante la catálisis la enzima se diferencia a un par de dímeros (dímeros A/C y B/D respectivamente) con una subunidad cerrada (A o B) y una abierta (C o D) por dímero (ver Figura 1.2).

En pasos posteriores, nuestros colaboradores investigaron los efectos de la unión de sustrato en Ccr de *K. setae* determinando la estructura de su complejo ternario con el producto de reducción butiril-CoA, análogo al sustrato, y NADPH (Figura 1.3A). La estructura es en general muy similar a la conformación del complejo binario. Comprende dos pares conformados por una subunidad abierta y otra cerrada, que se superponen de muy buena manera con las subunidades del complejo binario. El cofactor de NADPH está unido

a todos los sitios activos. Sin embargo, solo en la forma cerrada de las subunidades A y B se observa densidad electrónica para el tioéster de butiril-CoA, mientras que las subunidades de forma abierta (C y D) solo muestran densidad electrónica para el grupo adenina de los tioésteres de butiril-CoA. La presencia intacta del tioéster de butiril-CoA en el sitio activo de la subunidad de forma cerrada, sugiere firmemente que las conformaciones A y B representan el complejo de Michaelis-Menten. En la subunidad cerrada el sustrato y cofactor están posicionados eficientemente para llevar a cabo la reacción catalizada por la enzima. En contraste, la forma abierta de las subunidades C y D representan complejos ternarios incompetentes para la catálisis.

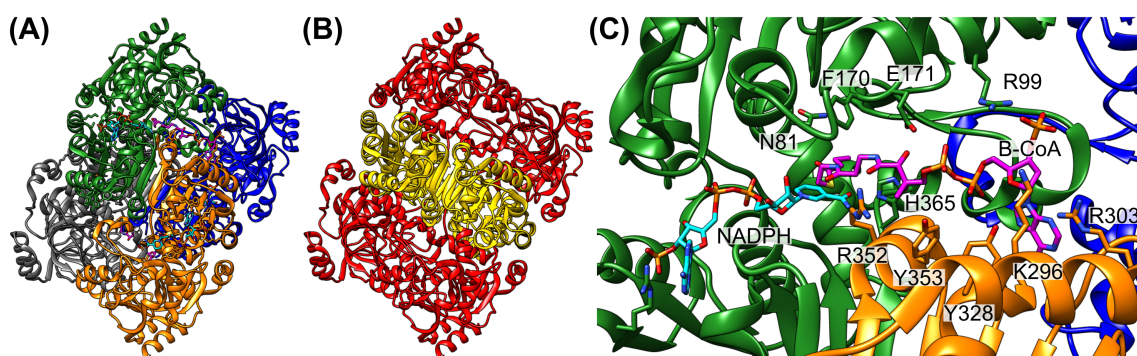


Figura 1.3: (A) Estructura cristalina para el complejo ternario de Ccr coloreado por subunidades (PDB ID 6NA4). (B) Estructura cristalina para el complejo binario de Ccr (PDB ID 6NA6), se muestran coloreados los dominios catalíticos en rojo y de oligomerización en amarillo. (C) Acercamiento al sitio activo cerrado para el sistema ternario, se muestran residuos importantes discutidos previamente en el texto.

La unión del cofactor y el sustrato en las subunidades de forma cerrada de Ccr se obtiene por múltiples interacciones del dominio catalítico de la pro-

teína con NADPH y butiril-CoA. Notablemente, el tioéster-CoA se extiende desde la forma cerrada del sitio activo hasta el dominio de oligomerización de la subunidad abierta vecina del mismo dímero (desde A hasta C en el dímero A/C, o desde B hasta D en el dímero B/D), donde R352 y Y353 de la subunidad abierta (C o D) interactúan con el esqueleto de fosfato del CoA (Figura 1.3C). La cola de adenosina del CoA extendida desde la subunidad cerrada, interactúa con tres residuos, Y328, K296 y R303 que forman un bolsillo de unión para adenina en la subunidad abierta vecina (Figura 1.3C). Cuando se inspeccionó la unión tioéster-CoA en la subunidad abierta, también se observó densidad electrónica en el bolsillo de unión de adenina de las subunidades cerradas (A o B), lo que indicaría que el tioéster-CoA se encuentra unido. Sin embargo, la densidad electrónica más allá del anillo de adenina se vuelve invisible, sugiriendo que la parte del CoA de la molécula que alcanza el sitio activo de la subunidad abierta permanece flexible y desordenado, lo que sería corroborado por mayores factores-B del dominio catalítico.<sup>16</sup>

Para evaluar la flexibilidad del sustrato en las distintas formas abiertas y cerradas de las subunidades, se realizaron simulaciones de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM) en el dímero de subunidades A y C. Estas simulaciones toman en cuenta los grados de libertad electrónicos del sustrato. En la subunidad abierta, la fracción acilo muestra un alto grado de flexibilidad en el sitio activo, en concordancia con los mayores factores-B observados en las estructuras cristalinas.<sup>16</sup> Juntas, las estructuras cristalográficas y las si-

mutaciones QM/MM indican que después de la unión de sustrato el complejo enzimático se separa en una subunidad catalíticamente competente (A o B) y una incompetente (C o D) por dímero. Esto sugiere que el tetrámero de la enzima opera con una reactividad parcial de sitios, en la cual los sitios activos catalíticamente competentes e incompetentes alternan durante la catálisis.

Por otro lado, se ha demostrado que mutaciones sobre residuos alejados del sitio activo, correspondientes a la interfaz entre los distintos dímeros, ralentizan la cinética de carboxilación de esta enzima.<sup>16</sup> Esta observación sustenta la hipótesis de la reactividad parcial de sitios, dado que compromete la comunicación entre las distintas subunidades y por lo tanto, entorpece el movimiento acoplado entre ellas en la catálisis. Para justificar esta hipótesis, Demirci *et al.*<sup>16</sup> modelaron el sistema suponiendo que los dímeros trabajan de manera sincrónica con cambios conformacionales de apertura y cerrado en sentido opuesto. Para ello asumieron cooperatividad positiva o negativa dentro de un dímero utilizando el método descrito por Hill y Levitski<sup>16,51</sup>. Los modelos mostraron que cooperatividad negativa en el dímero es el único comportamiento capaz de explicar la marcada modificación en la cinética de la enzima al perturbar la interacción entre los dímeros (material suplementario<sup>16</sup>).

Estos antecedentes estructurales de Ccr muestran la complejidad del sistema y un gran desconocimiento de información a escala microscópica, capaz de dar explicación a la ralentización de la cinética de este proceso. Diver-

sas interrogantes como por ejemplo si esta disminución en la velocidad de la reacción estaba asociada a la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo o al movimiento acoplado de las subunidades entre etapas catalíticas aún no estaban resueltas. Además, el mecanismo propuesto para la fijación de dióxido de carbono fue propuesto solo a través de la información cristalográfica, por lo que no se toma en cuenta el comportamiento de esta enzima en solución acuosa. Tanto la rapidez de cambios conformacionales, como la unión de  $\text{CO}_2$  sobre las distintas conformaciones del sistema no son conocidas y presentan la principal motivación de este trabajo.

## **1.2. Hipótesis y Objetivos**

### **Hipótesis**

Simulaciones de dinámica molecular revelarán sitios de unión para el dióxido de carbono de la enzima Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa silvestre. El modelamiento de la cinética de unión con modelos de estado de Markov permitirá identificar los pasos más lentos y proponer mutaciones de aminoácidos que mejoren la disponibilidad de CO<sub>2</sub> en el sitio activo de esta enzima.

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de mutaciones de aminoácidos en la enzima Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa (Ccr) sobre la cinética de unión de moléculas de CO<sub>2</sub>.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar las conformaciones de la proteína en solución para las distintas etapas del ciclo catalítico.
2. Determinar la distribución de CO<sub>2</sub> para las conformaciones representativas del ciclo catalítico y asignar sitios de unión.
3. Comparar los sitios de unión para las distintas conformaciones de la

enzima en el ciclo catalítico y relacionar cambios estructurales con la difusión o disponibilidad del CO<sub>2</sub>.

4. Obtener la constante de disociación  $k_{\text{off}}$  para los sitios de unión en las distintas etapas del ciclo catalítico
5. Estudiar el efecto de mutaciones puntuales establecidas experimentalmente sobre  $C_{\text{cr}}$ , que dan origen a una menor disponibilidad de CO<sub>2</sub> en el sitio activo.

## 2. Metodología

En esta sección se muestran las principales metodologías empleadas en la investigación. Se desarrollarán aspectos generales de la mecánica molecular y su uso en simulaciones de dinámica molecular. Se realiza una breve descripción de la estimación de energía libre en simulaciones computacionales, junto al análisis de componentes principales para el estudio conformacional de proteínas. Finalmente se describirá la metodología desarrollada para definir los sitios de unión y estimar la energía libre de unión de cada sitio activo junto a los tiempos de residencia ( $\tau$ ) de cada sitio para la unión de CO<sub>2</sub> presentes en el sitio activo de Ccr. Los tiempos de residencia promedio ( $\tau$ ) están directamente relacionados con la  $k_{\text{off}}$  de los diferentes sitios de unión.

### 2.1. Mecánica molecular

La descripción microscópica de los sistemas moleculares se realiza a través de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo, la cual describe estados estacionarios para los sistemas cuánticos.

$$\hat{H}\psi_i = E_i\psi_i \quad (2.1)$$



A través de la aproximación de Born-Oppenheimer es posible desacoplar el movimiento de los electrones y los núcleos, suponiendo que los electrones reaccionan de manera instantánea al movimiento de los núcleos debido a su diferencia de masa. Esto nos permite describir la energía del sistema como una contribución electrónica junto a un término paramétrico que depende de la posición de los núcleos en el espacio.

La mecánica molecular se basa en las leyes de la mecánica clásica aplicada al estudio de sistemas moleculares. Ella se aprovecha de la aproximación de Born-Oppenheimer con el fin de describir los sistemas atómicos a través de potenciales físicos sencillos. Estos potenciales representan la interacción entre los distintos núcleos del sistema.

Las funciones que describen las interacciones moleculares se denominan campo de fuerza y engloban dos componentes. El primer componente ayuda a definir la estructura covalente de la molécula, asociado con la interacción entre átomos vecinos. Este componente describe las uniones covalentes y la geometría de la molécula. Para ello utiliza posiciones de equilibrio y constantes de fuerza para las distancias y ángulos de enlace, junto a torsiones propias e impropias de la molécula.

El segundo componente describe la contribución no covalente, generada por las interacciones entre las distribuciones electrónicas que rodean los diferentes núcleos. A cortas distancias, las interacciones son principalmente de repulsión debido a la superposición entre las distribuciones electrónicas de

cada átomo. A largas distancias, hay diferentes tipos de interacciones entre las cuales, se pueden destacar dos. En primer lugar, están las interacciones de dispersión, producidas por las fluctuaciones en las distribuciones de carga de los grupos. En segundo lugar, están las interacciones electrostáticas, que surgen de la interacción entre las distribuciones de carga sobre cada molécula o parte de ella. En los campos de fuerza, generalmente se describen las interacciones de dispersión y repulsión por el potencial de Lennard-Jones y las interacciones electrostáticas con un término coulombico. Los parámetros asociados a campos de fuerza utilizados en este trabajo son definidos específicamente en la sección de resultados.

## **2.2. Dinámica molecular**

La dinámica molecular es una técnica de simulación computacional de tipo determinista, es decir, ella describe el movimiento de todas las partículas que componen el sistema. Está basada en las leyes de la mecánica clásica, donde se integran las ecuaciones de movimiento, con el fin de generar configuraciones sucesivas y obtener una secuencia temporal de la evolución del sistema. Esta secuencia temporal es denominada trayectoria del sistema y se refiere a las posiciones y momentos de cada partícula en el tiempo. Existe un conjunto finito para la combinación de posiciones y momentos del sistema y está definido por las condiciones iniciales de la simulación. Este conjunto

6N dimensional, con N siendo el número de partículas, se denomina espacio de fase. En el transcurso de una simulación el sistema evoluciona explorando parte de este espacio de fase. Para un tiempo de simulación infinito, la hipótesis ergódica presume que la exploración de este espacio es completa. El cálculo de las trayectorias en una simulación de dinámica molecular, se realiza a través de la integración numérica de las ecuaciones de movimiento dadas por la segunda ley de Newton:

$$\vec{F}_i(\vec{r}_i, \dots, \vec{r}_n) = m_i \ddot{\vec{r}}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad (2.2)$$

donde  $\vec{F}_i$  es la fuerza que actúa sobre el átomo  $i$ ,  $m_i$  es la masa del átomo, que se considera constante, y  $\ddot{\vec{r}}_i$  es la aceleración.

Dada una conformación inicial, las velocidades iniciales se asignan aleatoriamente a cada átomo, satisfaciendo una distribución de Maxwell-Boltzmann para una temperatura definida inicialmente. Si se conocen las posiciones y las velocidades iniciales solo resta conocer la fuerza que actúa sobre cada átomo para calcular la posición en el siguiente instante de tiempo  $t_0 + dt$ . Para las simulaciones de dinámica molecular con átomos de hidrógeno, las ventanas temporales de evaluación se realizan generalmente en intervalos de 1 a 2 femtosegundos.

Realizando un tratamiento clásico para la energía cinética y potencial mediante el teorema de trabajo y energía, además de asumir un sistema con fuer-

zas conservativas, donde la suma de energía cinética  $T$  y potencial  $V$  es constante, la fuerza sobre cada partícula se puede obtener a partir del siguiente gradiente de potencial:

$$\vec{F}_i(\vec{r}_i, \dots, \vec{r}_n) = -\nabla_i V(\vec{r}_i, \dots, \vec{r}_n) \quad (2.3)$$

La energía potencial  $V$  en un sistema molecular es requerida para hacer simulaciones de dinámica molecular y se puede obtener mediante la mecánica molecular descrita anteriormente. También es posible realizar simulaciones de dinámica molecular utilizando métodos basados en la mecánica cuántica para obtener la energía potencial en función de la posición de los núcleos. Sin embargo, estos métodos no serán descritos en esta tesis.

La descripción anterior permite realizar simulaciones con número de partículas, volumen y energía constante, generando así una simulación del sistema dentro del colectivo microcanónico (NVE). Los procesos termodinámicos macroscópicos no ocurren en estas condiciones de manera natural. Generalmente la propiedad que se mantiene constante es la temperatura y no la energía. La descripción de estos procesos se realiza a través del colectivo canónico (NVT), donde la energía de sus microestados sigue una distribución de Boltzmann. Adicionalmente puede describirse un sistema en el colectivo isotérmico-isobárico (NPT) para representar procesos llevados a temperatura y presión constantes.

Para asegurar que las condiciones de temperatura y presión permanezcan constantes en las simulaciones, es necesario acoplar la dinámica de los sistemas a construcciones matemáticas capaces de mantener estas propiedades sin variación, los denominados termostatos y barostatos respectivamente. El objetivo principal de los termostatos es asegurar que la temperatura promedio del sistema corresponda a su valor de equilibrio. Para ello, el sistema de simulación es acoplado a un baño térmico, proceso que puede ser formulado a través de diversas maneras.

El termostato de Berendsen<sup>52</sup> es uno de los más sencillos. En él se corrige la desviación de la temperatura de equilibrio  $T_0$  según la expresión

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (2.4)$$

la cual muestra que la desviación en la temperatura decae exponencialmente con una constante cinética  $\tau$ . Para ello se reescalan las velocidades de las partículas con el fin de mantener el sistema a temperatura constante, ya que la temperatura queda completamente definida a través de la energía cinética del sistema. Sin embargo, este termostato elimina la variación de la energía cinética, por lo que estrictamente no mantiene la simulación en el colectivo canónico. Un termostato muy utilizado y que corrige este problema es el conocido como de reescalado de velocidades.<sup>53</sup> Este añade un término estocástico que asegura la descripción correcta de la distribución de energía

cinética según

$$dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_T} + 2 \sqrt{\frac{KK_0}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_T}} \quad (2.5)$$

donde  $K$  es la energía cinética,  $N_f$  es el número de grados de libertad y  $dW$  corresponde a un proceso Wiener, utilizado para la descripción de movimientos brownianos. Este termostato mantiene la simulación dentro del colectivo canónico junto al decaimiento de primer orden para la desviación de la temperatura sin oscilaciones.

Simil a un baño térmico, es posible acoplar el sistema a un baño de presión a través de un barostato. El barostato de Berendsen<sup>52</sup> sigue la misma lógica que su termostato, reescalando las coordenadas y los vectores de la caja de simulación cada cierto número de pasos según una presión de referencia

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_p} \quad (2.6)$$

con  $\tau_p$  una constante cinética de primer orden análoga a la del termostato. Este barostato permite mantener la presión de equilibrio, sin embargo, no describe correctamente el colectivo NPT, ni las fluctuaciones de presión y volumen. Se han desarrollado otros barostatos como Parrinello-Rahman<sup>54</sup> o Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein<sup>55</sup> los que describen correctamente el colectivo isotérmico-isobárico. Los parámetros asociados a las simulaciones de dinámica molecular junto a termostatos y barostatos utilizados son definidos específicamente en la sección de resultados.

## 2.3. Cálculos de energía libre

Los cálculos de energía libre son relevantes debido a que permiten estudiar diferentes propiedades, como afinidades de unión de ligandos a proteínas, energías libres de solvatación, estabilidad de mutaciones, constantes de asociación/disociación, entre otros. En esta sección, se revisan los principales métodos para calcular la energía libre de transferencia protónica basados en simulaciones capaces de explorar el espacio de fase del proceso. Este método estima la diferencia de energía libre para la transferencia de un protón desde un residuo ionizable en la proteína, hacia otro residuo ionizable en un péptido en solución. Esta diferencia permite obtener una estimación para la diferencia de  $pK_a$  entre dos residuos y así conocer el estado de protonación para residuos ionizables que se encuentren en ambientes químicos poco representativos de la solución acuosa.

### 2.3.1. Método de Zwanzig

El método de Zwanzig,<sup>56</sup> también conocido como perturbación de energía libre, es el más conocido para calcular la diferencia de energía libre en simulaciones computacionales. Empleando el método de Zwanzig, la diferencia de energía libre puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$\Delta G_{ij} = G_j - G_i = -\frac{1}{\beta} \ln \langle e^{-\beta(U_j(\vec{q}) - U_i(\vec{q}))} \rangle_i \quad (2.7)$$

El método se basa en el muestreo de las configuraciones del estado  $i$  y su subsiguiente evaluación de las configuraciones en el Hamiltoniano de  $j$ . En la ecuación 2.7,  $\beta = \frac{1}{k_B T}$  siendo  $k_B$  la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta.  $U_j(\vec{q})$  y  $U_i(\vec{q})$  son las energías internas a lo largo de un espacio de coordenadas  $\vec{q}$  y  $\langle \rangle_i$  es el promedio sobre el colectivo del estado  $i$ . Para la obtención de la energía libre de transferencia protónica, el estado  $i$  corresponde a un estado de protonación definido para cada residuo ionizable y el estado  $j$  corresponde al estado de protonación inverso.

La precisión del método depende de la superposición de los espacios de fase de los estados  $i$  y  $j$ . En el caso de que la superposición sea pequeña, las configuraciones generadas en el estado  $i$  se identifican como microestados de alta energía cuando se evalúan con el Hamiltoniano del estado  $j$  y contribuyen poco a la media exponencial. Por tanto, se sabe que el enfoque converge lentamente y solo es manejable para la estimación de  $\Delta G$  entre dos estados que muestran un gran superposición en el espacio de fase.<sup>57,58</sup> Para la energía de transferencia protónica, la superposición entre espacios de fase es baja debido a cambios de la carga neta sobre los residuos e interacciones con el ambiente químico local, las cuales se ven modificadas desde un residuo al otro.



Cuando los espacios de fase no muestran gran superposición, se realiza una transformación paulatina introduciendo un parámetro  $\lambda$  en el Hamiltoniano  $H_\lambda(\vec{q}) = (1 - \lambda)H_i(\vec{q}) + \lambda H_j(\vec{q})$ . Este parámetro  $\lambda$  representa pequeñas alteraciones que modulan la energía potencial del sistema, de modo que a medida que  $\lambda$  pasa de 0 a 1, la descripción de la energía potencial cambia desde la del estado inicial hacia la del estado final del sistema.

### 2.3.2. Integración termodinámica

Otra de las metodologías más empleadas para el cálculo de diferencias de energía libre, que desde sus orígenes utilizó vías *alquímicas*, es la integración termodinámica (TI).<sup>59</sup> Los cálculos de TI estiman la diferencia de energía libre entre los dos estados A y B acoplados a través de un parámetro  $\lambda$  que sirve como una coordenada adicional no espacial. Bajo esta metodología,  $\lambda$  permite calcular la diferencia de energía libre entre los estados mediante la expresión.

$$\Delta G_{ij} = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_\lambda d\lambda \quad (2.8)$$

con  $\lambda = 0$  en el estado  $i$ ,  $\lambda = 1$  en el estado  $j$  y  $\langle \rangle_\lambda$  indica un promedio sobre el colectivo basado en un valor del parámetro  $\lambda$ . La ventaja de esta metodología es que las perturbaciones pueden ser ajustadas por el parámetro  $\lambda$ , llevando a una mejor convergencia de los valores de energía libre.

### 2.3.3. Bennett Acceptance Ratio (BAR)

La diferencia de la energía potencial en ambas direcciones entre dos estados, puede ser usada para estimar la energía libre. Esto proporciona una mejora sustancial comparado con otros métodos. Esta diferencia de energía potencial para la misma configuración  $\vec{q}$  de los estados diferentes a lo largo del camino es  $\Delta U_{ij}(\vec{q})$ . Hay una relación directa entre las distribuciones de energía potencial  $\Delta U_{ji}(\vec{q})$  con las configuraciones del estado  $i$   $\Delta U_{ij}(\vec{q})$  con las configuraciones del estado  $j$ . Es decir, existe una relación directa entre la diferencia de energía de un estado con la configuración del otro y viceversa. Por tanto, utilizando la información de ambos estados  $i$  y  $j$ , se puede aplicar un procedimiento estadísticamente óptimo para obtener una mejor estimación de la energía libre. Este procedimiento fue propuesto por el físico Charles H. Bennet y en su honor se establece el nombre de este método como *Bennett Acceptance Ratio* (BAR).<sup>60</sup> Bennett proporcionó la siguiente relación para la diferencia de energía libre:

$$\Delta G_{ij} = -k_B T \ln \frac{Q_i}{Q_j} = k_B T \ln \frac{\left\langle \alpha(\vec{q}) e^{-\beta \Delta U_{ij}(\vec{q})} \right\rangle_j}{\left\langle \alpha(\vec{q}) e^{-\beta \Delta U_{ji}(\vec{q})} \right\rangle_i} \quad (2.9)$$

Con  $Q_i$  y  $Q_j$  siendo las funciones de partición canónicas de los estados  $i$  y  $j$ . Esta expresión es válida para cualquier función  $\alpha > 0$  para todas las configuraciones  $\vec{q}$ . Bennett usó el cálculo variacional para encontrar el cambio de

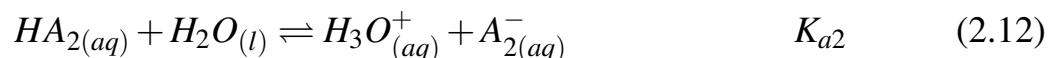
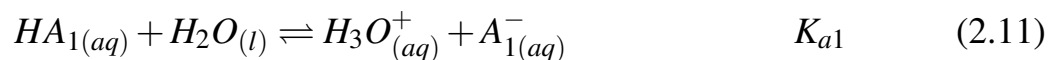
$\alpha(\vec{q})$  que minimiza la variación de la energía libre, obteniendo una función implícita de  $\Delta G$  que puede resolverse numéricamente:

$$\sum_{i=1}^{n_i} \frac{1}{1 + e^{(\ln(n_i/n_j) + \beta\Delta U_{ij} - \beta\Delta G)}} - \sum_{j=1}^{n_j} \frac{1}{1 + e^{(\ln(n_j/n_i) + \beta\Delta U_{ji} - \beta\Delta G)}} = 0 \quad (2.10)$$

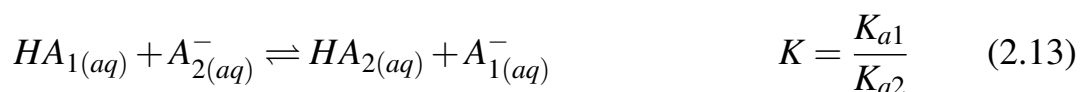
donde  $n_i$  y  $n_j$  son los números de configuraciones muestreadas para cada estado. Se ha demostrado que el método BAR es más eficiente que el método Zwanzig<sup>58,61</sup> y de integración termodinámica, debido a la inclusión de información para la transformación en sentido  $i \rightarrow j$  y  $j \rightarrow i$ .

#### 2.3.4. Estimación de $\Delta pK_a$ desde cálculos de energía libre

Como se mencionó anteriormente, la energía libre de transferencia protónica puede relacionarse con la diferencia en el  $pK_a$  de un residuo ionizable. Termodinámicamente, el cambio en la energía libre en reacciones ácido base está asociado con la variación en el  $pK_a$  para cualquier sistema protonable. A continuación se tratarán dos residuos con un grupo ácido para obtener una relación entre el  $pK_a$  y la energía libre de transferencia protónica. Sean  $HA_1$  y  $HA_2$  dos ácidos en solución:



Utilizando la ley de Hess y cambiando el sentido de (2.12) se obtiene:



Finalmente expresando la constante global y su relación con el cambio de energía libre se obtiene:

$$\Delta\Delta G_{rx}^o = -RT \ln \frac{K_{a1}}{K_{a2}} \Rightarrow \Delta\Delta G_{rx}^o = -2.303RT (\log K_{a1} - \log K_{a2}) \quad (2.14)$$

La variación en el cambio de energía libre asociado a la transferencia del protón queda expresada según:

$$\Delta\Delta G_{rx}^o = 2.303RT (pK_{a1} - pK_{a2}) \quad (2.15)$$

Finalmente, utilizando un residuo ionizable conocido como referencia, es posible determinar el  $pK_a$  de un residuo desconocido según:

$$\boxed{pK_{a1} = pK_{a2} + \frac{\Delta\Delta G_{rx}^o}{2.303RT}} \quad (2.16)$$

Para Ccr este procedimiento será utilizado sobre el residuo de histidina 365, el cual se encuentra en el sitio activo. La determinación de su estado de protonación es necesaria para realizar las simulaciones posteriores. El sistema de referencia corresponde a un péptido metilado de histidina que se encuentra completamente expuesto en la solución y su valor de  $pK_a$  es conocido.

## 2.4. Análisis de componentes principales (PCA)

El PCA (del inglés *principal component analysis*) es una técnica ampliamente utilizada para extraer información relevante de sistemas que presentan gran cantidad de variables donde su relación puede llegar a ser confusa.<sup>62</sup> La gran ventaja que tiene el PCA es su simple y no paramétrica capacidad para condensar estas variables en información útil. Este análisis es empleado continuamente en trabajos asociados a sistemas biológicos, especialmente en proteínas, donde es utilizado para encontrar cambios conformacionales sobre su estructura terciaria.

Dentro de las simulaciones de dinámica molecular se pueden encontrar movimientos de múltiples componentes que no están correlacionados con cambios conformacionales de la proteína. Movimientos oscilatorios de los átomos junto al desplazamiento de cadenas laterales de los aminoácidos que componen el sistema, no son indicativos de cambios conformacionales relacionados con la función de las proteínas. Para estudiar los cambios conformacionales de proteínas se utiliza la cadena peptídica, o una muestra representativa de ella, como variable de análisis.

La meta del PCA es encontrar una base de vectores óptima que describa de manera representativa los movimientos más significativos del sistema. En el caso de simulaciones de dinámica de proteínas, se debe encontrar una

combinación lineal de la posición de los átomos de la cadena peptídica de forma tal que los vectores resultantes cumplan los siguientes criterios: maximizar la varianza, para así aumentar la relación señal-ruido y disminuir la redundancia de los datos a través de la diagonalización de la matriz de covarianza. Se presume que las direcciones con mayor varianza muestran cambios conformacionales importantes para los sistemas.

El método PCA está basado en la matriz de covarianza<sup>63</sup>  $\mathbf{C}$  y sus elementos  $C_{ij}$  con coordenadas  $i$  y  $j$

$$C_{ij} = \langle (x_i - \langle x_i \rangle)(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle \quad (2.17)$$

donde  $x_1, \dots, x_{3N}$  son las coordenadas cartesianas ponderadas por masa de un sistema de  $N$  partículas de estudio y  $\langle \rangle$  es el promedio sobre las estructuras muestreadas durante la simulación. La matriz  $\mathbf{C}$  simétrica de  $3N \times 3N$  puede ser diagonalizada con una matriz  $\mathbf{R}$  de transformación ortonormal:

$$\mathbf{R}^T \mathbf{C} \mathbf{R} = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_{3N}) \quad (2.18)$$

donde  $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_{3N}$  corresponde a los valores propios, y  $\mathbf{R}^T$  es la transpuesta de  $\mathbf{R}$ . Las columnas de  $\mathbf{R}$  son los vectores propios, o modos principales; la trayectoria puede ser proyectada sobre los vectores propios para dar los componentes principales  $CP_i(t)$ . Estos componentes principales van

de  $i = 1, \dots, 3N$  para un sistema de  $N$  partículas:

$$\mathbf{CP} = \mathbf{R}^T(x(t) - \langle x \rangle) \quad (2.19)$$

El valor propio  $\lambda_i$  es la varianza en la dirección de ese modo principal. Los primeros componentes principales describen típicamente el movimiento colectivo global del sistema, conteniendo las mayores varianzas.

El algoritmo que sigue PCA es sencillo: primero selecciona una dirección normalizada del espacio  $N$ -dimensional, de forma tal que la varianza sea maximizada, este es el primer componente principal  $CP_1$ . Luego busca otra dirección que maximice la varianza y que además sea ortogonal al resto de componentes principales encontrados. Finalmente, se repite este proceso hasta encontrar  $N$  componentes principales que presentan un valor propio asociado.



## 2.5. Sitios de unión y tiempos de residencia de CO<sub>2</sub>

La unión de moléculas pequeñas sobre proteínas posee múltiples desafíos que deben ser abordados sistemáticamente. Para estudiar la unión de CO<sub>2</sub> en Ccr, se desarrolló un protocolo de análisis sobre la distribución local de densidad de moléculas de CO<sub>2</sub> alrededor de la proteína y en sus sitios activos.

### 2.5.1. Distribución de CO<sub>2</sub>

Para estudiar como el dióxido de carbono se distribuye alrededor de la proteína y particularmente cuales son sus sitios de unión, utilizamos las herramientas de análisis gromaps.<sup>64</sup> En ella la densidad de los átomos es representada expandiendo su posición como gaussianas tridimensionales en función de la distancia de cada átomo hacia los puntos de la grilla. La densidad atómica  $P$  en un punto  $d$  se obtiene según la ecuación 2.20, donde  $A_g$  y  $B_g$  son parámetros dependientes del tipo de átomo y fueron determinados ajustando los factores de dispersión atómica experimentales (*scattering factors*)

$$P(d) = \sum_{g=1}^{N_g} A_g e^{-B_g d^2} \quad (2.20)$$

siendo  $N_g$  el total de puntos de la grilla,  $d$  la separación entre un punto

de la grilla  $g_j$  y la posición del átomo de estudio  $r_i$  en un tiempo  $t$  determinado, según la expresión  $d = |g_j - r_i(t)|$ . Para obtener la densidad atómica compuesta sobre los puntos de la grilla, se suman todas las contribuciones por átomo  $P(d)$  sobre cada punto de la grilla  $g_j$  para un tiempo determinado

$$\rho(j, t) = \sum_{i=1}^N P(|g_j - r_i(t)|) \quad (2.21)$$

finalmente, la densidad promedio es obtenida a través del promedio del colectivo sobre los puntos de la grilla. Para ello se utiliza la densidad en cada configuración espacial generada desde las simulaciones de dinámica molecular

$$\overline{\rho(j)} = \frac{1}{S} \sum_{n=1}^S \rho(j, t_n) \quad (2.22)$$

En este trabajo, la discretización del espacio se llevó a cabo en una grilla con resolución de 0.1 nm y la trayectoria fue analizada en secciones de 100ns. Para poder comparar la concentración de CO<sub>2</sub> de los diferentes estados del sitio activo de la proteína, lo primero que se debe definir es la concentración en la solución, la cual se utilizará como estado de referencia para el sistema  $C_{\text{solución}}$ .

Esta concentración corresponde a la razón entre el número total de moléculas de dióxido de carbono dividida por el volumen accesible del solvente (VAS). El VAS es una magnitud que describe el espacio accesible para las moléculas de dióxido de carbono y agua, es decir, el volumen dentro de la

caja de simulación excluyendo a la proteína, el cofactor (NADPH) y el sustrato (crotonil-CoA). El VAS además es modulado por el movimiento de los átomos en las simulaciones de dinámica molecular, por lo que es necesario tomar en cuenta este efecto. Para ello se obtuvo la concentración en solución utilizando el promedio temporal del VAS

$$C_{\text{solución}} = \frac{N_{\text{CO}_2}}{\langle \text{VAS} \rangle} \quad (2.23)$$

Para obtener el VAS, se expanden las posiciones de los átomos pesados de la proteína, NADPH y crotonil-CoA como densidad atómica en cada cuadro de la trayectoria. Esta densidad es promediada en el tiempo y toma en cuenta diversas conformaciones de las cadenas laterales de la proteína. Una vez obtenido el mapa de densidad, se fijó una isosuperficie de 0.1 u.a. como límite de densidad. Esta isosuperficie recupera la forma general de la cadena peptídica, cadenas laterales, cofactores y sustratos en los complejos proteicos. Finalmente, para obtener el VAS se contaron todos los puntos de la grilla ( $g_j$ ) que no se encuentren ocupados con densidad de la proteína, cofactores ni sustratos, es decir, puntos con una densidad menor que el límite de 0.1 u.a. y, por lo tanto, accesibles para el solvente y  $\text{CO}_2$

$$\text{VAS} = \sum_j^N g_j; \forall \rho (g_j) < \text{límite} \quad (2.24)$$

Con la concentración en la solución ya calculada, es necesario obtener la concentración local del sitio activo. Para ello se definió el sitio activo como el volumen dentro de una caja que contiene todos los componentes claves para la reacción. En este volumen se encuentran los residuos Asn81, Phe170, Glu171 y His365 junto al anillo de nicotinamida y el fragmento de crotonil-CoA hasta el pirofosfato (ver Figura 2.1). Para obtener la concentración local de cada sitio activo, se debe calcular el número de moléculas de  $\text{CO}_{2,SA}$  y el  $\langle \text{VAS} \rangle_{SA}$  dentro del volumen definido como sitio activo. El número de moléculas de dióxido de carbono se puede calcular desde la densidad atómica dentro del sitio activo. Para el  $\langle \text{VAS} \rangle_{SA}$  seguimos el mismo procedimiento descrito para la proteína completa considerando solo el volumen de sitio activo.

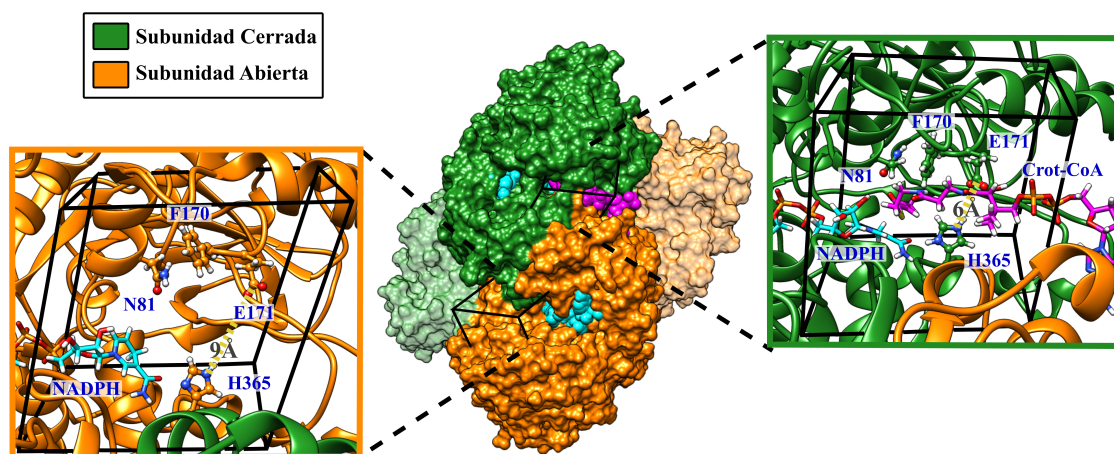


Figura 2.1: Estructura cristalina de Ccr (PDB ID 6NA4) en una configuración de dímero de dímeros con una subunidad abierta y una subunidad cerrada (anaranjada y verde, respectivamente). Un acercamiento al sitio activo para las subunidades abierta y cerrada, muestran los residuos N81, F170, E171 y H365. Una caja negra rodea el volumen del sitio activo usado para el análisis de la concentración local de  $\text{CO}_2$ . Se muestra el NADPH en bastones cian y el crotonil-CoA en bastones magenta.

Para obtener el número de moléculas de CO<sub>2</sub>, se deben sumar todas las contribuciones de la densidad asignadas a los puntos de la grilla del sitio activo y posteriormente dividirlo por el valor de densidad asociado a una molécula de CO<sub>2</sub>. Esta cantidad entrega el número de moléculas de CO<sub>2</sub> dentro del sitio activo. Luego este número de moléculas es dividido por el  $\langle VAS \rangle_{SA}$  para obtener la concentración:

$$C_{\text{Sitio Activo}} = \frac{N_{CO_2,SA}}{\langle VAS \rangle_{SA}} \quad (2.25)$$

Esta concentración representa el promedio temporal de diferentes configuraciones de moléculas de CO<sub>2</sub> dentro del sitio activo. En ella solo se toma en cuenta el volumen accesible para el solvente, el cual es compartido con las moléculas de CO<sub>2</sub>. Con ambas concentraciones, sitio activo y solución, podemos calcular la razón entre ellas, la cual representa el exceso o reducción de la concentración de CO<sub>2</sub> en el sitio activo.

$$C_{\text{exceso/reducción}} = \frac{C_{\text{Sitio Activo}}}{C_{\text{solución}}} \quad (2.26)$$

Para describir los siguientes pasos del protocolo se utilizará como ejemplo el sistema ternario de Ccr. En la Figura 2.2 se muestran los valores de la razón de concentraciones de CO<sub>2</sub> para cada ventana de 100 ns considerando doce trayectorias de 1600 ns para cada sitio activo del sistema. Cada punto corresponde al promedio temporal y espacial de las ventanas de 100 ns

para las diferentes trayectorias coloreadas conectadas con líneas punteadas. El sitio abierto muestra numerosas instancias de exceso de CO<sub>2</sub> (razón de concentraciones >1) y varias de ellas múltiples veces mayores que el promedio del sitio (línea azul horizontal). En los sitios cerrados, la mayoría de los puntos presentan una reducción en la concentración de CO<sub>2</sub> (razón de concentraciones <1) con un pequeño número de muestras con exceso de CO<sub>2</sub>. En el tetrámero, ambos sitios abiertos y cerrados presentan los mismos patrones y por ende fueron promediados para sus análisis posteriores. Las líneas azules horizontales en la Figura 2.2, representan el valor promedio de la razón de concentración y su ancho representa una estimación del error obtenida con análisis de *bootstrap*.<sup>65</sup>

Desde el cociente entre la concentración del sitio activo y la solución se puede obtener la energía libre de unión para cada uno de los sitios activos de la proteína. Conocida la razón de concentración local de CO<sub>2</sub> en el sitio activo (caja negra Figura 2.1) y la concentración en el solvente, se puede calcular la energía libre de unión de CO<sub>2</sub> para cualquier configuración específica del sitio activo. Con esta información, es posible comparar la afinidad de las distintas configuraciones del sitio activo y proponer una secuencia lógica para la unión de CO<sub>2</sub>.

$$\Delta G_{\text{unión}}^o = -k_B T \ln \left( \frac{C_{\text{Sitio Activo}}}{C_{\text{solución}}} \right) \quad (2.27)$$

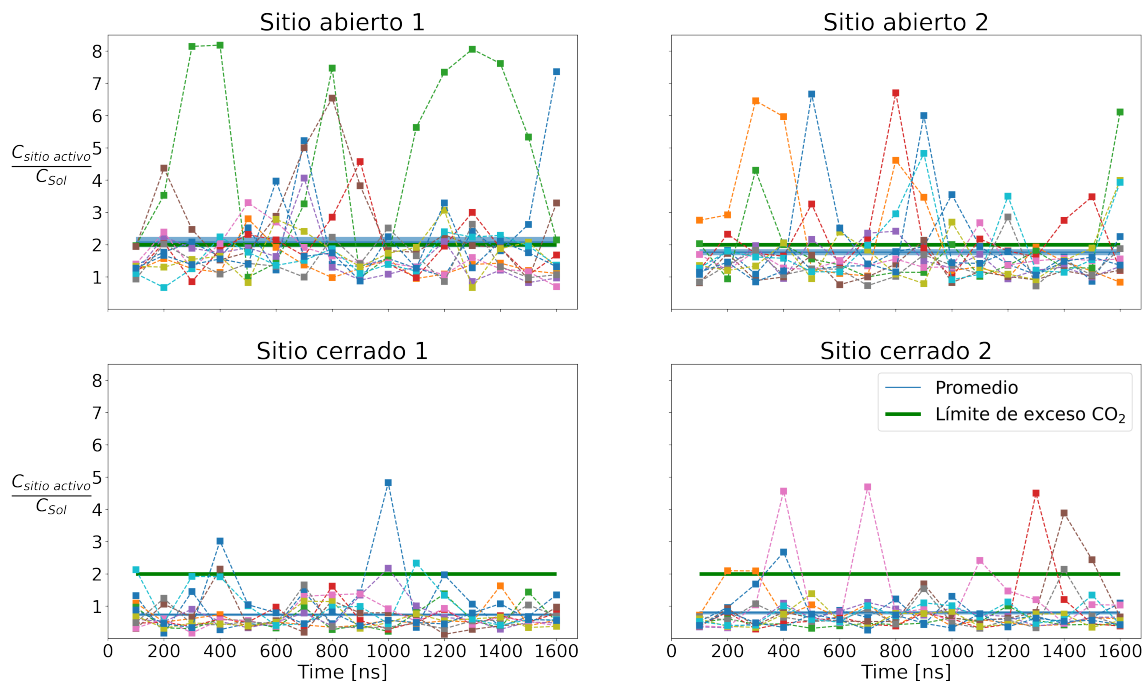


Figura 2.2: Exceso de  $\text{CO}_2$  en los cuatro sitios activos del complejo ternario de Ccr. Se muestra un total de doce trayectorias en diferentes colores para cada caja del sitio activo. Los puntos coloreados corresponden a promedios temporales de 100ns y están conectados con líneas punteadas que representan la evolución temporal de cada simulación. La línea horizontal azul representa el valor medio del exceso de  $\text{CO}_2$  y su ancho corresponde a una estimación del error obtenida a través de análisis de *bootstrap*.<sup>65</sup> La línea horizontal verde muestra el límite para seleccionar las ventanas de 100ns usadas para definir los sitios de unión.

### 2.5.2. Sitios de unión y tiempo de residencia

La energía libre de unión derivada anteriormente contiene información sobre el volumen general del sitio activo. Sin embargo, no entrega información específica sobre las interacciones que definen a los sitios de unión ni como ellas están relacionadas con la función de la enzima. Para explorar la unión de las moléculas de  $\text{CO}_2$  en el interior del sitio activo en sus distintas

conformaciones, se definió un protocolo para identificar los sitios de unión.

Para definir estos sitios de unión, se utilizaron nuevos mapas de densidad de CO<sub>2</sub> derivados para todas las ventanas de 100 ns que presentaron exceso de CO<sub>2</sub> mayores al doble de la concentración en solución. Estas ventanas corresponden a todos los puntos que se encuentran por sobre la línea verde en la Figura 2.2 de cada sitio activo. Esta razón de concentraciones corresponde a una diferencia de energía libre de  $0.7 k_b T$ . Adicionalmente, esta diferencia de energía libre y exceso de CO<sub>2</sub> coincide con el valor promedio observado para el sitio activo sin sustrato, el cual posee la máxima afinidad para los sistemas catalíticamente relevantes (ver línea horizontal azul y verde para el sitio abierto 1 en la Figura 2.2). Basado en estos dos argumentos se decidió utilizar este límite para seleccionar las ventanas temporales de 100ns para la identificación de los sitios de unión. En la Figura 2.2 la línea horizontal verde representa el valor límite 2 para el exceso de CO<sub>2</sub>. Todos los puntos de la trayectoria que se encontraron por sobre este valor fueron utilizados para definir los sitios de unión.

Los sitios de unión para los distintos sitios activos fueron extraídos desde estos nuevos mapas de densidad. Se definieron utilizando el volumen rodeado por la isosuperficie de la densidad para un valor de 20 veces de exceso de CO<sub>2</sub>. Los centros de esos volúmenes fueron utilizados para definir la posición de los sitios de unión como se muestra en la Figura 2.3. De la misma manera se definieron los sitios de unión para los demás sistemas mostrados en las



Figuras 3.8, 3.10 y 3.11.

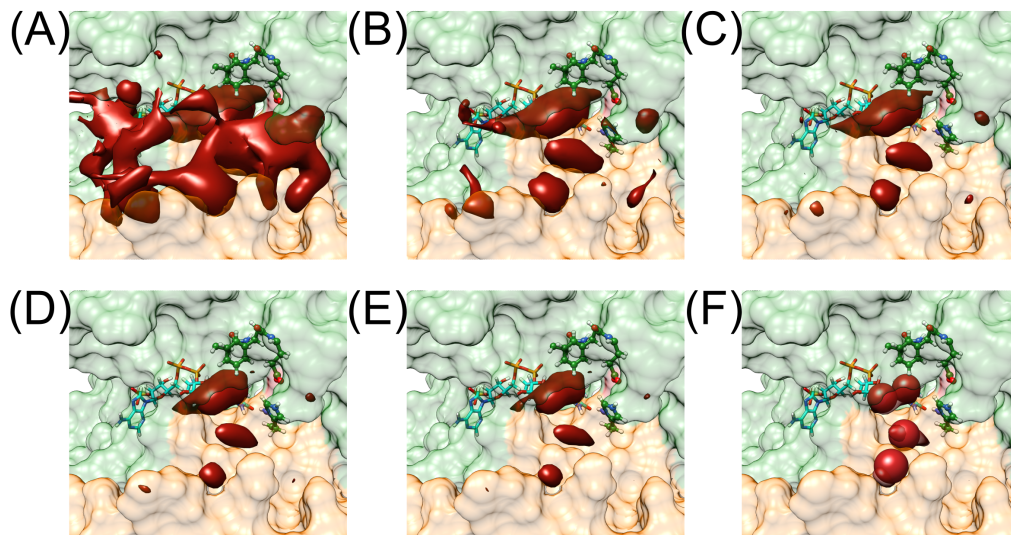


Figura 2.3: La superficie muestra en rojo las regiones del sitio activo donde la concentración de  $\text{CO}_2$  es 2, 5, 10, 15 y 20 veces más grande que la de la solución obtenida como promedios temporales en gromaps, (A)-(E) respectivamente. La posición de los sitios de unión que se mostrarán a continuación en esferas rojo oscuro, se corresponden con el centro de los lóbulos de 20 veces la concentración de  $\text{CO}_2$  de la solución(F).

Definidos los sitios de unión, se procede a obtener los tiempos de residencia promedio ( $\tau$ ) para las moléculas de  $\text{CO}_2$  en esos sitios. El tiempo de residencia se obtiene al promediar la duración de los eventos de unión asociados a cada sitio. Los eventos de unión se definen como el número de configuraciones consecutivas en que una molécula de  $\text{CO}_2$  cualquiera permanece unida a un sitio de unión específico. Para estimar la duración de estos eventos de unión, se cuenta el número de configuraciones consecutivas donde la distancia, desde el centro del sitio de unión, hasta el centro de masa de una

molécula de  $\text{CO}_2$  sea menor al doble de la distancia del enlace  $\text{C}=\text{O}$ . Esta distancia corresponde a la mitad de la separación entre los sitios de unión más cercanos. Los eventos de unión son independientes de la molécula específica de  $\text{CO}_2$  por lo que son promediados sin distinción para obtener el tiempo de residencia.

Se construyó una matriz de estado de unión  $S_{N,c}$  para cada conformación del sitio activo, donde sus configuraciones están separadas por 100 ps. Esta matriz tiene dimensiones del total de moléculas de  $\text{CO}_2$  caracterizadas por su índice ( $\text{CO}_{2,n}$ ) por el número total de configuraciones  $c$  de la trayectoria. Los elementos matriciales  $s_{n,c}$  son reemplazados con valores de  $i = 1, 2, 3, \dots, M$  cuando el centro de masa de la  $n$ -ésima molécula de  $\text{CO}_2$  se encuentra unida al  $i$ -ésimo sitio de unión para la configuración  $c$ . El elemento  $s_{n,c}$  tiene un valor de 0 en cualquier otro caso.

$$S_{N,c} = \begin{pmatrix} s_{1,1} & s_{1,2} & \cdots & s_{1,c} \\ s_{2,1} & s_{2,2} & \cdots & s_{2,c} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ s_{N,1} & s_{N,2} & \cdots & s_{N,c} \end{pmatrix} \quad (2.28)$$

El centro de masa de las moléculas de  $\text{CO}_2$  se analiza en función del número total de configuraciones. Para cada molécula por separado se hace correr un contador que almacena el número de configuraciones consecutivas que permanecen unidas a un sitio específico. Cuando cambia el estado de

unión del sitio, el contador se reestablece en cero. Al finalizar el ciclo de conteo, se promedia el largo de los intervalos asociados a los eventos de unión de cada sitio para así obtener sus tiempos de residencia.

Para ilustrar la metodología se utilizará de ejemplo la siguiente matriz con dos sitios de unión (1 y 2) y 10 configuraciones para 5 moléculas de CO<sub>2</sub> con una separación de 1 ns entre cada una de ellas

$$S_{5,10} = \begin{pmatrix} CO_{2,1} \\ CO_{2,2} \\ CO_{2,3} \\ CO_{2,4} \\ CO_{2,5} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 2 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (2.29)$$

Cada fila de la matriz  $S_{5,10}$  corresponde a una molécula específica y sus elementos matriciales describen el estado de unión de la molécula a los sitios de unión 1 y 2 o de no unión con el valor 0. Utilizando el protocolo para cada molécula de CO<sub>2</sub> se obtienen los siguientes valores:

- Sitio de unión 1: eventos de unión [1, 3, 4, 3, 4] ns,  $\tau_1 = 3$  ns
- Sitio de unión 2: eventos de unión [1, 1, 2, 2, 2] ns,  $\tau_2 = 1.6$  ns

Sin embargo, utilizar criterios geométricos para definir el estado de unión de una molécula puede llevar a subestimar el tiempo de residencia debido a efectos asociados al recruzado del límite definido. Cuando una molécula

traspasa el límite geométrico el contador del intervalo se reestablece en 0, aunque este evento solo sea de una configuración y vuelva a entrar en el sitio activo de manera consecutiva. En este caso, existe una disminución aparente del tiempo de residencia. Se desarrolló un protocolo iterativo para corregir la disminución aparente del tiempo de residencia asociada al recruzado. En este se utiliza el tiempo de residencia previo como criterio límite para los fenómenos de recruzado: si dos eventos de unión están separados por menos del tiempo de residencia previo, ellos son adjuntados y contabilizados como un único evento de unión. En caso contrario, el contador del intervalo se reestablece en 0. Los ciclos iterativos terminan cuando no hay diferencia entre los tiempos de residencia de dos iteraciones consecutivas.

Utilizando el protocolo iterativo descrito para la matriz del ejemplo anterior, podemos obtener nuevos eventos de unión modulados por el tiempo de residencia. En rojo se presentan los valores de la matriz que son adjuntados a los eventos de unión anteriores debido a que su duración es menor o igual que los tiempos de residencia del paso anterior:

Primera iteración  $\tau_1 = 3$  ns,  $\tau_2 = 1.6$  ns:

$$S_{5,10} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 2 & 2 & 2 & 2 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (2.30)$$

- Sitio de unión 1: eventos de unión [6, 4, 3, 4] ns,  $\tau_1 = 4.25$  ns
- Sitio de unión 2: eventos de unión [1, 4, 2, 2] ns,  $\tau_2 = 2.25$  ns

Los tiempos de residencia son distintos a los de la iteración anterior, por lo que se vuelve a ejecutar el conteo.

Segunda iteración  $\tau_1 = 4.25$  ns,  $\tau_2 = 2.25$  ns:

$$S_{5,10} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 2 & 2 & 2 & 2 & 2 & 2 & 2 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (2.31)$$

- Sitio de unión 1: eventos de unión [6, 4, 3, 4] ns,  $\tau_1 = 4.25$  ns
- Sitio de unión 2: eventos de unión [1, 8, 2] ns,  $\tau_2 = 3.67$  ns

El tiempo de residencia para el sitio 2 es distinto a la iteración anterior, por lo que se vuelve a ejecutar el conteo.

Tercera iteración  $\tau_1 = 4.25$  ns,  $\tau_2 = 3.67$  ns:

$$S_{5,10} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 2 & 2 & 2 & 2 & 2 & 2 & 2 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (2.32)$$

- Sitio de unión 1: eventos de unión [6, 4, 3, 4] ns,  $\tau_1 = 4.25$  ns
- Sitio de unión 2: eventos de unión [1, 8, 2] ns,  $\tau_2 = 3.67$  ns

Los tiempos de residencia son iguales, por lo que se termina el proceso iterativo y se almacenan los eventos de unión definitivos para cada uno de los sitios. Finalmente se obtienen los tiempos de residencia promedio para ambos sitios de unión junto a una estimación del error.<sup>65</sup>

### 3. Resultados y Discusión

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es un gas atmosférico de efecto invernadero que posee un rol preponderante en el calentamiento global. Enzimas fijadoras de  $\text{CO}_2$  llamadas carboxilasas fijan alrededor del 100 GT por año de  $\text{CO}_2$  a través de diversos mecanismos.<sup>16</sup> Este estudio se centra en la Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa (Ccr) una representante de la familia enoil-CoA Carboxilasas -Reductasas. Estas enzimas son completamente insensibles hacia el oxígeno molecular, requieren solo de NADPH como cofactor para su reacción y, a la fecha, son las carboxilasas más eficientes en términos de equivalentes de ATP por molécula de  $\text{CO}_2$  fijada.<sup>8</sup> El paso químico de la reacción ha sido estudiado en colaboración con nuestro grupo de investigación.<sup>21,22,66</sup> Sin embargo, no existía información reportada respecto a la difusión y unión de  $\text{CO}_2$ , previo a la reacción química, con el sustrato crotonil-CoA en la enzima. Este tema fue abordado en esta tesis, resultando en múltiples publicaciones científicas.<sup>16,66-68</sup> El transporte de ligandos desde y hacia el sitio activo de proteínas es un proceso muy común en la biología, la bioquímica y la biofísica.<sup>23</sup> Juega un rol preponderante en los pasos iniciales y finales de la catálisis enzimática, la cual consta de la unión de los sustratos previo a la reacción química y la posterior liberación de los productos desde el sitio activo.

En esta sección se presentan y discuten los resultados más relevantes de esta tesis. Estos fueron obtenidos mayoritariamente con simulaciones de dinámica molecular. En primera instancia se desarrolla el análisis conformacional de Ccr silvestre y su variante triple, asociada a una pérdida significativa de eficiencia catalítica. Posteriormente se discute la validación del modelo de CO<sub>2</sub> utilizado junto a las simulaciones con presencia explícita de CO<sub>2</sub>. Para estas simulaciones se definen y comparan las energías libres de unión, sitios de unión y tiempos de residencia para los distintos estados catalíticos de la enzima y su variante N81L inactiva. Se encontró la existencia de una dependencia del estado conformacional de la subunidad sobre la energía libre de unión de CO<sub>2</sub>. Además, la pérdida de actividad para la variante N81L se pudo explicar a través de la desaparición de los sitios de unión de dióxido de carbono bien posicionados para la reacción. Finalmente, a través de información cinética y termodinámica, se logró plantear una secuencia para los eventos de captura de CO<sub>2</sub> y sustrato acoplado a cambios conformacionales para el cierre del sitio activo.

Un requisito necesario para realizar simulaciones de dinámica molecular de proteínas es definir los estados de protonación para las cadenas laterales de los aminoácidos. Con este fin, primero se abordan los cálculos de  $\Delta pK_a$  necesarios para determinar la protonación de H365, residuo inmerso en un ambiente químico disimil a la solución y que además cumple un importante rol en la reacción.



### **3.1. Determinación del $pK_a$ de Histidina 365 para distintas configuraciones del sitio activo de Ccr**

Los sistemas proteicos tienen aminoácidos que pueden modificar su estado de protonación dependiendo del ambiente químico que los rodea. Esta característica genera un gran desafío a la hora de modelar estos sistemas. Cambios en la protonación pueden estar asociados a cambios conformacionales de la proteína o directamente con la función de la misma.<sup>69</sup> Uno de los residuos más interesantes en el contexto de Ccr es un residuo de histidina (H), el cual posee un  $pK_a$  de 6.5 para su segunda protonación.<sup>70</sup> Dado que su valor es cercano al pH 8, utilizado para realizar los estudios cinéticos,<sup>16,22</sup> una modificación del ambiente químico podría cambiar su estado de protonación en comparación a la solución. Dentro del sitio activo de Ccr y cercano al sitio de unión del sustrato se encuentra H365, residuo clave para la reacción. Se ha demostrado que en ausencia de este residuo, la constante catalítica  $k_{cat}$  disminuye 20 veces.<sup>22</sup>

Para poder estudiar los cambios conformacionales que esta enzima puede realizar, es necesario definir de manera correcta el estado de protonación del residuo H365, ya que se encuentra directamente relacionado con el sitio activo y el sitio de unión del sustrato. Los modelos computacionales se basa-

ron en la estructura cristalina del complejo ternario de *K. setae* Ccr (KsCcr, PDB ID 6NA4<sup>16</sup>). Esta estructura corresponde a un tetrámero que adopta la geometría de un dímero de dímeros. Cada dímero está compuesto por una subunidad abierta y una cerrada (subunidades A/C y B/D, con A y B cerradas), donde el estado cerrado es la conformación catalíticamente competente dentro del sitio activo. Cada subunidad contiene el cofactor de NADPH y las dos subunidades cerradas portan el análogo del sustrato butiril-CoA (subunidades A y B). Este análogo fue modificado para restaurar el sustrato original crotonil-CoA (se removió un hidrógeno del carbono  $\alpha$  y uno del carbono  $\beta$ ).

Para establecer el estado de protonación de H365 se realizaron cálculos de energía libre de transferencia protónica,<sup>71</sup> junto a transformaciones alquímicas para determinar el cambio de  $pK_a$  al compararlo con un residuo de histidina en un péptido completamente solvatado con sus terminales carboxi y amino metilados. El péptido de histidina fue añadido a la caja de simulación que contenía la proteína, cofactor, sustrato y solvente. Se utilizaron transformaciones alquímicas junto a cálculos de energía libre para obtener el cambio en energía libre ( $\Delta\Delta G^\circ$ ) al transferir un protón desde el residuo de H365 en el sitio activo abierto o cerrado hacia el residuo de histidina completamente solvatado. Se obtuvo el  $\Delta pK_a$  para los tres estados observados en los cristales, subunidad abierta sin sustrato (abierto(-)), subunidad cerrada sin sustrato (cerrado(-)) y la subunidad cerrada con sustrato (cerrado(+)). Además se modeló un estado hipotético que se debe presentar dentro del ciclo

catalítico de la enzima, el estado abierto con sustrato (abierto(+)). El cambio de  $pK_a$  para H365 en dos distintos sitios activos se obtuvo según lo descrito en la metodología sección 2.3.4.

Las topologías para los estados protonados y desprotonados de ambos residuos fueron creados con las herramientas de PMX.<sup>72,73</sup> La adición de hidrógenos y generación de la topología para los sistemas fue hecho en el paquete de simulaciones GROMACS 2019.3<sup>74</sup> utilizando el campo de fuerza CHARMM36m<sup>75</sup> y el modelo de agua modificado de CHARMM TIP3P<sup>76</sup> en combinación con el campo de fuerza general de CHARMM CGenFF<sup>77,78</sup> para describir sustrato y cofactor. Parámetros específicos para el NADPH y el fragmento de crotonil-CoA fueron tomados desde Pavelites *et al.*<sup>79</sup> y Aleksandrov *et al.*,<sup>80</sup> respectivamente.

Partiendo con H365 protonada dentro del sitio activo abierto o cerrado, se puso el tetrámero de la proteína dentro de una caja dodecahédrica solvada a través de gmx solvate, de forma tal que la distancia más corta entre cualquier átomo de la proteína y los bordes de la caja fueran de al menos 1.5 nm. Un péptido metilado de NME-His-ACE fue puesto a más de 3.5 nm de distancia de H365, reemplazando moléculas de agua en caso de ser necesario. Iones potasio y cloruro fueron añadidos para neutralizar el sistema, alcanzado la concentración fisiológica de 125 mmol/L. Se realizó una minimización de energía usando el algoritmo de *steepest descent* por 50000 pasos para cada sistema, seguido de una equilibración de 1 ns en el colectivo NVT aplican-

do restricciones de posición en la cadena peptídica de la proteína, péptido y ligandos, a continuación se realizó una equilibración de 5 ns en el colectivo NPT a 1 atm de presión y temperatura de 298K utilizando tiempos de integración de 2 femtosegundos. Se utilizó el termostato de reescalado de velocidades<sup>53</sup> y el barostato de Berendsen<sup>52</sup> con coeficientes de acoplado de  $\tau = 0.1$  ps y  $\tau = 2$  ps, respectivamente. Todas las distancias de enlace de la proteína, péptido y ligandos fueron restringidas utilizando el algoritmo LINCS<sup>81</sup> con un orden de expansión de 4. Las interacciones electrostáticas fueron calculadas usando *Particle-Mesh-Ewald*,<sup>82</sup> con un radio de corte para el espacio real de 12 Å y un espaciado de Fourier de 1.6 Å. Para las interacciones de van der Waals se utilizó un radio de corte de 12 Å junto a una función de cambio que iniciaba a 10 Å. Los parámetros y protocolos descritos anteriormente son comunes a todas las simulaciones realizadas en este trabajo, previas a sus dinámicas de producción.

Para la producción se realizaron cálculos de energía libre equilibrando cada estado alquímico por 5 ns para cada valor de  $\lambda$ . Se utilizaron 11 valores para las interacciones de Coulomb [0.00, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90, 1.00], 9 para las interacciones de van der Waals [0.00, 0.13, 0.25, 0.38, 0.50, 0.63, 0.75, 0.88, 1.00] y 7 para las interacciones enlazantes [0.00, 0.15, 0.30, 0.50, 0.70, 0.85, 1.00] en el colectivo NVT utilizando restricciones de posición sobre la cadena peptídica de proteína, péptido y los ligandos a 298K con dinámica estocástica. Las diferencias de energía libre

fueron estimadas con la razón de aceptación de Bennet<sup>60</sup> (BAR) incluido en gromacs como gmx bar.

Tabla 3.1: Valores de  $\Delta pK_a$  para el residuo H365 en las cuatro diferentes configuraciones que podría tener el sitio activo obtenidos a 298K. Además, informa el valor de  $\Delta pK_a$  para un sistema de dos péptidos utilizado como validación.

| Sistema             | $\Delta\Delta G^\circ$ kJmol <sup>-1</sup> | $\Delta pK_a$ |
|---------------------|--|---------------|
| Modelo de doble HIS | 1.55 ± 0.5                                 | 0.3 ± 0.1     |
| Abierto (-)         | -5.4 ± 0.2                                 | -0.9 ± 0.1    |
| Abierto (+)         | 4.9 ± 2.9                                  | 0.9 ± 0.5     |
| Cerrado (-)         | -3.7 ± 0.5                                 | -0.6 ± 0.1    |
| Cerrado (+)         | 7.0 ± 0.5                                  | 1.2 ± 0.1     |

Para validar la metodología se estudió un modelo con dos péptidos de histidina separados en 1.5 nm y metilados en sus terminales. Se encontró que el  $\Delta pK_a$  del sistema es 0.3, lo que puede ser asociado al error en la estimación de nuestra metodología. Al comparar los valores de  $\Delta pK_a$ , mostrados en la Tabla 3.1, podemos notar que tanto para la conformación abierta como la cerrada sin sustrato, el  $\Delta pK_a$  es negativo y por lo tanto, su estado de protonación más probable es el estado neutro  $\epsilon$ -monoprotonado, el tautómero más estable para los sistemas proteicos a pH cercanos al fisiológico. Cuando el sustrato se encuentra en el sitio activo, tanto para la conformación abierta como cerrada, el valor de  $\Delta pK_a$  es positivo y cercano a una unidad de  $pK_a$ , lo que llevaría su valor de  $pK_a$  a 7.5. Estos resultados sugieren que el estado de protonación de H365 es modulado por la presencia de sustrato y no por la conformación de la enzima. Es interesante destacar que el sistema monoprotonado es de ca-

rácter neutro mientras que el doblemente protonado posee una carga positiva. Dado que los experimentos son realizados a pH=8, es muy probable que el sistema doblemente protonado en el complejo ternario sea un estado válido en presencia de sustrato.

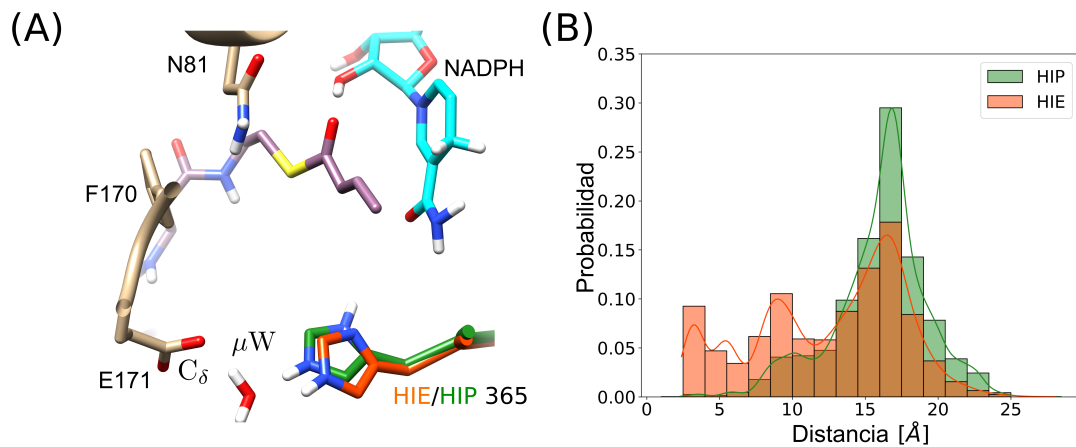


Figura 3.1: (A) Sitio activo de Ccr mostrando los residuos Asn81, Phe170, Glu171, His365 y una molécula de agua conservada ( $\mu W$ ) que une estos últimos dos residuos. H365 se representa con dos diferentes estados de protonación: monoprotonado (HIE, anaranjado) y doblemente protonado (HIP, verde). (B) Distribución de la distancia mínima entre los residuos E171 ( $C_{\delta}$ ) y los iones cargados positivamente ( $K^{+}$ ). Todas las distribuciones fueron obtenidas desde trayectorias de  $0.8 \mu s$  de simulación con las H365 en el sitio cerrado estando en estado monoprotonado (HIE) o doblemente protonado (HIP). La forma monoprotonada atrae los iones positivamente cargados evidenciando la estabilización de una histidina doblemente protonada (HIP).

Para poder determinar cuál es el estado de protonación más probable se realizaron simulaciones de dinámica molecular para el sistema ternario utilizando ambos estados de protonación para H365 (Figura 3.1A). Las dinámicas de producción se realizaron liberando las restricciones de posición sobre los átomos. Se comparó la distribución de la distancia mínima entre

el carbono carboxílico ( $C_{\delta}$ ) del residuo E171 con los iones potasio cargados positivamente ( $K^{+}$ , ver Figura 3.1B). Esta comparación se realizó para los estados monoprotonado (HIE) y doblemente protonado (HIP) de los residuos de H365 en las subunidades cerradas con sustrato. Para obtener las distribuciones se utilizaron las distancias obtenidas para ambas subunidades provenientes de 8 réplicas simulaciones de dinámica molecular de 100 ns de duración, sumando así  $1.6 \mu s$  de análisis por estado de protonación.<sup>66</sup> Se observó que el estado monoprotonado de H365 genera una atracción sobre los iones potasio hacia el sitio activo. Se obtiene una mayor población para distancias cortas e incluso, se poblan valores no alcanzados para el sistema doblemente protonado (ver Figura 3.1B). Estos resultados muestran que para el sistema monoprotonado existe un déficit de carga positiva, el cual genera la atracción de iones potasio hacia el sitio activo cerrado de Ccr. La presencia de H365 doblemente protonada elimina este efecto, demostrando que la protonación de este residuo posee un efecto directo sobre el sitio activo del sistema. Al añadir estos antecedentes a la estimación del  $\Delta pK_a$ , se decidió definir el estado doblemente protonado para la subunidad cerrada en presencia de sustrato.

Con la definición de los estados de protonación para las subunidades en sus diferentes configuraciones, se procedió a realizar simulaciones de dinámica molecular de la proteína en solución. Estas simulaciones se utilizaron para determinar las conformaciones más relevantes de Ccr y para caracterizar los movimientos de la enzima que le permiten cambiar desde conformaciones abiertas a conformaciones cerradas en sus subunidades.



## 3.2. Cambios conformacionales en Ccr asociados a su función catalítica

Las estructuras cristalinas para diversas configuraciones del sistema (APO, binario, ternario), mostraron diferentes conformaciones del dominio catalítico de las subunidades dependiendo de la presencia de cofactor y sustrato (discutido previamente en el marco teórico). Solo en las subunidades cerradas se logró determinar la posición del sustrato dentro del sitio activo. La enzima da paso a la reacción química en las subunidades que se encuentran cerradas, lo cual demuestra la importancia de los cambios conformacionales que se presentan en el sistema. Además, existen diversos antecedentes que sugieren una coordinación entre las diferentes subunidades del sistema. Por un lado, pese a tener la capacidad de unir sustrato en las cuatro subunidades, solos dos de ellas se encuentran en su conformación cerrada. Por otro lado, a lo largo de la interfaz intra e inter dímero se pueden caracterizar interacciones relevantes que podrían coordinar movimientos del complejo tetramérico (figura 3.2).

Dados los movimientos coordinados del dominio catalítico durante la catálisis ¿Cómo está la catálisis sincronizada a través del complejo enzimático, es decir, a través de los dímeros A/C y B/D? Un aspecto intrigante de la estructura del tetramero de Ccr es que los dominios catalíticos comparten una interfaz común de  $1632 \text{ \AA}^2$  entre los pares de dímeros, sugiriendo que

ellos se mueven en conjunto como cuerpos rígidos. ¿Cuáles son los determinantes moleculares que sincronizan la catálisis a través del par de dímeros abierto/cerrado? La interfaz del dominio intercatalítico es predominantemente hidrofóbica con algunas interacciones electrostáticas. Los residuos más notables son N218, el que forma un enlace de hidrógeno con N157 de la subunidad adyacente perteneciente al otro dímero, y E151 que interactúa con el nitrógeno de la cadena peptídica de N133 (y/o A134) de la subunidad vecina perteneciente al otro dímero, como se muestra en la Figura 3.2A. Al realizar un análisis de múltiples secuencias de ECRs de metabolismo primario se encontraron tres residuos altamente conservados E151, N218 y N157. Estos residuos no fueron encontrados en ECRs de metabolismo secundario, las cuales son en promedio 20 veces más lentas que las del metabolismo primario.<sup>16</sup> Esta información da origen a la interrogante de si poseen un rol en la promoción de la catálisis de estas ECRs. Notablemente, mutaciones de estos residuos que están más allá de 20 Å del sitio activo, afectan dramáticamente los parámetros cinéticos de Ccr de *K. setae*. Se demostró que la enzima triple mutante E151D/N157E/N218E, la cual carece de las interacciones mencionadas anteriormente, disminuyó su constante catalítica  $k_{cat}$  y su  $k_{cat}/K_M$  en 2 y 3 órdenes de magnitud respectivamente,<sup>16</sup> lo que muestra una relación marcada entre estos residuos y la actividad y la eficiencia catalítica de esta enzima.

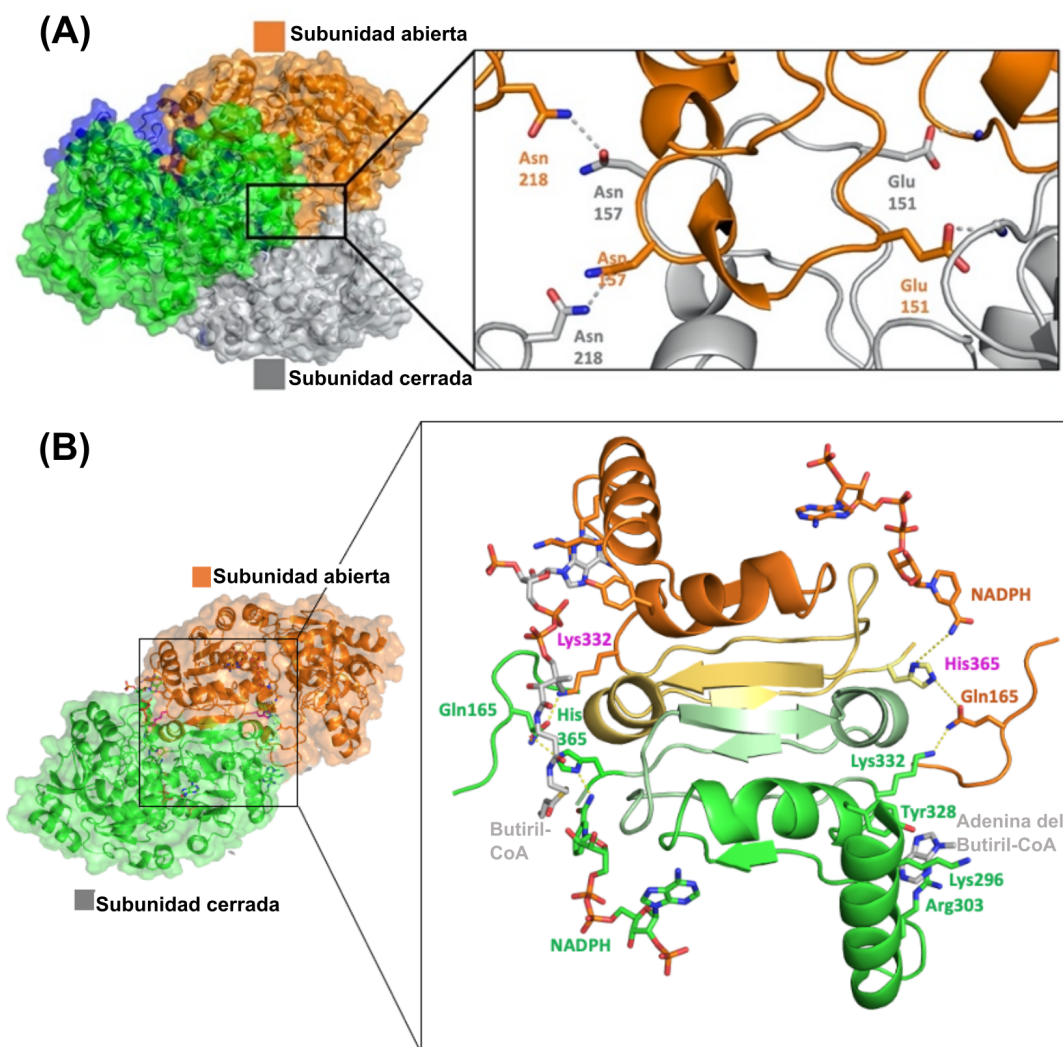


Figura 3.2: (A) Interfaz interdímico de los dominios catalíticos junto a la posición de los aminoácidos mutados que afectan la comunicación entre los dominios catalíticos (subunidad abierta en anaranjado y subunidad cerrada en gris). El panel derecho muestra la interacción mutua entre N218 y N157 de las subunidades de forma abierta y cerrada y entre E151 y el átomo de N de la cadena peptídica de la proteína a través de enlaces de hidrógeno. (B) Comunicación entre las subunidades cerradas (verde) y abiertas (anaranjada) dentro de cada dímero de *K. setae* Ccr. En la conformación cerrada los contactos entre NADPH H365-Q165 y K332 de la subunidad adyacente permiten la correcta comunicación intradímico. En la conformación abierta se compromete la red de comunicación, lo que se visualiza por el incremento en la distancia entre las cadenas laterales de los aminoácidos causada por el distinto posicionamiento del anillo de nicotinamida de NADPH.

A través de cromatografía de filtración en gel (material suplementario<sup>16</sup>) se demostró que la estructura tetramérica del complejo permanece formada pese a la mutación de los residuos E151, N218 y N157, tanto de manera singular como de la variante triple.<sup>16</sup> La disminución de la eficiencia catalítica, manteniendo la estructura del complejo para las variantes, junto a la posible comunicación entre dímeros propuesta desde la información estructural, sugiere que el efecto de estas mutaciones debe estar asociada a la dinámica conformacional de la enzima. Esta variante triple podría modificar la superficie de energía potencial de las conformaciones de la enzima, teniendo un efecto sobre la dinámica y su eficiencia catalítica.

Para abordar la dinámica conformacional de Ccr y el efecto que pueden tener las mutaciones sobre ella, se utilizaron simulaciones de dinámica molecular para estudiar el intercambio entre las conformaciones abiertas y cerradas de las subunidades en el complejo ternario. Partiendo desde la estructura cristalina del complejo ternario con NADPH y butiril-CoA, se modeló el sustrato natural crotonil-CoA para realizar simulaciones de dinámica molecular de la enzima catalíticamente activa<sup>16</sup>. En estas simulaciones la fracción acilo del mismo abandonó el sitio activo, resultando en un cambio conformacional rápido de la subunidad cerrada a la subunidad abierta.

Para estudiar el cambio conformacional de manera sistemática y determinar si existe algún efecto por el estado de un dímero sobre el otro, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular para tres sistemas distintos: i)

el complejo ternario descrito anteriormente, ii) el complejo binario con dos subunidades cerradas y dos subunidades abiertas. Para construirlo se eliminaron las moléculas de butiril-CoA sobre el complejo ternario y iii) sistema mixto, el cual fue creado *in silico* para estudiar el efecto de tener solo una molécula de sustrato unida al sitio activo cerrado del tetrámero. Este sistema contiene las 4 moléculas de NADPH y solo una molécula de crotonil-CoA en la subunidad cerrada del dímero BD. Estos sistemas son denominados WT.

Para estudiar el efecto sobre los cambios conformacionales de la triple mutación de la proteína E151D/N157E/N218E, se modificó la estructura inicial del complejo ternario utilizando el software UCSF Chimera.<sup>83</sup> Se seleccionó el rotámero más probable, propuesto por la herramienta *Structure editing*, para las mutaciones correspondiente de cada uno de los complejos discutidos previamente. Estos sistemas son denominados Mut triple.

Se realizaron diez réplicas de simulaciones de dinámica molecular de 100 ns cada una para los seis diferentes sistemas: binario, ternario y mixto silvestre (WT) y mutante triple (Mut triple). Todas las simulaciones siguieron el protocolo de preparación y parámetros mencionados en la sección 3.1. Para las dinámicas de producción, las restricciones sobre la proteína y los átomos de NADPH fueron liberadas, añadiendo restricciones de distancia sobre ciertas interacciones clave ( $k = 1000 \text{kJmol}^{-1} \text{nm}^{-2}$ ). En el sistema ternario, la distancia entre el residuo R99 y el grupo fosfato cercano fue restringida a su valor inicial junto a la distancia entre H409 y el grupo fosfato de NADPH

en las subunidades cerradas. Para el sistema binario, la distancia entre R276 y la fracción de adenina del NADPH también fue restringida. Las coordenadas del sistema se guardaron cada 100 ps, resultando en 101 configuraciones disponibles para el análisis en cada réplica.

En todas las 10 simulaciones de 100 ns del tetrámero complejo binario, las subunidades cerradas sufrieron un cambio conformacional rápido durante las primeras decenas de nanosegundos. El mismo efecto fue observado cuando se partió de la estructura cristalina del complejo binario PDB ID 6NA6. Las simulaciones del complejo ternario o mixto no presentaron esta apertura para sus subunidades cerradas con sustrato en posición. Para caracterizar esta apertura, se utilizó el análisis de componentes principales (en inglés PCA) con el fin de estudiar los cambios conformacionales del complejo binario silvestre (WT).

Para realizar el PCA, ambos dímeros del tetrámero fueron tratados de manera separada, generando así 20 trayectorias de 100 ns desde las 10 trayectorias simuladas de cada tetrámero. Se utilizaron las herramientas de análisis de componentes principales incluidas en GROMACS para obtener la matriz de covarianza para las posiciones de los carbonos alfa. La estructura cristalina fue utilizada como referencia para quitar los grados de libertad traslacionales y rotacionales de cada dímero. Las trayectorias asociadas a las diferentes configuraciones de los sistemas silvestre y mutante triple descritas anteriormente (binario, ternario y mixto) fueron proyectadas sobre los primeros dos

componentes principales. Ellos representan la dinámica de los mayores cambios conformacionales del sistema. Ambos vectores propios diferencian las estructuras cristalinas completamente abierta del sistema APO (diamante café) de la conformación inicial cerrado/abierto para el complejo ternario (cruz magenta) como se muestra en la Figura 3.3B. La escala de tiempo de 100 ns fue suficiente para describir los pasos principales de los cambios conformacionales. En la Figura A.1 se puede ver que el sistema no muestra un nuevo cambio conformacional cuando las simulaciones fueron alargadas hasta 200 ns de tiempo total.

El primer componente principal (CP1) representa la transición desde el estado cerrado hacia el estado abierto y el segundo componente principal (CP2) describe la rotación de una subunidad con respecto a la otra en cada dímero. En ambos casos, el dominio catalítico se mueve de manera relativa al dominio de oligomerización (Figura 3.3A).

En la Figura 3.3B se muestran las proyecciones de la trayectoria sobre la combinación de componentes principales CP1 y CP2 para tres sistemas representativos: binario silvestre ( $Ccr^{WT}$ . NADPH), mixto con sustrato en el dímero BD ( $Ccr^{WT}$ . NADPH, Dímero [B-Crot-CoA]D) y el sistema binario mutante triple ( $Ccr^{Mut\ triple}$ . NADPH). El sistema binario silvestre muestra una rápida apertura en CP1 y posteriormente, algunas trayectorias tuercen ambas subunidades del dímero AC. El sistema mixto muestra que la apertura representada por CP1, se mantiene para el dímero AC sin sustrato. Sin em-

bargo, el sistema con sustrato en su posición (dímero BD) presenta un desplazamiento bajo sobre CP1, asociado a la relajación de la estructura cristalina en solución. Al analizar la proyección del sistema ternario en la Figura A.2, ambos dímeros se comportan como el dímero BD del sistema mixto, donde no se produce la apertura de la subunidad cerrada en la escala de tiempo de 100 ns como se puede ver en la Figura 3.3B.

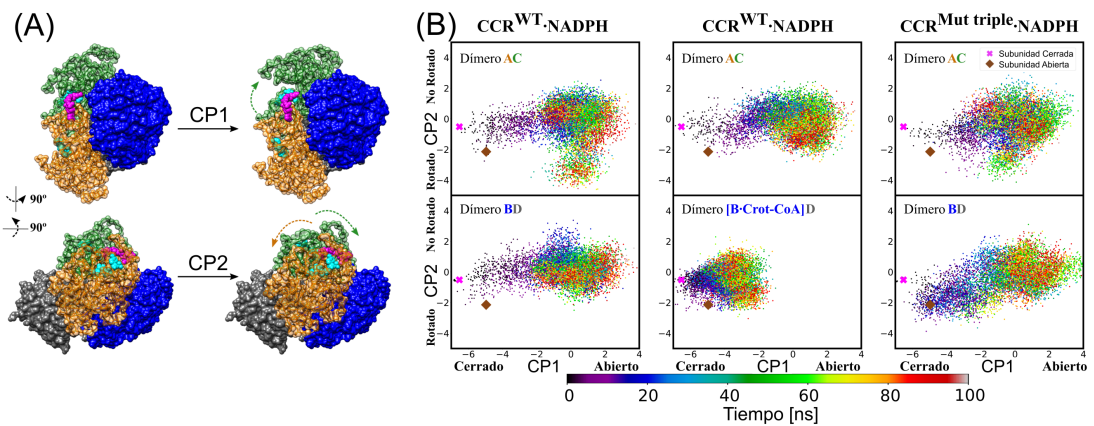


Figura 3.3: (A) Representación del movimiento de apertura para el dominio catalítico en el dímero AC descrito por el primer componente principal (CP1) y el movimiento de torsión de un monómero respecto al otro en CP2. La torsión podría acercar al sustrato unido con el cofactor NADPH, mostrados en esferas magenta y cian respectivamente. (B) Proyección de las 10 trayectorias de 100ns sobre los dos primeros componentes principales para el sistema silvestre binario con el cofactor de NADPH (cruces y diamantes representan las formas abiertas y cerradas de la subunidad desde la estructura cristalina, respectivamente). El panel central muestra la proyección sobre los mismos CP para el complejo ternario de Ccr<sup>WT</sup> que posee solo una molécula de sustrato en la subunidad B del dímero BD ([B·Crot-CoA]D). El panel de la derecha representa la dinámica de la mutante triple E151D/N157E/N218E con el cofactor de NADPH (CCR<sup>Mut triple</sup>.NADPH) sobre el mismo espacio de vectores. Los colores para cada punto representan la escala de tiempo de acuerdo a la barra inferior.



Como se discutió previamente la existencia de tres aminoácidos alejados del sitio activo cumplen un rol muy importante al acoplar la catálisis entre los pares de dímeros.<sup>16</sup> Se utilizaron simulaciones computacionales para estudiar el efecto de la triple mutación E151D/N157E/N218E sobre la sincronización de los dominios catalíticos junto a las transiciones conformacionales del complejo binario. Para ello se siguió el protocolo mencionado anteriormente. Las proyecciones de 10 trayectorias de 100ns, sobre el componente principal definido previamente, mostraron valores límite comparables para la transición de apertura en ambas subunidades cerradas del complejo binario triple mutante (ver Figura 3.3B). Sin embargo, esta transición ocurre de forma más lenta, lo que es representado por un aumento de puntos azules que corresponden a tiempos entre 20-40 ns en valores de CP1. Estos valores están asociados a un estado intermedio de apertura parcial para la transición descrita por este componente principal. Adicionalmente, la exploración de valores sobre CP2 se da simultáneamente con la apertura de la subunidad, mientras que para el sistema silvestre ocurre de manera secuencial. Primero la subunidad se abre y luego, en algunas trayectorias, ocurre la torsión entre subunidades.

Para analizar las diferencias entre la enzima silvestre y la variante mutante triple, se obtuvieron las trazas temporales de los primeros dos componentes principales para ambos dímeros del tetrámero. En la Figura 3.4 se muestra, para cada dímero, el promedio  $\pm 1.5\sigma$  de los valores proyectados sobre CP1. Se puede corroborar que la triple mutante abre las subunidades cerradas de

forma más lenta que la enzima silvestre. Además, presenta una distribución más ancha de valores para ambos dímeros durante la transición. Para cuantificar la diferencia observada entre los sistemas binario silvestre y mutante triple, se ajustó la transición del primer componente principal a un modelo cinético. Para ello se asumió una cinética de primer orden de la transición observada que fue ajustada al modelo

$$CP1(t) = A(1 - e^{(-kt)}). \quad (3.1)$$

Los valores asociados a ambos dímeros fueron promediados y su posición sobre el primer componente principal fue desplazada para que el ajuste exponencial comenzara con un valor de cero. En la Figura A.3 se muestran las curvas obtenidas para estos sistemas. Estimando la desviación estándar del modelo y asumiendo un intervalo de confianza del 95 %, las constantes cinéticas del proceso son  $1.22 \pm 0.02 \times 10^{-1}$  y  $8.7 \times \pm 0.4 \times 10^{-2} \text{ ns}^{-1}$  para los sistemas silvestre y mutante respectivamente. La razón entre estas constantes muestra que la mutante triple es un 30 % más lenta que la enzima silvestre en la apertura de la subunidad cerrada.

La cinética observada puede asociarse con perfiles de energía libre a lo largo de CP1 que se muestran en Figura 3.4. La mutante triple debe cruzar una barrera más alta para alcanzar el estado abierto reflejado en una menor constante cinética. La distribución más ancha durante la transición es causa-

da por un mínimo de energía libre con menor curvatura para el sistema triple mutante. Para CP2, las dinámicas del sistema silvestre y mutante también difieren. La triple mutante presenta una distribución más ancha con un mínimo de energía libre con menor curvatura y desplazado, causando que ambos sistemas evolucionen en direcciones opuestas al comienzo de la simulación. Interesantemente, solo la silvestre es capaz de sobrepasar la barrera de energía libre hacia el estado rotado en algunas de las trayectorias (mostrada en café en la Figura 3.4).

Estos resultados confirman que las mutaciones E151D/N157E/N218E en la interfaz de los dímeros, cambian el perfil de energía libre de las transiciones conformacionales considerablemente. La comunicación entre dímeros se ve reducida, dado que la triple mutante no comparte la dinámica concertada del sistema silvestre. Ella está caracterizada por un primer paso de apertura y luego una rotación de una subunidad respecto a otra. Este movimiento rotatorio acercaría el sustrato con el cofactor de NADPH y podría estar directamente acoplado al primer paso de la reacción de Ccr, la transferencia de hidruro.<sup>22,66</sup>

Simulaciones computacionales e información cinética de la triple mutante indican que el acoplamiento de la dinámica de ambos dímeros es conferido por estos tres aminoácidos conservados en Ccr (E151, N157 y N218) y es esencial para alcanzar rápidas cinéticas de fijación de dióxido de carbono. Durante la catálisis, el complejo enzimático se diferencia en distintas subuni-

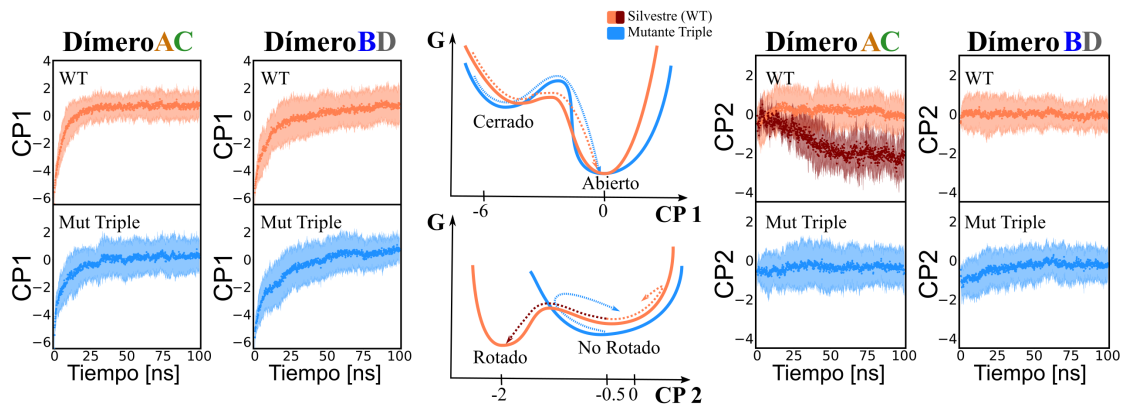


Figura 3.4: Valores promedio y 1.5 veces la desviación estándar de los componentes principales para las 10 trayectorias como función del tiempo de simulación para cada dímero en el sistema silvestre (anaranjado) y mutante E151D/N157E/N218E (azul) para los complejos binarios de Ccr. Las trazas temporales de CP1 se muestran en la izquierda y las de CP2 en la derecha. Al centro, perfiles de energía libre como función de CP1 y CP2 fueron derivados para el sistema silvestre (anaranjado) y mutante triple (azul) de acuerdo a las observaciones cinéticas. La mutante triple con una cinética de apertura más lenta (CP1) es consistente con una barrera mayor para la transición hacia la forma abierta, y su mayor desviación estándar, sugiere un mínimo de energía libre más profundo para la forma cerrada. El perfil de energía libre de CP2 corresponde a un mínimo más amplio para la mutante triple de acuerdo a la mayor desviación estándar observada en su cinética y una mayor barrera para alcanzar la conformación rotada observada en el sistema silvestre (trayectoria café mostrada en el dímero AC para CP2 en la derecha).

dades funcionales. La unión del cofactor de NADPH y el sustrato fuerza al sistema APO homotetramérico en un par de dímeros, donde cada dímero está constituido por una subunidad abierta y una cerrada. En la subunidad cerrada, el cofactor de NADPH y el sustrato están alineados entre sí, sugiriendo que este corresponde al estado catalíticamente competente. La subunidad abierta une el cofactor y el anillo de adenina del sustrato pero el resto del sustrato acil-CoA permanece flexible e invisible en el sitio activo (mostrado en la

Figura 3.2B). Así, la subunidad abierta representa un estado catalíticamente incompetente que está pre-organizado para una siguiente ronda de catálisis.

En resumen, esta reorganización estructural del complejo de Ccr sugiere firmemente la idea de que la enzima opera bajo una reactividad parcial de sitios. La catálisis se sincroniza a través del tetrámero y alterna entre subunidades abiertas y cerradas para incrementar la eficiencia general del complejo. Para sincronizar la reactividad parcial de sitios, la interacción de los dominios catalíticos entre y a través del par de dímeros es crucial. Cuando la última es perturbada en Ccr, a través de la mutante E151D/N157E/N218E, la constante catalítica de la enzima disminuye severamente.

La información estructural, bioquímica y de simulaciones indican que Ccr alcanza altas constantes catalíticas sincronizando sus sitios activos a través de diversas interacciones tanto intradímero, con las asociadas al bolsillo de unión de adenina (figura 3.2B), como interdímero, con los residuos E151, N157 y N218. La mutación de estos residuos disminuyó la actividad catalítica. La relación de  $k_{cat}/K_M$  es 3 órdenes de magnitud inferior para el sistema mutante triple, lo que indica que solo una de cada mil uniones del complejo enzima sustrato da paso a la formación del complejo de Michaelis-Menten, en comparación al sistema silvestre. La disminución en la velocidad de la apertura de la subunidad cerrada (CP1) junto con la pérdida del movimiento que podría acercar al sustrato y cofactor (CP2), relaciona los cambios conformacionales de la enzima con la disminución de la eficiencia catalítica del sistema triple

mutante. Una dinámica más lenta para el cambio conformacional de apertura y cerrado del sitio activo, puede asociarse con la disminución en la velocidad de generación de un complejo reactivo. Una menor capacidad de formación del complejo reactivo afecta directamente la capacidad de la enzima para dar paso a la reacción, lo cual se traduce en una menor eficiencia catalítica. Estos resultados permiten relacionar las conclusiones obtenidas a través de simulaciones computacionales con información cinética experimental.

En conjunto, el trabajo reveló las determinantes dinámico-estructurales que explican el aumento sustancial de velocidad de reacción alcanzada por la Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa a través de los movimientos coordinados de dominios catalíticos en comparación con reacciones catalíticas desincronizadas, es decir, en los cuatro monómeros de la mutante E151D/N157E/N218E. La estructura de rayos X de las formas APO, complejo binario y ternario de Ccr proveyeron los estados finales de los movimientos coordinados de dominios catalíticos. Un análisis de PCA de gran cantidad de simulaciones de dinámica molecular delinearon una imagen atomística de los movimientos acoplados, con un movimiento de apertura-cerrado del sitio activo y un movimiento de rotación que podría ayudar a la unión de sustrato y liberación del producto. La sincronización del sitio activo puede ser relacionada directamente a aminoácidos específicos en la interfaz del complejo y del bolsillo de unión del sustrato de CoA.

### **3.3. Unión de dióxido de carbono para pasos elementales del ciclo catalítico**

Previamente se caracterizó la dinámica conformacional de la enzima, el efecto que posee cada uno de los componentes de la reacción, cofactor y sustrato, y las estructuras representativas en solución para los diversos estados del ciclo catalítico. Para dar paso a la reacción, Ccr debe modificar la conformación de su subunidad, desde un estado abierto sin sustrato hacia uno cerrado formando el complejo de Michaelis-Menten. De manera complementaria, para la etapa de carboxilación, es necesario capturar la molécula de CO<sub>2</sub> al interior del sitio activo. Por lo tanto, la dinámica conformacional de la proteína puede cumplir un rol adicional a la formación del complejo reactivo. La unión de dióxido de carbono podría ser modulada por la dinámica de la enzima, logrando así modificar la disponibilidad de este compuesto tanto en los distintos sitios activos del sistema tetramérico, como en las diversas conformaciones de la subunidad.

Desde esta información estructural y dinámica de la proteína, se presentaron dos grandes interrogantes respecto al efecto que posee la conformación y la presencia de sustrato sobre la concentración de dióxido de carbono en la enzima. La primera de ellas es si existe influencia de la conformación de las subunidades de la enzima sobre la concentración de CO<sub>2</sub> en el sitio activo. La

segunda es si la presencia de sustrato sobre las subunidades en sus distintas conformaciones modifica la concentración de  $\text{CO}_2$ , mejorando o empeorando su unión.

Para abordar estas interrogantes se plantea un esquema donde se proponen posibles estados de una subunidad dentro del ciclo catalítico en la Figura 3.5. La primera etapa del esquema representa la unión de  $\text{CO}_2$  a un sistema donde la única diferencia entre sus subunidades es la conformación que adoptan. La subunidad puede diferenciarse entre conformaciones abiertas o cerradas bajo la presencia de NADPH. Esta etapa se relaciona con la primera interrogante, donde se plantea una dependencia conformacional de la concentración de  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, una subunidad cerrada no permitiría la unión del sustrato, lo que implica la no formación de un complejo reactivo y por lo tanto sería un camino inviable para la reacción (camino inferior de la Figura 3.5).

La segunda interrogante, si la presencia de sustrato en distintas conformaciones de la subunidad afecta la unión de  $\text{CO}_2$ , se representa en el camino superior del esquema de la Figura 3.5. La unión de  $\text{CO}_2$  puede ocurrir en la subunidad abierta con ausencia o presencia de sustrato, dando paso a la reacción al cerrar el sitio activo de manera consecutiva. Incluso, la unión de  $\text{CO}_2$  podría ser posterior al cambio conformacional del cerrado del sitio activo. Esta unión podría incluir la difusión hacia el sitio activo después de alcanzar su conformación cerrada.



Para responder estas interrogantes, se realizaron simulaciones computacionales de dinámica molecular en presencia explícita de moléculas de CO<sub>2</sub> con una concentración elevada, para así mejorar el muestreo de sus sitios de unión. Debido a la alta complejidad que implica el estudio acoplado de la dinámica conformacional y la unión de CO<sub>2</sub> sobre el complejo enzimático libre, se definieron conformaciones representativas para estados posibles dentro del ciclo catalítico por subunidad, discutido en el esquema de la Figura 3.5. La definición de los sistemas de simulación elegidos se discute en la sección 3.3.2.

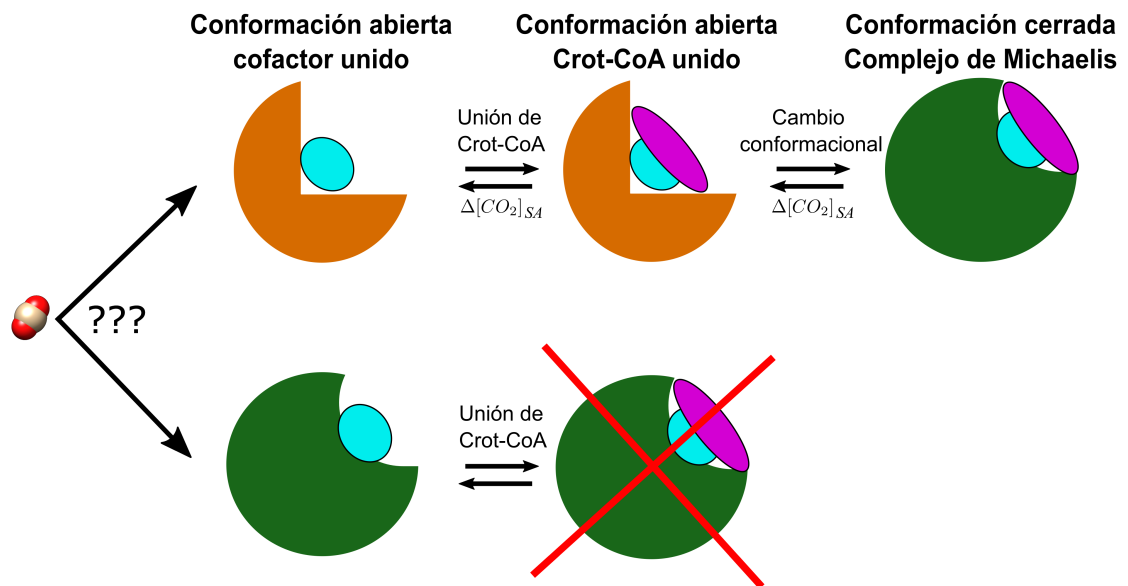


Figura 3.5: Esquema para las posibles fases de unión de CO<sub>2</sub> al sitio activo de Ccr. En anaranjado se representa el sitio activo abierto, en verde el sitio activo cerrado, en cian la molécula de NADPH y en magenta la molécula de crotonil-CoA

### 3.3.1. Validación de parámetros para CO<sub>2</sub>

Para estudiar la distribución de dióxido de carbono alrededor de la proteína y solvente, es esencial tener una descripción adecuada de las interacciones entre las moléculas de CO<sub>2</sub> y de agua y el ambiente proteico. Se realizaron cálculos de la energía libre de solvatación para la molécula de dióxido de carbono, tanto en agua como en un solvente orgánico que modele el carácter apolar del sistema proteico. En este trabajo se utilizó heptano para modelar el ambiente proteico, ya que se encontraron datos experimentales para la solubilidad de CO<sub>2</sub> en este solvente.<sup>84</sup> Con este fin, se hicieron cálculos de energía libre de solvatación de CO<sub>2</sub> utilizando dos conjuntos distintos de parámetros de campo de fuerza. Por un lado, los derivados por Panhuis<sup>85</sup> que reproducen el momento cuadrupolar de la molécula de dióxido de carbono y por otro lado, los parámetros obtenidos desde CGenFF<sup>77,78</sup> derivados directamente para su uso en campos de fuerza CHARMM. Para realizar los cálculos de energía libre se utilizó GROMACS 2019.3<sup>74</sup> con el modelo de agua TIP3P<sup>75</sup> de CHARMM, siguiendo el protocolo definido por Riquelme *et al.*<sup>86</sup> Parámetros para heptano fueron obtenidos desde CGenFF.

Los resultados presentados en la Tabla 3.2 muestran que ambos conjuntos de parámetros resultan en la misma energía libre de solvatación para heptano. Para la energía de hidratación, los parámetros obtenidos por Panhuis subestiman la interacción entre moléculas de CO<sub>2</sub> y solvente generando mayores

valores positivos. Los parámetros de CGenFF reproducen de mejor manera la interacción con el agua. Se compararon los coeficientes de partición (Log(P)) derivados para los cálculos de energía libre, con el calculado a partir de información experimental de solubilidad.<sup>84</sup> Los parámetros de CGenFF presentan una menor diferencia que los de Panhuis al compararlos con el valor obtenido experimentalmente. Se decidió utilizar los parámetros de CGenFF debido a que presentan menores diferencias para la energía libre de hidratación y el coeficiente de partición.

Tabla 3.2: Energía libre de solvatación para CO<sub>2</sub> obtenido mediante cálculos de energía libre y su coeficiente de partición respectivo. Datos experimentales obtenidos a 298K desde *Solvation Thermodynamics*.<sup>87</sup> Log(P)<sup>a</sup> fue calculado desde los datos de Takeuchi *et al.*<sup>84</sup>

| Parámetros CO <sub>2</sub> | $\Delta G_{\text{hid}}^{\circ}$ kJmol <sup>-1</sup> | $\Delta G_{\text{heptano}}^{\circ}$ kJmol <sup>-1</sup> | log(P)             |
|----------------------------|---|---|--------------------|
| Panhuis                    | 2.6 ± 0.1   | -2.6 ± 0.2  | 0.91 ± 0.01        |
| CGenFF                     | 0.7 ± 0.2   | -2.4 ± 0.1  | 0.54 ± 0.01        |
| Experimental               | 0.469   | -   | 0.225 <sup>a</sup> |

### 3.3.2. Definición de conformaciones representativas para la unión de CO<sub>2</sub> en etapas elementales del ciclo catalítico

Basado en los estados de protonación más probables para H365 discutidos en secciones anteriores, se contruyeron los sistemas para analizar la concentración de dióxido de carbono en los sitios activos. Se partió desde

la estructura cristalina reportada para Ccr (PDB ID 6NA4) generando tres configuraciones distintas. El complejo binario, que solo posee NADPH en los sitios activos abiertos o cerrados con sus respectivas H365 monoprotionadas, el complejo ternario que posee NADPH en sus cuatro subunidades, tiene crotonil-CoA en sus subunidades cerradas en las cuales H365 esta doblemente protonada y el sistema ternario *in silico*, el cual posee NADPH y crotonil-CoA en sus cuatro subunidades con todas sus H365 doblemente protonadas (vease Figura 3.6).

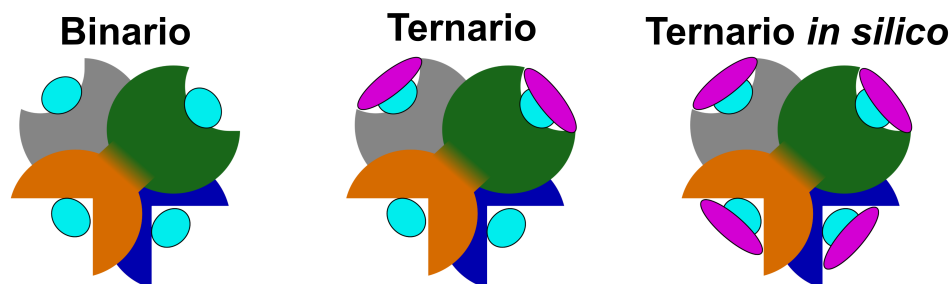


Figura 3.6: Representación de los sistemas de simulación. Sistema Binario no posee ninguna molécula de crotonil-CoA unida a los sitios activos (PDB ID 6NA6). Sistema Ternario solo presenta moléculas de crotonil-CoA en las subunidades cerradas (PDB ID 6NA4). Sistema Ternario *in silico* presenta moléculas de crotonil-CoA modeladas en los sitios abiertos (PDB ID 6NA4)

Todas las simulaciones siguieron el protocolo de preparación mencionado anteriormente a excepción de la caja de simulación. Para simplificar el posterior análisis de la trayectoria se utilizó una caja cúbica. Las moléculas de CO<sub>2</sub> fueron descritas con los parámetros obtenidos desde CGenFF. Después de la equilibración inicial, 100 moléculas de CO<sub>2</sub> fueron añadidas reempla-

zando moléculas de agua en caso de ser necesario. Para mejorar el muestreo, las simulaciones presentaron aproximadamente 60 veces la concentración experimental de  $\text{CO}_2$  ( $C_{\text{sim}} = 55\text{mM}$ ).<sup>22</sup> Se repitió la fase de minimización y equilibración ahora con presencia de las moléculas de  $\text{CO}_2$ .

Después de equilibrar la presión, simulaciones de producción en el colectivo canónico (NVT) fueron realizadas manteniendo restricciones de posición sobre los carbonos alfa y átomos pesados de NADPH para mantener fija la conformación inicial del sistema. Restricciones sobre interacciones específicas para cada sistema fueron añadidas en esta etapa. Para el sistema binario, las distancias entre los residuo R276 de cada subunidad con el fragmento de adenina del NADPH fue restringido a su valor inicial. Para el sistema ternario, se restringieron a su valor inicial las distancias entre R99 de las subunidades cerradas y el grupo fosfato de crotonil-CoA, R303 y el fragmento de adenina de crotonil-CoA, el carbono reactivo del crotonil-CoA  $C_\beta$  con  $C_4$  del NADPH y H409 con el grupo fosfato del NADPH para las subunidades cerradas. Para el sistema ternario *in silico*, se añadieron todas las restricciones mencionadas para el sistema ternario, además de restringir la posición de las moléculas de crotonil de las subunidades abiertas. Se demostró previamente que en las subunidades abiertas, el crotonil-CoA es altamente móvil, lo que no permitiría estudiar el paso específico donde sustrato y cofactor se encuentran en posición previo al cerrado del sitio activo. Estas restricciones fueron necesarias para estudiar la distribución de  $\text{CO}_2$  en pasos definidos del

ciclo catalítico. Se realizaron múltiples réplicas generando un total de hasta 20  $\mu\text{s}$  de tiempo de simulación acumulado para cada sistema. Las coordenadas fueron guardadas cada 100ps resultando en hasta  $2 \times 10^5$  configuraciones disponibles para el análisis.

Las configuraciones obtenidas a través de las simulaciones computacionales fueron utilizadas para analizar la distribución de dióxido de carbono y sus sitios de unión alrededor de la proteína y sus sitios activos. Para ello se expandieron las posiciones de los átomos de las moléculas de  $\text{CO}_2$  presentes en las trayectorias como densidades atómicas. Estas densidades fueron construidas utilizando gaussianas con coeficientes ajustados a factores de dispersión atómica experimentales (*scattering factors*), utilizando las herramientas de análisis *gromaps*<sup>64</sup>. Se compararon las concentraciones de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo para los estados abiertos y cerrados en presencia y ausencia del sustrato. Para ello se definió el sitio activo como una zona que contuviera a los 4 residuos de interés asociados a la reacción química,<sup>22</sup> junto a las zonas reactivas de NADPH y sustrato. Esta representación del sitio activo se encuentra enmarcada en la Figura 3.7.

Se definió el exceso/reducción de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo en comparación a la solución. Para ello se calculó la razón de concentraciones entre el sitio activo y la solución. La concentración en solución corresponde al número de moléculas de  $\text{CO}_2$  que se encuentran en el volumen accesible del solvente VAS en la caja de simulación. Para la concentración

del sitio activo, se obtiene el número de moléculas de CO<sub>2</sub> que se encuentran dentro del sitio activo y se divide por el VAS del sitio activo. Todas estas propiedades son derivadas a través de mapas de densidad atómica obtenidos en ventanas de 100ns para las simulaciones de los distintos sistemas. Una descripción detallada del proceso se presenta en la sección 2.5.

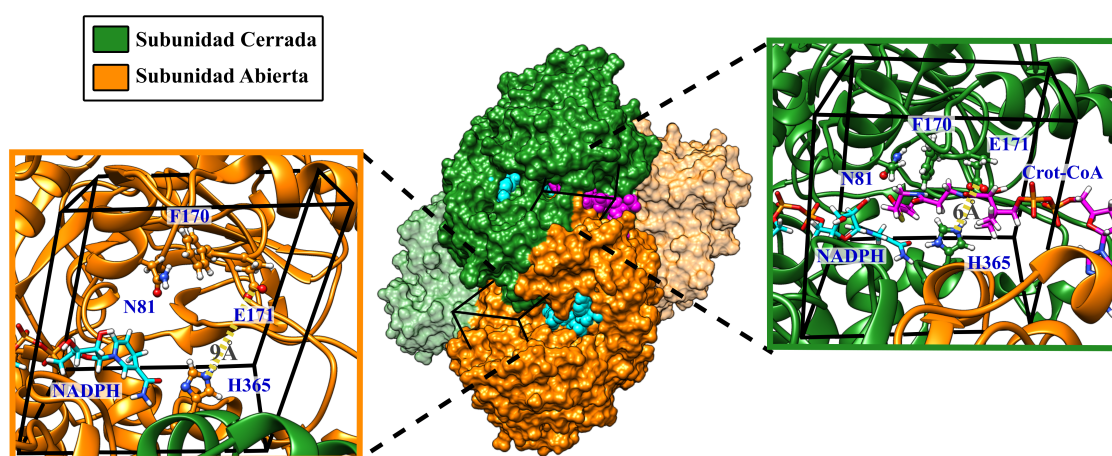


Figura 3.7: Estructura cristalina de Ccr (PDB ID 6NA4) en una configuración de dímero de dímeros con una subunidad abierta y una subunidad cerrada (anaranjada y verde, respectivamente). Un acercamiento al sitio activo para las subunidades abierta y cerrada, muestran los residuos N81, F170, E171 y H365. Una caja negra rodea el volumen del sitio activo usado para el análisis de la concentración local de CO<sub>2</sub>. Se muestra el NADPH en bastones cian y el crotonil-CoA en bastones magenta.

Para definir sitios de unión se utilizaron nuevos mapas de densidad obtenidos con las secciones de las trayectorias que presentaron un exceso mayor al doble para la razón de concentración. Se utilizaron estas secciones de la trayectoria para así seleccionar configuraciones donde el dióxido de carbono se encuentre unido al sitio activo. Los sitios de unión fueron definidos utilizando el volumen que utiliza la isosuperficie de la concentración de CO<sub>2</sub>

que tienen un valor 20 veces mayor que la concentración en solución (Figura 2.3). Los centros de los volúmenes definen el centro del sitio de unión mostrados en las Figuras 3.8, 3.10 y 3.11. Para una información más detallada del método utilizado ver la sección 2.5.

### **3.3.3. Dependencia conformacional en la unión de CO<sub>2</sub> al sitio activo**

Para estudiar las distintas variables asociadas al funcionamiento de Ccr, se planteó como interrogante si existe alguna dependencia de la distribución de CO<sub>2</sub> con la conformación que presentan las subunidades en el sitio activo del ciclo catalítico que fueron observadas en las estructuras cristalinas.

Para responder a esta pregunta se analizó el sistema binario, donde la única diferencia que poseen los distintos sitios activos es la conformación de la subunidad. Al analizar las concentraciones relativas de las subunidades abiertas y cerradas (Figura 3.8), se notó la existencia de un exceso de CO<sub>2</sub> para ambos estados conformacionales de la subunidad comparado con el solvente. Al comparar entre sitios, se puede notar que existe un exceso mayor sobre el sitio cerrado en comparación al sitio abierto. Al analizar los sitios de unión de CO<sub>2</sub> para la subunidad abierta, ellos se encuentran en zonas expuestas al solvente alejados de los residuos N81 y H365. Se ha demostrado que estos residuos son muy importantes para la reacción de carboxilación.<sup>22</sup> Para la subunidad cerrada, existen sitios de unión profundos que se superponen con



la posición que toma el sustrato en el complejo ternario. Uno de los sitios más profundos corresponde a la zona de unión para la cola hidrofóbica del crotonil-CoA, sitio que permitiría una unión favorable para el CO<sub>2</sub>, lo que podría explicar la alta afinidad del CO<sub>2</sub> por esta configuración específica de la subunidad.

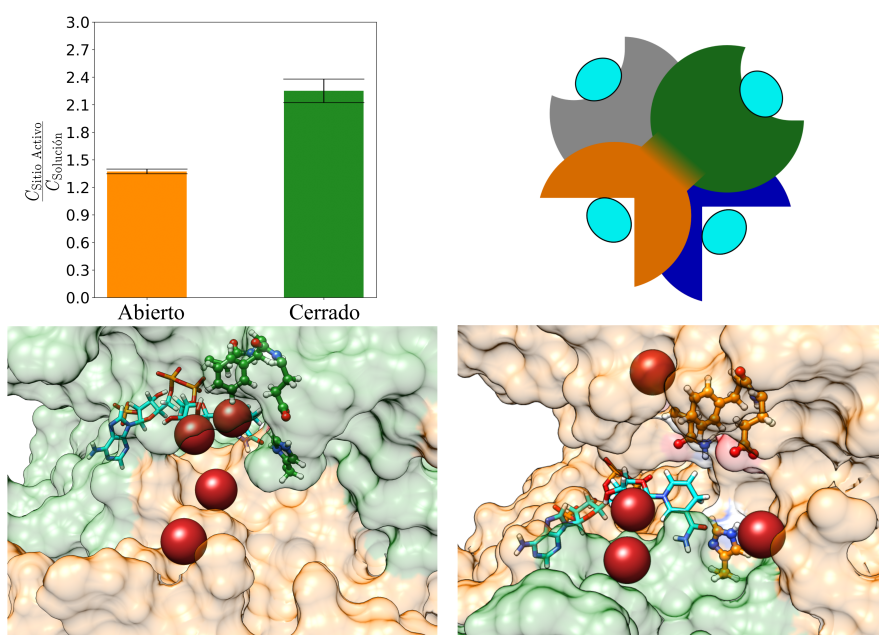


Figura 3.8: Arriba: Razón de concentración de CO<sub>2</sub> para la subunidad abierta y cerrada del sistema binario junto al esquema del sistema de simulación. Abajo: Sitios de unión de CO<sub>2</sub> más probables para las subunidades cerrada y abierta respectivamente (esferas color rojo oscuro). Se muestra el NADPH en bastones cian.

Desde estos resultados se puede concluir que el estado conformacional de la subunidad modifica la concentración local de CO<sub>2</sub> en el sitio activo para el complejo binario, siendo el estado cerrado el más favorable para la unión de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, la subunidad cerrada sin sustrato, no representa una

conformación catalíticamente activa, ya que no es posible unir el sustrato si la subunidad se encuentra cerrada (ver Figura 3.5). Para entender las etapas que debe seguir el  $\text{CO}_2$  previo a su unión sobre el complejo de Michaelis-Menten, se analizó el camino superior del ciclo postulado en la Figura 3.5, donde se descartó el sistema binario y se estudiaron los sistemas ternario y ternario *in silico*.

De forma paralela al estudio de la distribución de  $\text{CO}_2$  para las distintas conformaciones de las subunidades en el ciclo catalítico, se generó una colaboración con investigadores de Alemania quienes descubrieron que Ccr posee una capacidad similar a la anhidrasa carbónica, siendo capaz de catalizar las reacciones de formación y consumo de bicarbonato desde  $\text{CO}_2$ . Se encontró que posee una huella espectroscópica muy similar a la anhidrasa carbónica,<sup>88</sup> la cual basa su actividad en la activación de una molécula de agua a través de la formación del ion hidroxilo en el sitio activo de la enzima. Sin embargo, la actividad de formación de bicarbonato se ve fuertemente disminuída por la presencia de sustrato o producto de reducción, crotonil-CoA y butiril-CoA respectivamente. Esta disminución se muestra claramente en el gráfico de barras izquierdo de la Figura 3.9A. Para dar una explicación microscópica a esta observación experimental, se estableció un trabajo colaborativo teórico-experimental,<sup>67</sup> el cuál puede servir como validación para las simulaciones en presencia de  $\text{CO}_2$  y el posterior modelado de su distribución alrededor de los sistemas modelo.

### 3.3.4. Descubrimiento y análisis de la actividad de anhidrasa carbónica de Ccr

La catálisis para la formación de bicarbonato desde  $\text{CO}_2$  es denominada actividad de anhidrasa carbónica y está principalmente asociada a metaloenzimas. Su nombre se debe a la anhidrasa carbónica, enzima que utiliza iones  $\text{Zn}^{2+}$  para activar una molécula de agua coordinada, la cual posteriormente da paso a la reacción junto a una molécula de dióxido de carbono. Sin embargo, en el año 2021 se reportó la existencia de anhidrasas carbónicas sin metales, asociando su actividad a componentes completamente orgánicos.<sup>89</sup>

Al estudiar la reacción de carboxilación sobre Ccr a través de un nuevo método basado en espectroscopía infrarroja (FTIR) desarrollado por Stripp *et al.*,<sup>38</sup> se descubrió la capacidad intrínseca de anhidrasa carbónica que posee la Ccr. Este método se basa en espectroscopía infrarroja de diferencia utilizando una fina capa de proteína formada en la superficie del cristal de silicio de una celda óptica de reflectancia total atenuada (ATR). Esto permite a la proteína responder a los cambios que ocurren en la fase gaseosa. La reacción con  $\text{CO}_2$  puede ser gatillada a través de la fase gaseosa, haciendo pasar un flujo de gas que cambia desde no reactivo ( $\text{N}_2$ ) hacia una mezcla con  $\text{CO}_2$ . Debido a la gran intensidad de las señales asociadas a la cadena peptídica de la proteína, se realiza un espectro de diferencia entre el sistema en ausencia de la mezcla reactiva de gases y su posterior espectro en reacción.

Se utilizó el sistema silvestre APO como referencia, el cual tuvo la máxima actividad de anhidrasa carbónica (izquierda 3.9A). La presencia de cofactor no genera un efecto significativo sobre la formación de bicarbonato. En cambio, la presencia de crotonil-CoA y butiril-CoA disminuyó la actividad de anhidrasa carbónica en un 70 y 85 % respectivamente. Al analizar mutaciones sobre los residuos claves del sitio activo<sup>22</sup> (derecha Figura 3.9A), se encontró que mutaciones sobre N81 y F170 no disminuyeron la actividad de anhidrasa carbónica. Mutaciones sobre los residuos E171 y H365 disminuyeron la actividad en un 50%. En la conformación cerrada de la subunidad, estos residuos están conectados por una molécula de agua ( $\mu W$ ) y se especula que pueden cumplir la función de activar esta molécula de agua generando un ión hidroxilo a través de una red de transferencia de hidrógeno con el solvente. Al realizar mutaciones para E171 y H365 la disminución en la actividad aumenta hasta un 75%. Esto demostraría la dependencia de la actividad de anhidrasa carbónica con estos dos residuos E171 y H365.

Para racionalizar la inhibición observada sobre la actividad de anhidrasa carbónica a través de la unión de sustrato, utilizamos las simulaciones de dinámica molecular en presencia de  $CO_2$  de los sistemas de Ccr propuestos anteriormente. La enzima es un tetrámero con reactividad parcial de sitios y existe como dímeros con una subunidad cerrada y una abierta (Figura 3.7). Para estas simulaciones, se calculó la energía libre de unión de  $CO_2$  para las subunidades abiertas y cerradas. Notablemente, residuos del sitio activo

H365 y E171, que son asociados a la actividad de anhidrasa carbónica, adoptan diferentes geometrías en las conformaciones cerrada y abierta. Realizar mutaciones sobre estos residuos disminuye notablemente su actividad de formación de bicarbonato como se muestra en el panel derecho de la Figura 3.9A. Al comparar la subunidad cerrada con la subunidad abierta, la distancia entre E171 y H365 es  $3\text{\AA}$  más corta en la subunidad cerrada, y posee una molécula de agua conservada  $\mu\text{W}$  la cual conecta ambos residuos a través de enlaces de hidrógeno.

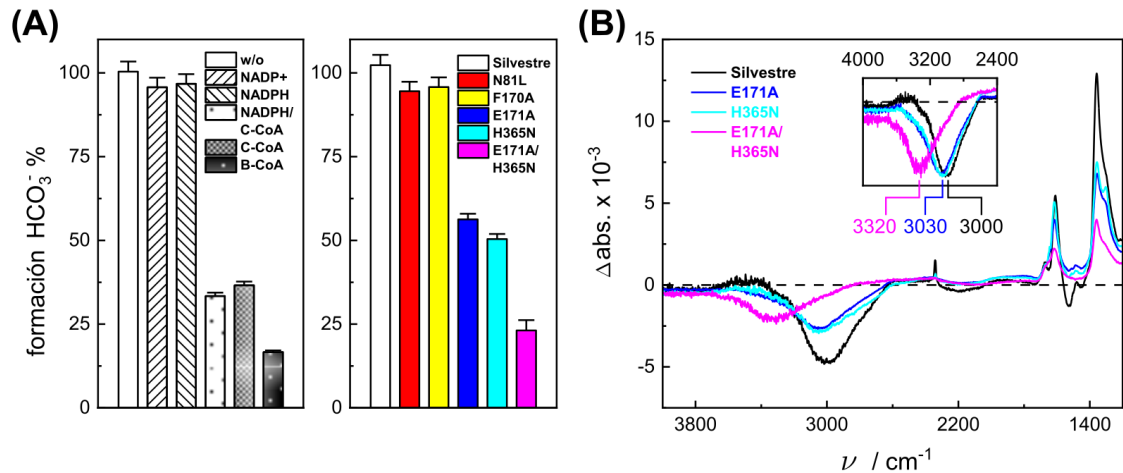


Figura 3.9: Actividad de formación de bicarbonato para Ccr silvestre y mutantes. (A) El área del peak de formación de bicarbonato después de 60 s en presencia de una mezcla gaseosa 10%  $\text{CO}_2/\text{N}_2$  es fijada como el 100% para el sistema Ccr silvestre (WT) el cual es comparado para diferentes condiciones (panel izquierdo) y con diversas variantes en el sitio activo (panel derecho) de acuerdo a la leyenda del gráfico de barras. (B) Espectro FTIR ' $\text{CO}_2\text{-N}_2$ ' de diferencia después de 60 s destacando diferencias cuantitativas entre los sistemas silvestre y variante seleccionados. El recuadro muestra un desplazamiento hacia mayores números de onda de la banda de agua (escalada), el cual es claramente más visible para el sistema E171A/H365N.

Como comparación, el complejo binario presenta geometrías similares para ambos residuos en las subunidades abiertas y cerradas. El residuo H365 puede actuar como una base en su forma neutra monoprotonada, iniciando la sustracción del protón sobre el agua  $\mu\text{W}$ , así formando el  $\text{OH}^-$  para la siguiente reacción de hidratación. En la sección 3.1 se determinaron los estados de protonación de este residuo a través de cálculos de  $\Delta\text{p}K_a$  (ver Tabla 3.1). Para el sitio abierto, el cambio de  $\text{p}K_a$  es negativo, indicando que H365 permanecería en un estado monoprotonado. Para la subunidad cerrada sin el sustrato también se obtuvo un cambio negativo. La presencia de sustrato generó un cambio de  $\text{p}K_a$  positivo, probablemente debido a interacciones favorables de H365 con los grupos fosfatos negativamente cargados de crotonil-CoA. Así H365 se encuentra monoprotonado en los sitios activos vacíos, siendo capaz de iniciar la abstracción del protón del agua  $\mu\text{W}$ . En la presencia del sustrato, es muy probable que H365 cambie su estado de protonación, así suprimiendo la actividad de anhidrasa carbónica.

De manera adicional al efecto de la protonación de la histidina, los sitios de unión del sitio activo también juegan un rol importante para la disminución de la actividad de anhidrasa carbónica. Para entender la influencia de los cambios conformacionales y la presencia del sustrato sobre el  $\text{CO}_2$ , se utilizaron las simulaciones para los sistemas definidos previamente. Desde la razón de concentración de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo y el solvente, se calculó la energía libre de unión de  $\text{CO}_2$  al sitio activo para las subunidades abiertas y cerradas

del complejo binario y ternario según la ecuación 2.27.

Los cálculos muestran que la energía libre de unión de  $\text{CO}_2$  en la subunidad cerrada con sustrato (complejo ternario) es positiva, mientras que la subunidad cerrada sin sustrato (complejo binario) presenta la mayor afinidad por el  $\text{CO}_2$ , duplicando la probabilidad de encontrar una molécula de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo en comparación al solvente (Figura 3.10A). La subunidad abierta del complejo ternario muestra un incremento significativo en la afinidad de  $\text{CO}_2$  respecto a su par del complejo binario. Sin embargo, la distancia entre los grupos H365 y E171 es mayor en el sitio abierto, sin una molécula de agua que funcione de puente entre ellos sugiriendo una disminución en la actividad catalítica de anhidrasa carbónica.

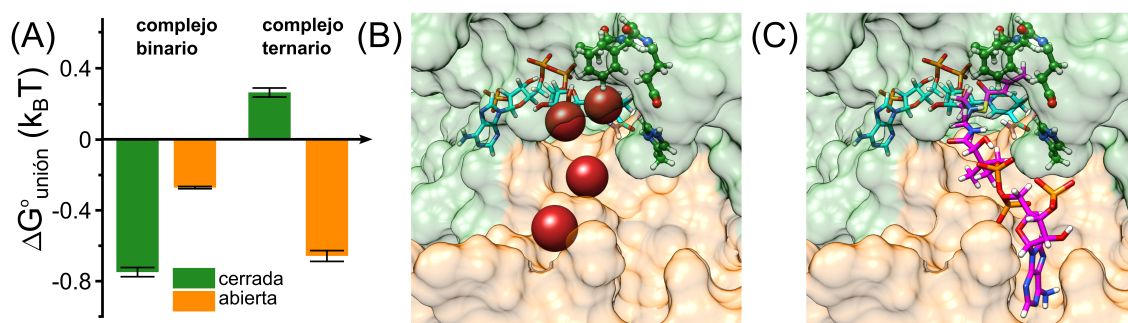


Figura 3.10: Unión de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo de Ccr. (A) Energía libre de unión de  $\text{CO}_2$  ( $k_B T$ ) en la subunidad cerrada y abierta del complejo binario con NADPH (PDB ID 6NA6, izquierda) y el complejo ternario con NADPH y crotonil-CoA (PDB ID 6NA4, derecha) obtenidas desde simulaciones de dinámica molecular. (B) Sitios de unión más probables para el  $\text{CO}_2$  en el sitio activo cerrado del complejo binario representados como esferas rojo oscuro. (C) Imagen representativa del complejo ternario donde el sustrato ocupa la posición de los sitios de unión  $\text{CO}_2$ . Se muestra el NADPH en bastones cian y el crotonil-CoA en bastones magenta y residuos claves se muestran en bastones verdes.

Al enfocarse en los sitios de unión de dióxido de carbono para el sitio activo cerrado sin sustrato, el cual presenta la mayor afinidad, se puede notar que sus sitios de unión conectan el interior del sitio activo con el solvente. Adicionalmente, los sitios de unión que se encuentran más profundo en el sitio activo se ubican próximos a H365, la molécula de agua conservada  $\mu W$  y E171. Notablemente el sustrato, dentro del complejo ternario, ocupa las mismas posiciones de los sitios de unión asociados al  $CO_2$  en el complejo binario.

Las simulaciones muestran que la subunidad cerrada del complejo binario tiene la mayor afinidad de unión para el  $CO_2$ . Al simular el sistema con el sustrato unido a la subunidad cerrada, la afinidad del sitio cerrado disminuye generando una reducción en la concentración de  $CO_2$ . De manera sorprendente, el sitio abierto sin sustrato se vuelve el más afín para este sistema. Los sitios de unión de  $CO_2$  en la subunidad cerrada del sistema binario están cercanos a H365 y a la molécula de agua conservada  $\mu W$ , de forma que el estado mono-protonado de H365 es capaz de abstraer el protón desde  $\mu W$  para formar el ión hidroxilo nucleofílico. Se espera que la ausencia de NADPH o  $NADP^+$  no afecte la unión de  $CO_2$  o el estado de protonación de H365 ya que el cofactor no se une directamente a los sitios de unión de sustrato. En contraste, la presencia de crotonil-CoA o butiril-CoA en el complejo ternario incrementa el  $pK_a$  de un posible aceptor de protones H365, así eliminando su habilidad de activar el agua  $\mu W$  a través de una transferencia de protón y simultáneamente



suprimir la unión de CO<sub>2</sub>. Esto puede explicar la observación experimental de reducción de actividad de anhidrasa carbónica y estaría en línea con el hecho de que el complejo ternario de la enzima promueve la fijación de CO<sub>2</sub> y no la actividad de anhidrasa carbónica.

Para este trabajo colaborativo, se aplicó espectroscopía in situ ATR FTIR de diferencia<sup>38</sup> y simulaciones computacionales para investigar y entender la interacción de la Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa con CO<sub>2</sub>. Sorpresivamente, los resultados muestran que Ccr posee una actividad reversible de anhidrasa carbónica. Esta reacción es suprimida fuertemente en la presencia de crotonil-CoA, el sustrato natural de la enzima. Simulaciones de dinámica molecular revelaron cómo crotonil-CoA suprime la unión de CO<sub>2</sub> e identifica a H365 como un posible aceptor de protón para la hidratación del CO<sub>2</sub>. Al comparar la Ccr silvestre con las variantes H365N y E171A se pierde un 50% de actividad anhidrasa carbónica (ver Figura 3.9A). Ambas mutantes pierden la capacidad para formar una red de enlaces de hidrógeno con H365 a través de la molécula de agua intersticial ( $\mu$ W). Esta última tiene contacto con una red de moléculas de agua que facilitarían el contacto con el agua de la solución. Para la mutante H365N la actividad catalítica remanente podría explicarse por la protonación del ácido glutámico 171, el cual podría modificar su  $pK_a$  al ser el único aceptor de protones disponible. Al realizar estas mediciones sobre el sistema doble mutante H365N/E171A, la huella espectroscópica de la actividad anhidrasa carbónica se pierde completamente como

se muestra en la Figura 3.9B. La señal característica de iones hidroxilo se desplaza hacia mayores números de onda y se relaciona con el comportamiento que posee el solvente sobre una unidad biológica no catalítica, como el sistema de albúmina de suero bovino o RuBisCO utilizadas en este trabajo como referencia.<sup>67</sup>

### 3.3.5. Efecto del sustrato sobre la unión de CO<sub>2</sub>

Cerrando el capítulo de colaboración sobre la actividad anhidrasa de Ccr y la validación del método computacional, se retoma la segunda interrogante propuesta. Cuál es el efecto de la unión de sustrato en la concentración de dióxido de carbono para los sistemas ternario y ternario *in silico*, representativos de los estados de la subunidad abierto(-) junto a cerrado(+) y abierto(+) junto a cerrado(+) respectivamente. Siguiendo el esquema de la Figura 3.5 ¿podrían los sitios de unión para la subunidad abierta verse modificados por la presencia de sustrato?

Al comparar la razón de concentraciones para las subunidades cerradas de los sistemas ternario y ternario *in silico* (Figura 3.11), podemos notar que no existe diferencia entre sus concentraciones, lo que implica que la presencia de sustrato en el sitio abierto no tiene un efecto significativo sobre la concentración de CO<sub>2</sub> del sitio cerrado. Al comparar la razón de concentraciones de los sitios abiertos, se puede apreciar que la presencia del sustrato disminuye la concentración de CO<sub>2</sub> sobre este sitio. Este efecto está asociado, en gran

parte, a la pérdida del sitio de unión de NADPH. Esto se relaciona con la modificación de la conformación de su fracción de nicotinamida debido a la presencia del sustrato (Figura 3.11). Se presenta un resumen para las energías libres de unión de los sistemas binario, ternario y ternario *in silico* en la Figura 3.12.

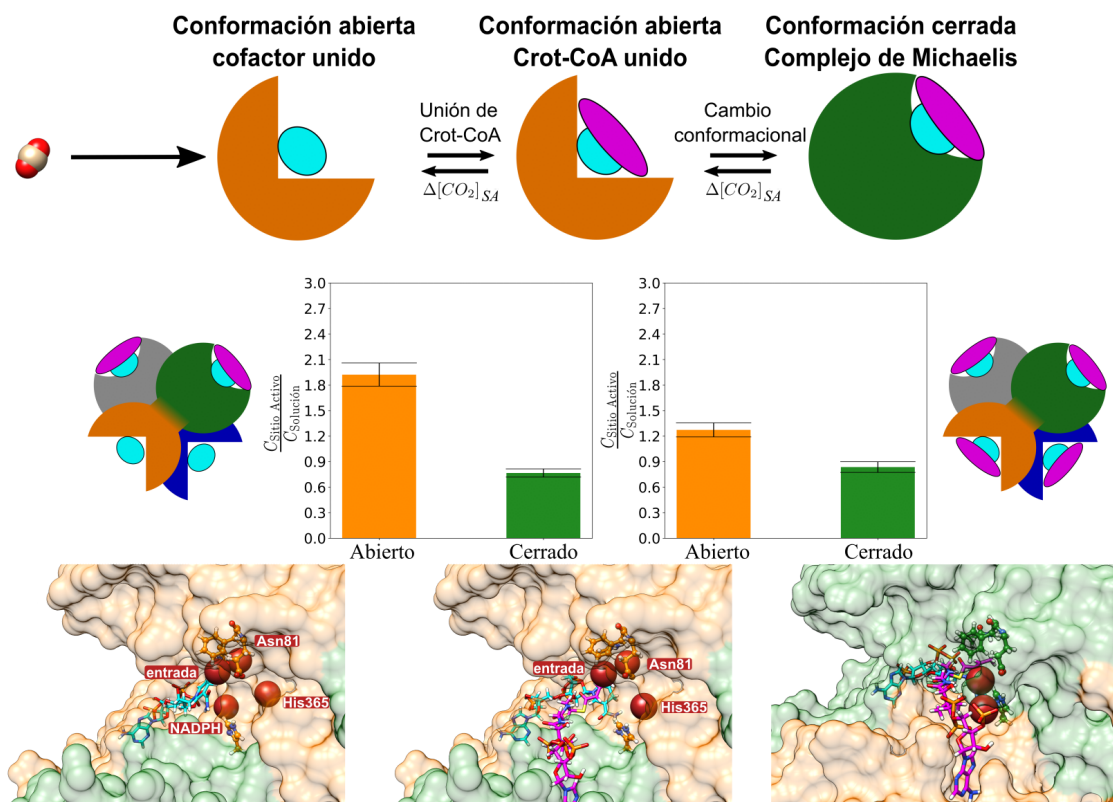


Figura 3.11: Arriba: Posibles pasos del ciclo catalítico donde el CO<sub>2</sub> puede unirse al sitio activo. Medio: Concentración de CO<sub>2</sub> en la subunidad abierta y cerrada para los sistemas ternario y complejo ternario *in silico* esquematizados en los extremos. Abajo: Sitios de unión de CO<sub>2</sub> más probables para las subunidades abierta sin sustrato, abierta con sustrato y cerrada con sustrato respectivamente (esferas color rojo oscuro). Se muestra el NADPH en bastones cian y el crotonil-CoA en bastones magenta.

Cuando comparamos los sitios de unión para el estado abierto sin sustrato del sistema ternario, Figura 3.11, con su símil del sistema binario Figura 3.8, podemos notar que los sitios de unión para el sistema ternario se encuentran más profundo dentro del sitio activo llegando a los residuos de interés N81 y H365. Al centrarnos en los sitios de unión para la subunidad abierta del sistema con o sin sustrato (Figure 3.11), se puede notar que ambos comparten estos sitios de unión cercanos a los residuos de interés. Sin embargo, los sitios de unión de la subunidad cerrada se encuentran alejados de estos residuos de interés, lo que sugiere que la molécula de  $\text{CO}_2$  debe unirse al sitio activo previo al cambio conformacional de cerrado de la subunidad. No obstante, esto es válido solamente si la molécula de  $\text{CO}_2$  permanece unida un tiempo mayor al tiempo necesario para realizar el cambio conformacional de cerrado del sitio activo. En el próximo capítulo se cuantificó la escala de tiempo de los procesos de unión de  $\text{CO}_2$  para los diversos sitios activos y el cambio conformacional de cerrado, para poder proponer una secuencia clara para el ciclo catalítico de Ccr.

### **3.3.6. Análisis cinético de la unión de $\text{CO}_2$**

El análisis de la termodinámica de unión demuestra que las moléculas de  $\text{CO}_2$  se unen preferentemente al sitio activo abierto en posiciones cercanas a H365 y N81. Estas posiciones permanecen presentes incluso con la unión del sustrato. Como siguiente paso, estudiamos el efecto de la unión de sustrato

sobre el tiempo de residencia de  $\text{CO}_2$ . Mayores tiempos de residencia le darían a la enzima el tiempo necesario para que el sitio activo se cierre e inicie la reacción.

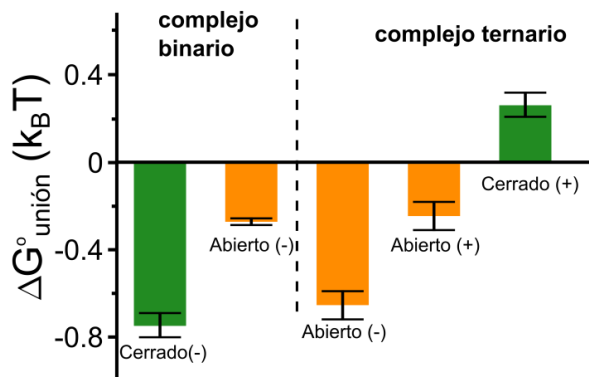


Figura 3.12: Energía libre de unión de  $\text{CO}_2$  ( $k_B T$ ) para el complejo binario, ternario y ternario *in silico* en las conformaciones del sitio activo abierto(-), abierto(+) y cerrado(+). Barras de error estimadas con análisis de *bootstrap*.

Para estudiar este efecto se calculó el tiempo promedio que una molécula de  $\text{CO}_2$  permanece unida en cada sitio según lo descrito en la Sección 2.5.2 de la metodología. Tiempos de residencia son presentados en la Tabla 3.3. Los sitios de unión cercanos a la entrada del sitio activo y por ende más expuestos al solvente, presentaron los menores tiempos de residencia. Esto se debe a la posibilidad de un rápido intercambio con el solvente. El sitio de unión cercano a NADPH en el sitio abierto(-) tiene el tiempo de residencia más largo. Interesantemente, la unión del sustrato incrementa el tiempo de residencia cerca al residuo de H365, donde el  $\text{CO}_2$  está posicionado de manera ideal para atacar el enolato una vez que se ha formado. El sitio de unión

cercano a N81 presenta tiempos de residencia de varios nanosegundos y se ve levemente reducido con la unión de sustrato.

Tabla 3.3: Tiempos de residencia promedio ( $\tau$ ) en nanosegundos obtenidos para los sitios de unión mostrados en la Figura 3.11, la estimación del error fue obtenida a través de un análisis de *bootstrap*.<sup>65</sup>

| Sitios de unión  | Asn81     | His365      | NADPH       | entrada       |
|------------------|-----------|-------------|-------------|---------------|
| WT Abierto (-)   | $8 \pm 2$ | $11 \pm 2$  | $56 \pm 17$ | $0.2 \pm 0.1$ |
| WT Abierto (+)   | $5 \pm 2$ | $68 \pm 16$ | -           | $0.2 \pm 0.1$ |
| N81L Abierto (+) | -         | -           | -           | $1.3 \pm 0.1$ |

Se debió comparar el tiempo de residencia para los sitios Asn81 y His365, con el tiempo necesario para realizar el cambio conformacional de cerrado del sitio activo. Esto es necesario para determinar si la molécula de CO<sub>2</sub> es capaz de permanecer unida durante el cambio conformacional en un sitio de unión alcanzado previo a este. Para ello se estimó el tiempo requerido para cerrar el sitio activo.

Se consideró la dinámica conformacional del complejo ternario con sustrato en sus dos sitios activos cerrados, sistema que fue utilizado para la determinación de la distribución de iones K<sup>+</sup>. La constante cinética de primer orden para la apertura de la subunidad del complejo ternario es de  $3.20 \pm 0.01 \times 10^{-2} \text{ ns}^{-1}$  (Figura 3.13). Esta constante se obtuvo a través del mismo procedimiento utilizado para comparar la apertura para los sistemas binarios silvestre y triple mutante. El sistema binario muestra una apertura más rápida que el ternario, constante cinética  $1.22 \pm 0.02 \times 10^{-1} \text{ ns}^{-1}$ , evidenciando el

efecto que tiene la presencia de sustrato sobre la estabilidad de la conformación cerrada. Los tiempos de vida media correspondientes a la apertura de los complejos binario y ternario son de 5.7 y 21.7 ns, respectivamente.

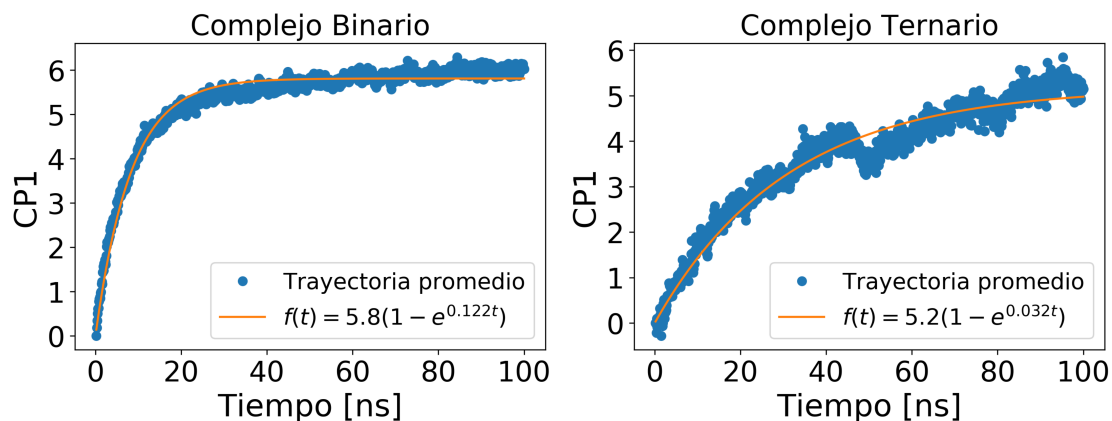
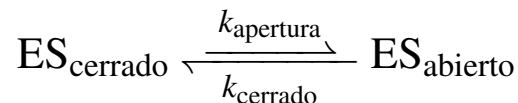


Figura 3.13: Ajuste de modelo cinético para la apertura de la subunidad cerrada, descrita por PC1, para los sistemas binario y ternario silvestre.

Los cambios conformacionales en Ccr son esenciales para la función de la proteína. Ellos son utilizados para fijar el sustrato previo a la reacción y liberar los productos posteriormente. En presencia del sustrato la enzima cambia su conformación entre estados abiertos y cerrados alcanzando el equilibrio entre los estados termodinámicos  $ES_{\text{cerrado}}$  y  $ES_{\text{abierto}}$  descritos por



Se obtuvo la constante de apertura desde el modelado cinético del sitio activo en el complejo ternario  $k_{\text{apertura}} = 3.2 \times 10^{-2} \text{ ns}^{-1}$ . Para estimar la constante de cerrado se utilizó el principio de la reversibilidad microscópica, la

definición cinética de la constante de equilibrio y una estimación del valor de la constante de equilibrio  $K$ .

$$K = \frac{\text{prob}(\text{ES}_{\text{abierto}})}{\text{prob}(\text{ES}_{\text{cerrado}})} = \frac{k_{\text{apertura}}}{k_{\text{cerrado}}} \quad (3.2)$$

$$k_{\text{cerrado}} = \frac{k_{\text{apertura}}}{K} \quad (3.3)$$

Desde las estructuras cristalinas se sabe que la subunidad con el análogo de sustrato unido estabiliza la conformación cerrada en vez de la conformación abierta presente en la estructura APO. Basado en esta información, el estado  $\text{ES}_{\text{cerrado}}$  debe ser más estable, representado por una constante de equilibrio termodinámica menor que uno, debido a una mayor probabilidad del estado cerrado. Con esta información es posible concluir que la dinámica de cerrado es más rápida que la de apertura.

A través de este modelo simple se puede estimar la constante de cerrado junto a su tiempo de vida media para varios valores de la constante de equilibrio (ver Tabla 3.4). Se asume que la magnitud en la diferencia de energía libre entre ambos estados corresponde a múltiplos de la energía térmica del sistema ( $RT$ ). Bajo este supuesto, se calculó la constante de equilibrio  $K$  para valores de  $\Delta G^o$  en un rango entre 0.0 y 3.0  $RT$ .

Utilizando la constante de apertura estimada previamente se calcularon tiempos de vida media entre 1 y 22 ns para el cerrado del sitio activo. Estos



tiempos de vida media dependen del valor seleccionado para la constante de equilibrio entre los estados abierto y cerrado de la subunidad. Ambos valores límites son considerablemente más cortos que el tiempo de residencia de CO<sub>2</sub> en el sitio de unión H365 del sistema silvestre abierto(+), indicando que el cambio conformacional ocurre más rápido que la liberación de CO<sub>2</sub>.

Tabla 3.4: Constantes de primer orden en [ $\times 10^{-2}$  ns<sup>-1</sup>] y tiempos de vida media en [ns] para la apertura y el cerrado del sitio activo del sistema ternario. Las constantes de cerrado fueron obtenidas utilizando diferentes valores para la constante de equilibrio del cambio conformacional. La constante de equilibrio fue estimada describiendo la diferencia de energía libre entre estados conformacionales como múltiplos de la energía térmica del sistema  $n \times RT$ . La constante de apertura fue obtenida desde la Figura A.3.

| $k_{\text{apertura}}$ | $t_{1/2, \text{apertura}}$ | $\Delta G^{\circ}$ [RT] | K    | $k_{\text{cerrado}}$ | $t_{1/2, \text{cerrado}}$ |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------|------|----------------------|---------------------------|
| 3.2                   | 22                         | 0.0                     | 1.00 | 3.2                  | 22                        |
| 3.2                   | 22                         | 0.5                     | 0.61 | 5.3                  | 13                        |
| 3.2                   | 22                         | 1.0                     | 0.37 | 8.7                  | 8.0                       |
| 3.2                   | 22                         | 2.0                     | 0.14 | 24                   | 2.9                       |
| 3.2                   | 22                         | 3.0                     | 0.05 | 64                   | 1.1                       |

Desde el análisis de los tiempos de residencia, se concluyó que la unión de sustrato incrementa el tiempo que el CO<sub>2</sub> permanece en el sitio activo reactivo a varias decenas de nanosegundos. Este periodo de tiempo más largo le da a la enzima la posibilidad de cerrar su sitio activo y llevar acabo la reacción.

### 3.3.7. Análisis de la pérdida de reactividad para variante N81L

Para evaluar si los cálculos de la termodinámica de unión y su cinética representan el mecanismo por el cual la enzima posiciona el CO<sub>2</sub> para la reacción se estudió la variante N81L, la cual es completamente inactiva para la fijación de CO<sub>2</sub>.<sup>22</sup> Siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular en presencia de CO<sub>2</sub> sobre la variante N81L del sistema ternario *in silico*. Para modelar este sistema se modificó la estructura inicial del complejo ternario *in silico* utilizando el software UCSF Chimera.<sup>83</sup> Se seleccionó el rotámero más probable para la mutación. Para este sistema se obtuvo un tiempo de cálculo acumulado de 10 $\mu$ s, equivalente a la mitad del tiempo generado para los sistemas silvestres presentados anteriormente.

Se calcularon las energías libres de unión de los complejos ternarios para ambas conformaciones de la subunidad como se muestra en la Figura 3.14. No se observó un cambio en la afinidad de unión para los sitios activos abiertos o cerrados del complejo ternario *in silico*. Sin embargo, la mutación eliminó los sitios de unión cercanos a N81 y H365 dejando dos sitios de unión expuestos al solvente y otro en la entrada al sitio activo. Uno de ellos se comparte entre la proteína silvestre y la variante N81L (entrada).

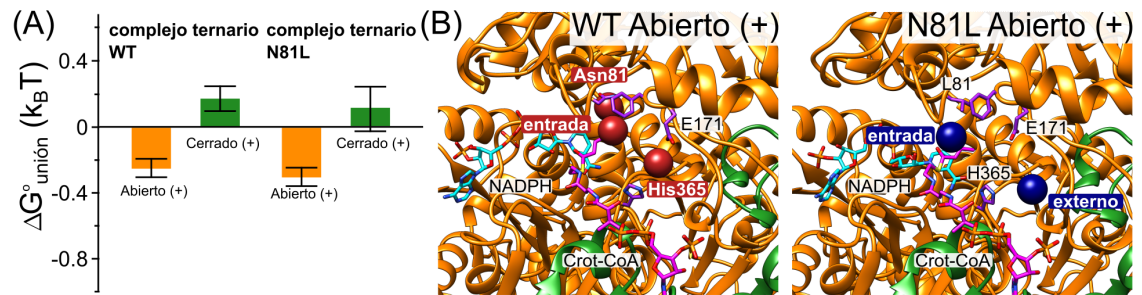


Figura 3.14: (A) Comparación de la energía libre de unión de CO<sub>2</sub> ( $k_B T$ ) para el complejo ternario *in silico* con sustrato en las subunidades abierto(+) y cerrado(+) para la enzima silvestre y la variante N81L. (B) Sitios de unión para la conformación abierto(+) de los sistemas silvestre y variante N81L. Los sitios de unión profundos N81 y el sitio reactivo cercano a H365 desaparecen como resultado de la mutación, dejando solo sitios de unión expuestos al solvente cercanos a la entrada del sitio activo.

El tiempo de residencia, mostrado en la Tabla 3.3, para el sitio de unión compartido se ve incrementado en el sistema mutante en comparación al sistema silvestre. Este resultado sugiere que la mutación mantiene la afinidad en el sitio activo pero con una distribución distinta de sus sitios unión, poblando en mayor medida los sitios expuestos al solvente y no en el interior de la proteína, los cuales se encuentran en una posición cercana al centro reactivo. Los resultados demuestran que la inactividad en la carboxilación de la variante N81L está asociada con la eliminación de los sitios de unión de CO<sub>2</sub> en el interior de la proteína. Cuando la variante N81L de la enzima cierra su sitio activo para la reacción, es poco probable que el CO<sub>2</sub> se encuentre en su posición reactiva.

En resumen, las afinidades de unión más grandes se observaron para la conformación abierta sin sustrato, donde los sitios de unión de CO<sub>2</sub> se encuentran cercanos a los residuos H365 y N81. Estos dos sitios se mantienen bajo la presencia de sustrato. Además, el tiempo de residencia en el sitio H365 donde CO<sub>2</sub> está mejor posicionado para la reacción se ve incrementado. Los resultados de los sitios de unión y tiempos de residencia son validados por las simulaciones con la variante N81L, la cual es inactiva para carboxilación. Específicamente, las mutaciones eliminan los sitios de unión en el interior de la proteína (H365 y N81) favoreciendo los sitios expuestos al solvente con tiempos de residencia cortos, explicando así su inactividad.

### **3.3.8. Mecanismo de unión de CO<sub>2</sub> y sustrato para Ccr**

Dada la información obtenida a través de los cambios conformacionales de la enzima, la concentración de CO<sub>2</sub> para cada configuración del sistema, sus sitios de unión y energía libres de unión y la información cinética de los sitios de unión, se propone que el mecanismo de unión de CO<sub>2</sub> de esta enzima siga el esquema de la Figura 3.15. En un primer paso el sitio activo abierto sin sustrato une la molécula de CO<sub>2</sub>, en una etapa siguiente se une el sustrato en posición, lo que gatillaría el cambio conformacional dando paso a la reacción.

Basado en los resultados se propone un ciclo catalítico que aprovecha las distintas conformaciones y estados de unión de Ccr para la fijación de CO<sub>2</sub>. Los cambios conformacionales de la enzima serían utilizados para modu-

lar distintas etapas de la reacción . La conformación de la subunidad abierta sin sustrato incrementaría la concentración de  $\text{CO}_2$  previa unión del sustrato. Posteriormente a su unión, el sitio activo es cerrado y la reacción es llevada a cabo. La comunicación entre los dos dímeros coordinaría el cerrado del sitio activo para la reacción química y la apertura del dímero complementario para la liberación de producto. El ciclo catalítico completo alterna entre tres pasos característicos en las cuatro subunidades del tetrámero: la preparación del sitio activo, la reacción química y la unión de  $\text{CO}_2$ . El ciclo propuesto es discutido en mayor detalle en la sección 4.1.

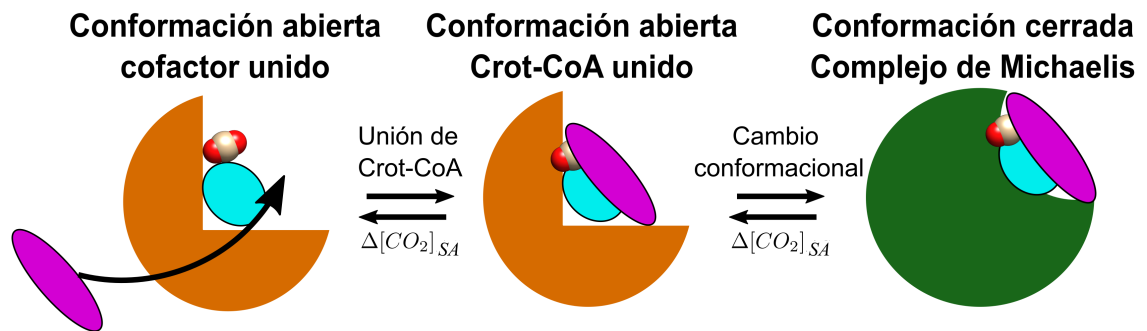


Figura 3.15: Esquema para la propuesta de unión de  $\text{CO}_2$  dentro del ciclo catalítico de Ccr.

## 4. Conclusiones

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar y entender los mecanismos asociados a la difusión y unión de dióxido de carbono para la enzima más eficiente en la fijación de este gas de efecto invernadero. Con el fin de racionalizar su excelente y particular capacidad de carboxilación, se llevaron a cabo múltiples simulaciones de dinámica molecular de diversas combinaciones de sistemas y conformaciones del sitio activo para la Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa (Ccr) silvestre y mutantes. Se utilizaron técnicas validadas en el área de simulaciones computacionales y se desarrollaron nuevos protocolos para extraer información y determinar propiedades fisicoquímicas de la unión del CO<sub>2</sub> a la proteína.

Dentro del sitio activo de Ccr se encuentran cuatro residuos claves para la reacción de carboxilación N81, F170, E171 y H365. La segunda protonación de histidina en disolución acuosa tiene un  $pK_a$  de 6.5 el cual es cercano al pH 8 experimental. Los cambios conformacionales del sitio activo podrían generar una variación del  $pK_a$  de este residuo al modificar el ambiente químico desde una solvatación completa en su conformación abierta a una cerrada con una menor cantidad de moléculas de agua. Para posteriormente poder llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular de Ccr fue necesario definir

la protonación de H365 en Ccr.

Se determinó que el estado de protonación del residuo H365 utilizando cálculos de energía libre de transferencia protónica. Este residuo es clave para la reacción de carboxilación y posee una dependencia con la presencia del sustrato en el sitio activo. En ausencia de sustrato permanece en su estado monoprotonado. Sin embargo, bajo la unión de sustrato al sitio activo, este residuo aumenta su  $pK_a$  estabilizando el estado doblemente protonado. A diferencia de las simulaciones del sistema ternario con H365 doblemente protonado, el estado neutro de H365 en el sitio activo cerrado evidenció un déficit de carga positiva reflejado en la atracción de iones  $K^+$ . Considerando el cambio de su  $pK_a$  y el comportamiento de los cationes en las simulaciones con el estado neutro, se utilizó H365 en su estado doblemente protonado en presencia del sustrato.

Estructuras cristalinas obtenidas para Ccr demuestran la existencia de cambios conformacionales relacionados con la actividad de la enzima. El sistema está conformado por cuatro subunidades idénticas que, en ausencia de sustrato y cofactor, toma una simetría tetraédrica con todas sus subunidades abiertas. Bajo la presencia de cofactor y un análogo de sustrato, se rompe la simetría tetraédrica generando un dímero de dímeros con una subunidad abierta y una subunidad cerrada. Esta subunidad cerrada presenta al análogo de sustrato y cofactor en posición, lo que mostraría el complejo de Michaelis-Menten. Desde estas estructuras cristalinas se propuso un ciclo catalítico aso-

ciado a los cambios conformacionales gatillados por el sustrato.

Simulaciones de dinámica molecular entregaron una perspectiva microscópica de los cambios conformacionales de la proteína en solución. La presencia del sustrato en su posición reactiva favorece el estado cerrado del sitio activo. Cuando el sustrato no se encuentra unido al sitio activo, la subunidad cerrada se abre rápidamente. Este proceso ocurre en la escala de decenas de nanosegundos. Se encontró la existencia de un movimiento de torsión entre subunidades de un mismo dímero acoplado a la apertura del sistema. Este movimiento podría estar asociado al acercamiento de sustrato y cofactor para dar inicio a la primera etapa de la reacción química que corresponde a la transferencia de hidruro desde el cofactor de NADPH hacia el carbono beta del tioester de crotonil-CoA. Esta primera etapa genera el enolato que posteriormente ataca a la molécula de CO<sub>2</sub> para producir el producto carboxilado.

Desde un análisis de múltiples secuencias se determinaron tres residuos conservados en ECRs de metabolismo primario, no presentes en aquellas del metabolismo secundario. Las enzimas de metabolismo primario son en promedio 20 veces más rápidas que las de metabolismo secundario. Se estudió una enzima variante triple E151D/N157E/N218E donde su eficiencia catalítica se ve disminuída en más de 3 órdenes de magnitud. La mutación lleva a una diferencia en la apertura del sitio obtenidas desde el análisis de componentes principales. Se demostró que para el sistema mutante la apertura es un 30 % más lenta que el silvestre y no se encuentra una torsión marcada co-



mo en el caso de la enzima silvestre. La diferencia en su capacidad fijadora de CO<sub>2</sub> estaría asociada a una disminución en la comunicación interdímero debido a las mutaciones en su interfaz.

Para llevar a cabo la carboxilación es necesaria la presencia de una molécula de dióxido de carbono en el sitio activo. Los cambios conformacionales del sistema podrían estar relacionados con la acumulación de CO<sub>2</sub> en las diversas conformaciones del sitio activo. Para estudiar la distribución de dióxido de carbono alrededor de la proteína, se seleccionaron tres conformaciones representativas de etapas elementales del ciclo catalítico. Se seleccionaron tres distintos sistemas para realizar las simulaciones en presencia explícita de moléculas de CO<sub>2</sub>: en ausencia de sustrato (sistema binario), con moléculas de sustrato en sus dos subunidades cerradas (sistema ternario) y con moléculas de sustrato en sus cuatro subunidades (sistema ternario *in silico*). Estas simulaciones fueron usadas para estudiar la unión de CO<sub>2</sub> al sitio activo. Se utilizó la herramienta existente *gromaps* para obtener la densidad de CO<sub>2</sub> alrededor de la proteína y se desarrolló un protocolo capaz de estimar el exceso o reducción de la concentración en el sitio activo de la proteína respecto a la concentración en solución. También se diseñó una forma de identificar sitios de unión al interior del sitio activo capaz de detectar diferencias entre los estados conformacionales y de unión de sustrato de los sistemas.

Se propuso un esquema con etapas elementales para los posibles pasos de unión de CO<sub>2</sub>. Bajo este marco, se planteó la interrogante de si la confor-

mación de la subunidad en el sitio activo modula la concentración de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo. Para ello, se estudió el efecto que tiene la conformación de la subunidad sobre la concentración de  $\text{CO}_2$  utilizando el sistema binario como modelo. Para este sistema, las cuatro cadenas del tetrámero solo difieren en la conformación de los sitios activos con subunidades abiertas y cerradas. La energía libre de unión muestra que para ambos estados de la subunidad existe un exceso de  $\text{CO}_2$  en el sitio activo con respecto a la solución. Sin embargo, se encontró que existe una modulación en la concentración de  $\text{CO}_2$  para el sitio activo asociada a la conformación de la subunidad. El sitio más favorable para unir esta molécula corresponde a la subunidad cerrada. Sorpresivamente, este sitio posee la máxima afinidad de  $\text{CO}_2$  entre todas las diferentes configuraciones, incluyendo todos los pasos elementales del ciclo catalítico. Esta gran afinidad de unión se explica debido a que en ausencia de sustrato, el  $\text{CO}_2$  utiliza libremente los sitios de unión asociados a la unión del sustrato.

Durante el desarrollo de la tesis se estableció una colaboración experimental con investigadores en Alemania que descubrieron que la enzima Ccr es capaz de catalizar la reacción de formación de bicarbonato desde  $\text{CO}_2$  de manera similar a la anhidrasa carbónica. Esta actividad es máxima para la enzima silvestre APO y se ve disminuida significativamente con la presencia de sustrato. Mutación de los residuos H365 y E171 también disminuyen significativamente la actividad de anhidrasa carbónica de la enzima.

A través de espectroscopía *in situ* ATR FTIR de diferencia se detectó una

señal asociada a la generación de iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ). Desde esta información se propuso que esta especie puede ser formada dentro del sitio activo cerrado desde la molécula de agua  $\mu\text{W}$  coordinada a los residuos H365 y E171. Estos residuos estabilizarían la especie a través de una red de transferencia de protones. La disminución en la actividad de anhidrasa carbónica en presencia del sustrato, observada en el experimento, puede ser explicada en base a los resultados obtenidos con las simulaciones en conjunto con la estimación de la energía libre de unión y la caracterización de los sitios de unión.

En ausencia del sustrato, el  $\text{CO}_2$  se acumula en la subunidad cerrada permaneciendo unido a los sitios de unión cercanos al agua  $\mu\text{W}$  y los residuos H365 y E171. En el sistema ternario, el sustrato ocupa estos sitios de unión, lo que muestra una competencia entre ambas moléculas para utilizar estas posiciones dentro del sitio activo cerrado. Estos sitios de unión corresponden a una zona de la proteína donde podría generarse el ión hidroxilo, lo que explicaría la disminución su actividad. La disminución en la actividad por las mutaciones de H365 y E171 se explicaría por la desestabilización del ión hidroxilo al perturbar la red de transferencia de protones.

Este trabajo de colaboración teórico-experimental permitió validar los resultados obtenidos desde la metodología de análisis desarrollada en esta tesis, permitiendo así racionalizar el origen de la actividad de anhidrasa carbónica para la enzima Ccr y entregar argumentos de carácter atómico-molecular pa-

ra explicar la modificación de esta actividad al perturbar el sistema, ya sea al ocupar el sitio activo o con mutaciones sobre residuos directamente asociados a la generación del ión hidroxilo.

Sin embargo, la configuración de la subunidad cerrada sin sustrato no posee ninguna relevancia dentro del contexto de la catálisis de la reacción de carboxilación. Esto se debe a que no permitiría la unión del sustrato en su posición dentro del sitio activo. Es por ello que se analizaron los estados que corresponden a pasos elementales dentro del ciclo catalítico. Con este objetivo se centró el estudio sobre los sistemas ternario y ternario *in silico*, definidos previamente.

Al analizar los sistemas mencionados, se encontró que la afinidad del CO<sub>2</sub> por el sitio activo de la subunidad cerrada con sustrato disminuye notablemente, incluso llegando a ser menos probable que encontrar CO<sub>2</sub> en solución. Sus sitios de unión se encuentran alejados de los residuos que promueven la catálisis y no se encontró un camino que permita la difusión hacia el interior del sitio activo. Tampoco se encontró ninguna dependencia con la unión de sustrato en el monómero complementario de cada dímero, es decir, el estado de la subunidad abierta no modula la concentración de su subunidad cerrada.

Para los sitios activos de la subunidad abierta, la presencia de sustrato disminuye en un 32% la concentración local de CO<sub>2</sub> sobre el sitio activo. Ambos estados, abierto(-) y abierto(+) comparten sitios de unión relevantes para la reacción cercanos a los residuos N81 y H365. Sin embargo, la unión

de sustrato elimina la presencia del sitio activo asociado a NADPH debido a la modificación en su conformación para interactuar con la molécula de sustrato. La permanencia de los sitios N81 y H365 permite concluir que la presencia de sustrato no modifica los sitios de unión de CO<sub>2</sub> sobre estos estados. Para determinar el rol que ellos poseen sobre la función catalítica de la enzima, se estudió la cinética de la unión de CO<sub>2</sub> en estos sitios para relacionar las etapas elementales del ciclo catalítico a los cambios conformacionales del sitio activo de Ccr.

Para ello se obtuvo el tiempo de residencia promedio ( $\tau$ ) de cada sitio de unión con el fin de determinar cual es el sitio que permitiría mantener unido, en caso de que exista, el CO<sub>2</sub> a lo largo del cambio conformacional. Se propuso un método iterativo para estimar el tiempo de residencia promedio ( $\tau$ ) de las moléculas de CO<sub>2</sub> en los sitios activos definidos previamente, para los estados abierto(-) y abierto(+) de los sistemas ternario y ternario *in silico* respectivamente. La presencia de sustrato disminuye levemente el tiempo de residencia para la unión de CO<sub>2</sub> en el sitio activo cercano a N81. Al analizar el sitio de unión cercano a H365, este presenta un aumento considerable de su tiempo de residencia como consecuencia de la unión del sustrato. Además, este sitio se encontraría en la posición ideal para dar paso a la reacción de carboxilación una vez se cierra el sitio activo.

Determinados los tiempos de residencia para los sitios de unión N81 y H365, fue necesario estimar el tiempo necesario para el cambio conforma-

cional de cerrado del sitio activo. Si el tiempo de residencia es mayor que el tiempo asociado al cambio conformacional, la unión en el estado abierto permitiría mantener la molécula de CO<sub>2</sub> en posición, durante el cambio conformacional, para su posterior reacción en el estado cerrado. Utilizando principios fisicoquímicos, se modeló la cinética de cerrado de la subunidad abierta para el sistema ternario. La dinámica del cerrado del sitio activo es más veloz que el tiempo de permanencia del CO<sub>2</sub> en el sitio H365 con el sustrato en posición. Considerando este resultado, la unión de CO<sub>2</sub> puede ocurrir previo al cerrado del sitio activo y se mantendría en posición a lo largo del cambio conformacional.

Desde los resultados asociados a la afinidad de CO<sub>2</sub> sobre los sitios activos de los sistemas ternario y ternario *in silico*, junto a sus sitios de unión y tiempos de residencia, se propone que el mecanismo de unión de CO<sub>2</sub> en esta enzima sigue la secuencia descrita a continuación. Inicialmente el CO<sub>2</sub> se une al sitio activo abierto sin sustrato. De manera consecutiva, el sustrato se posiciona dentro del sitio activo gatillando el cambio conformacional, asociado al cierre del sitio activo, lo que finalmente da paso a la reacción química.

El protocolo validado para la proteína silvestre fue utilizado para estudiar la variante N81L, la cual en el estudio experimental de la cinética de reacción, no mostró actividad de carboxilación. Se estudió el sistema N81L ternario *in silico* para comparar la unión de CO<sub>2</sub> antes del cerrado del sitio activo. La energía libre de unión no tuvo una variación significativa dentro del sitio

activo al comparar los sistemas silvestre y mutante. Sin embargo, los sitios de unión y tiempos de residencia para la subunidad abierta fueron modificados.

La mutante N81L no presenta sitios de unión al interior de esta subunidad, a diferencia de la enzima silvestre. Además, presenta un aumento del tiempo de residencia para el sitio de entrada al sitio activo. Para el sistema mutante el CO<sub>2</sub> se une por mayores periodos de tiempo a este sitio y no penetra hacia el sitio activo. Las simulaciones permiten explicar la pérdida de actividad de la enzima para la variante N81L debido a la ausencia de CO<sub>2</sub> en el sitio activo previo al cambio conformacional que permite cerrar la subunidad y dar paso a la reacción.

## **4.1. Propuesta de ciclo catalítico**

Combinando los resultados expuestos en esta tesis, junto a trabajos asociados al mecanismo de la reacción, se propone un ciclo catalítico para la fijación de CO<sub>2</sub> en Ccr<sup>22,66</sup>. Este nuevo ciclo considera los diferentes aspectos asociados a la afinidad de CO<sub>2</sub>, los sitios de unión en cada sitio activo junto a los cambios conformacionales del sistema.

En base al ajuste de información cinética de Ccr asociada a la disminución de su capacidad catalítica debido a la disrupción en las interacciones de la interfaz, la cual es explicada a través de cooperatividad negativa y un modelo de sincronía entre los dímeros del tetrámero,<sup>16</sup> la necesidad de reali-

zar cambios conformacionales para atrapar al sustrato y liberar los productos, junto a la secuencialidad en las etapas necesarias para la reacción química, se propone que las cuatro subunidades de la estructura tetramérica cumplen una función distinta en cada etapa del ciclo. Esto permitiría explicar la gran eficiencia de este enzima.

El ciclo catalítico completo alterna entre tres pasos característicos en las cuatro subunidades del tetrámero: la preparación del sitio activo, la reacción química y la unión de  $\text{CO}_2$  al dímero opuesto para dar inicio a la preparación del sitio activo para la reacción. En la Figura 4.1 se representan los pasos que ocurren de manera simultánea en subunidades distintas del tetrámero, los cuales son descritos a continuación:

- Preparación de la subunidad (monómero azul) con  $\text{CO}_2$ , sustrato y co-factor unidos para la reacción. Los productos son liberados y NADPH se une a la subunidad del otro dímero (monómero verde). Acompañando la liberación de producto, ocurre un cambio conformacional en el cual la subunidad que libera los productos se abre (monómero verde) y el sitio activo donde ocurrirá la reacción se cierra (monómero azul). La preparación finaliza con la unión de sustrato a la subunidad opuesta del dímero cerrado (monómero gris).
- La reacción química ocurre en el sitio activo (monómero azul) al alcanzar la conformación cerrada siguiendo el mecanismo de reacción.



Primero la transferencia de hidruro desde el NADPH al crotonil-CoA y la posterior reacción de carboxilación.<sup>22,66</sup>

- Después de la reacción, esta subunidad (monómero azul) se abre parcialmente. La subunidad abierta del otro dímero sin sustrato (monómero verde) acumula  $\text{CO}_2$  en los sitios de unión cercanos a H365 y N81 a causa de la mayor afinidad de unión. Esto preparará el sitio activo para la unión de sustrato y el posterior cambio conformacional.

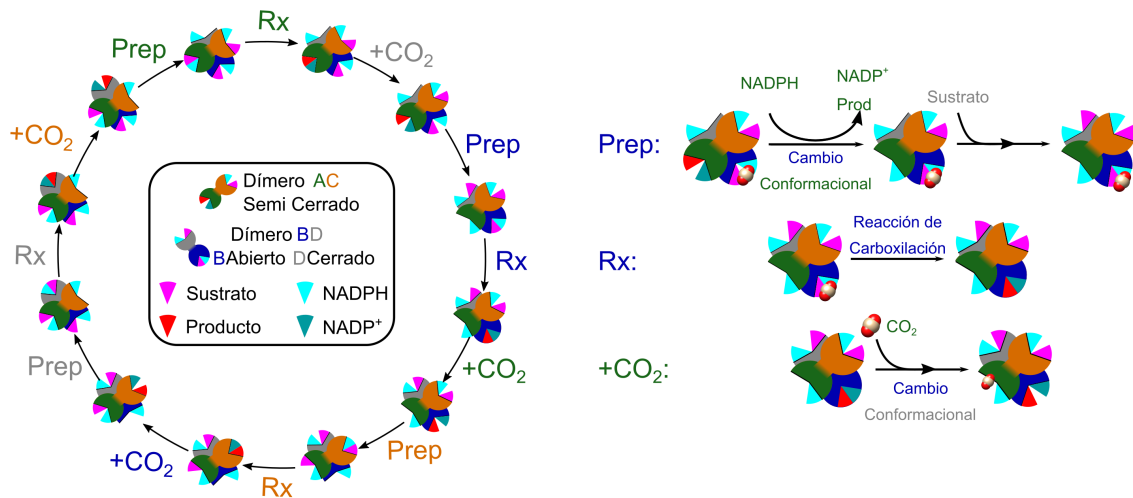


Figura 4.1: Ciclo catalítico propuesto para la fijación de  $\text{CO}_2$ : La estructura del tetrámero es representada por dos dímeros con una subunidad abierta o cerrada (colores de la Figura 2.1) que contienen solo el NADPH (triángulo cian) o NADPH y sustrato (triángulo rosado), que son transformados en NADP<sup>+</sup> (triángulo verde) y producto (triángulo rojo) después de la reacción química en la subunidad cerrada. Cada paso está caracterizado por la preparación para la reacción (Prep), la reacción química (RX) o la adición de  $\text{CO}_2$  a la subunidad abierta (+ $\text{CO}_2$ ). El color del paso denota la subunidad donde está ocurriendo cada etapa del proceso, las cuales se muestran a la derecha de cada paso y se encuentran descritas en el texto.

La secuencia propuesta de eventos que componen el ciclo catalítico completo asume que existe comunicación entre los dímeros: la liberación del producto y la apertura de un dímero gatilla el cerrado del sitio activo de una subunidad del dímero complementario. Se ha demostrado que la comunicación entre dímeros de Ccr existe y puede ser alterada por la mutación de residuos en la interfaz de los dímeros, disminuyendo su eficiencia catalítica en 3 órdenes de magnitud.

El ciclo propuesto permitiría racionalizar la gran eficiencia lograda por la Crotonil-CoA Carboxilasa-Reductasa. Para ello cada subunidad del tetrámero estaría cumpliendo una función distinta de manera paralela. Cuando en una subunidad ocurre la reacción química, las demás subunidades se preparan para la reacción en pasos posteriores. La apertura de la subunidad debido a la liberación de los productos en un dímero, induce el cerrado de la subunidad abierta con sustrato, cofactor y  $\text{CO}_2$  en el otro dímero, para que ocurra la reacción. Esta secuencia se repite sobre las subunidades abiertas intercalando entre ambos dímeros. Las subunidades se preparan para la reacción uniendo sustrato y  $\text{CO}_2$  en su estado abierto, para así maximizar la eficiencia de la enzima.

### 4.1.1. Proyecciones

Esta tesis proporcionó información relevante y nueva respecto al funcionamiento de Ccr y sus cambios conformacionales. Se planteó un mecanismo que incluye la unión de CO<sub>2</sub> y sustrato dentro de sus etapas elementales junto al cambio conformacional (ver Figura 3.5). Finalmente, en base a la alta eficiencia y el traspaso de información entre subunidades, se planteó un ciclo catalítico altamente especializado donde cada subunidad se encuentra en una etapa distinta del mecanismo de acción para la reacción.

Sin embargo, el traspaso de información desde una subunidad a otra es aún motivo de investigación. Describir como la proteína comunica el estado de la subunidad hacia el resto del tetramero es una interesante línea a seguir, la cual puede ser complementada directamente con las simulaciones ya realizadas. Actualmente se estudia el traspaso de información en proteínas a través de grafos, los cuales son construidos utilizando la matriz de covarianza. Esta matriz es obtenida desde simulaciones de dinámica molecular. Con este procedimiento es posible conectar el movimiento correlacionado de la proteína a través de un camino definido de aminoácidos, el cual queda definido desde la matriz de covarianza.<sup>90,91</sup>

Por otro lado, existe información cinética para las mutaciones sobre los cuatro residuos de interés para la reacción química N81, F170, E171 y H365. La variante N81L, la cual pierde completamente su actividad de carboxila-

ción fue abordada en este estudio. El protocolo desarrollado puede aplicarse a las variantes asociadas a los otros residuos, los cuales poseen una disminución parcial de su actividad y, por lo tanto, podría evaluarse el origen de esta disminución explicada desde la unión de CO<sub>2</sub>.

Finalmente, a través del entendimiento de la unión de CO<sub>2</sub> y el mecanismo de la reacción, se podrían probar mutaciones cercanas a los sitios de unión y estudiar computacionalmente la modificación en la concentración de CO<sub>2</sub> dentro del sitio activo o en los tiempos de residencia de los sitios descubiertos previamente. Resultados positivos obtenidos desde este protocolo, aumentando la eficiencia de Ccr, podrían ser útiles para los ciclos artificiales de fijación de CO<sub>2</sub> desarrollados por nuestros colaboradores.<sup>6,7</sup>

Para finalizar, el uso del protocolo desarrollado en este trabajo es replicable en otras enzimas fijadoras de moléculas pequeñas. Se utiliza con el fin de analizar la función de la proteína sobre la acumulación y disponibilidad de estas moléculas sobre su sitio activo. Dentro de nuestro grupo de investigación, este protocolo será utilizado para profundizar el entendimiento sobre RuBisCO y la función de su subunidad pequeña sobre la reactividad y selectividad de esta enzima, tema en el cual se ha ido retomando el interés en los últimos años.<sup>92</sup>

# Bibliografía

- [1] Glueck, S. M.; Gümüs, S.; Fabian, W. M. F.; Faber, K. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 313–328.
- [2] Burkart, M. D.; Hazari, N.; Tway, C. L.; Zeitler, E. L. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 7937–7956.
- [3] Ra, E. C.; Kim, K. Y.; Kim, E. H.; Lee, H.; An, K.; Lee, J. S. *ACS Catal.* **2020**, *10*, 11318–11345.
- [4] Ye, R.-P.; Ding, J.; Gong, W.; Argyle, M. D.; Zhong, Q.; Wang, Y.; Russell, C. K.; Xu, Z.; Russell, A. G.; Li, Q.; Fan, M.; Yao, Y.-G. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5698.
- [5] Alper, E.; Yuksel Orhan, O. *Petroleum* **2017**, *3*, 109–126.
- [6] Schwander, T.; Schada von Borzyskowski, L.; Burgener, S.; Cortina, N. S.; Erb, T. J. *Science* **2016**, *354*, 900–904.
- [7] Bierbaumer, S.; Nattermann, M.; Schulz, L.; Zschoche, R.; Erb, T. J.; Winkler, C. K.; Tinzl, M.; Glueck, S. M. *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 5702–5754.
- [8] Erb, T. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 8466–8477.
- [9] Erb, T. J.; Zarzycki, J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *49*, 100–107.
- [10] Tcherkez, G. G. B.; Bathellier, C.; Stuart-Williams, H.; Whitney, S.; Gout, E.; Bligny, R.; Badger, M.; Farquhar, G. D. *Biochem.* **2013**, *52*, 869–877.
- [11] Cummins, P. L.; Kannappan, B.; Gready, J. E. *J. Comput. Chem.* **2018**, *39*, 1656–1665.
- [12] Cummins, P. L.; Kannappan, B.; Gready, J. E. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 2679–2686.

- [13] van Lun, M.; Hub, J. S.; van der Spoel, D.; Andersson, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3165–3171.
- [14] Erb, T. J.; Berg, I. A.; Brecht, V.; Müller, M.; Fuchs, G.; Alber, B. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 10631–10636.
- [15] Alber, B. E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 17–25.
- [16] DeMirici, H. et al. *ACS Cent. Sci.* **2022**, *8*, 1091–1101.
- [17] Quade, N.; Huo, L.; Rachid, S.; Heinz, D. W.; Müller, R. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 117–124.
- [18] Zhang, L.; Mori, T.; Zheng, Q.; Awakawa, T.; Yan, Y.; Liu, W.; Abe, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13462–13465.
- [19] Mosunova, O.; Navarro-Muñoz, J. C.; Collemare, J. *Encyclopedia of Mycology*; Elsevier, 2021; pp 458–476.
- [20] Cavalier-Smith, T. In *Novartis Foundation Symposia*; Chadwick, D. J., Whelan, J., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2007; pp 64–87.
- [21] Bernhardsgrütter, I.; Schell, K.; Peter, D. M.; Borjian, F.; Saez, D. A.; Vöhringer-Martinez, E.; Erb, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9778–9782.
- [22] Stoffel, G. M. M.; Saez, D. A.; DeMirici, H.; Vögeli, B.; Rao, Y.; Zarzycki, J.; Yoshikuni, Y.; Wakatsuki, S.; Vöhringer-Martinez, E.; Erb, T. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 13964–13969.
- [23] Wang, P.-H.; De Sancho, D.; Best, R.; Blumberger, J. *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2016; Vol. 578; pp 299–326.
- [24] Linker, S. M.; Magarkar, A.; Köfinger, J.; Hummer, G.; Seeliger, D. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 4974–4981.
- [25] Kitahara, R.; Yoshimura, Y.; Xue, M.; Kameda, T.; Mulder, F. A. A. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20534.
- [26] Krimmer, S. G.; Cramer, J.; Schiebel, J.; Heine, A.; Klebe, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10419–10431.

- [27] Vesper, M. D.; Groot, B. L. d. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003232.
- [28] Tilton, R. F.; Singh, U. C.; Weiner, S. J.; Connolly, M. L.; Kuntz, I. D.; Kollman, P. A.; Max, N.; Case, D. A. *J. Mol. Biol.* **1986**, *192*, 443–456.
- [29] Schoenborn, B. P.; Watson, H. C.; Kendrew, J. C. *Nature* **1965**, *207*, 28–30.
- [30] Schoenborn, B. P. *Nature* **1965**, *208*, 760–762.
- [31] Springer, B. A.; Sligar, S. G.; Olson, J. S.; Phillips, G. N. J. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 699–714.
- [32] Tilton, R. F.; Kuntz, I. D.; Petsko, G. A. *Biochem.* **1984**, *23*, 2849–2857.
- [33] Hermans, J.; Shankar, S. *Isr. J. Chem.* **1986**, *27*, 225–227.
- [34] Prangé, T.; Schiltz, M.; Pernot, L.; Colloc'h, N.; Longhi, S.; Bourguet, W.; Fourme, R. *Proteins: Struct. Funct.* **1998**, *30*, 61–73.
- [35] Quillin, M. L.; Breyer, W. A.; Griswold, I. J.; Matthews, B. W. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 955–977.
- [36] Desvaux, H.; Dubois, L.; Huber, G.; Quillin, M. L.; Berthault, P.; Matthews, B. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11676–11683.
- [37] Holt, J. M.; Ackers, G. K. *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2009; Vol. 455; pp 193–212.
- [38] Stripp, S. T. *ACS Catal.* **2021**, *11*, 7845–7862.
- [39] Numoto, N.; Kawano, Y.; Okumura, H.; Baba, S.; Fukumori, Y.; Miki, K.; Ito, N. *IUCrJ* **2021**, *8*, 954–962.
- [40] Wang, P.-h.; Best, R. B.; Blumberger, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3548–3556.
- [41] De Sancho, D.; Kubas, A.; Wang, P.-H.; Blumberger, J.; Best, R. B. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 1919–1927.
- [42] Husen, P.; Nielsen, C.; Martino, C. F.; Solov'yov, I. A. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 4868–4879.

- [43] Husic, B. E.; Pande, V. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2386–2396.
- [44] Leroux, F.; Dementin, S.; Burlat, B.; Cournac, L.; Volbeda, A.; Champ, S.; Martin, L.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Fontecilla-Camps, J.; Rousset, M.; Léger, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 11188–11193.
- [45] Dementin, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10156–10164.
- [46] Smith, A. J. T.; Müller, R.; Toscano, M. D.; Kast, P.; Hellinga, H. W.; Hilvert, D.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15361–15373.
- [47] Barnsley, K. K.; Ondrechen, M. J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2022**, *74*, 102384.
- [48] Levitzki, A.; Stallcup, W. B.; Koshland, D. E. *Biochem.* **1971**, *10*, 3371–3378.
- [49] Bernhard, S. A.; MacQuarrie, R. A. *J. Mol. Biol.* **1973**, *74*, 73–78.
- [50] Wielgus-Kutrowska, B.; Grycuk, T.; Bzowska, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *642*, 31–45.
- [51] Hill, T. L.; Levitzki, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 5741–5745.
- [52] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- [53] Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101.
- [54] Parrinello, M.; Rahman, A. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182–7190.
- [55] Martyna, G. J.; Tuckerman, M. E.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. *Mol. Phys.* **1996**, *87*, 1117–1157.
- [56] Zwanzig, R. W. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 1420–1426.
- [57] Lu, N.; Singh, J. K.; Kofke, D. A. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 2977–2984.
- [58] Lu, N.; Adhikari, J.; Kofke, D. A. *Phys. Rev. E* **2003**, *68*, 026122.



- [59] Kirkwood, J. G. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 300–313.
- [60] Bennett, C. H. *J. Comput. Phys.* **1976**, *22*, 245–268.
- [61] Shirts, M. R.; Pande, V. S. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 144107.
- [62] Shlens, J. *preprint arXiv:1404.1100* **2014**,
- [63] Maisuradze, G. G.; Liwo, A.; Scheraga, H. A. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 312–329.
- [64] Briones, R.; Blau, C.; Kutzner, C.; de Groot, B. L.; Aponte-Santamaría, C. *Biophys. J.* **2019**, *116*, 4–11.
- [65] Nishikawa, Y.; Takahashi, J.; Takahashi, T. *preprint arXiv:2112.11837* **2021**,
- [66] Recabarren, R.; Tinzl, M.; Saez, D. A.; Gomez, A.; Erb, T. J.; Vöhringer-Martinez, E. *ACS Catal.* **2023**, *13*, 6230–6241.
- [67] Gomez, A.; Tinzl, M.; Stoffel, G.; Grubmüller, H.; Erb, T. J.; Vöhringer-Martinez, E.; Stripp, S. *preprint ChemRxiv* **2023**,
- [68] Gomez, A.; Erb, T. J.; Grubmüller, H.; Vöhringer-Martinez, E. *preprint ChemRxiv* **2023**,
- [69] Aghera, N.; Dasgupta, I.; Udgaonkar, J. B. *Biochem.* **2012**, *51*, 9058–9066.
- [70] Thurlkill, R. L.; Grimsley, G. R.; Scholtz, J. M.; Pace, C. N. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1214–1218.
- [71] Gomez, A.; Vöhringer-Martinez, E. *Proteins: Struct. Funct.* **2019**, *87*, 467–477.
- [72] Gapsys, V.; Yildirim, A.; Aldeghi, M.; Khalak, Y.; van der Spoel, D.; de Groot, B. L. *Commun. Chem.* **2021**, *4*, 61.
- [73] Gapsys, V.; de Groot, B. L. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 109–114.
- [74] Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. *SoftwareX* **2015**, *1-2*, 19–25.

- [75] Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B. L.; Grubmüller, H.; MacKerell, A. D. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 71–73.
- [76] Boonstra, S.; Onck, P. R.; van der Giessen, E. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 3692–3698.
- [77] Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell Jr., A. D. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 671–690.
- [78] Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3144–3154.
- [79] Pavelites, J. J.; Gao, J.; Bash, P. A.; Mackerell Jr., A. D. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 221–239.
- [80] Aleksandrov, A.; Field, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 10503.
- [81] Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472.
- [82] Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- [83] Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- [84] Takeuchi, H.; Fujine, M.; Sato, T.; Onda, K. *J. Chem. Eng. Japan / JCEJ* **1975**, *8*, 252–253.
- [85] M. In Het Panhuis C. H. Patterson R, *Mol. Phys.* **1998**, *94*, 963–972.
- [86] Riquelme, M.; Lara, A.; Mobley, D. L.; Verstraelen, T.; Matamala, A. R.; Vöhringer-Martinez, E. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *58*, 1779–1797.
- [87] Ben-Naim, A. *Solvation Thermodynamics*; Springer US: Boston, MA, 1987.

- [88] Steiner, H.; Jonsson, B.-H.; Lindskog, S. *European J. Mol. Biol. Biochem.* **1975**, *59*, 253–259.
- [89] Hirakawa, Y.; Senda, M.; Fukuda, K.; Yu, H. Y.; Ishida, M.; Taira, M.; Kinbara, K.; Senda, T. *BMC Biol.* **2021**, *19*, 105.
- [90] Sethi, A.; Eargle, J.; Black, A. A.; Luthey-Schulten, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 6620–6625.
- [91] Osuna, S. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2021**, *11*.
- [92] Schulz, L.; Guo, Z.; Zarzycki, J.; Steinchen, W.; Schuller, J. M.; Heimerl, T.; Prinz, S.; Mueller-Cajar, O.; Erb, T. J.; Hochberg, G. K. A. *Science* **2022**, *378*, 155–160.

## A. Análisis conformacional

En este anexo se añade información complementaria para la sección 3.2. La Figura A.1A muestra una comparación en la convergencia en las transiciones conformacionales del sistema binario para 100 y 200 ns de simulación de las 20 trayectorias asociadas a cada dímero de los sistemas de simulación. La Figura A.1B muestra el criterio de separación para las trayectorias que se encuentran en su estado rotado o no rotado. En ella, el valor del promedio y la desviación estándar de CP2 para los últimos 100 ns de simulación se deben encontrar por debajo de la línea burdeo. La Figura A.2 muestra la evolución temporal para las trayectorias de los seis sistemas utilizados con el fin de describir los cambios conformacionales de Ccr silvestre y la pérdida de eficiencia en la variante triple mutante E151D/N157E/N218E.

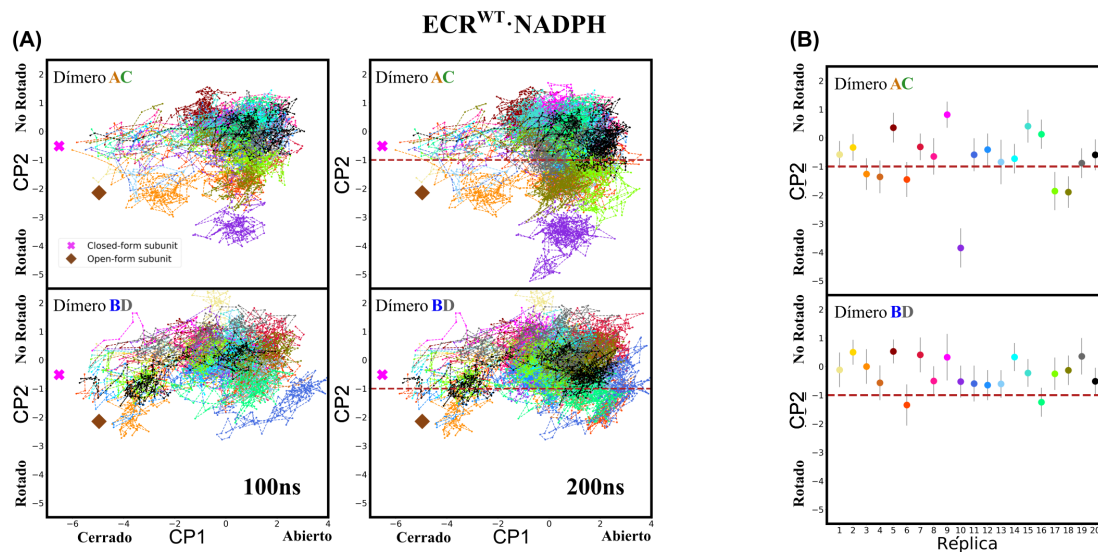


Figura A.1: (A) Proyección de 20 trayectorias sobre los primeros dos componentes principales para el sistema binario silvestre (*WT*) con el cofactor de NADPH (( $\text{ECR}^{\text{WT}} \cdot \text{NADPH}$ )) a los 100 ns (izquierda) y 200 ns (derecha) del tiempo total de simulación. Cada color representa una réplica distinta. La comparación de las trayectorias a 100 y 200 ns evidencia que la mayoría de la dinámica del sistema ocurre en los primeros 100 ns. (B) Para separar las trayectorias que alcanzan la conformación rotada (mostrada en café en la Figura 3.4 de la sección 3.2) el promedio y la desviación estándar de CP2 sobre los 100ns finales de las trayectorias de 200ns de tiempo de simulación es mostrado. Las réplicas con un promedio por debajo de la línea burdeo alcanzan la conformación rotada, donde los que se encuentran por encima de ella permanecen no rotadas.

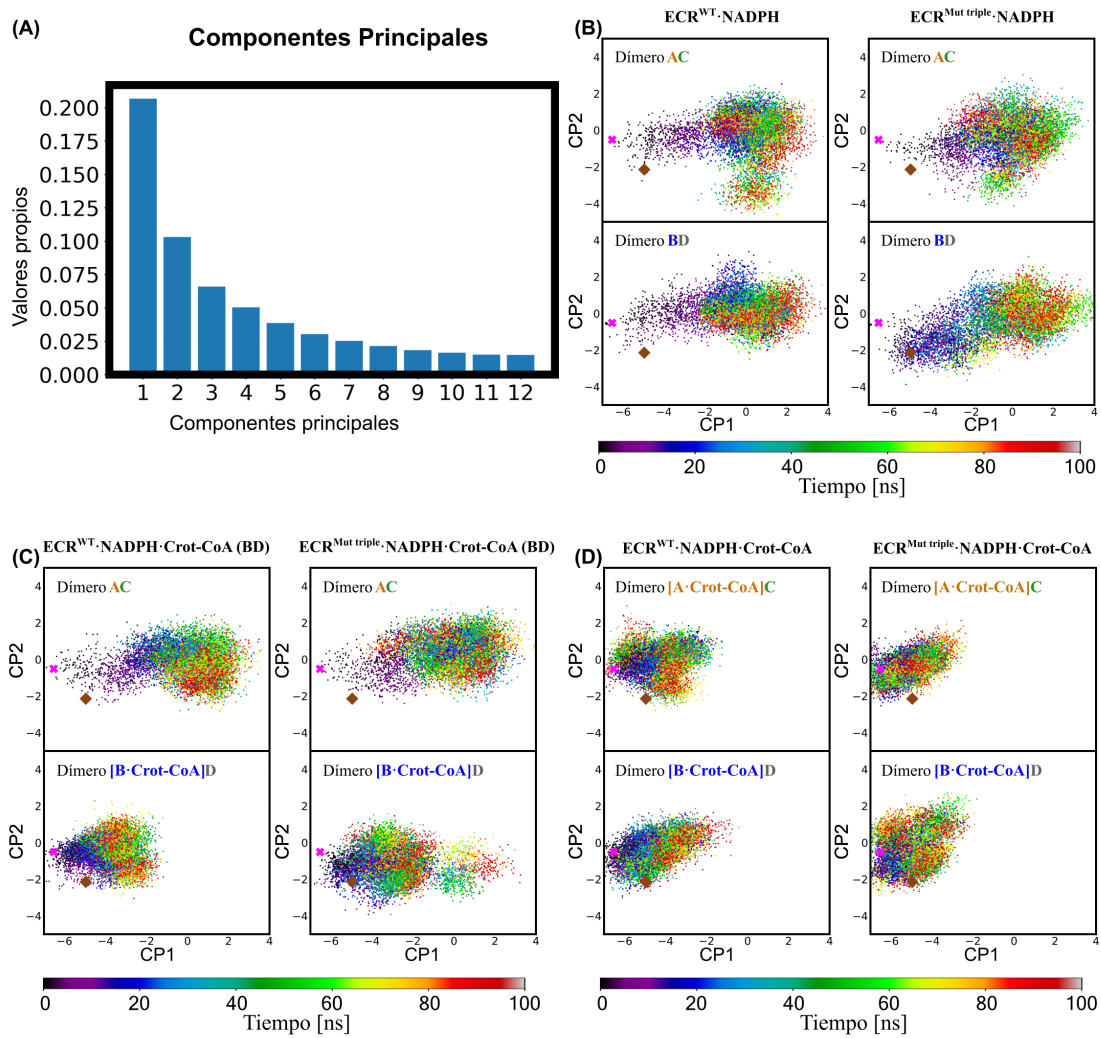


Figura A.2: (A) Valores propios de los 12 primeros componentes principales del análisis de PCA sobre la dinámica del sistema binario *WT* ( $\text{ECR}^{\text{WT}} \cdot \text{NADPH}$ ). El análisis de PCA considera la posición de los átomos de carbono alfa de los dos dímeros en el tetrámero después de remover los grados de libertad traslacionales y rotacionales de las 10 simulaciones. En total 20 trayectorias de ambos dímeros en el tetrámero equivalen a  $2 \mu\text{s}$  de simulación que fueron analizadas. (B-D) Las trayectorias del sistema silvestre y mutante triple de cada dímero (superior e inferior) están proyectadas sobre los dos primeros componentes principales (CP) para comparar la dinámica asociada a la apertura del sitio activo y el movimiento de rotación de un monómero respecto al otro (coloreado según el tiempo de simulación). (B) Se comparan diez trayectorias de 100 ns del sistema binario con cofactor de NADPH ( $\text{ECR}^{\text{WT}} \cdot \text{NADPH}$ ) en la izquierda con la enzima mutante triple E151D/N157E/N218E ( $\text{ECR}^{\text{Mut trip}} \cdot \text{NADPH}$ ) en la derecha (cruz y diamante representan las subunidades abierta y cerrada de la estructura cristalina). (C) Proyección de diez trayectorias sobre los mismos CPs para el sistema complejo ternario portando sustrato solo en la subunidad B del dímero BD ( $[\text{B} \cdot \text{Crot-CoA}]_{\text{D}}$ ) en la izquierda comparada con la misma configuración para el sistema mutante triple en el lado derecho. El dímero con el sustrato unido permanece en el estado cerrado no rotado para el sistema silvestre, sin embargo, el sistema mutante triple muestra algunas transiciones al estado abierto para el dímero con el sustrato unido. (D) Comparación de la proyección de diez trayectorias de 100 ns para el complejo ternario silvestre con sustrato unido a ambas subunidades cerradas ( $[\text{A} \cdot \text{Crot-CoA}]_{\text{C}}$ ) y ( $[\text{B} \cdot \text{Crot-CoA}]_{\text{D}}$ ) en la izquierda y las trayectorias del sistema mutante triple en la misma configuración en la derecha. Ambos sistemas mantienen la configuración cerrada no rotada en sus dos dímeros.

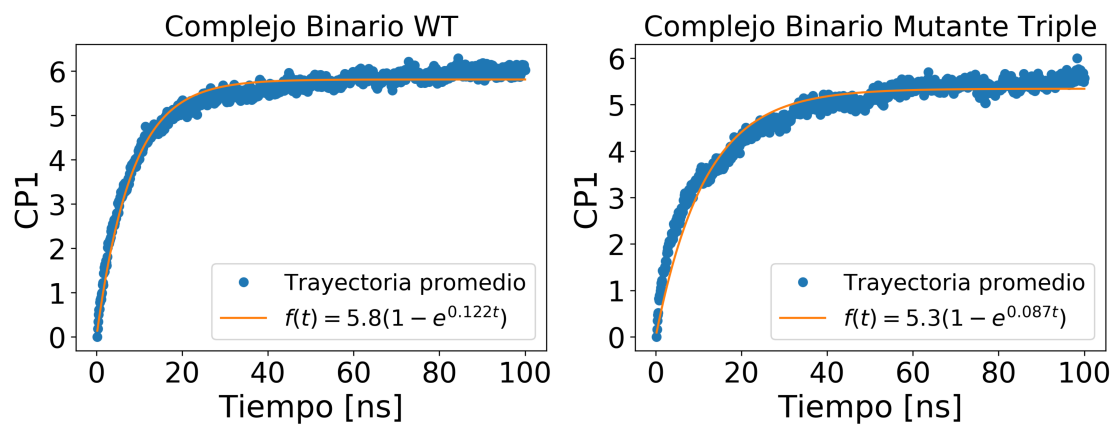


Figura A.3: Ajuste de modelo cinético para la apertura de la subunidad cerrada descrita por PC1, correspondiente a los sistemas binarios silvestre y mutante triple. Constantes estimadas en ns<sup>-1</sup>.



## **B. Unión de CO<sub>2</sub> para los sistemas de estudio**

En este anexo se añaden las distribuciones para el exceso o reducción en la concentración de CO<sub>2</sub> sobre el sitio activo para los diferentes sistemas analizados en la sección 3.3.

# Sistema Binario

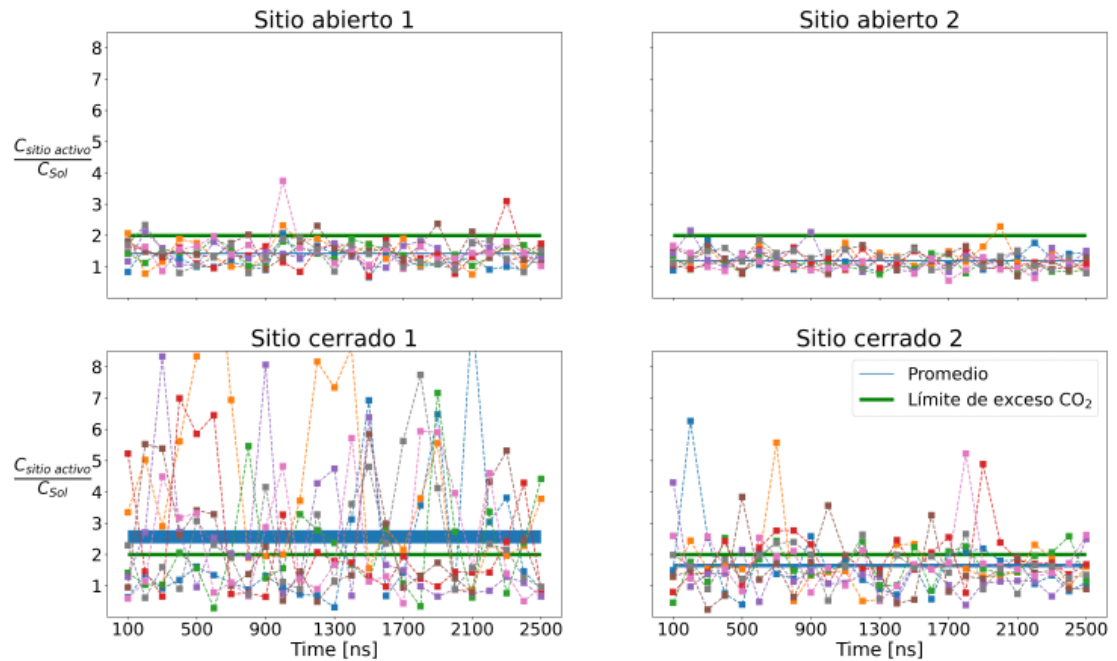


Figura B.1: Exceso de CO<sub>2</sub> en los cuatro sitios activos del complejo binario *WT* de Ccr. Se muestra un total de ocho trayectorias en diferentes colores para cada caja del sitio activo. Los puntos coloreados corresponden a promedios temporales de 100ns y están conectados con líneas punteadas que representan la evolución temporal de cada simulación. La línea horizontal azul representa el valor medio del exceso de CO<sub>2</sub> y su ancho corresponde a una estimación del error obtenida a través de análisis de bootstrap. La línea horizontal verde muestra el límite para seleccionar las ventanas de 100ns usadas para definir los sitios de unión.

# Sistema Ternario

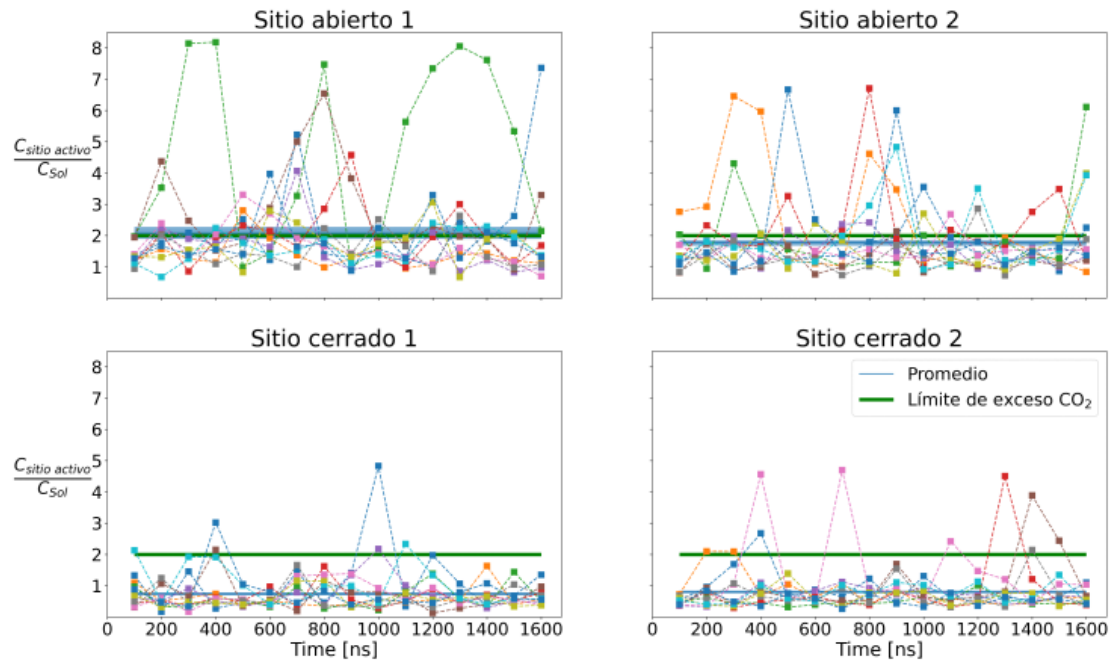


Figura B.2: Exceso de CO<sub>2</sub> en los cuatro sitios activos del complejo ternario *WT* de Ccr. Se muestra un total de doce trayectorias en diferentes colores para cada caja del sitio activo. Los puntos coloreados corresponden a promedios temporales de 100ns y están conectados con líneas punteadas que representan la evolución temporal de cada simulación. La línea horizontal azul representa el valor medio del exceso de CO<sub>2</sub> y su ancho corresponde a una estimación del error obtenida a través de análisis de bootstrap. La línea horizontal verde muestra el límite para seleccionar las ventanas de 100ns usadas para definir los sitios de unión.

# Sistema Ternario *in silico*

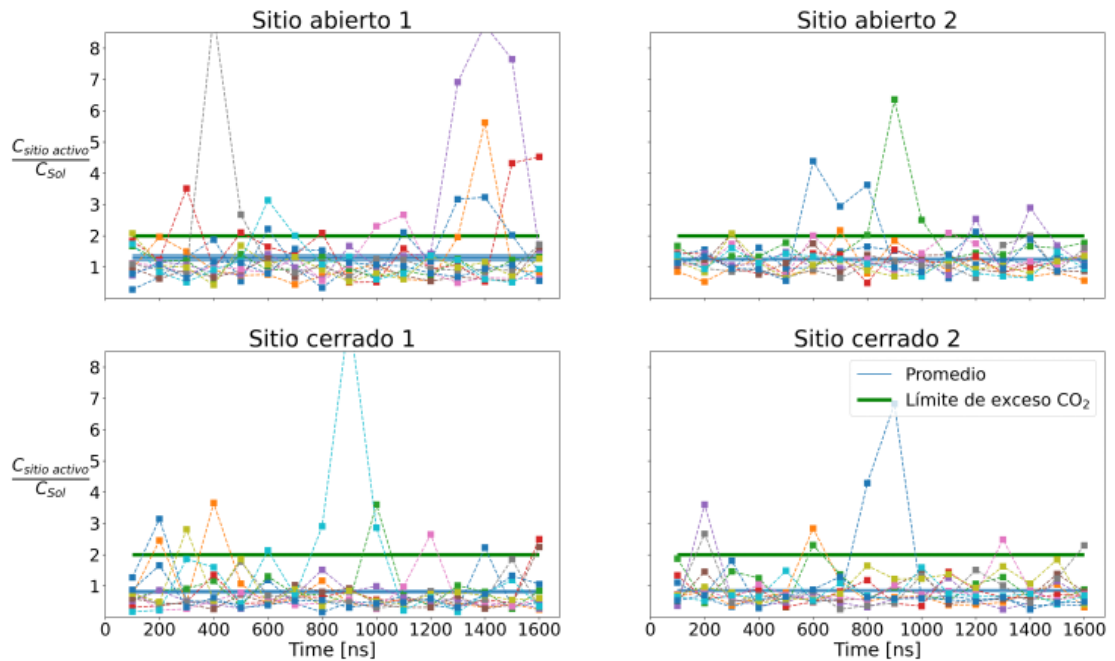


Figura B.3: Exceso de  $\text{CO}_2$  en los cuatro sitios activos del complejo ternario *in silico* WT de Ccr. Se muestra un total de doce trayectorias en diferentes colores para cada caja del sitio activo. Los puntos coloreados corresponden a promedios temporales de 100ns y están conectados con líneas punteadas que representan la evolución temporal de cada simulación. La línea horizontal azul representa el valor medio del exceso de  $\text{CO}_2$  y su ancho corresponde a una estimación del error obtenida a través de análisis de bootstrap. La línea horizontal verde muestra el límite para seleccionar las ventanas de 100ns usadas para definir los sitios de unión.

# Sistema Ternario *in silico* N81L

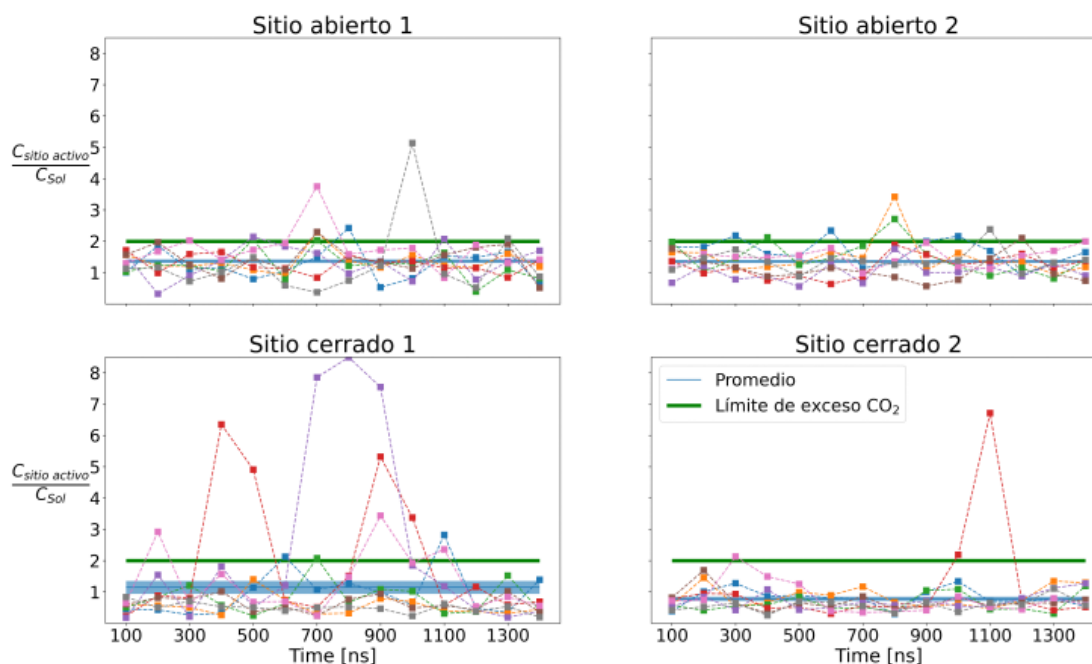


Figura B.4: Exceso de CO<sub>2</sub> en los cuatro sitios activos del complejo ternario *in silico* variante N81L de Ccr. Se muestra un total de ocho trayectorias en diferentes colores para cada caja del sitio activo. Los puntos coloreados corresponden a promedios temporales de 100ns y están conectados con líneas punteadas que representan la evolución temporal de cada simulación. La línea horizontal azul representa el valor medio del exceso de CO<sub>2</sub> y su ancho corresponde a una estimación del error obtenida a través de análisis de bootstrap. La línea horizontal verde muestra el límite para seleccionar las ventanas de 100ns usadas para definir los sitios de unión.

## C. Parámetros de simulación

Tabla C.1: Serie de comandos utilizados para la ejecución de simulaciones en gromacs.

```
cd Solvate/
gmx editconf -f ../complex.gro -bt cubic -d 1.5
gmx solvate -cp out.gro -cs spc216 -p ../topol.top
gmx grompp -f ions.mdp -p ../topol.top -c out.gro -maxwarn 1
echo 16 | gmx genion -s topol.tpr -p ../topol.top -conc 0.125
-pname K -nname CL -neutral
cd ../Minim/
gmx grompp -f minim.mdp -c ../Solvate/out.gro -p ../topol.top
gmx mdrun -v
cd ../Equil/
gmx grompp -f nvt.mdp -c ../Minim/confout.gro -r ../Minim/confout.gro
-p ../topol.top -o nvt
gmx mdrun -s nvt.tpr -deffnm nvt
gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -r nvt.gro -p ../topol.top -o npt
gmx mdrun -s npt.tpr -deffnm npt
cd ../Prod/
gmx grompp -f md.mdp -c ../Equil/npt.gro -r ../Equil/npt.gro -p ../topol.top
gmx mdrun
```

Tabla C.2: Parámetros de minimización con el integrador *steep*.

```
define = -DPOSRES
integrator = steep
  emtol = 1000.0
  emstep = 0.01
  nsteps = 5000
  nstlist = 1
cutoff-scheme = Verlet
  ns_type = grid
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
rvdw = 1.2
pbc = xyz
```

Tabla C.3: Parámetros de equilibración colectivo canónico NVT.

```

define = -DPOSRES
integrator = md
nsteps = 5000000
dt = 0.002
nstenergy = 5000
nstlog = 5000
nstxout-compressed = 5000
continuation = no
constraint-algorithm = lincs
constraints = h-bonds
lincs_iter = 1
lincs_order = 4
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid
nstlist = 20
rlist = 1.2
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
pme_order = 4
fourierspacing = 0.16
tcoupl = V-rescale
tc-grps = Prot_full non-prot_full
tau_t = 0.1 0.1
ref_t = 298 298
pcoupl = no
pbc = xyz
DispCorr = no
gen_vel = yes
gen_temp = 300
gen_seed = -1

```



Tabla C.4: Parámetros de equilibración isobárico-isotérmico canónico NPT.

```
define = -DPOSRES
integrator = md
nsteps = 2500000
dt = 0.002
nstenergy = 5000
nstlog = 5000
nstxout-compressed = 5000
continuation = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints = h-bonds
lincs_iter = 1
lincs_order = 4
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid
nstlist = 20
rlist = 1.2
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
pme_order = 4
fourierspacing = 0.16
tcoupl = V-rescale
tc-grps = Prot_full non-prot_full
tau_t = 0.1 0.1
ref_t = 298 298
pcoupl = Berendsen
pcoupltype = isotropic
refcoord_scaling = com
```

tau\_p = 2.0  
ref\_p = 1.0  
compressibility = 4.5e-5 pbc = xyz  
DispCorr = no  
gen\_vel = no

Tabla C.5: Parámetros de producción en el colectivo canónico NVT.

```

define = -DPOSRES_CA
integrator = md
nsteps = 1250000000
dt = 0.002
nstenergy = 50000
nstlog = 50000
nstxout-compressed = 50000
continuation = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints = h-bonds
lincs_iter = 1
lincs_order = 4
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid
nstlist = 20
rlist = 1.2
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
pme_order = 4
fourierspacing = 0.16
tcoupl = V-rescale
tc-grps = Prot_full non-prot_full
tau_t = 0.1 0.1
ref_t = 298 298
pcoupl = no
pbc = xyz
DispCorr = no
gen_vel = no
; COM constraint
pull = yes

```

```

        pull-ngroups = 16
        pull-ncoords = 8
    pull_group1_name = ARG99_A
    pull_group2_name = HIS409_A
    pull_group3_name = ARG99_B
    pull_group4_name = HIS409_B
    pull_group5_name = P1A1
    pull_group6_name = P1A2
    pull_group7_name = P2
    pull_group8_name = P5
    pull_group9_name = but_A
    pull_group10_name = but_B
    pull_group11_name = arg303_A
    pull_group12_name = arg303_B
    pull_group13_name = crot_1
    pull_group14_name = crot_2
    pull_group15_name = nadph_1
    pull_group16_name = nadph_2
        ; but-arg_A
    pull_coord1_type = flat-bottom
pull_coord1_geometry = distance
    pull_coord1_groups = 1 5
    pull_coord1_dim = Y Y Y
    pull_coord1_k = 1000
    pull_coord1_start = yes
        ;but-arg_B
    pull_coord2_type = flat-bottom
pull_coord2_geometry = distance
    pull_coord2_groups = 2 7
    pull_coord2_dim = Y Y Y
    pull_coord2_k = 1000
    pull_coord2_start = yes
        ;nadph_arg_A
    pull_coord3_type = flat-bottom
pull_coord3_geometry = distance
    pull_coord3_groups = 3 6

```

```

    pull_coord3_dim = Y Y Y
      pull_coord3_k = 1000
    pull_coord3_start = yes
      ;nadph_arg_B
    pull_coord4_type = flat-bottom
pull_coord4_geometry = distance
    pull_coord4_groups = 4 8
      pull_coord4_dim = Y Y Y
        pull_coord4_k = 1000
    pull_coord4_start = yes
      ;nadph_arg_B
    pull_coord5_type = flat-bottom
pull_coord5_geometry = distance
    pull_coord5_groups = 9 12
      pull_coord5_dim = Y Y Y
        pull_coord5_k = 1000
    pull_coord5_start = yes
      ;nadph_arg_B
    pull_coord6_type = flat-bottom
pull_coord6_geometry = distance
    pull_coord6_groups = 10 11
      pull_coord6_dim = Y Y Y
        pull_coord6_k = 1000
    pull_coord6_start = yes
      ;nadph_arg_B
    pull_coord7_type = flat-bottom
pull_coord7_geometry = distance
    pull_coord7_groups = 13 15
      pull_coord7_dim = Y Y Y
        pull_coord7_k = 1000
    pull_coord7_start = yes
      ;nadph_arg_B
    pull_coord8_type = flat-bottom
pull_coord8_geometry = distance
    pull_coord8_groups = 14 16
      pull_coord8_dim = Y Y Y

```

```
pull_coord8_k = 1000  
pull_coord8_start = yes
```

Tabla C.6: Parámetros de transformaciones alquímicas.

```
define = -DPOSRES_LIG
integrator = sd
nsteps = 2500000
dt = 0.002
nstenergy = 500
nstxout = 5000
nstvout = 5000
nstlog = 5000
continuation = yes
constraint-algorithm = lincs
constraints = h-bonds
lincs_iter = 1
lincs_order = 4
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid
nstlist = 10
rlist = 1.2
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
pme_order = 4
fourierspacing = 0.16
pcoupl = no
pbc = xyz
DispCorr = no
gen_vel = no
free-energy = yes
nstdhdl = 200
couple-lambda1 = none
couple-lambda0 = vdw-q
couple-intramol = yes
```

```
calc_lambda_neighbors = -1
    sc-power = 1
    sc-alpha = 0.5
init-lambda-state = 1
    coul-lambdas = $LAMBDA
    vdw-lambdas = $LAMBDA
    bonded-lambdas = $LAMBDA
```



Tabla C.7: Obtención de mapas de densidad de CO<sub>2</sub>.

```
source /Users/aharongomez/agomez/Software/gromaps/bin/GMXRC
for i in {0..24}
do for j in {0..7}
do gmx maptide -f traj_"j"_"i"00.xtc -s ../tpout.tpr -mo traj_"j"_"i"00
-spacing 0.1 -select 'group CO2' -refmap
/home/agomez/New_Binario_equal/Replica_0/Trjs_analysis/traj_0_000.ccp4
gmx mapconvert -mi traj_"j"_"i"00.ccp4 -mo traj_"j"_"i"00.dump
done
done
```

# D. Presentaciones en congresos y publicaciones

## D.1. Congresos

1. *LatinXchem Twitter Conference 2021* póster titulado *Conformational Changes Modulates CO<sub>2</sub> Concentration in the Active Site of the Most Efficient Carboxylase*
2. *EMBO virtual workshop Advances and Challenges in biomolecular simulations* póster titulado *Conformational Changes Modulates CO<sub>2</sub> Concentration in the Active Site of the Most Efficient Carboxylase*, Heidelberg (online), Alemania.
3. QCMM-2022 presentación oral titulada *Subunit conformation modulates the concentration of CO<sub>2</sub> in the active site of the most efficient carboxylase*, Universidad de Concepción, Chile.
4. IV Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones y las III Jornadas de Biocatálisis póster titulado *Descifrando el mecanismo de fijación de CO<sub>2</sub> en Crotonil-CoA Carboxilasa/Reductasa: oportunidades para futuras aplicaciones*

## D.2. Publicaciones

### 1. **Intersubunit Coupling Enables Fast CO<sub>2</sub>-Fixation by Reductive Carboxylases**

Hasan DeMirci, Yashas Rao, Gabriele M. Stoffel, Bastian Vögeli, Kristina Schell, Aharon Gomez, Alexander Batyuk, Cornelius Gati, Raymond G. Sierra, Mark S. Hunter, E. Han Dao, Halil I. Ciftci, Brandon Hayes, Fredric Poitevin, Po-Nan Li, Manat Kaur, Kensuke Tono, David Adrian Saez, Samuel Deutsch, Yasuo Yoshikuni, Helmut Grubmüller, Tobias J. Erb, Esteban Vöhringer-Martinez, and Soichi Wakatsuki *ACS Central Science* 2022 8 (8), 1091-1101 DOI: [10.1021/acscentsci.2c00057](https://doi.org/10.1021/acscentsci.2c00057)

### 2. **Covalent adduct formation as strategy for efficient CO<sub>2</sub> fixation in crotonyl-CoA carboxylases/reductases**

Rodrigo Recabarren, Matthias Tinzl, David Saez, Aharon Gomez Llanos, Tobias Erb, Esteban Vöhringer-Martinez, *ACS Catalysis* 2023 13 (9), 6230-6241 [10.1021/acscatal.2c05250](https://doi.org/10.1021/acscatal.2c05250)

### 3. **Infrared Spectroscopy Reveals Metal-independent Carbonic Anhydrase Activity in Crotonyl-CoA Carboxylase/Reductase** Aharon Gomez, Matthias Tinzl, Gabriele Stoffel, Helmut Grubmüller, Tobias J. Erb, Esteban Vöhringer-Martinez, and Sven T. Stripp, *Submitted to Chemical Science. Preprint* [10.26434/chemrxiv-2022-00rfw](https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-00rfw)

### 4. **Development of the Biocatalytic Reductive Aldol Reaction** Gabriele M. Stoffel, Matthias Tinzl, David Adrian Saez, Patrick D. Gerlinger, Rodrigo Recabarren, Carlos Castillo, Timothy Bradley, Hendrik Westedt, Pascal Pfister, Aharon Gomez, Nicole Paczia, Marc-Olivier Ebert, Esteban Vöhringer-Martinez, Tobias J. Erb, *Submitted to Nature Catalysis*.

### 5. **Conformational dynamics of the most efficient carboxylase contributes to efficient CO<sub>2</sub> fixation** Aharon Gomez, Tobias J. Erb, Helmut Grubmüller and Esteban Vöhringer-Martinez, *Submitted to ACS Catalysis. Preprint* [10.26434/chemrxiv-2023-xt3rv](https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-xt3rv).