



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Químicas - Programa de Doctorado en Ciencias  
Con Mención en Química

## **Estudio teórico sobre la biosíntesis de (R)-fenilacetilcarbinol en la enzima AHAS**

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

OMAR BLAS ALVARADO CARRIPÁN  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2018

Profesor Guía: Eduardo Delgado Ramírez  
Dpto. de Físico Química, Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Concepción

## Tabla de Contenido

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tablas.....	xiii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
Agradecimientos.....	xvii
Abreviaturas.....	xix
<b>Capítulo 1: Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 (R)-Fenilacetilcarbinol.....	2
1.2 Enzima Ácido Acetohidroxi Sintasa.....	4
1.3 Propuesta de Investigación.....	10
1.4 Hipótesis y Objetivos.....	17
1.4.1 Hipótesis.....	17
1.4.2 Objetivos.....	17
<b>Capítulo 2: Metodología.....</b>	<b>20</b>
2.1 Construcción de los sistemas AP, IP y APH <sup>+</sup> .....	21
2.2 Simulaciones de dinámica molecular mecánico clásicas.....	26
2.3 Simulaciones de dinámica molecular mecánico clásicas/mecánico cuánticas (QM/MM).....	32
2.4 Superficies de energía potencial QM/MM.....	36
<b>Capítulo 3: Resultados y discusiones.....</b>	<b>42</b>
3.1 Dinámica molecular mecánico clásica.....	43
3.1.1 Dinámica molecular MM sistema AP.....	44
3.1.2 Dinámica molecular MM sistema IP.....	77
3.1.3 Dinámica molecular MM sistema APH <sup>+</sup> .....	106
3.2 Dinámica molecular QM/MM.....	141
3.2.1 Dinámica molecular QM/MM sistema AP.....	142
3.2.2 Dinámica molecular QM/MM sistema IP.....	152
3.2.3 Dinámica molecular QM/MM sistema APH <sup>+</sup> .....	161
3.3 Superficies de energía potencial QM/MM.....	171
3.3.1 Superficie de energía potencial QM/MM sistema AP.....	172
3.3.2 Superficie de energía potencial QM/MM sistema IP.....	184
3.3.3 Superficie de energía potencial QM/MM sistema APH <sup>+</sup> .....	197
<b>Capítulo 4: Conclusiones y proyecciones.....</b>	<b>215</b>
4.1 Conclusiones.....	216
4.2 Proyecciones.....	221

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Síntesis de l-efedrina, l-norefedrina, d-pseudoefedrina y d-norpseudoefedrina a partir del intermediario R-PAC .....	2
<b>Figura 1.2.</b> Formación de subproductos en la producción de R-PAC mediante biotransformación utilizando la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	3
<b>Figura 1.3.</b> Estructura cofactor tiamina difosfato con los diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ .....	5
<b>Figura 1.4.</b> Mecanismo correspondiente a las etapas de activación del cofactor ThDP.....	6
<b>Figura 1.5.</b> Estructura del cofactor FAD, las unidades de riboflavina, adenina, ribosa y el grupo difosfato se muestran en los colores: azul, rojo, verde y amarillo, respectivamente.....	7
<b>Figura 1.6.</b> Ciclo catalítico de la enzima AHAS y formación de R-PAC.....	8
<b>Figura 1.7.</b> Mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC.....	11
<b>Figura 1.8.</b> Esquema de las interacciones no enlazantes reportadas para la formación de acetolactato en el tercer paso del ciclo catalítico de la enzima AHAS.....	15
<b>Figura 2.1.</b> Monómero beta de la estructura cristalina 1N0H de la enzima AHAS plegada en los dominios alfa, beta y gamma, con el cofactor ThDP en color rojo y el herbicida CE en color naranja .....	21
<b>Figura 2.2.</b> Sitios activos de la estructura cristalina 1N0H de la enzima AHAS. <b>A-</b> Sitio activo 1 monómero A cofactor ThDP parcialmente degradado y <b>B-</b> Sitio activo 2 monómero B cofactor a la forma del intermediario iluro-ThDP.....	23
<b>Figura 2.3</b> Estructuras optimizadas en fase gas y con el método semiempírico AM1 de los complejos. <b>A-</b> HETHDP-BA-AP, <b>B-</b> HETHDP-BA-IP y <b>C-</b> HETHDP-APH <sup>+</sup> .....	25
<b>Figura 2.4</b> Estructura enzima AHAS solvatada con caja moléculas de agua.....	27
<b>Figura 2.5</b> Estructura enzima AHAS solvatada con esfera moléculas de agua.....	33
<b>Figura 2.6</b> Coordenadas asimétricas del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC en la enzima AHAS .....	37
<b>Figura 3.1.</b> RMSD backbone de los residuos sistema AP dinámica molecular MM.....	45

<b>Figura 3.2.</b> $\Delta$ RMSD backbone de los residuos sistema AP dinámica molecular MM.....	45
<b>Figura 3.3.</b> RMSD backbones, HETHDP-BA-AP y FAD sistema AP 100 ns DM MM.....	46
<b>Figura 3.4.</b> $\Delta$ RMSD backbones, HETHDP-BA-AP y FAD sistema AP 100 ns DM MM.....	46
<b>Figura 3.5.</b> Enlaces de hidrógeno entre residuos sistema AP 100 ns DM MM.....	48
<b>Figura 3.6.</b> Radio de giro de la enzima AHAS sistema AP 100 ns DM MM.....	49
<b>Figura 3.7.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema AP 100 ns DM MM.....	50
<b>Figura 3.8.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema AP 100 ns DM MM.....	50
<b>Figura 3.9.</b> Residuos con mayores valores de RMSF señalados en la representación de la estructura cuaternaria de la enzima AHAS .....	52
<b>Figura 3.10.</b> Estructura promedio sitio activo 2 del sistema AP para 100ns DM MM.....	54
<b>Figura 3.11.</b> Estructura promedio sitio activo 2 del sistema AP para el intervalo entre los 30 ns y los 60 ns DM MM .....	54
<b>Figura 3.12.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA-AP para el sitio activo 2 del sistema AP para los 100 ns de DM MM.....	56
<b>Figura 3.13.</b> Estructura promedio sitio activo 1 del sistema AP para 100ns DM MM.....	57
<b>Figura 3.14.</b> Estructura promedio sitio activo 1 del sistema AP para el intervalo entre los 30 ns y los 60 ns DM MM .....	58
<b>Figura 3.15.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA-AP para el sitio activo 1 del sistema AP para los 100 ns de DM MM.....	59
<b>Figura 3.16. A-</b> Distribución distancia enlace de hidrógeno Met525-H/N3'-pirimidina y <b>B-</b> Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....	61

<b>Figura 3.17. A-Distribución distancia interacción Met525-S/S-tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 3.18. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O<math>\alpha</math>-HETHDP-AP B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 3.19. A-Distribución distancia interacción Gly116-H/O<math>\beta</math>-Benzaldehído B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 3.20. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/O<math>\alpha</math>-HETHDP-AP y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 3.21. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-Amino AP y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 3.22. A-Distribución distancia interacción Arg380/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 3.23. A-Distribución distancia interacción Trp586/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 3.24. A-Distribución distancia interacción Phe201/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 3.25. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Glu139-H/N1'-Pirimidina y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 3.26. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly523-O/H-Amino y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 3.27. A-Distribución distancia interacción Met582-S/S-Tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 3.28. RMSD del backbone de los aminoácidos del sitio activo 1 del sistema AP.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 3.29. RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-AP del sitio activo 1 del sistema AP para 100ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 3.30. Nombre de los átomos del complejo HETHDP-BA-AP del sitio activo 1 del sistema AP para 100 ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 3.31. Estructura del sitio activo 1 del sistema AP correspondiente a los 59 ns de dinámica molecular mecánico clásica.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 3.32. RMSD backbone de los residuos sistema IP dinámica molecular MM.....</b>	<b>78</b>

<b>Figura 3.33.</b> $\Delta$ RMSD backbone de los residuos sistema IP dinámica molecular MM....	78
<b>Figura 3.34.</b> RMSD backbones, HETHDP-BA-IP y FAD sistema IP 100 ns DM MM.....	79
<b>Figura 3.35.</b> $\Delta$ RMSD backbones, HETHDP-BA-IP y FAD sistema IP 100 ns DM MM....	80
<b>Figura 3.36.</b> Enlaces de hidrógeno entre residuos sistema IP 100 ns DM MM.....	81
<b>Figura 3.37.</b> Radio de giro de la enzima AHAS sistema IP 100 ns DM MM.....	81
<b>Figura 3.38.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema IP 100 ns DM MM.....	82
<b>Figura 3.39.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema IP 100 ns DM MM.....	82
<b>Figura 3.40.</b> Estructura promedio sitio activo 1 del sistema IP para 100ns DM MM.....	84
<b>Figura 3.41.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA-IP para el sitio activo 1 del sistema IP para los 100 ns de DM MM.....	85
<b>Figura 3.42.</b> Estructura promedio sitio activo 2 del sistema IP para 100ns DM MM.....	86
<b>Figura 3.43.</b> Estructura promedio sitio activo 2 del sistema IP para el intervalo entre los 40 ns y los 60 ns DM MM .....	87
<b>Figura 3.44.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA-IP para el sitio activo 2 del sistema IP para los 100 ns de DM MM.....	87
<b>Figura 3.45.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Met525-H/N3'-pirimidina y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....	89
<b>Figura 3.46.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Met525-S/S-tiazolio y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....	90
<b>Figura 3.47.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\alpha$ -HETHDP-IP y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....	91
<b>Figura 3.48.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\beta$ -Benzaldehído y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....	91
<b>Figura 3.49.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-Imino IP y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....	92
<b>Figura 3.50.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-IP y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....	93

<b>Figura 3.51. A-Distribución distancia interacción Arg380/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 3.52. A-Distribución distancia interacción Trp586/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 3.53. A-Distribución distancia interacción Phe201/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 3.54. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Glu139-O/H-N1'-Pirimidina y B-Variación energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 3.55. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Glu523-O/H-Imino y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 3.56. A-Distribución distancia interacción Met582-S/S-Tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 3.57. RMSD del backbone de los aminoácidos del sitio activo 2 del sistema IP.....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 3.58. RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-IP del sitio activo 2 del sistema IP para 100ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 3.59. Nombre de los átomos del complejo HETHDP-BA-IP del sitio activo 2 del sistema IP para 100ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.....</b>	<b>104</b>
<b>Figura 3.60. Estructura del sitio activo 2 del sistema IP correspondiente a los 50 ns de dinámica molecular mecánico clásica.....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 3.61. RMSD backbone de residuos sistema APH<sup>+</sup> dinámica molecular MM.....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 3.62. <math>\Delta</math>RMSD backbone de residuos sistema APH<sup>+</sup> dinámica molecular MM.....</b>	<b>107</b>
<b>Figura 3.63. RMSD backbones, complejos HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> y cofactores FAD sistema APH<sup>+</sup> 100 ns DM MM.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 3.64. <math>\Delta</math>RMSD backbone, complejos HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> y cofactores FAD sistema APH<sup>+</sup> 100 ns DM MM.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 3.65. Número de enlaces de hidrógeno entre residuos del sistema APH<sup>+</sup> durante 100 ns DM MM.....</b>	<b>109</b>

<b>Figura 3.66.</b> Radio de giro de la enzima AHAS sistema APH <sup>+</sup> 100 ns DM MM.....	110
<b>Figura 3.67.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema APH <sup>+</sup> 100 ns DM MM.....	111
<b>Figura 3.68.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema APH <sup>+</sup> 100 ns DM MM.....	112
<b>Figura 3.69.</b> Estructura promedio sitio activo 1 del sistema APH <sup>+</sup> para 100ns DM MM.....	114
<b>Figura 3.70.</b> Estructura promedio sitio activo 1 del sistema APH <sup>+</sup> para el intervalo entre los 35 ns y los 80 ns DM MM.....	115
<b>Figura 3.71.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA- APH <sup>+</sup> para el sitio activo 1 del sistema APH <sup>+</sup> para los 100 ns de DM MM.....	117
<b>Figura 3.72.</b> Estructura promedio sitio activo 2 del sistema APH <sup>+</sup> para 100ns DM MM.....	118
<b>Figura 3.73.</b> Estructura promedio sitio activo 2 del sistema APH <sup>+</sup> para el intervalo entre los 35 ns y los 80 ns DM MM.....	119
<b>Figura 3.74.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA- APH <sup>+</sup> para el sitio activo 2 del sistema APH <sup>+</sup> para los 100 ns de DM MM.....	121
<b>Figura 3.75.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Met525-H/N3'-pirimidina y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH <sup>+</sup> .....	123
<b>Figura 3.76.</b> <b>A</b> -Distribución distancia interacción Met525-S/S-tiazolio y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH <sup>+</sup> .....	123
<b>Figura 3.77.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\beta$ -Benzaldehído y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH <sup>+</sup> .....	124
<b>Figura 3.78.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\alpha$ -HETHDP-APH <sup>+</sup> <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH <sup>+</sup> .....	125
<b>Figura 3.79.</b> <b>A</b> -Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-APH <sup>+</sup> y <b>B</b> -Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH <sup>+</sup> .....	126

<b>Figura 3.80. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-Iminio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup></b> .....	126
<b>Figura 3.81. A-Distribución distancia interacción Arg380/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup></b> .....	127
<b>Figura 3.82. A-Distribución distancia interacción Trp586/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup></b> .....	128
<b>Figura 3.83. A-Distribución distancia interacción Phe201/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup></b> .....	128
<b>Figura 3.84. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Glu139-O/H-N1'-Pirimidina y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup></b> .....	130
<b>Figura 3.85. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Glu523-O/H-Imonio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup></b> .....	131
<b>Figura 3.86. A-Distribución distancia interacción Met582-S/S-Tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup></b> .....	132
<b>Figura 3.87. RMSD backbone de aminoácidos del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup></b> .....	136
<b>Figura 3.88. RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> para 100ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica</b> .....	137
<b>Figura 3.89. Nombre de los átomos del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> para 100 ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica</b> .....	138
<b>Figura 3.90. Estructura del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> correspondiente a los 50 ns de dinámica molecular mecánico clásica</b> .....	139
<b>Figura 3.91. RMSD backbone residuos, complejo HETHDP-BA-AP y cofactor FAD sistema AP para 1 ns de DM QM/MM</b> .....	143

<b>Figura 3.92.</b> RMSF de los carbonos alfa de los residuos del monómero A sistema AP 1 ns DM QM/MM.....	145
<b>Figura 3.93.</b> RMSF de los carbonos alfa de los residuos del monómero B sistema AP 1 ns DM QM/MM.....	145
<b>Figura 3.94.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA-AP para el sitio activo del sistema AP para 1 ns de DM QM/MM .....	148
<b>Figura 3.95.</b> RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-AP del sitio activo del sistema AP para 1 ns de simulación de dinámica molecular QM/MM.....	151
<b>Figura 3.96.</b> Estructura representativa del sistema AP correspondiente a los 349 ps de dinámica molecular QM/MM.....	152
<b>Figura 3.97.</b> RMSD backbone residuos, complejo HETHDP-BA-IP y cofactor FAD sistema IP para 1 ns de DM QM/MM.....	153
<b>Figura 3.98.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema IP 1 ns DM QM.....	154
<b>Figura 3.99.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema IP 1ns DM QM/MM.....	154
<b>Figura 3.100.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA-IP para el sitio activo del sistema IP para 1 ns de DM QM/MM .....	157
<b>Figura 3.101.</b> RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-IP del sitio activo del sistema IP para 1 ns de simulación de dinámica molecular QM/MM.....	160
<b>Figura 3.102.</b> Estructura representativa del sistema IP correspondiente a los 454 ps de dinámica molecular QM/MM.....	161
<b>Figura 3.103.</b> RMSD backbone y cofactores HETHDP-BA-APH <sup>+</sup> y FAD sistema AP para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.....	162
<b>Figura 3.104.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema APH <sup>+</sup> 1 ns DM QM/MM.....	163
<b>Figura 3.105.</b> RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema APH <sup>+</sup> 1 ns DM QM/MM.....	163
<b>Figura 3.106.</b> Valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del complejo HETHDP-BA-APH <sup>+</sup> para el sitio activo del sistema APH <sup>+</sup> para 1 ns de DM QM/MM.....	165

<b>Figura 3.107.</b> RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-APH <sup>+</sup> del sitio activo del sistema APH <sup>+</sup> para 1ns de simulación de dinámica molecular QM/MM.....	168
<b>Figura 3.108.</b> Estructura representativa del sistema APH <sup>+</sup> correspondiente a los 477 ps de dinámica molecular QM/MM.....	169
<b>Figura 3.109.</b> Superficie de energía potencial 3D QM/MM formación de R-PAC enzima AHAS sistema AP.....	173
<b>Figura 3.110.</b> Superficie de energía potencial QM/MM de contorno para la formación de R-PAC enzima AHAS sistema AP.....	174
<b>Figura 3.111.</b> Diagrama de energía potencial (Kcal/mol) para la formación de R-PAC en la enzima AHAS con el intermediario HETHDP bajo la forma de AP.....	175
<b>Figura 3.112.</b> Estructura zona de reactantes PES QM/MM sistema AP.....	176
<b>Figura 3.113.</b> Estructura zona del estado de transición 1 PES QM/MM sistema AP.....	178
<b>Figura 3.114.</b> Estructura zona del intermediario PES QM/MM sistema AP.....	180
<b>Figura 3.115.</b> Estructura zona del estado de transición 2 PES QM/MM sistema AP.....	181
<b>Figura 3.116.</b> Estructura zona de productos PES QM/MM sistema AP.....	182
<b>Figura 3.117.</b> Superficie de energía potencial 3D QM/MM formación de R-PAC enzima AHAS sistema IP.....	185
<b>Figura 3.118.</b> Superficie de energía potencial QM/MM de contorno para la formación de R-PAC enzima AHAS sistema IP.....	186
<b>Figura 3.119.</b> Diagrama de energía potencial (Kcal/mol) para la formación de R-PAC en la enzima AHAS con el intermediario HETHDP bajo la forma de IP.....	187
<b>Figura 3.120.</b> Estructura zona de reactantes PES QM/MM sistema IP.....	188
<b>Figura 3.121.</b> Estructura zona del estado de transición 1 PES QM/MM sistema IP.....	190
<b>Figura 3.122.</b> Estructura zona del intermediario PES QM/MM sistema IP.....	192
<b>Figura 3.123.</b> Estructura zona del estado de transición 2 PES QM/MM sistema IP.....	193

<b>Figura 3.124.</b> Estructura zona de productos PES QM/MM sistema IP.....	195
<b>Figura 3.125.</b> Superficie de energía potencial 3D QM/MM formación de R-PAC enzima AHAS sistema APH <sup>+</sup> .....	198
<b>Figura 3.126.</b> Superficie de energía potencial QM/MM de contorno para la formación de R-PAC enzima AHAS sistema APH <sup>+</sup> .....	200
<b>Figura 3.127.</b> Diagrama de energía potencial (Kcal/mol) para la formación de R-PAC en la enzima AHAS con el intermediario HETHDP bajo la forma de APH <sup>+</sup> .....	201
<b>Figura 3.128.</b> Estructura zona de reactantes PES QM/MM sistema APH <sup>+</sup> .....	203
<b>Figura 3.129.</b> Estructura zona estado de transición 1 PES QM/MM sistema APH <sup>+</sup> .....	205
<b>Figura 3.130.</b> Estructura zona del intermediario PES QM/MM sistema APH <sup>+</sup> .....	206
<b>Figura 3.131.</b> Estructura zona estado de transición 2 PES QM/MM sistema APH <sup>+</sup> .....	207
<b>Figura 3.132.</b> Estructura zona de productos PES QM/MM sistema APH <sup>+</sup> .....	209



## Índice de Tablas

<b>Tabla 3.1.</b> Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo 1 y 2 del sistema AP en la enzima AHAS para 100 ns de dinámica molecular MM.....	52
<b>Tabla 3.2.</b> Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo 1 y 2 del sistema AP y energías de interacción promedio del sitio activo 1 para 100 ns de dinámica molecular MM.....	72
<b>Tabla 3.3.</b> Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitios activos 1 y 2 del sistema IP en la enzima AHAS 100 ns de dinámica molecular MM .....	83
<b>Tabla 3.4.</b> Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo 1 y 2 del sistema IP y energías de interacción promedio del sitio activo 2 para 100 ns de dinámica molecular MM.....	101
<b>Tabla 3.5.</b> Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo 1 y 2 del sistema APH <sup>+</sup> en la enzima AHAS para 100 ns de dinámica molecular MM.....	112
<b>Tabla 3.6.</b> Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo 1 y 2 del sistema APH <sup>+</sup> y energías de interacción promedio del sitio activo 2 para 100 ns de dinámica molecular MM.....	133
<b>Tabla 3.7.</b> Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo del sistema AP en la enzima AHAS para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.....	146
<b>Tabla 3.8.</b> Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo del sistema AP para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.....	150
<b>Tabla 3.9.</b> Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo del sistema IP en la enzima AHAS para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.....	155
<b>Tabla 3.10.</b> Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo del sistema IP para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.....	159
<b>Tabla 3.11.</b> Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo del sistema APH <sup>+</sup> en la enzima AHAS para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.....	164

<b>Tabla 3.12.</b> Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo del sistema APH <sup>+</sup> para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.....	167
<b>Tabla 3.13.</b> Distancias de las coordenadas de reacción y valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del intermediario HETHDP-AP de la PES QM/MM para la formación de R-PAC.....	183
<b>Tabla 3.14.</b> Distancias de las coordenadas de reacción y valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del intermediario HETHDP-IP de la PES QM/MM para la formación de R-PAC.....	196
<b>Tabla 3.15.</b> Distancias de las coordenadas de reacción y valores de los ángulos diedros $\Phi_P$ y $\Phi_T$ del intermediario HETHDP-APH <sup>+</sup> de la PES QM/MM para la formación de R-PAC.....	210



## Resumen

Una importante  $\alpha$ -hidroxicetona utilizada como precursor en la industria farmacéutica en la síntesis de fármacos con propiedades  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicas es el (R)-fenilacetilcarbinol, R-PAC. La producción de R-PAC usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, glucosa y benzaldehído, fue el primer proceso de biotransformación quiral comercializado. En este proceso el R-PAC es sintetizado a partir de la condensación de piruvato y benzaldehído, utilizando la enzima piruvato descarboxilasa (PDC). Sin embargo, este proceso presenta baja eficiencia, toxicidad del sustrato hacia las células, y la formación de importantes cantidades de subproductos debido a la acción de enzimas intracelulares. Hace algunos años, se ha reportado que otra enzima Tiamino Difosfato (ThDP) dependiente, el ácido acetohidroxi sintasa (AHAS) es una eficiente alternativa para la producción de R-PAC, permitiendo una eficiente utilización de piruvato y altos niveles de conversión de benzaldehído a temperatura ambiente. A pesar de su importancia, el mecanismo de reacción involucrado en la carboligación del sustrato benzaldehído y la posterior liberación del producto R-PAC no ha sido dilucidado. Otras interrogantes son la identificación de los residuos cercanos al cofactor ThDP, y al sustrato benzaldehído, encargados de favorecer la formación del R-PAC en comparación a la del producto fisiológico acetolactato (AL), y la determinación del estado de protonación del intermediario HETHDP. En la presente tesis doctoral se abordó este tema mediante un estudio combinado de simulaciones de dinámica molecular (DM) y cálculos QM/MM, considerando los tres posibles estados de protonación (AP, IP, y APH<sup>+</sup>) del intermediario Hidroxietyl Tiamina Difosfato (HETHDP). Los resultados sugieren que el intermediario HETHDP debiera estar bajo la forma de 4'-iminopirimidinio (APH<sup>+</sup>) en orden de favorecer la formación de R-PAC, con respecto a los productos fisiológicos. Sólo bajo este estado de protonación ambos sitios activos tienen la capacidad de realizar la catálisis, otorgándole a la enzima una máxima eficiencia catalítica. La barrera de activación teórica calculada fue de 12 kcal/mol, la cual es menor a la barrera de activación observada experimentalmente para la formación del producto fisiológico de la enzima AL.

## Abstract

An important  $\alpha$ -hydroxy ketone used as precursor in the pharmaceutical industry is (R)-phenylacetylcarbinol or R-PAC. It is used in the synthesis of drugs with  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic properties. The production R-PAC using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, glucose and benzaldehyde was the first chiral biotransformation process commercialized. In this fermentative route R-PAC is formed due to the condensation of pyruvate and benzaldehyde catalyzed by the enzyme pyruvate decarboxylase (PDC). However, these processes have low efficiency, substrate toxicity toward living cells and production of important amounts of by-products due to the action of multiple intracellular enzymes. A few years ago, it has been reported that other ThDP dependent enzyme, the acid acetohydroxy synthase (AHAS) is an efficient alternative in the production of R-PAC. It shows high levels of conversion of benzaldehyde at room temperature. Despite of its importance, the reaction mechanism involved in the carboligation of the benzaldehyde substrate and the subsequent release of the product R-PAC from the cofactor has not yet been clarified. Other open questions are the identification of the residues near to the cofactor Thiamine Diphosphate (ThDP), and the benzaldehyde, responsible for promoting the formation of the R-PAC compared to the physiological product acetolactate, AL, and the determination of the protonation state of the Hydroxy Ethyl Thiamine Diphosphate (HETHDP) intermediate. This thesis addresses these issues by a combined molecular dynamics (MD) and hybrid QM/MM approach considering the three possible protonation states (AP,IP and APH<sup>+</sup>) of the intermediate HETHDP. The results suggest that the intermediate would be in the form of 4<sup>l</sup>-iminopyrimidinium (APH<sup>+</sup>), in order to favor the formation of R-PAC, compared to the physiological products. Only in this protonation state both active sites have the ability to perform the catalysis, granting the enzyme a maximum catalytic efficiency. The calculated activation barrier for the formation of R-PAC is 12 kcal/mol, which is less than the activation barrier observed experimentally for the formation of the physiological product of the enzyme AL.

## Agradecimientos

El presente trabajo de tesis doctoral que he desarrollado durante los últimos años ha involucrado directamente a mi núcleo familiar. Que hoy me encuentre en esta instancia de mi vida académica se lo debo principalmente a mi madre Monserrat Carripán Sáez ya que este logro fue fruto del trabajo en equipo que comenzó desde hace ya muchos años en el comienzo de mi vida escolar. Gracias a ti mamá, a tu enseñanza, apoyo y perseverancia que durante las diferentes etapas de mi vida me han hecho la persona y el profesional que soy hoy en día, gracias mamá. También agradezco a mi abuela Irene Sáez López quien junto a mi madre han sido los pilares fundamentales en mi vida para que pudiera desarrollarme durante todos los años de mi formación. A mi tía Sofía Seger Sáez quien me ha entregado su apoyo desde que he sido un niño y quien junto a su esposo Fredrik Seger y mi prima Isabella Seger me han acompañado durante mi etapa de pasantía. A mi tía Matilda Carripán Sáez quien ha sido participe de mi formación profesional desde pre-grado y un gran apoyo durante mis años de formación en el doctorado y a mi hermano Matías Alvarado Carripán físico y docente. También quiero agradecer a mi compañera, a mi amiga, a mi amor Claudia González Fuentes quien ha vivido el desarrollo de este trabajo de tesis de codo a codo conmigo, hemos recorrido este camino juntos y sin ti, mi vida, mi trabajo de estos años no valdría lo mismo gracias mi amor, te amo.

También quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Químicas, al departamento de Físico Química y a las autoridades del programa de Doctorado en Ciencias con Mención en Química de la Universidad de Concepción por el apoyo entregado para terminar este trabajo de tesis. A mi profesor guía, a mi tutor el Dr. Eduardo Delgado Ramírez, gracias por su apoyo, su consejo y por creer en mí durante el transcurso de estos años. A mi compañero de laboratorio y amigo Ignacio Lizana quien me ayudo a lo largo de estos años de forma personal y académica, gracias nacho. Además quiero dar especiales agradecimientos al Dr. Iñaki Tuñón García De Vicuña de la Universidad de Valencia, España, quien junto a su equipo de investigación efectos del medio me

han recibido de la mejor manera durante mi periodo de pasantía, como si me hubiesen conocido de toda la vida, gracias por su apoyo en la realización de esta tesis doctoral, que sin ellos esta tesis no se hubiese podido concretar. Al Dr. Rafael García Meseguer, al Dr. Javier Ruiz-Pernia, al Dr. Kirill Zinovjev, al Dr. Juan Luis Pascual-Ahuir y los Doctores Manuel Delgado y Sergio Martí del departamento de Química física y analítica de la Universidad de Jaume I de Castellón de la plana, España. A todos ellos muchísimas gracias.

Por último quiero agradecer al gobierno de Chile, al organismo nacional CONICYT y la beca doctorado nacional CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2013-21130346 por otorgarme el financiamiento durante la realización de esta tesis doctoral y mis agradecimientos por la financiación por conceptos de pasantía. Además quiero agradecer a la Universidad de Concepción y al programa de Red doctoral REDOC por su financiación por concepto de pasantía en la Universidad de Valencia, España



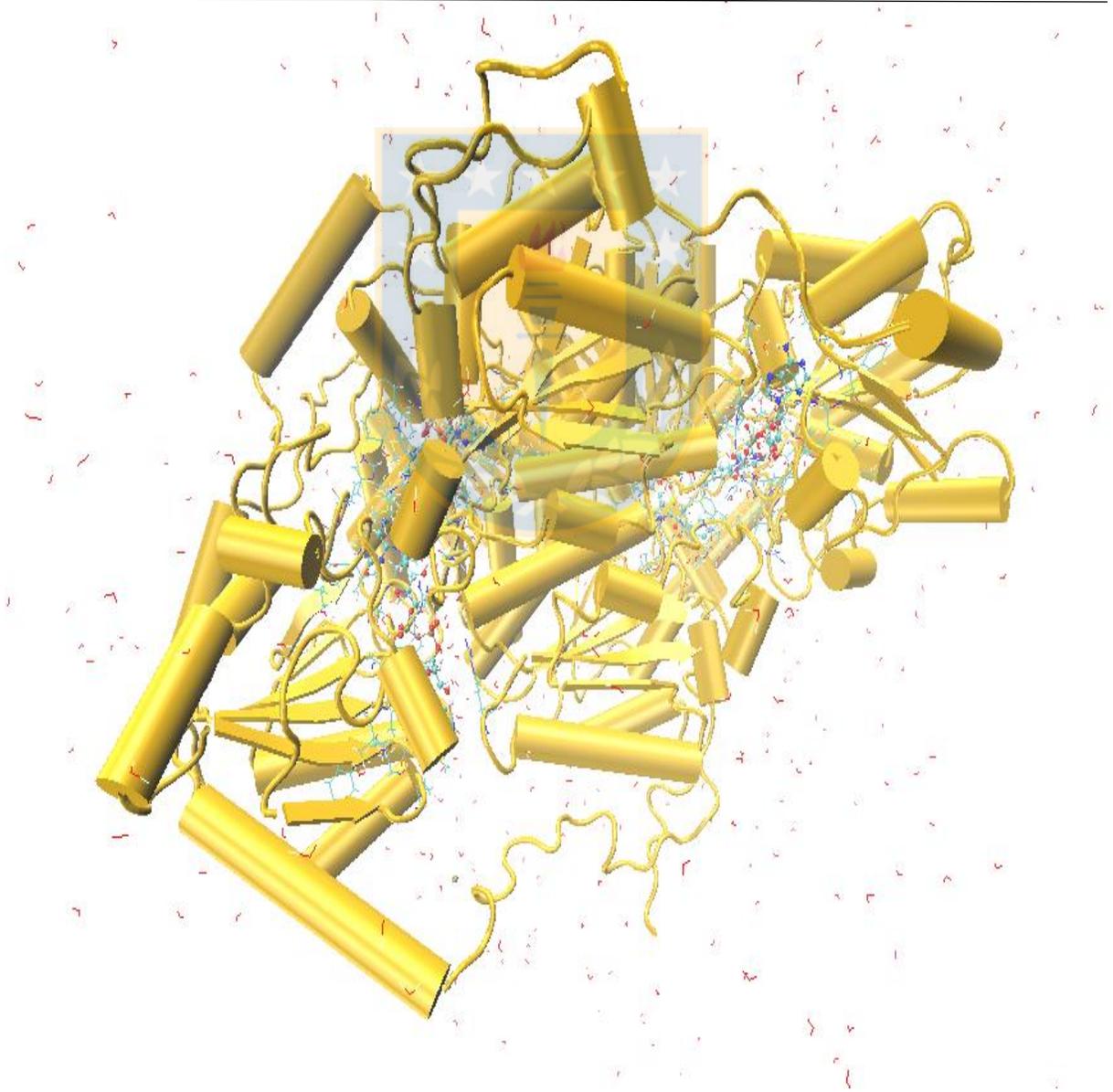
## Abreviaturas

<b>2CB</b>	= 2-cetobutirato
<b>AHB</b>	= (2s)-2-Acetohidroxibutirato
<b>AHAS</b>	= Acido Acetohidroxi sintasa
<b>AL</b>	= (2s)-2-Acetolactato
<b>AP</b>	= 4'-aminopirimidina
<b>APH<sup>+</sup></b>	= 4'-iminopirimidinio
<b>DM</b>	= Dinámica Molecular
<b>FAD</b>	= Flavin Adenin Dinucleótido
<b>HETHDP</b>	= Hydroxy Ethyl Thiamine Diphosphate
<b>IP</b>	= 1'-4'-iminopirimidina
<b>L-ThDP</b>	= Lactyl Thiamine Diphosphate
<b>MM</b>	= Molecular Mechanics
<b>OPLS-AA</b>	= Optimized Potentials for Liquid Simulations All-Atoms
<b>PES</b>	= Potential Energy Surface
<b>PDC</b>	= Piruvato Descarboxilasa
<b>QM</b>	= Quantum Mechanics
<b>R-PAC</b>	= R-Phenyl Acetyl Carbinol
<b>ThDP</b>	= Thiamine Diphosphate

# *Capítulo 1:*

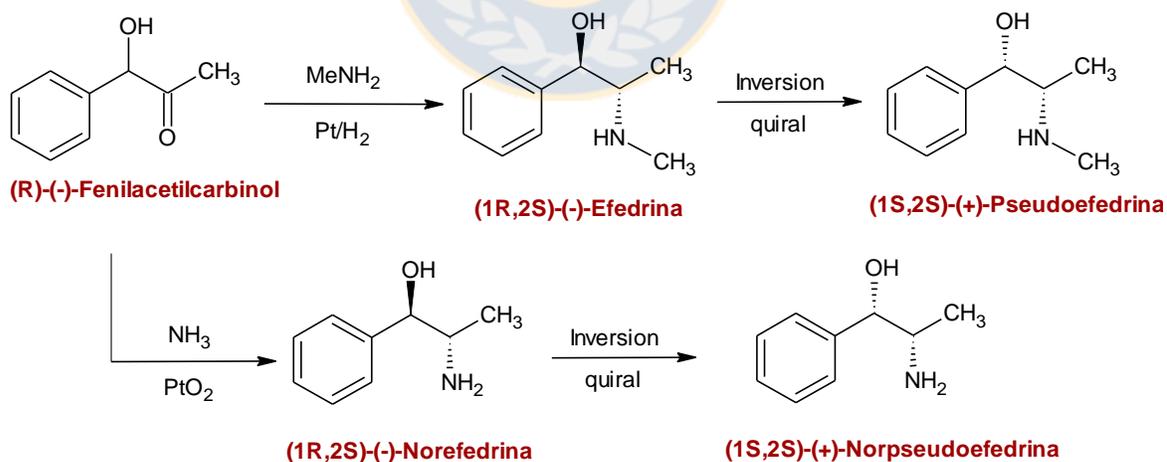
# *Introducción*

---



## 1.1 (R)-Fenilacetilcarbinol

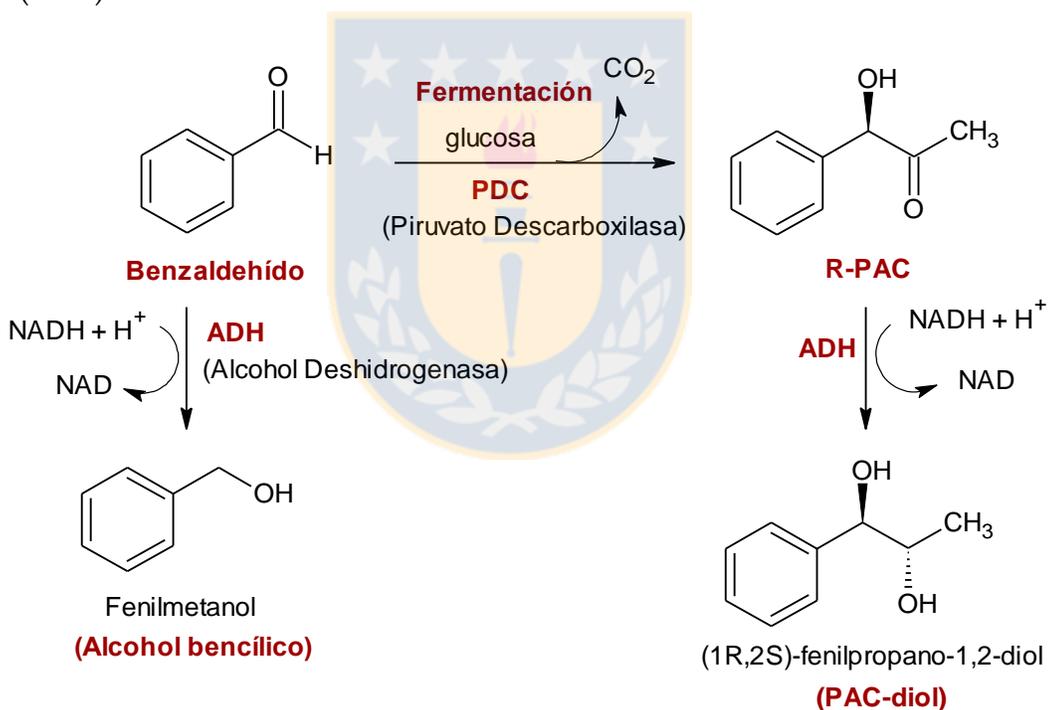
Una importante  $\alpha$ -hidroxicetona utilizada como intermediario en la industria farmacéutica es la (R)-(-)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona, conocida comúnmente como (R)-fenilacetilcarbinol o R-PAC [(R)-phenylacetylcarbinol]. Esta actúa como precursor en la síntesis de fármacos con propiedades  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicas que incluyen a la l-efedrina, d-pseudoefedrina, l-norefedrina y la d-norpseudoefedrina, Figura 1.1, los cuales se utilizan como descongestionantes en antigripales y medicamentos antiasmáticos. En general las  $\alpha$ -hidroxicetonas poseen una gran variedad de aplicaciones como intermediarios en síntesis orgánica<sup>1</sup> y como precursores en la industria farmacéutica.<sup>2</sup> Ejemplo de ello es la síntesis de la vitamina E,<sup>3</sup> la síntesis de compuestos antifúngicos pertenecientes a la familia de los azoles,<sup>4</sup> la síntesis de descongestionantes y antiasmáticos mediante la formación de amino alcoholes mencionados anteriormente,<sup>5</sup> la síntesis de inhibidores en la producción de la proteína  $\beta$ -amiloide como medicamentos para la enfermedad de Alzheimer<sup>6</sup> y fármacos para la inhibición de enzimas bacterianas como la formación de inhibidores de ureasa.<sup>7</sup> Además son intermediarios en la formación de dioles (glicoles),<sup>8</sup> cetonas y dicetonas.<sup>9</sup>



**Figura 1.1.** Síntesis de l-efedrina, l-norefedrina, d-pseudoefedrina y d-norpseudoefedrina a partir del intermediario R-PAC.

Fuente: P. L. Rogers, H. S. Shin, B. Wang *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 1997, 56, 33-59.<sup>5</sup>

En lo que respecta al R-PAC, durante muchas décadas este precursor fue obtenido mediante un proceso de biotransformación, en el cual se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* junto con glucosa y benzaldehído<sup>10, 11</sup> (German Patent Nr. 548 459). Sin embargo, la eficiencia de este proceso está limitada en primer lugar por la toxicidad del benzaldehído hacia las células de la levadura *S.cerevisiae* y en segundo lugar por la formación de subproductos tales como el fenilmetanol y el PAC-diol los cuales disminuyen el rendimiento de formación del R-PAC<sup>12</sup>, Figura 1.2. Estudios han postulado que la presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa dentro de las células de la levadura *S. cerevisiae* es la encargada de la formación de estos subproductos y que la formación de R-PAC es catalizada por la enzima Piruvato Descarboxilasa E.C 4.1.1.1 (PDC).<sup>5, 13</sup>



**Figura 1.2.** Formación de subproductos en la producción de R-PAC mediante biotransformación utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente: V. B. Shukla, P. R. Kulkarni *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **2000**, 16, 499-506.<sup>14</sup>

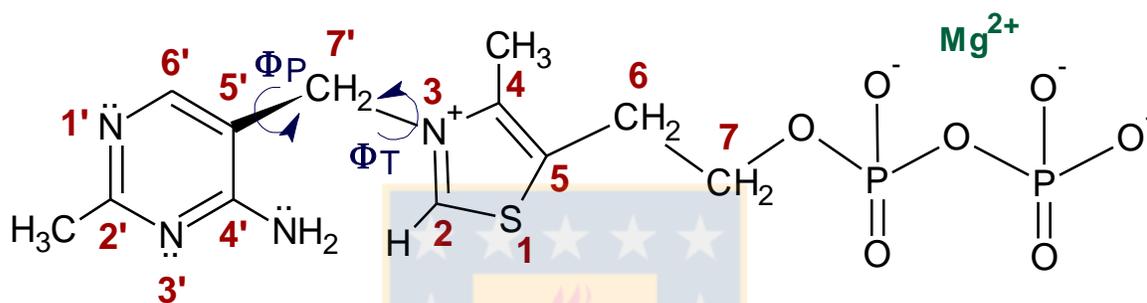
Diversos estudios se han realizado utilizando a la PDC libre o aislada de las células con el fin de evitar la formación de estos subproductos. Sin embargo el proceso presenta inconvenientes, tanto en la estabilidad de la enzima bajo las condiciones de producción una vez aislada como en la eficacia en la formación de R-PAC, debido a que este compete con la formación del producto natural de la PDC correspondiente a acetaldehído.<sup>11, 15</sup>

Debido a las limitaciones presentadas en la biocatálisis de R-PAC utilizando la enzima PDC, se ha reportado que otra enzima ThDP-dependiente, la enzima ácido acetohidroxi sintasa (AHAS) es una eficiente alternativa en la producción de esta  $\alpha$ -hidroxicetona mediante el uso de catálisis enzimática (Patente Española Nr. 2 278 143), permitiendo una eficiente utilización de piruvato y altos niveles de conversión de benzaldehído a temperatura ambiente, ambos sustratos necesarios para la formación de R-PAC. Además a diferencia de la PDC, la AHAS presenta una alta estabilidad frente a solventes orgánicos miscibles en agua como el isopropanol y el dimetilsulfóxido, necesarios para facilitar la disolución de benzaldehído y de R-PAC.<sup>16</sup>

## 1.2 Enzima Acido Acetohidroxi Sintasa

La enzima AHAS, EC. 4.1.3.18,<sup>17, 18</sup> es una enzima que se encuentra en plantas, algas, hongos y bacterias y su función es catalizar los primeros pasos en la ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina.<sup>19</sup> Conocida comúnmente como AHAS es una enzima tiamina dependiente por lo que su actividad catalítica se debe principalmente a la presencia del cofactor tiamina difosfato (ThDP). Pero además, la AHAS requiere de la presencia de otros dos cofactores. El primero corresponde al metal divalente  $Mg^{2+}$  y el segundo corresponde al cofactor flavina adenina dinucleotido (FAD).<sup>17</sup> El cofactor 3-[(4'-amino-2'-metilpirimidina-5'-il)metil]-5-(2-[hidroxidifosfato]etil)-4-metil-1,3-tiazolio conocido comúnmente como ThDP, es el derivado activo de la vitamina B1. Este cofactor está formado por un anillo de tiazolio y por un anillo de pirimidina. El anillo de pirimidina se encuentra sustituido en la

posición 2' por un grupo metilo y en la posición 4' por un grupo amino. Ambos anillos están enlazados a través de un carbono puente con el cual forman los ángulos diedros  $\Phi_P = N3-C7'-C5'-C4'$  y  $\Phi_T = C2-N3-C7'-C5'$  tal como se muestra en la Figura 1.3. Las tres conformaciones básicas que puede adoptar el ThDP debido a la torsión de estos diedros son: la conformación tipo F ( $\pm 90^\circ, 0^\circ$ ), la conformación tipo S ( $\pm 150^\circ, \pm 100^\circ$ ) y la conformación tipo V ( $\pm 70^\circ, \pm 95^\circ$ ), en donde el primer valor corresponde al diedro  $\Phi_P$  y el segundo al diedro  $\Phi_T$ , respectivamente.<sup>20-22</sup>

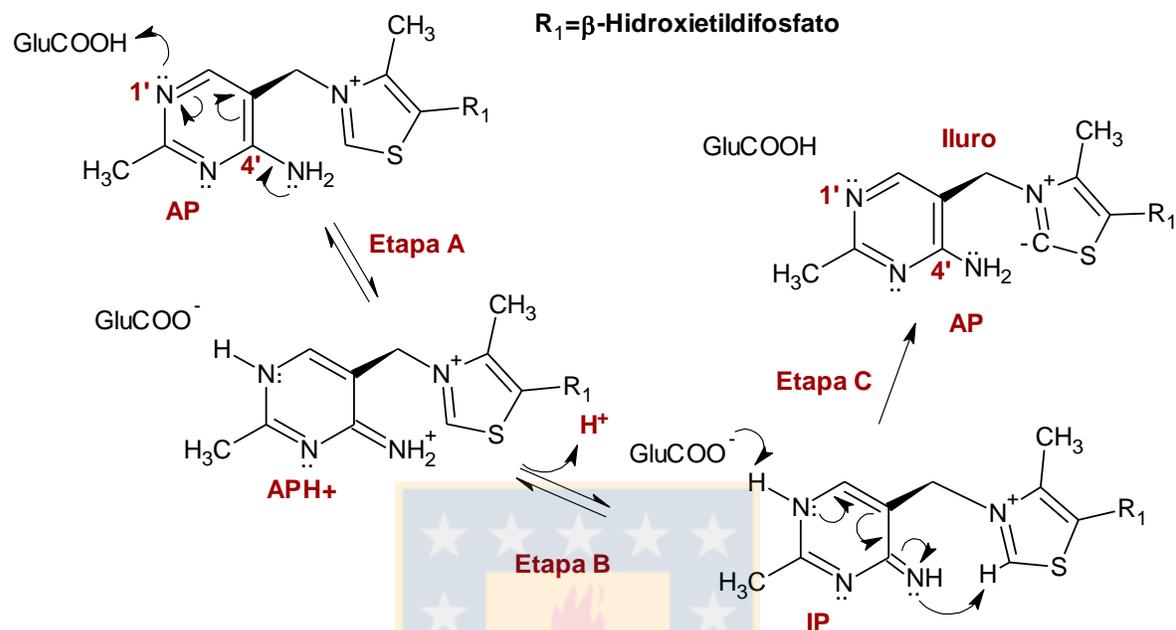


**Figura 1.3.** Estructura cofactor tiamina difosfato con los diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$ .

Fuente: J. A. McCourt, R. G. Duggleby *Amino Acids*. 2006, 31, 173-210.<sup>23</sup>

La conformación tipo V es la que confiere la actividad al ThDP, debido a la cercanía existente entre el grupo amino del anillo de pirimidina y el hidrógeno enlazado al carbono C2 en el anillo tiazolio. Esta cercanía permite la abstracción del hidrógeno enlazado al carbono C2 por parte del grupo amino, produciendo de esta manera la formación de la especie activa conocida como iluro,<sup>17</sup> Figura 1.4. Estas etapas de activación consideran un equilibrio tautomérico que comienza con la protonación del nitrógeno N1' por parte del aminoácido altamente conservado ácido glutámico (Glu139 en la AHAS). Con esto el anillo de aminopirimidina pasa de la forma 4'-aminopirimidina (AP) a la forma 4'-iminopirimidinio (APH<sup>+</sup>). Luego, el grupo amino cuaternario cede uno de sus protones y el anillo queda en la forma 1',4'-iminopirimidina (IP). Por último, el grupo imino del anillo de pirimidina en la forma

IP extrae el átomo de hidrógeno enlazado al carbono C2 formando la especie altamente reactiva iluro ThDP.<sup>23, 24</sup>



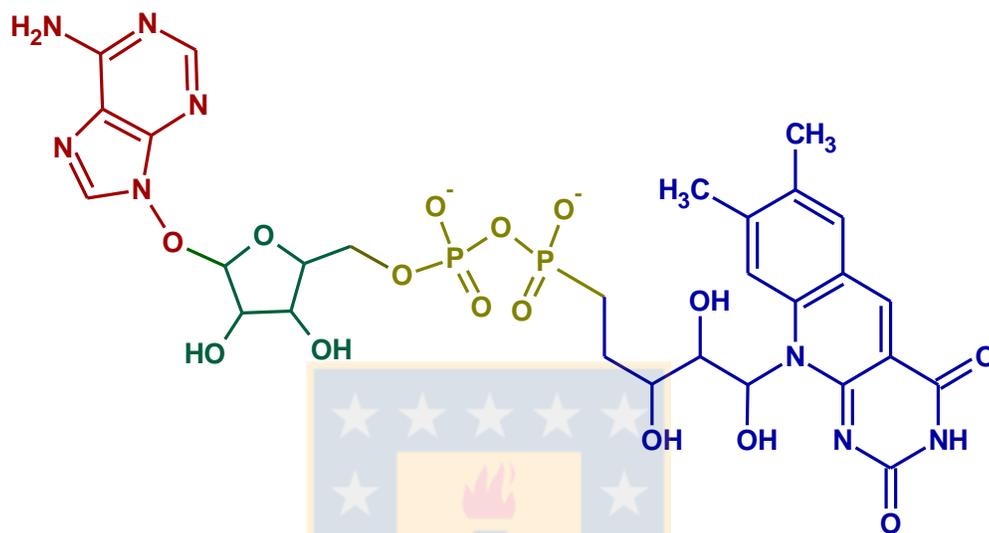
**Figura 1.4.** Mecanismo correspondiente a las etapas de activación del cofactor ThDP.

Fuente: E. J. Delgado, J. B. Alderete, G. A. Jana *Journal of Molecular Modeling*. **2011**, *17*, 2735-2739.<sup>24</sup>

Por otra parte en lo que respecta al anillo tiazolio, éste además de estar unido al carbono puente, se encuentra enlazado por su otro extremo a un grupo etilhidroxidifosfato, el cual a su vez está unido al metal divalente Mg<sup>2+</sup>, Figura 1.3. Este metal cumple la función de anclar al ThDP al sitio activo de la AHAS al interactuar con dos aminoácidos del ambiente enzimático, los cuales corresponden específicamente a un ácido aspártico (Asp550) y a una Asparagina (Asn577).<sup>25</sup>

El otro cofactor presente en la AHAS y que no interacciona con sustratos debido a que la AHAS no lleva a cabo reacciones de óxido-reducción, es el cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD). Este cofactor está compuesto por una unidad de riboflavina (vitamina B2), que está unida a un grupo pirofosfato, el cual está enlazado a una ribosa, la que a su vez está unida a una adenina, Figura 1.5. Se ha postulado que el FAD

confiere dos propiedades fundamentales a la AHAS: una de ellas consiste en el aumento de la actividad catalítica de la enzima cuando este cofactor se encuentra presente y la otra es que estimula a la AHAS a adoptar la conformación de tetrámero, confiriendo al FAD un rol estructural dentro de la enzima.<sup>19</sup>

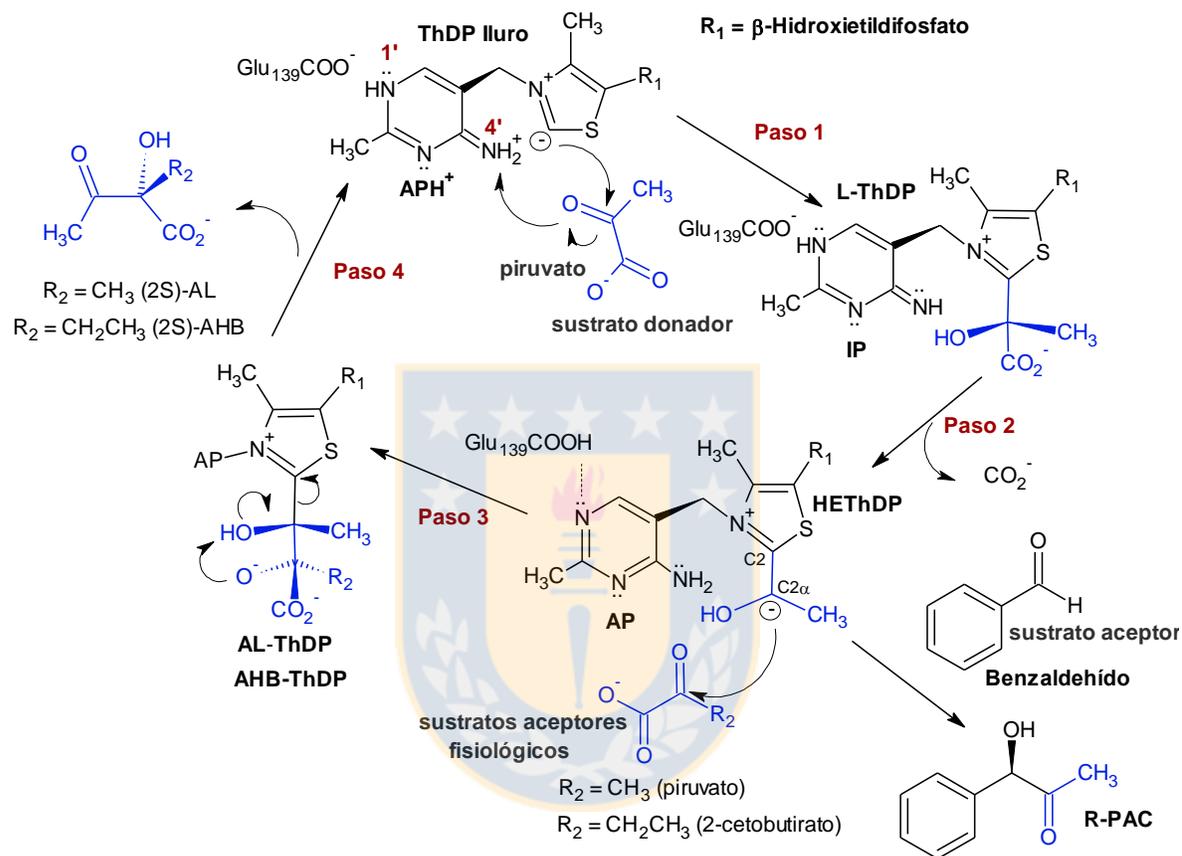


**Figura 1.5.** Estructura del cofactor FAD, las unidades de riboflavina, adenina, ribosa y el grupo difosfato se muestran en los colores: azul, rojo, verde y amarillo, respectivamente.

Fuente: Elaboración propia.

La AHAS cataliza la descarboxilación de forma irreversible y no oxidativa, de una molécula de piruvato como sustrato donador en el primer paso del ciclo catalítico, Figura 1.6. Posteriormente, la enzima puede formar dos tipos de productos, dependiendo de cuál sea el segundo  $\alpha$ -cetoácido en reaccionar como sustrato aceptor con el intermediario Hidroxietil Tiamina difosfato (HET<sub>h</sub>DP). Si este corresponde a una segunda molécula de piruvato, se produce la formación de (2S)-2-acetolactato (AL). Pero si el segundo sustrato corresponde a una molécula de 2-cetobutirato (2CB) se produce la formación de (2S)-2-acetohidroxibutirato (AHB).<sup>19, 23, 26</sup> En este sentido la

formación de R-PAC requiere que el benzaldehído actúe como sustrato aceptor en el paso 3 del ciclo catalítico uniéndose al intermediario HEThDP mediante una carboligación y necesitando de la protonación del oxígeno carbonílico para la formación del R-PAC.<sup>16, 27</sup>



**Figura 1.6.** Ciclo catalítico de la enzima AHAS y formación de R-PAC.

Fuente: S. Engel, M. Vyazmensky, S. Geresh, Z. Barak, D. M. Chipman *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, 83, 833-840.<sup>16</sup>

Sin embargo, pese a conocerse la etapa del ciclo catalítico en que interviene el sustrato aceptor no fisiológico benzaldehído, el mecanismo de reacción involucrado en su carboligación y la posterior liberación del producto R-PAC desde el cofactor aún no ha sido clarificado. Esto debido a que una de las principales desventajas de la enzima AHAS es que no posee grupos ionizables en los residuos que rodean al cofactor ThDP que sean capaces de protonar tanto a los sustratos que participan en la formación de

los productos naturales de la enzima<sup>23, 28</sup> como al benzaldehído al momento de producirse la formación de R-PAC. Sin embargo, a pesar de esta interrogante, resultados experimentales muestran la correcta formación de esta  $\alpha$ -hidroxicetona.<sup>16, 27, 29, 30</sup> Otro aspecto que no ha sido completamente dilucidado, es la identificación de los aminoácidos cercanos al cofactor ThDP y al sitio activo de la enzima, encargadas de favorecer la formación del R-PAC en comparación a la del producto fisiológico AL, además del valor de la energía de activación asociada a la formación del producto R-PAC en la enzima AHAS. Esto debido, a que el R-PAC al formarse en los pasos 3 y 4 del ciclo catalítico de la AHAS compite directamente con la formación del producto natural de la enzima, en donde se presume que la formación de R-PAC debiera tener una energía de activación un tanto menor que la energía de activación del producto AL, debido a las velocidades iniciales de formación reportadas en literatura<sup>16</sup> que indican que la velocidad máxima de formación para R-PAC es de 3,3  $\mu\text{mol}$  de producto formado por minuto por miligramo de enzima utilizado, mientras que para el producto natural AL es de 2,9  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ , en donde la energía de activación en términos de energía libre reportada en literatura para la formación de AL es de 13,8 Kcal/mol.<sup>31</sup> El AL se forma por la condensación de dos moléculas de piruvato, en donde la última de estas moléculas es la que compite con el sustrato no fisiológico benzaldehído al momento de producirse el ataque nucleofílico por parte del intermediario HETHDP sobre el carbono carbonílico de los sustratos, en el tercer paso del ciclo catalítico de la enzima,<sup>16</sup> Figura 1.6. Una clara identificación de los residuos encargados de estabilizar la formación de R-PAC podría proporcionar una ventaja en la producción de R-PAC por sobre el producto natural AL aunque para esto es necesario proponer un mecanismo de reacción para la formación de R-PAC y en base a este mecanismo de reacción identificar a los residuos que participan en su estabilización.

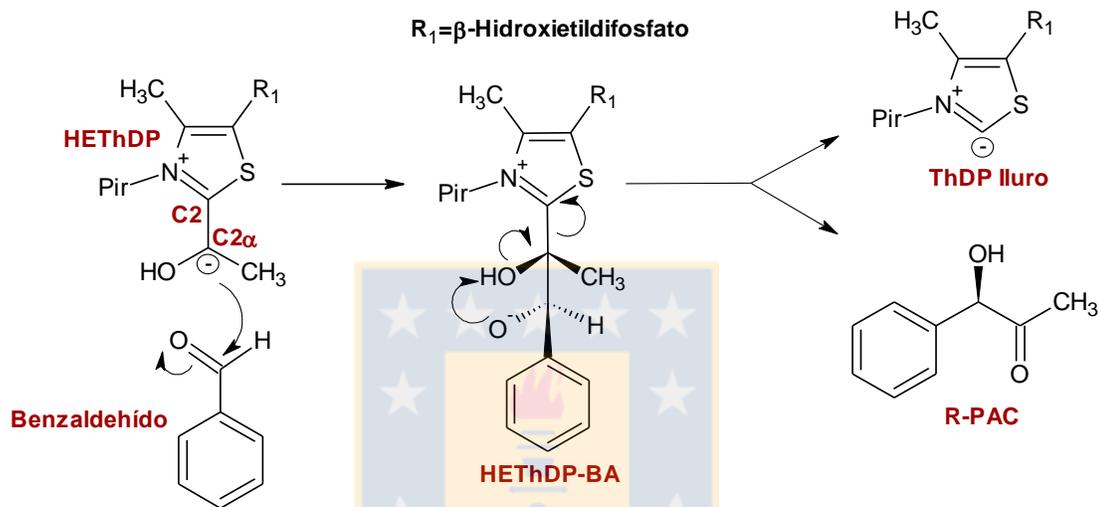
Otra interrogante a dilucidar dentro del ciclo catalítico de la enzima AHAS es la relacionada con el estado de protonación del grupo amino que está enlazado al anillo de pirimidina del cofactor ThDP para el paso 3 del ciclo catalítico que involucra al

intermediario HETHDP, Figura 1.6. En este sentido, el mecanismo de reacción propuesto en literatura para la formación del primer intermediario del ciclo catalítico de la AHAS correspondiente al 2-Lactil-ThDP (L-ThDP) postula que el grupo imino protonado, catión imonio, del anillo de pirimidina del cofactor, cuando este se encuentra bajo la forma de APH<sup>+</sup>, en el primer paso del ciclo catalítico, Figura 1.6, es el grupo ionizable encargado de protonar al sustrato donador piruvato por lo que el intermediario L-ThDP al formarse queda con el anillo de pirimidina bajo la forma de IP.<sup>32, 33</sup> Esto genera la interrogante de cual es el estado de protonación del intermediario HETHDP al momento de realizar el ataque nucleofílico sobre el benzaldehído, ya que el ciclo catalítico al terminar debe liberar al producto R-PAC y el cofactor ThDP debe regenerarse con el anillo de pirimidina bajo la forma de APH<sup>+</sup> para continuar el paso 1 del ciclo catalítico. Las posibilidades son que el intermediario HETHDP se encuentre con el anillo de pirimidina bajo la forma de IP debido a la formación del L-ThDP o que se encuentre bajo la forma de AP o APH<sup>+</sup> debido a la protonación del grupo imino una vez formado el intermediario L-ThDP, en donde uno de estos últimos estados de protonación son los que permitirían una óptima regeneración del cofactor ThDP a la forma de iluro para reinsertarse al ciclo catalítico.

### 1.3 Propuesta de Investigación

De acuerdo a las interrogantes planteadas en la sección 1.2, en la presente tesis doctoral se propone determinar mediante las herramientas de la química teórica computacional las energías de activación y las bases moleculares involucradas en la estabilización de las etapas de formación del precursor farmacéutico R-PAC, correspondientes a los pasos 3 y 4 del ciclo catalítico de la AHAS. Para ello se realizará la exploración de la superficie de energía potencial (PES, Potential Energy Surfaces) del mecanismo propuesto, el cual involucra la transferencia protónica intermolecular entre el cofactor en su forma de intermediario HETHDP y el sustrato no fisiológico benzaldehído, Figura 1.7. La exploración de la PES del mecanismo propuesto se realizará mediante cálculos QM/MM, esto permitirá obtener la energía de activación en términos de energía

potencial y con ello una energía de activación teórica. Las energías potenciales de activación teóricas obtenidas se compararán con la energía libre de activación experimental reportada para la formación de AL correspondiente a 13,8 Kcal/mol<sup>31</sup> validando de esta manera el mecanismo de reacción propuesto, ya que es de esperar una energía de activación menor en la formación de R-PAC en base a las velocidades máximas de formación reportadas para el AL y para el R-PAC.<sup>16</sup>



**Figura 1.7.** Mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC.

Fuente: Elaboración propia.

Además, la exploración de la PES del mecanismo propuesto para los tres posibles estados de protonación del intermediario HETHDP permitirá discernir con cual de ellos la reacción de formación de R-PAC es el más estable. Con la exploración de las coordenadas de reacción se podrán obtener tres superficies de energía potenciales, una para cada sistema, que describirán en primer lugar si el mecanismo ocurre por etapas, es decir que primero ocurra la carboligación del benzaldehído al cofactor y luego la transferencia protónica o viceversa, o que el mecanismo sea de forma concertada, es decir que ambas coordenadas de reacción tengan un movimiento simultáneo para la formación del R-PAC. En segundo lugar, la exploración de la PES de cada uno de los tres sistemas permitirá calcular la energía de activación involucrada en la formación de R-PAC, ya que se podrá calcular la energía de activación en cada una de las etapas o

pasos en que este descrito el mecanismo de reacción obtenido; en donde el que posea la menor barrera de activación corresponderá al estado de protonación más estable.

En cuanto a la identificación de los residuos encargados de estabilizar la formación de R-PAC, estos se determinarán mediante cálculos de energía de interacción no enlazantes entre los residuos cercanos al sitio activo de la enzima y el sustrato benzaldehído y el intermediario HETHDP. Estas interacciones residuo sustrato se calcularán en base a las estructuras obtenidas de las simulaciones de dinámica molecular mecánico clásicas (MM) y se realizarán para cada uno de los tres estados de protonación. Las que una vez concluidas y analizadas, darán paso a simulaciones de dinámica molecular mecánico cuánticas/mecánico clásicas (QM/MM) a cuyas estructuras se le realizará un seguimiento de las interacciones no enlazantes residuo sustrato a través del cálculo de las distancias entre los átomos involucrados en las interacciones. Las dinámicas moleculares se llevarán a cabo con el fin de minimizar la energía para los tres sistemas y relajar energéticamente sus estructuras, obteniendo así conformaciones estables de mínima energía de la estructura enzimática y principalmente del sitio activo.

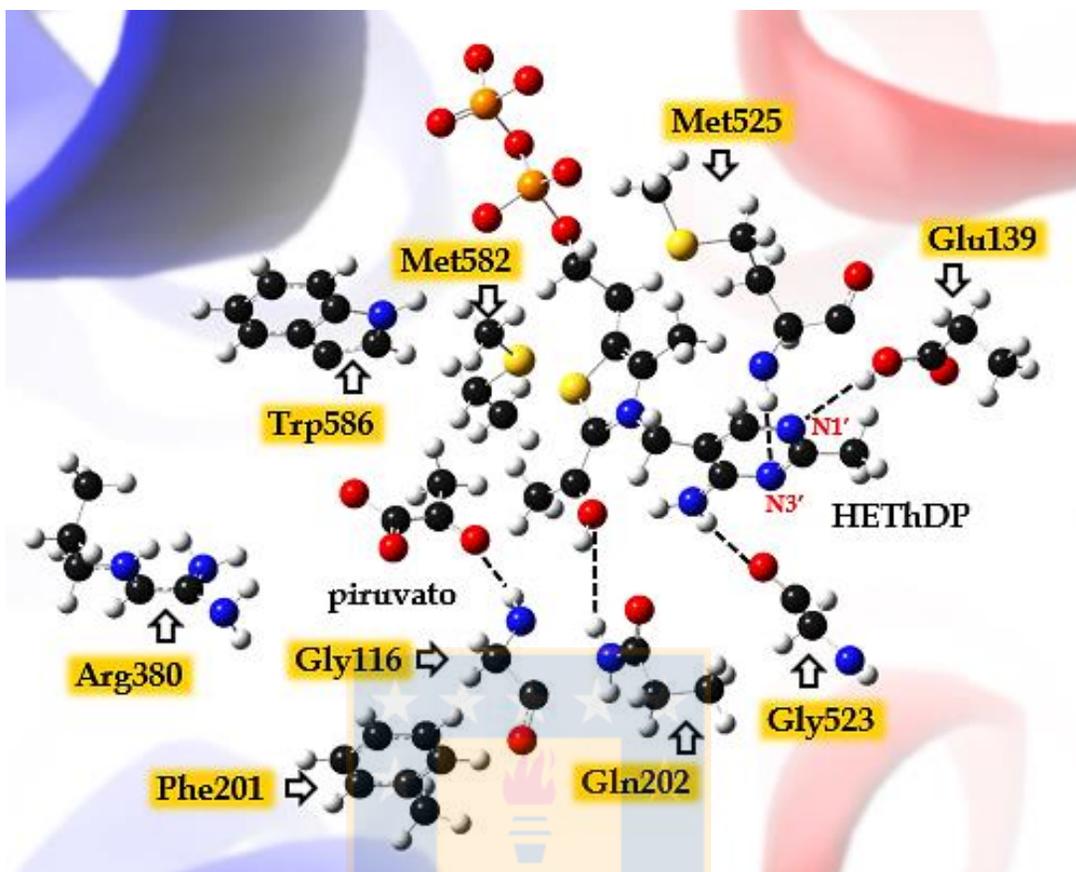
De las estructuras de las dinámicas moleculares QM/MM de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, se seleccionará una estructura en la que el intermediario HETHDP mantenga la conformación activa de acuerdo a los valores experimentales de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  y que además las interacciones residuo sustrato formadas durante la simulación sean similares a las que presente la estructura promedio de las zonas de estabilidad conformacional obtenidas mediante cálculos de RMSD. Así, se seleccionará una estructura de la dinámica molecular QM/MM de cada sistema que sea representativa, la cual será utilizada como estructura inicial para la exploración de las PES. Además, las interacciones no enlazantes residuo sustrato calculadas se compararán con las interacciones reportadas en literatura que están involucradas en la estabilización del mecanismo de reacción para la formación del producto natural AL en la tercera etapa del ciclo catalítico,<sup>27, 34</sup> Figura 1.8. Esto último se realiza con el propósito de verificar

cual de los tres sistemas en estudio mantiene similitudes con las interacciones no enlazantes residuo sustrato presentes en la formación del producto natural AL, permitiendo así contar con un criterio adicional al momento de proponer cual sería el estado de protonación del intermediario HETHDP con el cual ocurre la formación de R-PAC.

Las moléculas de piruvato y de benzaldehído comparten un grupo carbonilo en su estructura y para una correcta formación estereoquímica del precursor R-PAC en la enzima AHAS se necesita que el sustrato benzaldehído se oriente de igual manera que lo hace la molécula de piruvato en la formación de AL. Así, al superponer ambas estructuras sus grupos carbonilos quedan orientados en la misma ubicación, provocando el intercambio del grupo carboxilato del piruvato por el anillo de benceno del benzaldehído y el grupo metilo por el hidrógeno carbonílico del benzaldehído.<sup>16, 27</sup> De esta manera, el residuo Gly116, al igual que en la formación de AL, debería interactuar mediante un enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico del benzaldehído, estabilizando la densidad de carga del oxígeno provocando así una mayor reactividad del carbono carbonílico al momento de la carboligación con el intermediario HETHDP, debido al aumento del carácter electrofílico del carbono carbonílico.<sup>27</sup> Otra de las interacciones reportadas es la interacción mediante enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el oxígeno del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP, el cual es precisamente el oxígeno desde donde se propone que ocurre la transferencia del átomo de hidrógeno hacia el oxígeno carbonílico del sustrato aceptor.<sup>27, 34</sup> La interacción mediante enlace de hidrógeno entre la Met525 con el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina, a la cual se le atribuye la torción de los diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  para mantener la conformación activa tipo V del cofactor ThDP.<sup>17, 23</sup> Junto con la interacción por enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico de backbone de la Gly523 y los hidrógenos del grupo amino del anillo de pirimidina del cofactor, la cual cumple un propósito similar a la interacción Met525-N3'<sup>17</sup> y la interacción, también mediante enlace de hidrógeno, entre el Glu139 y el nitrógeno N1' del anillo de pirimidina en su

forma protonada o desprotonada<sup>25, 34</sup> constituyen las cinco interacciones no enlazantes reportadas en literatura para la formación del producto natural AL que se compararán con las obtenidas en los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>.

A estas se sumarán además las interacciones no enlazantes residuo sustrato reportadas en literatura para los aminoácidos Phe201, Arg380, Met582 y Trp586 involucradas en la formación tanto de AL como de los productos AHB y R-PAC. En este sentido, estudios experimentales de mutaciones sitio dirigidas<sup>27</sup> revelan que para la tercera etapa del ciclo catalítico la Arg380 no cumple un rol catalítico importante en la formación de R-PAC, en comparación a como lo hace para la formación de AL y AHB debido a la interacción con el grupo carboxilato de los sustratos naturales piruvato y 2-cetobutirato (2CB). Estudios similares sobre la Phe201<sup>27</sup> muestran que su importancia radica en ayudar a la Arg380 a adoptar la conformación correcta al momento de estabilizar al grupo carboxilato de la molécula de piruvato en la formación de AL, pero que en la formación de R-PAC no juegan un rol catalítico importante debido que la Arg380 se encuentra alejada del sustrato benzaldehído. En cuanto al Trp586, resultados experimentales de mutaciones sitio dirigidas muestran que este residuo es fundamental para la estabilización del sustrato 2-cetobutirato en la formación de AHB, debido a que se atribuye que el anillo de indol que conforma la cadena lateral del Trp586 interacciona en mayor medida con el grupo etilo del 2CB. Mientras que para la formación de AL y R-PAC su función sería irrelevante, debido a que no tendría interacción ni con el grupo metilo en el caso que el sustrato fuera piruvato, ni con el hidrógeno carbonílico del sustrato benzaldehído.<sup>27, 31, 35</sup> Por último, para la Met582 se postula que este residuo no presenta especificidad sobre la segunda molécula de sustrato en el ciclo catalítico de la enzima AHAS, ya sea piruvato o 2-cetobutirato. Sino que más bien juega un rol estructural ya que participa en la estabilidad de la enzima y la afinidad con los cofactores debido a que se encuentra en una zona hidrofóbica ubicada entre los cofactores ThDP, FAD y el residuo Trp586.<sup>35</sup>



**Figura 1.8.** Esquema de las interacciones no enlazantes reportadas para la formación de acetolactato en el tercer paso del ciclo catalítico de la enzima AHAS.

Fuente: S. Engel, M. Vyazmensky, M. Vinogradov, D. Berkovich, A. Bar-Ilan, U. Qimron, Y. Rosiansky, Z. Barak, D. M. Chipman *Journal of Biological Chemistry*. **2004**, 279, 24803-24812.<sup>27</sup>

Estudios químicos computacionales recientemente publicados sobre la formación de R-PAC,<sup>36</sup> basados en la obtención de energías de activación teóricas mediante la exploración de la PES para los tres estados de protonación del intermediario HETHDP, muestran que el estado de protonación 4'-aminopirimidina (AP) es el que presenta la menor energía de activación, con una barrera de 13,3 Kcal/mol, mientras que la mayor energía de activación la presentó el sistema con el intermediario HETHDP bajo la forma de 1'-4'-iminopirimidina (IP). Las exploraciones de las PES fueron realizadas considerando a los sustratos aislados en fase gas y las energías de interacción fueron calculadas en términos de energía libre utilizando un medio de constante dieléctrica para simular el ambiente enzimático. Similares resultados se encuentran reportados en

literatura en base a cálculos químico computacionales basados en la exploración de la PES para la formación del producto natural AL,<sup>28</sup> mediante métodos QM/MM y considerando el ambiente enzimático. Estos resultados indican que el estado de protonación AP con una energía de activación de 16,3 Kcal/mol en termino de energía potencial, fue la menor energía de activación en comparación con los estados IP y APH<sup>+</sup>.



## 1.4 Hipótesis y Objetivos

### 1.4.1 Hipótesis

La biosíntesis de R-PAC catalizada por la enzima AHAS ocurre mediante el mecanismo de reacción que involucra la transferencia protónica intermolecular desde el intermediario HETHDP hacia el oxígeno carbonílico del sustrato no fisiológico benzaldehído, con el intermediario HETHDP bajo la forma el estado de protonación AP, en donde la energía de activación será menor que la energía de activación necesaria para la formación del producto natural AL.

### 1.4.2 Objetivos

#### Objetivo general.

Explorar la PES del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC en la enzima AHAS con el intermediario HETHDP en los estados de protonación AP, IP y APH<sup>+</sup> e identificar a los residuos cercanos al sitio activo encargados de estabilizar su formación.

#### Objetivos específicos.

- a) Realizar simulaciones de dinámica molecular para los sistemas que incluyen al benzaldehído, a la enzima AHAS y al intermediario HETHDP en los estados de protonación AP, IP y APH<sup>+</sup>.
- b) Identificar mediante cálculos de energía de interacción no enlazantes a los residuos cercanos al sitio activo de la enzima AHAS de mayor relevancia en la estabilización del sustrato benzaldehído y del intermediario HETHDP en la formación de R-PAC.
- c) Realizar cálculos híbridos QM/MM para explorar y construir la PES del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC en la enzima AHAS, el cual involucra la transferencia protónica intermolecular desde el intermediario HETHDP al sustrato no fisiológico benzaldehído, bajo los estados de protonación AP, IP y APH<sup>+</sup>.

## Referencias

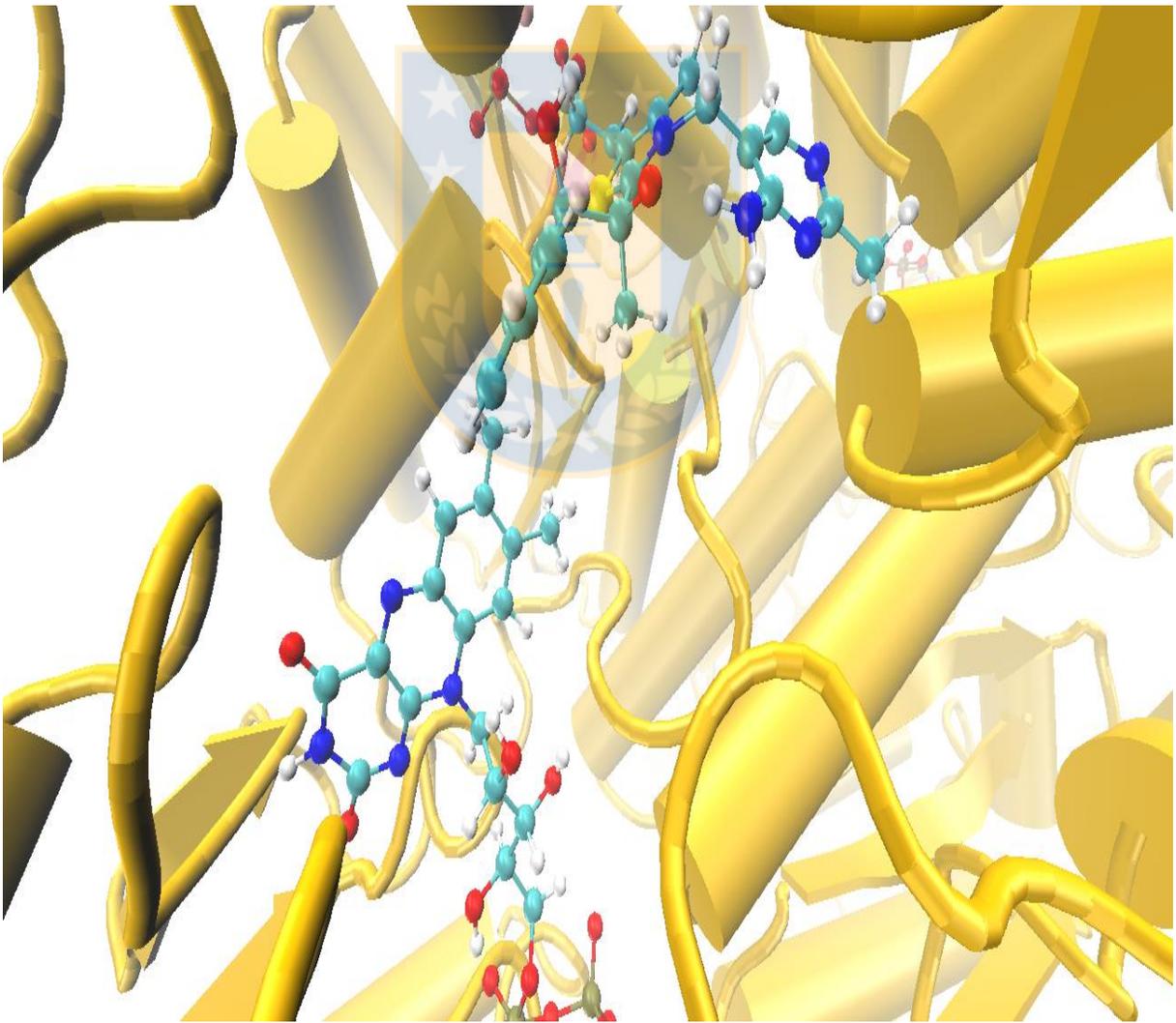
- [1] P. Hoyos, J. V. Sinisterra, F. Molinari, A. R. Alcantara, P. D. De Maria *Accounts of Chemical Research*. **2010**, *43*, 288-299.
- [2] H. Iding, P. Siegert, K. Mesch, M. Pohl *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. **1998**, *1385*, 307-322.
- [3] C. Fuganti, P. Grasselli *Journal of chemical society*. **1982**, *4*, 205-206.
- [4] D. Gala, M. S. Puar, P. R. Das, M. Kugelman, D. J. Dibenedetto *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1992**, *81*, 1199-1203.
- [5] P. L. Rogers, H. S. Shin, B. Wang *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. **1997**, *56*, 33-59.
- [6] O. B. Wallace, D. W. Smith, M. S. Deshpande, C. Polson, K. M. Felsenstein *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2003**, *13*, 1203-1206.
- [7] T. Tanaka, M. Kawase, S. Tani *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2004**, *12*, 501-505.
- [8] J. Kulig, A. Frese, W. Kroutil, M. Pohl, D. Rother *Biotechnology and Bioengineering*. **2013**, *110*, 1838-1848.
- [9] J. J. O. Bloofield, D. N. Nelke, J. M., *Organic reactions, The acyloin Condensation*, John Wiley and Sons, Inc, Nueva York, **1976**.
- [10] A. L. Oliver, B. N. Anderson, F. A. Roddick *Advances in Microbial Physiology, Vol 41*. **1999**, *41*, 1-45.
- [11] C. Andreu, M. L. del Olmo *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2014**, *98*, 5901-5913.
- [12] H. S. Shin, P. L. Rogers *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1995**, *44*, 7-14.
- [13] M. Pohl, B. Lingen, M. Muller *Chemistry-a European Journal*. **2002**, *8*, 5289-5295.
- [14] V. B. Shukla, P. R. Kulkarni *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **2000**, *16*, 499-506.
- [15] D. Meyer, L. Walter, G. Kolter, M. Pohl, M. Muller, K. Tittmann *Journal of the American Chemical Society*. **2011**, *133*, 3609-3616.
- [16] S. Engel, M. Vyazmensky, S. Geresh, Z. Barak, D. M. Chipman *Biotechnology and Bioengineering*. **2003**, *83*, 833-840.
- [17] S. S. Pang, L. W. Guddat, R. G. Duggleby *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, *278*, 7639-7644.
- [18] M. Pohl, G. A. Sprenger, M. Muller *Current Opinion in Biotechnology*. **2004**, *15*, 335-342.
- [19] D. M. Chipman, R. G. Duggleby, K. Tittmann *Current Opinion in Chemical Biology*. **2005**, *9*, 475-481.
- [20] R. Friedemann, S. Naumann *Journal of molecular structure*. **2003**, *630*, 275-281.
- [21] Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Ermler, M. Sundstrom *Embo Journal*. **1992**, *11*, 2373-2379.
- [22] A. vonFircks, S. Naumann, R. Friedemann, S. Konig *Journal of Molecular Modeling*. **1996**, *2*, 312-318.
- [23] J. A. McCourt, R. G. Duggleby *Amino Acids*. **2006**, *31*, 173-210.
- [24] E. J. Delgado, J. B. Alderete, G. A. Jana *Journal of Molecular Modeling*. **2011**, *17*, 2735-2739.
- [25] A. Bar-Ilan, V. Balan, K. Tittmann, R. Golbik, M. Vyazmensky, G. Hubner, Z. Barak, D. M. Chipman *Biochemistry*. **2001**, *40*, 11946-11954.
- [26] D. Chipman, Z. A. Barak, J. V. Schloss *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. **1998**, *1385*, 401-419.
- [27] S. Engel, M. Vyazmensky, M. Vinogradov, D. Berkovich, A. Bar-Ilan, U. Qimron, Y. Rosiansky, Z. Barak, D. M. Chipman *Journal of Biological Chemistry*. **2004**, *279*, 24803-24812.
- [28] G. Jana, V. Jimenez, J. Villa-Freixa, X. Prat-Resina, E. Delgado, J. B. Alderete *Computational and Theoretical Chemistry*. **2011**, *966*, 159-166.
- [29] S. Engel, M. Vyazmensky, D. Berkovich, Z. Barak, D. M. Chipman *Biotechnology and Bioengineering*. **2004**, *88*, 825-831.

- [30] M. Vinogradov, A. Kaplun, M. Vyazmensky, S. Engel, R. Golbik, K. Tittmann, K. Uhlemann, L. Meshalkina, Z. Barak, G. Hubner, D. M. Chipman *Analytical Biochemistry*. **2005**, *342*, 126-133.
- [31] K. Tittmann, M. Vyazmensky, G. Hubner, Z. Barak, D. M. Chipman *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, *102*, 553-558.
- [32] O. Alvarado, G. Jana, E. J. Delgado *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **2012**, *26*, 977-982.
- [33] I. Lizana, G. A. Jana, E. J. Delgado *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2015**, *55*, 1640-1644.
- [34] M. Vyazmensky, A. Steinmetz, D. Meyer, R. Golbik, Z. Barak, K. Tittmann, D. M. Chipman *Biochemistry*. **2011**, *50*, 3250-3260.
- [35] M. Ibdah, A. Barllan, O. Livnah, J. V. Schloss, Z. Barak, D. M. Chipman *Biochemistry*. **1996**, *35*, 16282-16291.
- [36] O. Alvarado, I. Lizana, G. Jana, I. Tunon, E. Delgado *Chemical Physics Letters*. **2017**, *677*, 30-34.



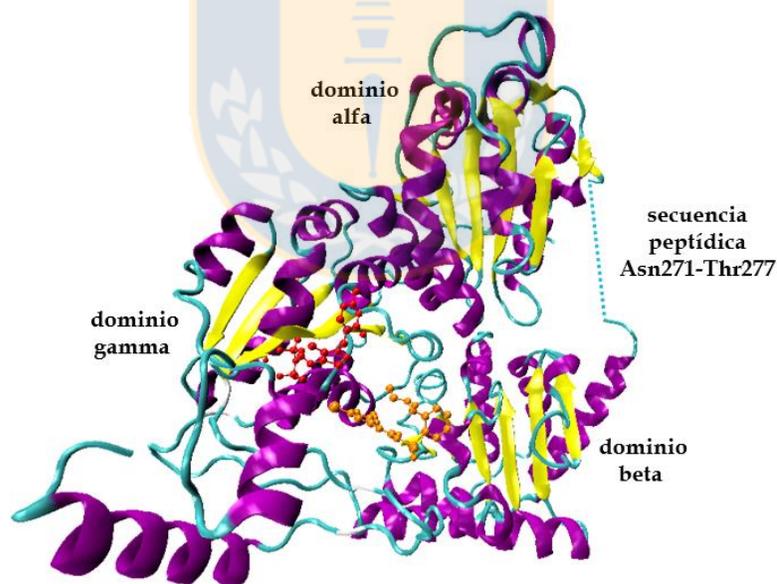
# *Capítulo 2: Metodología*

---



## 2.1 Construcción de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>

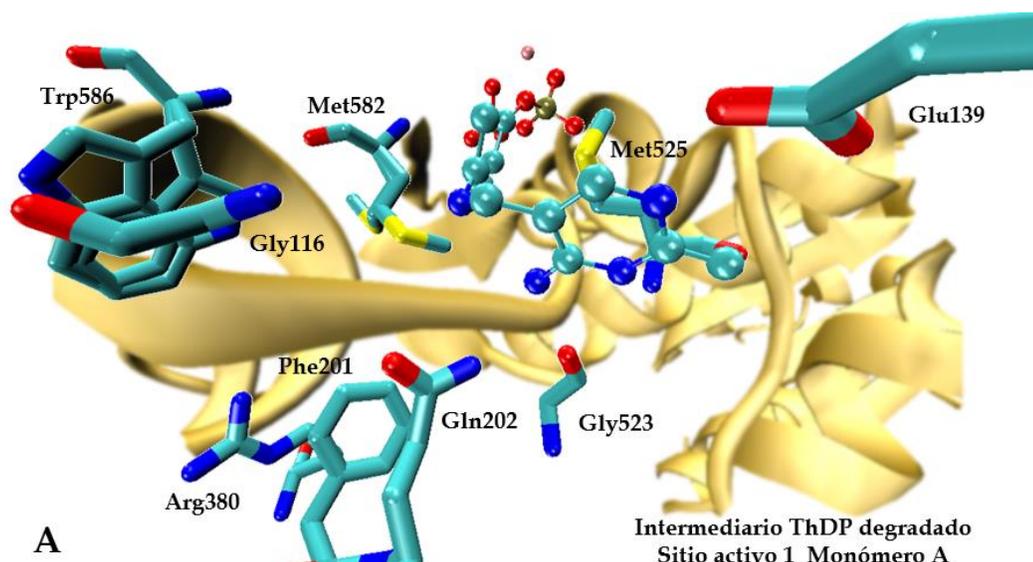
Como estructura inicial para para la construcción de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup> se utilizó la estructura cristalina de la enzima AHAS obtenida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* código 1N0H de la base de datos Protein Data Bank,<sup>1</sup> la cual se encuentra cristalizada con el herbicida CE (Chlorimuron ethyl). Esta estructura cristalina está compuesta por dos monómeros denominados A y B, los cuales presentan 599 y 598 aminoácidos, respectivamente. Cada uno de los dos monómeros esta plegado en tres dominios como se aprecia en la Figura 2.1, designados como alfa para la secuencia de residuos Met85-Pro269, como beta para la secuencia Gln281-Tyr458 y el dominio gamma conformado por la secuencia Pro473-Val643. Entre los dominios alfa y beta de cada monómero la estructura cristalina presenta la pérdida de una secuencia peptídica comprendida entre los residuos Asn271 y Leu276 para el monómero A y Asn271 y Thr277 para el monómero B.

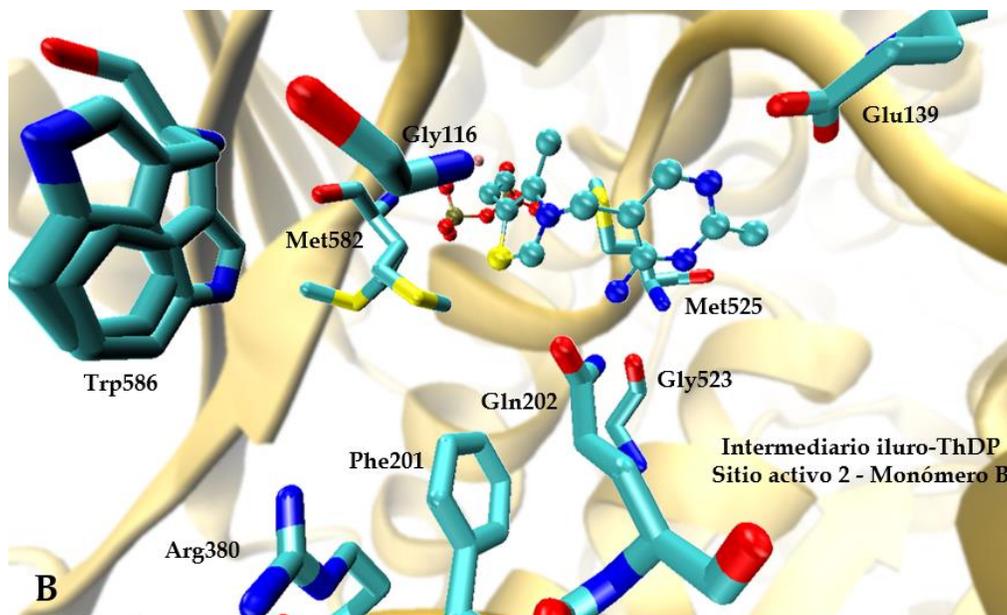


**Figura 2.1.** Monómero B de la estructura cristalina 1N0H de la enzima AHAS plegada en los dominios alfa, beta y gamma, con el cofactor ThDP en color rojo y el herbicida CE en color naranja.

Fuente: S. S. Pang, L. W. Guddat, R. G. Duggleby *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, 278, 7639-7644.<sup>2</sup>

La estructura cristalina 1N0H presenta dos sitios activos, debido a que contiene dos moléculas de ThDP, dos moléculas de FAD, dos átomos de  $Mg^{2+}$ , además de dos moléculas del herbicida CE y 832 moléculas de aguas cristalinas. El cofactor ThDP del monómero A, denominado arbitrariamente sitio activo 1, está rodeado por los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201 y Gln202 del monómero B y los aminoácidos Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586 del monómero A. Tal como se muestra en la Figura 2.2, este cofactor se encuentra con el anillo de tiazolio parcialmente degradado, sin los átomos S1 y C2, como resultado de la exposición del cristal a la alta intensidad de radiación emitida por el sincrotrón al momento de la recolección de los datos. Como consecuencia el cofactor ThDP del sitio activo 1 no posee ángulo diedro  $\Phi_T$ , mientras que el ángulo diedro  $\Phi_P$  presenta un valor de  $-60^\circ$ . En tanto el cofactor ThDP del monómero B, denominado sitio activo 2 se encuentra rodeado por los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201 y Gln202 del monómero A y los aminoácidos Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586 del monómero B. Este cofactor no presenta pérdida de átomos en su estructura molecular y se encuentra bajo la forma del intermediario iluro ThDP con valores para los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  de  $-60^\circ$  y  $91^\circ$ , respectivamente. Además, en ambos sitios activos los residuos Met582 y Trp586 presentan doble cadena lateral producto del análisis del diagrama de densidad electrónica obtenido a partir del patrón de difracción de la enzima cristalizada.<sup>2</sup>





**Figura 2.2.** Sitios activos de la estructura cristalina 1N0H de la enzima AHAS. **A-** Sitio activo 1 monómero A cofactor ThDP parcialmente degradado y **B-** Sitio activo 2 monómero B cofactor a la forma del intermediario iluro-ThDP.

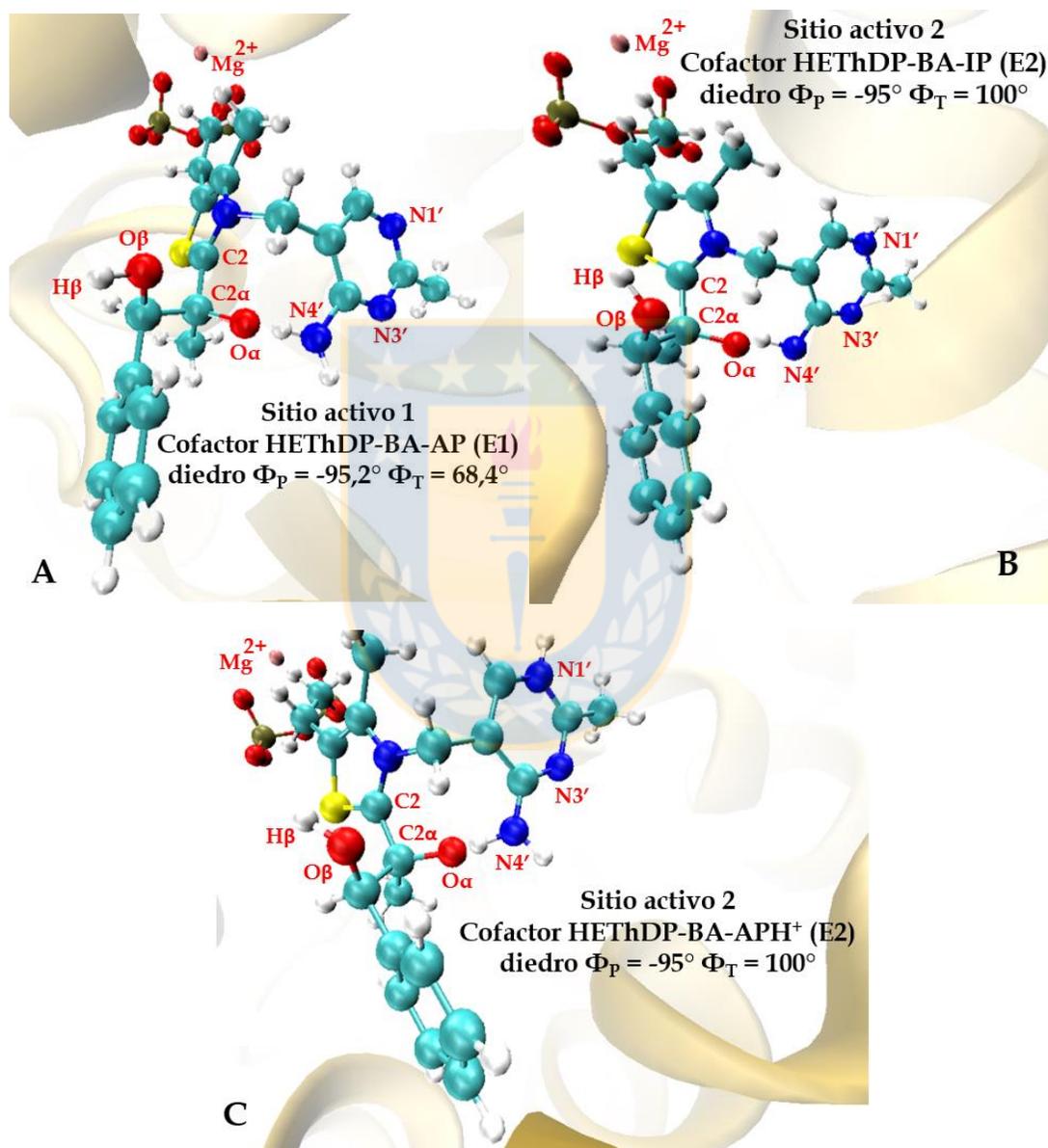
Fuente: S. S. Pang, L. W. Guddat, R. G. Duggleby *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, 278, 7639-7644.<sup>2</sup>

Por estos motivos se procedió a reconstruir los dos cofactores ThDP presentes en la estructura cristalina, como también a completar la secuencia de aminoácidos faltantes que unen a los dominios alfa y beta en cada uno de los monómeros. Además para los residuos Met582 y Trp586 se seleccionó la cadena lateral con mayor valor de ocupancia según los datos entregados en el archivo pdb de la estructura cristalina 1N0H.<sup>2</sup> Por último también fueron eliminadas las dos moléculas de herbicida CE que estaban ubicadas en cada uno de los sitios activos de la estructura cristalina. La reconstrucción de los cofactores ThDP se realizó con la ayuda del visualizador GaussView 5.0.8,<sup>3</sup> con el cual se reemplazó el cofactor ThDP de los sitios activos 1 y 2 de la estructura cristalina, por el complejo HETHDP-BA para los estados de protonación AP, IP y APH<sup>+</sup>. Con el fin de modelar una estructura cercana a un estado de transición teórico basado en el mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC, los intermediarios

HEThDP de cada sitio activo, se reconstruyeron con el sustrato acceptor no fisiológico benzaldehído enlazado al carbono C2 $\alpha$  y con el hidrógeno del grupo hidroxilo del intermediario HEThDP transferido al oxígeno carbonílico del benzaldehído, generando los complejos HEThDP-BA-AP para el sistema AP, HEThDP-BA-IP para el sistema IP y HEThDP-BA-APH<sup>+</sup> para el sistema APH<sup>+</sup>. Se comenzó por el complejo HEThDP-BA-AP el cual fue reconstruido para cada sitio activo por separado, en donde a cada uno de los complejos reconstruidos se les realizó una optimización de geometría en fase gas con el software Gaussian 09<sup>4</sup> a nivel semiempírico utilizando el hamiltoniano AM1.<sup>5,6</sup> A partir de las estructuras optimizadas de los complejos de los sitios activos 1 y 2 del sistema AP, se modificaron los estados de protonación del grupo amino enlazado al anillo de pirimidina, generando los complejos HEThDP-BA-IP y HEThDP-BA-APH<sup>+</sup> para los sitios activos 1 y 2 de sus respectivos sistemas, lo cuales fueron denominados E1 y E2, respectivamente, tal como se aprecia en la Figura 2.3. Esta metodología se realizó con el propósito de que los valores de partida de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  de las estructuras iniciales de los cofactores E1 y E2, entre los sitios activos 1 y entre los sitios activos 2 de cada sistema, fueran idénticos y que los cambios producidos durante las simulaciones de dinámica molecular MM sean atribuidos a la única zona de los cofactores que es diferente entre los tres sistemas, zona correspondiente al estado de protonación del nitrógeno enlazado al anillo de pirimidina del intermediario HEThDP. De esta manera y con la ayuda del software NAMD (NAnoscale Molecular Dynamics)<sup>7</sup> los nuevos complejos enzima-HEThDP-benzaldehído fueron ubicados sobre las coordenadas de los átomos del cofactor ThDP originales que presenta en ambos sitios activos la estructura cristalina, en donde los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  para los cofactores de los sitios activos 1 de cada sistema son -95,2° y 68,4° y para los cofactores de los sitios activos 2 -95° y 100°, respectivamente.

En cuanto a la secuencia de aminoácidos faltantes, esta se completó con la ayuda del visualizador GaussView 5.0.8, en donde ninguno de los aminoácidos reconstruidos fue

manipulado en su ubicación, ya que la cadena se completó con las geometrías moleculares intrínsecas de los átomos que conforman el backbone de los residuos, mientras que la cadena lateral de cada aminoácido fueron agregadas automáticamente con el software NAMD al momento de construir los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup> para las simulaciones de dinámica molecular MM.



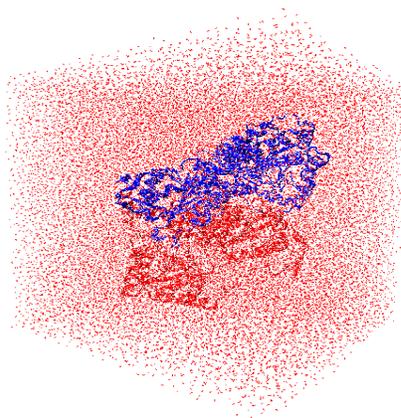
**Figura 2.3.** Estructuras optimizadas en fase gas y con el método semiempírico AM1 de los complejos. **A-** HETHDP-BA-AP, **B-** HETHDP-BA-IP y **C-** HETHDP-APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

## 2.2 Simulaciones de dinámica molecular mecánico clásicas

Debido a que la actividad catalítica de la AHAS se manifiesta en un rango de pH entre 6,0 a 8,5, teniendo una máxima actividad a pH 7,0, el estado de protonación de los aminoácidos con grupos ionizables en sus cadenas laterales presentes en los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, fueron asignados según el valor de pH de máxima actividad, mediante el cálculo de los valores de pKa utilizando el software PROPKA 3.0.<sup>8</sup> De esta manera los aminoácidos Glu139, Glu147 y Glu407 se mantuvieron protonados para el sistema AP al igual que los residuos Asp248, Asp546, mientras que para los sistemas IP y APH<sup>+</sup> el único cambio lo registró el residuo Glu139, el cual se construyó con el grupo carboxilato desprotonado a la forma de glutamato. En tanto, los residuos de histidinas presentes en cada uno de los monómeros de la enzima se mantuvieron neutras, en este sentido la ubicación del átomo de hidrógeno en la cadena lateral de los residuos de histidina, correspondiente a un anillo de imidazol, se asignó favoreciendo la formación de enlaces de hidrógenos con los aminoácidos cercanos a cada histidina, mediante la visualización del archivo de coordenadas pdb de la estructura cristalina 1N0H con la ayuda del visualizador VMD (Visual Molecular Dynamics) versión 1.9.2.<sup>9</sup> De esta manera, se agregaron los átomos de hidrógenos a los residuos de la estructura cristalina, a los cofactores FAD y a los complejos HETHDP-BA, mediante el input ENDMOL del software psfgen el cual se encuentra incorporado en el software NAMD e incluye a los archivos de parámetros y de topología de los aminoácidos que constituyen la enzima, junto con los de los cofactores FAD y los de los complejos HETHDP-BA para cada uno de los sistemas. En este sentido, las DM MM fueron simuladas utilizando el campo de fuerza CHARMM36<sup>10, 11</sup> utilizando el software NAMD y los archivos de parámetros y de topología de los aminoácidos de la enzima fueron obtenidos desde la página web del grupo de investigación del Dr. Alexander Mackerell de la escuela de Farmacia de la Universidad de Maryland.<sup>12</sup> En tanto, para los cofactores FAD y los complejos HETHDP-BA de cada sistema los archivos de parámetros y topología fueron obtenidos utilizando el programa del campo de fuerzas

general de CHARMM (CGenFF, CHARMM General Force Field)<sup>13, 14</sup> de la página web paramchem.org, mientras que las cargas atómicas fueron obtenidas mediante cálculos single points de la estructuras de los cofactores utilizando el software GAUSSIAN 09, en los cuales se incorporó el cálculo de análisis poblacional CHELPG (Charges from Electrostatic Potential using a Grid based method) el cual está basado en asignar las cargas atómicas para reproducir al potencial electrostático molecular (MEP, Molecular Electrostatic Potential).<sup>15-17</sup> De esta forma se obtuvieron los tres sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup> a los cuales se les calculó la carga total de cada sistema para posteriormente neutralizarla agregando iones sodio, posicionándolos a 5 Å distancia desde la superficie de la enzima. Los nuevos complejos enzima-HEThDP-benzaldehído fueron solvatados utilizando una caja cubica de moléculas de agua del modelo TIP3P<sup>18</sup> (112 x 102 x 123 Å<sup>3</sup>), la cual se centró en el centro geométrico de cada sistema asegurándose que los átomos superficiales de la enzima se encuentren a una distancia de 10 Å de las aristas de la caja, tal como se aprecia en la Figura 2.4. De esta manera, el sistema AP final contiene 136384 átomos de los cuales 20476 no pertenecen a moléculas de agua, en tanto el sistema IP final está conformado por 136372 átomos, de los cuales 20474 no pertenecen a moléculas de agua, mientras que el sistema APH<sup>+</sup> final está conformado por 136392 átomos, de los cuales 20476 corresponden a la estructura proteica, a los cofactores y sustratos de la enzima.



**Figura 2.4.** Estructura enzima AHAS solvatada con caja de moléculas de agua.

Fuente: Elaboración propia.

En las simulaciones de DM se utilizó el ensamble isotérmico-isobárico (NPT), en donde la temperatura y la presión de trabajo fueron de 300 K y 1 atm y se mantuvieron controladas utilizando el método Nosé-Hoover - Langevin implementados en el software NAMD.<sup>19, 20</sup> En tanto, Para la medición de las interacciones del tipo Van der Waals durante la simulación se utilizó un radio de corte de 12 Å y para la medición de las interacciones electrostáticas se utilizó el método de Malla de partículas de Ewald (PME, Particle Mesh Ewald)<sup>21</sup> motivo por el cual se neutralizó la carga de los sistemas y se impusieron condiciones de frontera mediante la aplicación de condiciones periódicas de contorno (PBCs, Periodic Boundary Conditions), método en donde el sistema condensado en estudio contenido en la caja de solvatación se replica por sobre todas las caras de la caja, convirtiendo un sistema finito en uno infinito en donde la enzima en estudio se mantiene siempre solvatada.<sup>17, 22</sup>

Una vez generada la caja de agua para cada uno de los sistemas se procedió a realizar la minimización de los sistemas realizando 100000 pasos con el algoritmo gradiente conjugado para cada etapa, minimizando en primer lugar las moléculas de agua de los sistemas, luego la estructura proteica de la enzima junto con los cofactores y sustratos, para terminar con la relajación del sistema completo enzima-solvente. De la estructura obtenida se procedió a equilibrar los sistemas realizando en primer lugar una nueva minimización de 100000 pasos con el algoritmo gradiente conjugado para sistema completo enzima-solvente, seguido de simulaciones de dinámica molecular en donde el sistema fue calentado escalando velocidades desde los 0 K hasta los 400 K y luego enfriado desde los 400 K hasta los 300 K, todo cada 50 K, con tiempos de simulación de 100 ps para cada etapa, con un paso de integración de 1 fs, guardando estructuras cada 10 ps. Adicionalmente se realizó 1 ns de equilibrio a la temperatura de trabajo (300 K) para cada sistema, en donde los sistemas se mantuvieron libres sin restricciones armónicas. Finalmente se llevó a cabo una dinámica de producción de 100 ns para cada sistema con tiempos de integración de 2 fs, guardando estructuras cada 0,02 ns, generando 5000 estructuras para cada uno de los tres sistemas en estudio. Las etapas

de minimización, de equilibrio y de dinámica de producción fueron realizadas con el software NAMD, en donde todos los movimientos intramoleculares asociados a los átomos de hidrógeno fueron restringidos y modelados como enlaces rígidos usando el algoritmo SHAKE,<sup>23,24</sup> mientras que el análisis de las trayectorias fueron realizadas con el software de visualización VMD.

A las dinámicas de producción de 100 ns de cada uno de los sistemas se les realizaron cálculos de la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD, root-mean-squared deviations) para la estructura proteica de la enzima y también en conjunto con los cofactores FAD (F1 y F2) y los complejos HETHDP-BA (E1 y E2), los cuales incluyen al sustrato benzaldehído carboligado y el protón trasferido. El RMSD permitió medir la distancia recorrida de un conjunto de átomos, al considerar el desplazamiento total para cada uno de los pasos de la trayectoria, permitiendo encontrar cambios conformacionales significativos en tiempos de simulación específicos durante la dinámica de producción, en donde para cada frame o tiempo de simulación de la trayectoria de la dinámica molecular se calculó un valor de RMSD.<sup>25</sup> También se realizaron cálculos de la fluctuación de la raíz cuadrática media (RMSF, root-mean-squared fluctuation) a los carbonos alfa de los aminoácidos de ambos monómeros para ver la movilidad y flexibilidad de los aminoácidos en regiones determinadas de la enzima y así verificar las diferencias de movilidad entre los aminoácidos periféricos, los cuales están en contacto directo con el solvente y los que se encuentran en el interior de la enzima, referidos principalmente aquellos que conforman el sitio activo. El RMSF permitió determinar la fluctuación total del movimiento de un átomo en particular durante los 100 ns de simulación, en donde se obtuvo un valor para cada átomo por el total del tiempo simulado.<sup>26</sup> Los cálculos de RMSD y RMSF se realizaron utilizando el plugin vmdICE<sup>27</sup> incorporado en el software VMD.

Además, se realizaron cálculos del conteo de enlaces de hidrógenos entre los residuos para comprobar la estabilidad conformacional de la estructura secundaria y terciaria de la enzima durante las simulaciones. Una abrupta disminución de los enlaces de

hidrógeno durante la simulación, permite inferir tanto la ruptura de algunas de las hélices- $\alpha$  y hojas  $\beta$ -plegadas debido a la pérdida de los enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos que mantienen unidos a los backbones de los aminoácidos, como la deformación del plegamiento globular de la enzima, generado por la pérdida de los enlaces de hidrógenos existentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos que mantienen la estructura terciaria.<sup>28,29</sup> El análisis se realizó utilizando el software VMD, considerando una distancia de corte de 3 Å, entre el átomo donador enlazado al átomo de hidrógeno y el átomo aceptor que forma el enlace de hidrógeno y un ángulo de corte que contabilizó solo los enlaces de hidrógeno que poseen un ángulo donor-hidrógeno-aceptor entre 180° y 160°.

Con el fin de ratificar la estabilidad tanto de la estructura terciaria de la enzima como la estabilidad de las simulaciones realizadas para los sistemas se calculó, de forma complementaria la variación del radio de giro de la enzima en base a su centro geométrico, el cual está relacionado con el grado de compactación y con la pérdida o conservación de la estructura terciaria. Un aumento del radio de giro permite inferir que las interacciones no enlazantes entre las cadenas laterales de los aminoácidos de las conformaciones hélices- $\alpha$  y hojas  $\beta$ -plegadas se han perdido durante la simulación, provocando la ruptura del plegamiento globular de la enzima, aumentando su diámetro desde su centro geométrico. Ambos cálculos se realizaron utilizando el software VMD.

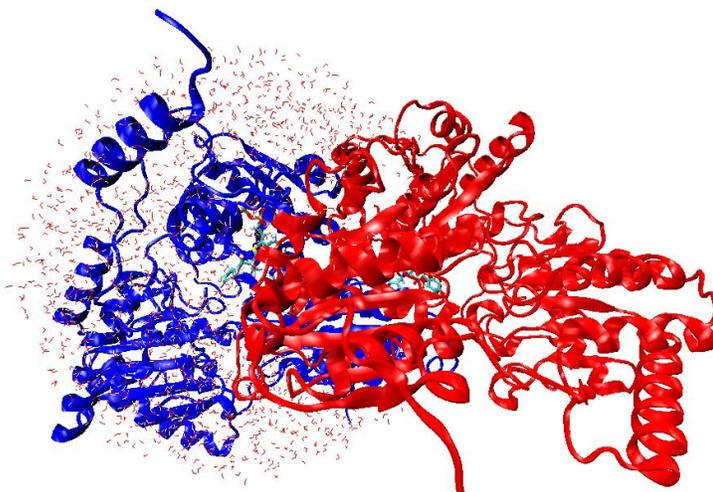
Posteriormente se realizó un análisis visual de las trayectorias de las tres dinámicas de producción efectuadas para los sistemas en estudio utilizando el software VMD, con el fin de seleccionar un sitio activo representativo para cada estado de protonación en base a las similitudes encontradas con las interacciones no enlazantes residuo sustrato reportadas en literatura, para luego elegir una estructura representativa del sitio activo seleccionado y utilizarla como estructura inicial en las simulaciones de dinámica molecular QM/MM de cada sistema. Con la finalidad de demostrar las interacciones no enlazantes registradas en el sitio activo seleccionado durante la simulación, se

calcularon las distancias involucradas en las interacciones no enlazantes residuo sustrato entre los átomos que conforman la interacción, es decir entre un átomo de hidrógeno y un átomo aceptor (oxígeno o nitrógeno) en la formación de una interacción mediante un enlace de hidrógeno.<sup>30</sup> En el caso de interacciones que involucraron a grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos, como por ejemplo anillos aromáticos en el caso de interacciones  $\pi$ -stacking<sup>31,32</sup> o el grupo guanidinio en el caso de la Arg380, los valores de las distancias fueron calculados desde el centro geométrico de cada grupo funcional. Además de calcular los valores promedio de cada distancia de interacción no enlazante observada en el sitio activo seleccionado, también se representó la variación de los valores de la distancia durante la simulación en forma de distribución, con el propósito de indicar cuál fue el valor de distancia más frecuente durante la dinámica de producción. Posteriormente, se realizaron cálculos de la energía potencial involucrada en las interacciones no enlazantes residuo sustrato, mediante el cálculo de la energía potencial electrostática descrita por la interacción Coulómbica entre los átomos que conforman la interacción y la energía de Van der Waals descrita por el potencial de Lennard-Jones, el cual se utiliza para el cálculo de las interacciones repulsivas de corto alcance núcleo-núcleo y las interacciones de dispersión atractivas de largo alcance.<sup>11, 17</sup> Para los cálculos de distancia se utilizó el plugin *distance.tcl* incorporado en el software VMD, mientras que los cálculos de energía de interacción se realizaron en fase gas con una constante dieléctrica de 1 y considerando solo a los átomos involucrados en la interacción, utilizando el plugin NAMD Energy 1.4 incorporado en el software NAMD. A modo de complementar las interacciones no enlazantes representativas de cada sitio activo de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, utilizando el software VMD se realizó el cálculo de la estructura promedio tanto para los 100 ns de simulación como para las zonas de estabilidad conformacional obtenidas desde los cálculos de RMSD, junto con los valores promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  de cada sitio activo para los 100 ns de simulación. Además, con la intención de ver la estabilidad conformacional del sitio activo seleccionado de cada sistema, se realizaron cálculos de RMSD de los aminoácidos que conforman el sitio activo y que

rodean al complejo HETHDP-BA. Por último, para identificar las fluctuaciones y flexibilidad de los átomos del complejo HETHDP-BA del sitio activo seleccionado para cada uno de los tres sistemas, se calculó el RMSF para todos los átomos que lo componen.

### 2.3 Simulaciones de dinámica molecular mecánico clásicas/mecánico cuánticas (QM/MM)

Una vez analizada cada una de las trayectorias de las dinámicas de producción mecánico clásicas, se procedió a seleccionar una estructura representativa de cada uno de los tres sistemas en estudio, con el fin de utilizarla como estructura inicial en los cálculos de dinámica molecular QM/MM. El criterio de selección se basó en escoger al sitio activo que presentó la mayor cantidad de las interacciones residuo sustrato reportadas en literatura. Posteriormente se escogió una estructura ubicada entre la zona de estabilidad conformacional señalada por los cálculos de RMSD de cada sistema. Además, como la estructura seleccionada debe ser representativa del sitio activo seleccionado de cada sistema, se escogieron estructuras que mostraron concordancia con las interacciones no enlazantes residuo sustrato presentadas en las estructuras promedio para los 100 ns de simulación de cada sistema y para la zona de estabilidad conformacional obtenidos desde los RMSD calculados. Entre las estructuras de la zona de estabilidad conformacional se priorizó a las que mostraron las interacciones no enlazantes residuo sustrato reportadas en literatura esenciales para mantener la conformación activa tipo V del intermediario HETHDP. De esta manera, para la estructura seleccionada del sitio activo representativo de cada sistema se seleccionó una esfera de moléculas de agua de 30 Å de radio centrada en el carbono C2 $\alpha$  del complejo HETHDP-BA, tal como se muestra en la Figura 2.5. Así, el radio de 30 Å en el sistema AP contiene 7563 átomos de los cuales 4482 pertenecen a moléculas de agua, en tanto el sistema IP está conformado por 7544 átomos, de los cuales 3993 pertenecen a moléculas de agua, mientras que el sistema APH<sup>+</sup> quedó conformado por 7531 átomos, de los cuales 4251 corresponden a moléculas de agua.



**Figura 2.5.** Estructura enzima AHAS solvatada con esfera moléculas de agua.

Fuente: Elaboración propia.

Dentro de la esfera se seleccionó una zona de 24 Å de radio también considerada desde el átomo C2 $\alpha$  del complejo HETHDP-BA, la cual corresponde a la zona móvil de los sistemas, durante las simulaciones de DM QM/MM realizadas, mientras que los últimos 6 Å de la esfera, corresponde a una zona de reservorio en donde los átomos se mantuvieron inmóviles. Al igual que en las dinámicas mecánico clásicas los aminoácidos Glu139, Glu147 y Glu407 se mantuvieron protonados para el sistema AP al igual que los residuos Asp248, Asp546, mientras que para los sistemas IP y APH<sup>+</sup> el único cambio lo registro el residuo Glu139, el cual se mantuvo con el grupo carboxilato desprotonado a la forma de glutamato. De esta manera se generaron tres estructuras iniciales, cada una proveniente de la estructura seleccionada del sitio activo representativo de los cálculos de dinámica molecular MM de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>.

Con el fin de relajar energéticamente los sistemas en estudio se utilizaron las estructuras iniciales generadas para realizar simulaciones de dinámica molecular QM/MM utilizando en conjunto los software fDynamo<sup>33</sup> y MOPAC 2012.<sup>34</sup> En primera instancia a cada sistema se le realizó un equilibrio de 100 ps de simulación, con un paso de integración de 1 fs y utilizando el ensamble canónico NVT. La temperatura de

trabajo fue de 300 K y se mantuvo como referencia utilizando el método Langevin-Verlet incorporado en fDynamo con una frecuencia de colisión de 100 ps<sup>-1</sup>. Posteriormente se realizó una dinámica de producción de 1000 ps considerando un radio de corte o cutoff entre 14,5 y 16 Å para todos los tipos de interacciones no enlazantes.

Dentro de la parte móvil de 24 Å de radio se seleccionó una zona denominada zona QM conformada por 62 átomos para el sistema AP, 61 átomos para el sistema IP y 62 átomos para el sistema APH<sup>+</sup>. La zona QM está constituida por los átomos del complejo HETHDP-BA sin considerar a los átomos del grupo difosfato y los átomos de la cadena lateral del residuo Glu139, los cuales fueron optimizados con el hamiltoniano semiempírico AM1 durante el equilibrio y la dinámica de producción QM/MM. El resto de los átomos de la zona móvil, denominada zona MM, fueron optimizados utilizando el campo de fuerza OPLS-AA (Optimized Potentials for Liquid Simulations All-Atoms version)<sup>35-37</sup> mediante el algoritmo Velocity Verlet incorporado en fDynamo. Los parámetros de los enlaces, ángulos, ángulos diedros y términos no enlazantes de Lennard-Jones de los residuos ubicados dentro de la zona móvil se obtuvieron de la página web del grupo de investigación del Dr. William Jorgensen del departamento de química de la Universidad de Yale.<sup>38</sup> Mientras que los parámetros para el cofactor FAD fueron obtenidos de la página web LigParGen<sup>39</sup> e implementados con la ayuda del Dr. Sergio Marti Forés de la Universidad Jaime I de Castellón.<sup>40</sup> Para describir y completar la valencia de los átomos de la frontera entre las regiones QM y MM se utilizó el método Link Atom el cual se aplicó en enlaces no polares carbono-carbono para los complejos HETHDP-BA de cada sistema y la cadena lateral del residuo Glu139.

Al igual que en las simulaciones de la dinámica molecular mecánica clásica, una vez concluidas las dinámicas de producción QM/MM de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, se realizaron cálculos de RMSD para los backbones de los aminoácidos de la zona móvil de cada uno de los tres sistemas en estudio, incluyendo al cofactor FAD y al complejo

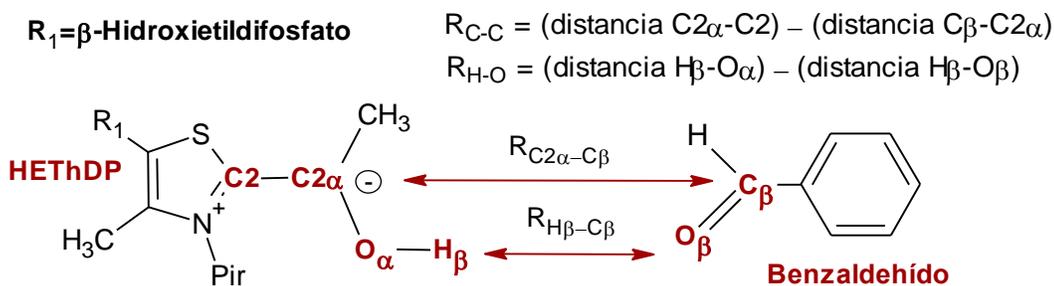
HEThDP-BA correspondiente de cada sistema, cálculos que se realizaron con la finalidad de determinar cambios conformacionales durante las simulaciones. Además se realizaron cálculos de RMSF de los carbonos alfa de los aminoácidos de la zona móvil para analizar su movilidad y fluctuaciones durante las simulaciones.

En cuanto a las interacciones no enlazantes presentes durante la simulación entre los residuos y los sustratos del sitio activo representativo de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, se realizaron cálculos de las distancias promedio de los átomos involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno y de las distancias promedio calculadas desde los centros de masas para aquellos átomos que conforman grupos funcionales y anillos aromáticos de las cadenas laterales de los residuos involucrados en interacciones  $\pi$ -stacking con el complejo HEThDP-BA. Así, las distancias de interacción promedio se relacionaron con la estabilidad de las interacciones no enlazantes residuo sustrato, lo que permitió realizar un seguimiento a las interacciones que fueron observadas previamente en las dinámicas moleculares MM. Además se calcularon los valores promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HEThDP-BA del sitio activo de cada sistema para los 1000 ps de simulación.

Por último y con el fin de representar la estabilidad conformacional durante la dinámica de producción se presenta el RMSF de los átomos del complejo HEThDP-BA del sitio activo de cada sistema en estudio. Los cálculos de RMSD y RMSF al igual que en las simulaciones de dinámica molecular MM, se realizaron utilizando el plugin vmdICE incorporado en el software VMD, mientras que para los cálculos de distancia se utilizó el plugin distance.tcl incorporado en el software VMD. En tanto los cálculos de las estructuras promedio y los valores promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  se realizaron utilizando el software VMD.

## 2.4 Superficies de energía potencial QM/MM

El análisis de las simulaciones de dinámica molecular QM/MM de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup> permitió realizar la selección de una estructura relajada energéticamente y representativa de cada sistema para utilizarla como estructura inicial en la exploración de la superficie de energía potencial del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC. El criterio de selección se basó en considerar a una estructura que presentara interacciones no enlazantes residuo sustrato en concordancia con las reportadas en literatura. A este criterio se le sumó además la necesidad de seleccionar una estructura en donde el hidrógeno H<sub>β</sub> se mantuviera orientado hacia el oxígeno O<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA y que además presentara una distancia no menor a 2 Å entre el hidrógeno carbonílico H<sub>β</sub> del sustrato benzaldehído y el oxígeno desprotonado O<sub>α</sub> enlazado al átomo de carbono C2<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA, oxígeno donador desde donde se transfiere el átomo de hidrógeno H<sub>β</sub> hacia el oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> de sustrato benzaldehído. Debido a que el mecanismo de reacción propuesto para la formación y liberación del producto R-PAC involucra a los pasos 3 y 4 del ciclo catalítico de la enzima AHAS, está constituido por tres coordenadas de reacción: la carboligación del sustrato benzaldehído mediante el ataque nucleofílico del intermediario HETHDP, la transferencia protónica intermolecular desde el grupo hidroxilo del intermediario HETHDP hacia oxígeno carbonílico del sustrato benzaldehído y liberación del producto R-PAC mediante la ruptura del enlace entre los carbonos C2 y C2<sub>α</sub>. Por este motivo la exploración de la PES del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC se realizó a través de dos coordenadas de reacción asimétricas. La coordenada R<sub>C-C</sub> que representa la resta de la distancia entre los carbonos C2 y C2<sub>α</sub> menos la distancia entre los carbonos C<sub>β</sub> y C2<sub>α</sub> y la coordenada R<sub>H-O</sub> que corresponde a la resta entre la distancia del enlace H<sub>β</sub> y O<sub>α</sub> y la distancia de los átomos H<sub>β</sub> y O<sub>β</sub>, tal como se aprecia en la Figura 2.6.



**Figura 2.6.** Coordenadas asimétricas del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC en la enzima AHAS.

Fuente: Elaboración propia.

Para explorar la energía potencial del mecanismo de reacción propuesto, el incremento de la distancia de la coordenada  $R_{C-C}$  se realizó cada  $0,05 \text{ \AA}$  generando un total de 120 estructuras a partir de las estructuras representativas seleccionadas desde las dinámicas de producción QM/MM de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>. De esta manera la coordenada  $R_{C-C}$  fue explorada desde una zona de reactantes, ubicada a los  $-3,0 \text{ \AA}$ , zona en la cual el sustrato benzaldehído se encuentra a una distancia aproximada de  $4,5 \text{ \AA}$  del carbono  $C2\alpha$  del intermediario HETHDP. En tanto, la zona de los productos en la coordenada  $R_{C-C}$  se ubicó a los  $3,0 \text{ \AA}$ , zona en la cual el producto R-PAC se encuentra formado y liberado y el cofactor ThDP regenerado a la forma de iluro-ThDP. Cuando la coordenada  $R_{C-C}$  adopta el valor de 0, el sustrato benzaldehído se encuentra carboligado al intermediario HETHDP y los enlaces  $C2\alpha-C2$  y  $C\beta-C2\alpha$  poseen la misma distancia. Así para cada una de las 120 estructuras generadas con la variación de la coordenada  $R_{C-C}$  se exploró la coordenada  $R_{H-O}$  incrementando el valor de la distancia cada  $0,05 \text{ \AA}$ , generando un total de 7,680 estructuras para la exploración de la PES del mecanismo propuesto en cada uno de los sistemas. De esta manera, la coordenada  $R_{H-O}$  se exploró desde un valor de  $-1,6 \text{ \AA}$ , zona de reactantes en donde el oxígeno carbonílico  $O\beta$  del sustrato benzaldehído se encuentra desprotonado a una distancia aproximada de  $2,5 \text{ \AA}$  del hidrogeno  $H\beta$  del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP, hasta la zona de productos ubicada a los  $1,6 \text{ \AA}$ , zona en la cual el hidrógeno  $H\beta$  se encuentra enlazado al oxígeno carbonílico  $O\beta$  del sustrato benzaldehído. En tanto, la

zona en que el valor de la coordenada  $R_{H-O}$  es igual a 0 el hidrógeno se encuentra a distancias equidistantes entre los oxígenos  $O_\alpha$  y  $O_\beta$ .

Cada una de estas estructuras fueron relajadas energéticamente mediante la optimización de su geometría, utilizando el hamiltoniano semiempírico AM1 para los átomos de la zona QM y el campo de fuerza OPLS-AA para los átomos de la zona MM los cuales se minimizaron mediante el algoritmo de optimización Steepest-Descent<sup>41</sup> para los primeros 100 pasos de minimización y luego utilizando el algoritmo LBFGSB<sup>42</sup> para otros 100 pasos de minimización. Los cálculos se realizaron utilizando MOPAC 2012 acoplado al software fDynamo. Con el fin de corregir la sobre estimación de la energía potencial obtenidas para las estructuras optimizadas con el hamiltoniano semiempírico AM1 en la zona QM y aprovechando la buena aproximación de las geometrías obtenidas se realizó un cálculo puntual de energía potencial o cálculo “singles point” a cada una de las estructuras de los sistemas en estudio, mediante la aproximación de la teoría del funcional de la densidad (DFT, Density Functional Theory)<sup>43-45</sup> utilizando el funcional de intercambio y correlación híbrido de gradiente corregido B3LYP<sup>46, 47</sup> y el set de base 6-31++G(d,p)-D3 que incorpora la descripción de las fuerzas de interacción no enlazantes de Van der Waals mediante las correcciones de Grimme<sup>48, 49</sup> debido a la deficiencias que presenta la aproximación DFT, además de funciones de polarización y funciones difusas para todos los átomos,<sup>16, 17</sup> mientras que las cargas atómicas fueron obtenidas mediante el cálculo de análisis poblacional CHELPG. En tanto, la energía potencial de los átomos de la zona MM fue obtenida por el campo de fuerza OPLS-AA. Los cálculos se realizaron utilizando el software GAUSSIAN 09 acoplado con el software fDynamo. Los resultados fueron graficados con el software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc.),<sup>50</sup> programa con el cual se representó las superficies de energía potencial obtenidas para cada uno de los sistemas en estudio, mediante gráficos en tres dimensiones, en los cuales se consideran a las coordenadas  $R_{C-C}$ ,  $R_{H-O}$  y a la energía potencial en Kcal/mol. Además para cada una de las PES a nivel DFT de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup> se realizó la búsqueda de los estados de transición (TS, Transitions

States) de las estructuras ubicadas en las zonas de puntos de silla de la topología de las PES, zonas que corresponden a una zona de mínimo de energía potencial para una de las coordenadas, mientras que para la otra coordenada corresponde a una zona de máxima energía potencial, en donde la estructura queda caracterizada si presenta valores de frecuencias negativas obtenidas por la segunda derivada de la energía potencial con respecto a la coordenada de reacción explorada en el mecanismo de reacción<sup>16</sup>. De las estructuras de dichas zonas se tomaron las coordenadas de los átomos de la zona QM y se les realizaron cálculos de frecuencia a nivel DFT con el set de base 6-31++G(d,p) considerando una constante dieléctrica de 4,80, constante dieléctrica del cloroformo, para simular el ambiente apolar del sitio activo de la enzima, para lo cual se utilizó el método de solvatación implícita CPCM (Conductor Polarizable Continuum Model).<sup>51</sup> Los cálculos de frecuencia para la determinación de las estructuras correspondientes a los estados de transición en la PES de los sistemas en estudio, junto con los cálculos de IRC (Intrinsic Reactions Coordinates)<sup>52</sup> realizados para comprobar si las estructuras que presentaron una frecuencia imaginaria, de valor negativo, en las coordenadas de reacción  $R_{C-C}$ ,  $R_{H-O}$  conducen hacia los reactantes y productos de la reacción de formación de R-PAC fueron realizados con el programa GAUSSIAN 09 y utilizando visualizador Gauss View 5.0.8.

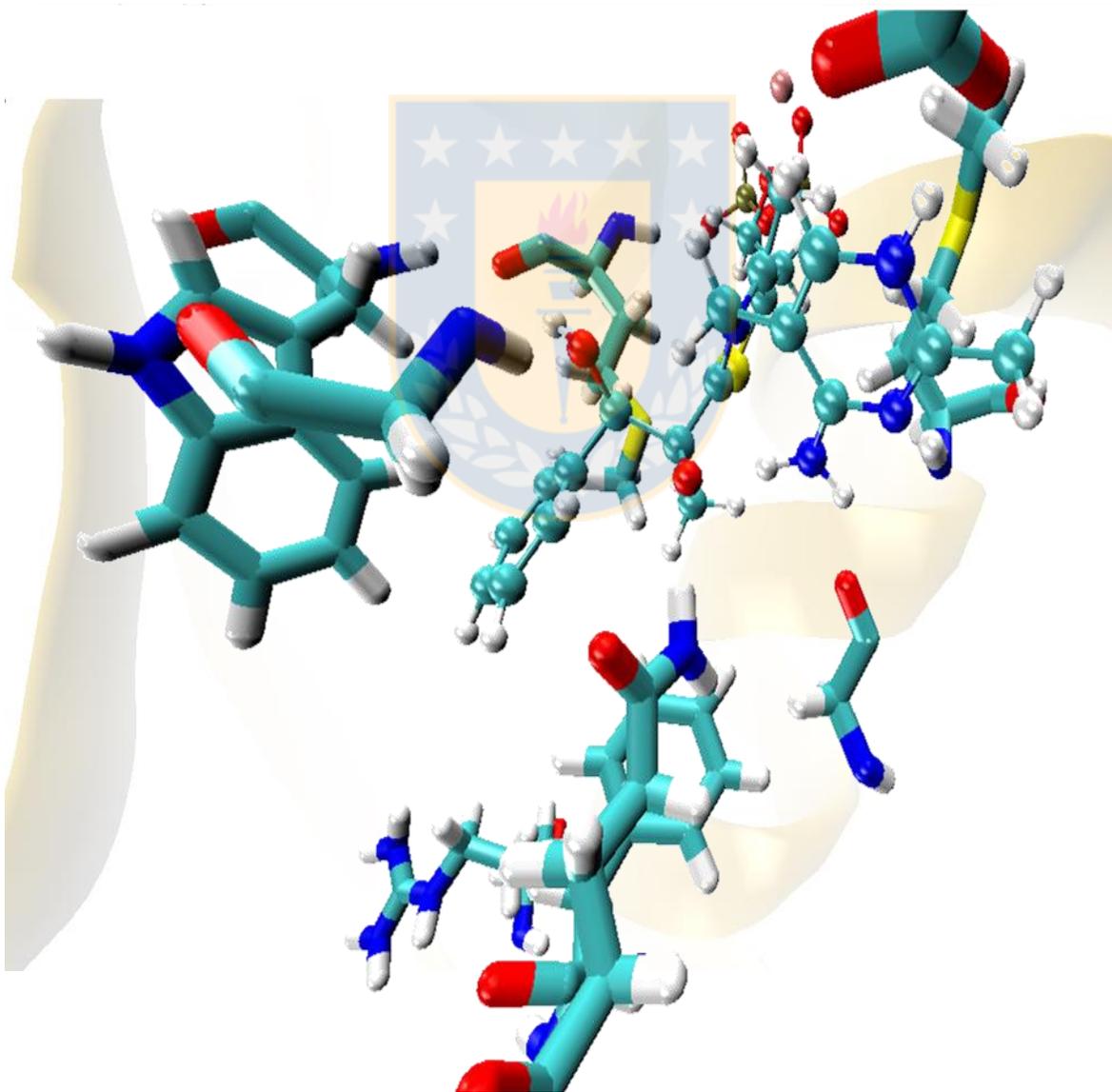
## Referencias

- [1] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne *Nucleic Acids Research*. **2000**, *28*, 235-242.
- [2] S. S. Pang, L. W. Guddat, R. G. Duggleby *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, *278*, 7639-7644.
- [3] D. D. Roy, A. K. Todd, M. M. John, *Gauss View 5.0.8.*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA., **2009**.
- [4] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA., **2009**.
- [5] E. G. Zoebisch *Current Contents/Engineering Technology & Applied Sciences*. **1993**, 8-8.
- [6] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart *Journal of the American Chemical Society*. **1993**, *115*, 5348-5348.
- [7] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, K. Schulten *Journal of Computational Chemistry*. **2005**, *26*, 1781-1802.
- [8] M. H. M. Olsson, C. R. Sondergaard, M. Rostkowski, J. H. Jensen *Journal of Chemical Theory and Computation*. **2011**, *7*, 525-537.
- [9] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. **1996**, *14*, 33-38.
- [10] R. B. Best, X. Zhu, J. Shim, P. E. M. Lopes, J. Mittal, M. Feig, A. D. MacKerell *Journal of Chemical Theory and Computation*. **2012**, *8*, 3257-3273.
- [11] B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, M. Karplus *Journal of Computational Chemistry*. **2009**, *30*, 1545-1614.
- [12] A. D. Mackerell *Mackerell Lab Homepage*, <http://mackerell.umaryland.edu/charmff.html>.
- [13] K. Vanommeslaeghe, A. D. MacKerell *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2012**, *52*, 3144-3154.
- [14] K. Vanommeslaeghe, E. P. Raman, A. D. MacKerell *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2012**, *52*, 3155-3168.
- [15] C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry Theories and Models*, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, West Sussex, **2004**, pp.1-102, 131-201, 249-301, 457-485.
- [16] D. C. Young, *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*, John Wiley and Sons, Inc, New York, **2001**, pp.19-60.
- [17] M. J. Field, *A Practical Introduction to the Simulation of Molecular Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, **2007**, pp.51-105.
- [18] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura *The Journal of Chemical Physics*. **1983**, *79*, 926-935.
- [19] G. J. Martyna, D. J. Tobias, M. L. Klein *Journal of Chemical Physics*. **1994**, *101*, 4177-4189.
- [20] S. E. Feller, Y. H. Zhang, R. W. Pastor, B. R. Brooks *Journal of Chemical Physics*. **1995**, *103*, 4613-4621.
- [21] T. Darden, D. York, L. Pedersen *Journal of Chemical Physics*. **1993**, *98*, 10089-10092.

- [22] M. P. Allen, D. J. Tildesley *Computer simulation of liquids*, Oxford University Press, New York, **1987**, pp.23-32.
- [23] S. A. Adcock, J. A. McCammon *Chemical Reviews*. **2006**, *106*, 1589-1615.
- [24] J. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen *Journal of Computational Physics*. **1977**, *23*, 327-341.
- [25] K. Sargsyan, C. Grauffel, C. Lim *Journal of Chemical Theory and Computation*. **2017**, *13*, 1518-1524.
- [26] Y. Q. Zhao, Y. J. Wang, Y. D. Gao, G. H. Li, J. F. Huang *Plos One*. **2015**, *10*, 21.
- [27] B. Knapp, N. Lederer, U. Omasits, W. Schreiner *Journal of Computational Chemistry*. **2010**, *31*, 2868-2873.
- [28] A. Karshikoff *Non-Covalent Interactions in Proteins*, Imperial College Press, Londres, **2006**, pp.1-127.
- [29] K. A. Dill *Biochemistry*. **1990**, *29*, 7133-7155.
- [30] G. A. Jeffrey, W. Saenger *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1991**, pp.15-44.
- [31] M. Sinnokrot, E. Valeev, C. Sherrill *Journal of the American Chemical Society*. **2002**, *124*, 10887-10893.
- [32] R. Podeszwa, R. Bukowski, K. Szalewicz *The Journal of Physical Chemistry A*. **2006**, *110*, 10345-10354.
- [33] M. J. Field, M. Albe, C. Bret, F. Proust-De Martin, A. Thomas *Journal of Computational Chemistry*. **2000**, *21*, 1088-1100.
- [34] J. J. P. Stewart, *MOPAC 2012*, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, **2012**.
- [35] W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives *Journal of the American Chemical Society*. **1988**, *110*, 1657-1666.
- [36] W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. **1998**, *216*, U696-U696.
- [37] G. A. Kaminski, R. A. Friesner, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen *Journal of Physical Chemistry B*. **2001**, *105*, 6474-6487.
- [38] W. L. Jorgensen *William. L. Jorgensen Research Group*, <http://zarbi.chem.yale.edu/oplsaam.html>.
- [39] L. S. Dodda, I. C. de Vaca, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen *Nucleic Acids Research*. **2017**, *45*, W331-W336.
- [40] R. Garcia-Meseguer, S. Marti, J. J. Ruiz-Pernia, V. Moliner, I. Tunon *Nature Chemistry*. **2013**, *5*, 566-571.
- [41] P. Deift, X. Zhou *Annals of Mathematics*. **1993**, *137*, 295-368.
- [42] C. Y. Zhu, R. H. Byrd, P. H. Lu, J. Nocedal *Acm Transactions on Mathematical Software*. **1997**, *23*, 550-560.
- [43] W. Koch, M. C. Holthausen, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, pp.33-89.
- [44] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker *Chemical Reviews*. **2003**, *103*, 1793-1873.
- [45] R. G. Parr, W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms And Molecules*, Oxford University Press, New York, **1989**, pp.47-69;105-200.
- [46] A. D. Becke *Journal of Chemical Physics*. **1993**, *98*, 1372-1377.
- [47] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch *Journal of Physical Chemistry*. **1994**, *98*, 11623-11627.
- [48] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg *Journal of Chemical Physics*. **2010**, *132*, 19.
- [49] S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk *Journal of Computational Chemistry*. **2011**, *32*, 1456-1465.
- [50] SigmaPlot (*Systat Software, San Jose, CA*).
- [51] M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone *Journal of Computational Chemistry*. **2003**, *24*, 669-681.
- [52] K. Fukui *Accounts of Chemical Research*. **1981**, *14*, 363-368.

# *Capítulo 3:* *Resultados y discusión*

---



### 3.1 Dinámica Molecular Mecánico Clásica

A continuación se presentan los resultados para los 100 ns de dinámica molecular de producción mecánico clásicas (MM) calculados para los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>. En cada uno de los sistemas, las dinámicas de producción incluyeron la simulación de los dos sitios activos presentes en la enzima AHAS, de los cuales se ha seleccionado solo uno de ellos, como sitio representativo de cada sistema para la selección de una estructura inicial utilizada en los cálculos de dinámica molecular QM/MM y luego para la posterior exploración del mecanismo de reacción propuesto. Esta selección se ha realizado en base a las interacciones no enlazantes residuo sustrato presentes en los sitios activos durante la simulación y que están relacionadas con los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  que confieren la actividad del cofactor ThDP. Además, debido a la similitud del grupo carbonilo entre el sustrato piruvato y el benzaldehído, las interacciones fueron comparadas con los resultados experimentales reportados en literatura, referentes a los aminoácidos más relevantes en estabilizar la formación del producto fisiológico (2S)-2-acetolactato (AL).

Para los sitios activos de los sistemas en estudio, se presenta el análisis de las trayectorias de la dinámica de producción. Además se presentan cálculos de RMSF de todos los carbonos alfa de los aminoácidos de la enzima y cálculos de RMSD para la estructura proteica de la enzima y en conjunto con los cofactores FAD (F1 y F2) y los complejos HETHDP-BA (E1 y E2), los cuales incluyen al sustrato benzaldehído enlazado al intermediario HETHDP y el protón H $\beta$  transferido, con F1, F2, E1 y E2 referentes al sitio activo 1 y sitio activo 2, respectivamente.

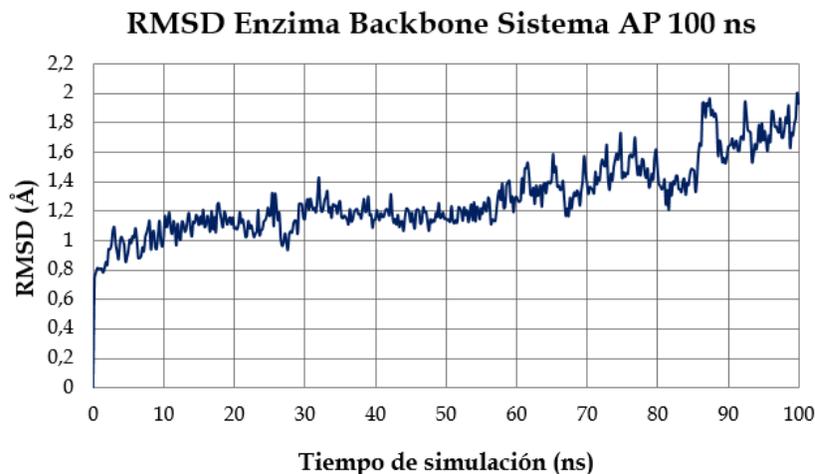
Con el propósito de corroborar cambios en las interacciones no enlazantes encargadas de mantener el correcto plegamiento de la enzima durante las dinámicas de producción, se presenta el análisis del conteo de los enlaces de hidrógeno entre pares de residuos de la enzima durante la simulación, los cuales representan la conservación de la estructura secundaria y terciaria de la enzima. A esto se le añade el análisis de la

variación del radio de giro de la enzima, el cual está relacionado con el grado de compactación y con la pérdida o conservación de la estructura terciaria de la enzima.

Para cada sitio activo se presenta la estructura promedio obtenida de los 100 ns de simulación como representación de las interacciones residuo sustrato presentes en cada uno de los sistemas en estudio. En tanto, para el sitio activo seleccionado se presentan cálculos de RMSD y RMSF de los aminoácidos que conforman el sitio activo y para los complejos HETHDP-BA, respectivos, además de cálculos de la distancia y de la energía potencial total de las interacciones no enlazantes residuo sustrato presentes en el sitio activo representativo de cada sistema durante la simulación.

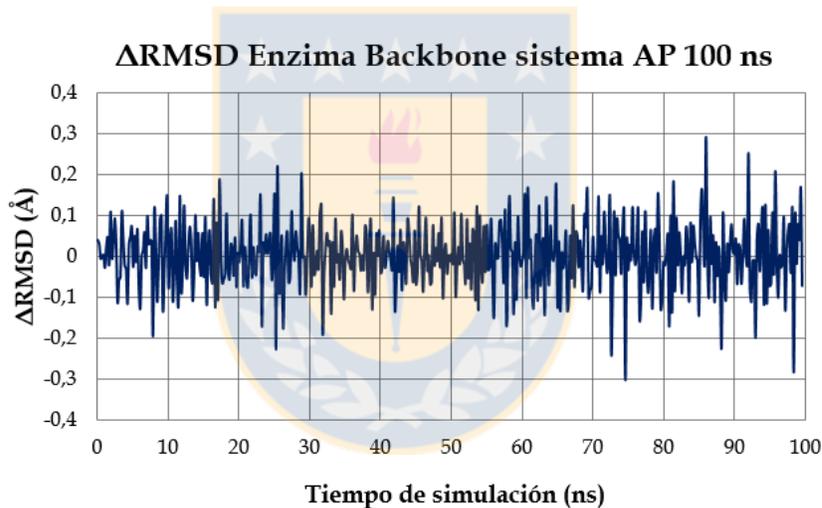
### 3.1.1 Dinámica molecular MM sistema AP

En la Figura 3.1, se presenta el gráfico del RMSD para la dinámica de producción de 100 ns de los átomos del backbone de los aminoácidos del sistema AP. Los valores de RMSD fueron calculados cada 0,2 ns y su valor promedio para los 100 ns fue de  $1,29 \pm 0,03$  Å. A medida que el tiempo de simulación aumenta también lo hace el valor del RMSD del backbone de los residuos, presentando una zona de estabilidad conformacional entre los 30 y los 60 ns, con valores de RMSD similares durante dicho intervalo de tiempo de simulación. Cuenta de ello es el gráfico del  $\Delta$ RMSD para los átomos del backbone del sistema AP representado en la Figura 3.2. En él se observa que durante toda la simulación, salvo algunas estructuras a tiempos de simulación sobre los 70 ns, las variaciones en valor absoluto del  $\Delta$ RMSD no distan más allá de los 0,2 Å, indicando que el movimiento de los residuos la enzima entre cada estructura de la dinámica correspondió a distancias menores a los 0,4 Å.



**Figura 3.1.** RMSD backbone de los residuos sistema AP dinámica molecular MM.

Fuente: Elaboración propia.

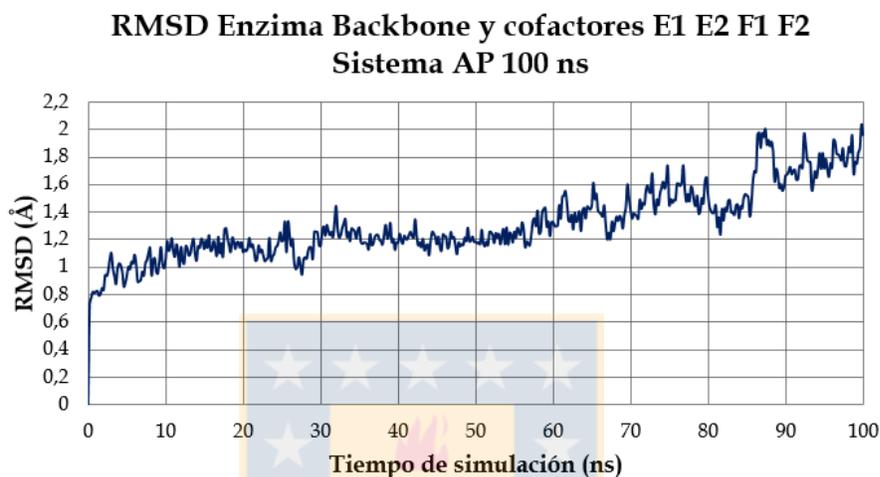


**Figura 3.2.**  $\Delta$ RMSD backbone de los residuos sistema AP dinámica molecular MM.

Fuente: Elaboración propia.

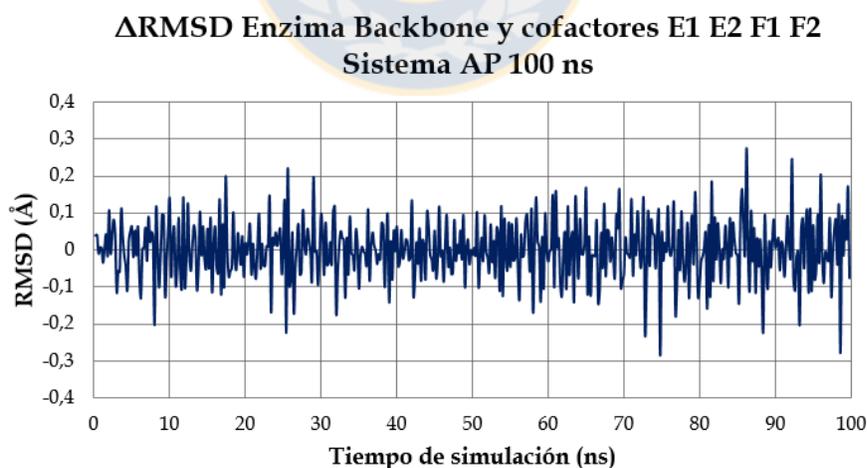
Similares resultados se presentan en el gráfico del RMSD, Figura 3.3 y su respectivo  $\Delta$ RMSD, Figura 3.4, en los cuales se incluye, además de los átomos del backbone de la enzima, a los complejos HETHDP-BA-AP (E1 y E2) y los cofactores FAD (F1 y F2) de los dos sitios activos. La inclusión de los complejos y cofactores aumentó levemente el valor promedio del RMSD a  $1,32 \pm 0,03$  Å, en comparación al gráfico del RMSD de la Figura 3.1, lo cual da cuenta del movimiento restringido de los cofactores situados en

los sitios activos al interior de la enzima. Además, sus topologías son similares, presentando en ambos gráficos de RMSD una zona de estabilidad conformacional que va desde los 30 ns a los 60 ns. Esta similitud entre los RMSD, tras la inclusión de los cofactores, da cuenta de la conservación de los sitios activos durante la simulación, ratificando la estabilidad de la simulación de dinámica molecular realizada.



**Figura 3.3.** RMSD backbones, HETHDP-BA-AP y FAD sistema AP 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

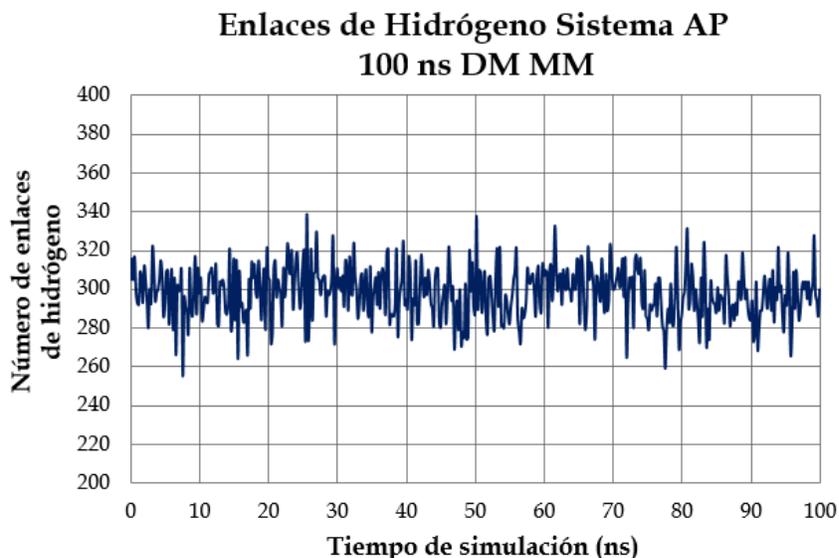


**Figura 3.4.**  $\Delta$ RMSD backbones, HETHDP-BA-AP y FAD sistema AP 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Para comprobar la estabilidad conformacional de la estructura secundaria y terciaria de la enzima durante la simulación, se presenta en la Figura 3.5 el conteo de los enlaces de hidrógeno entre pares de residuos durante los 100 ns de simulación. Como se aprecia en el gráfico, el número de enlaces de hidrógenos se mantuvo constante durante la dinámica de producción, con un valor promedio de 298 enlaces de hidrógeno, dando cuenta de la estabilidad en la estructura proteica de la enzima y de la representatividad de la simulación de dinámica molecular del sistema AP. Por otro lado, una abrupta disminución de los enlaces de hidrógeno durante la simulación, daría indicios de la pérdida de la estructura secundaria o terciaria de la enzima. Esto significaría tanto la ruptura de algunas de las hélices- $\alpha$  y hojas  $\beta$ -plegadas debido a la pérdida de los enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos que mantienen unidos a los backbones de los aminoácidos, como la deformación del plegamiento globular de la enzima, generado por la pérdida de los enlaces de hidrógenos existentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos que mantienen la estructura terciaria.<sup>1,2</sup>

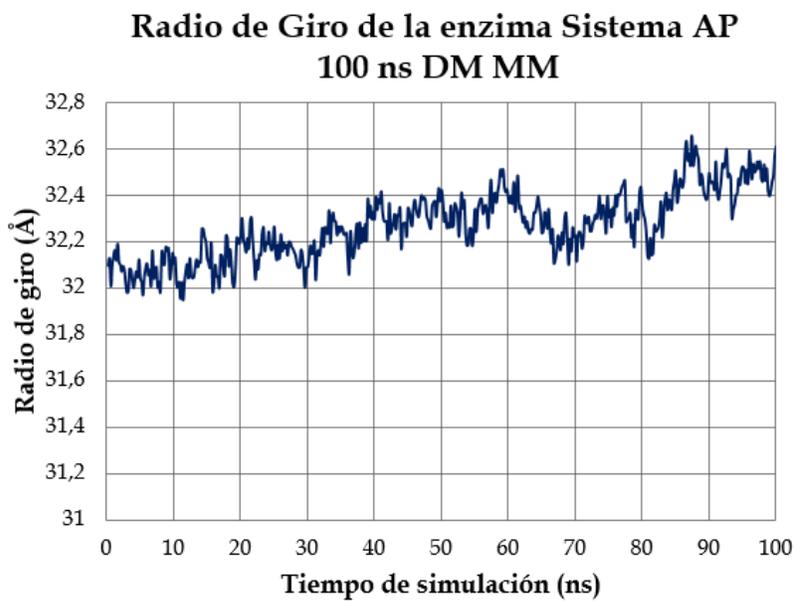
Las pequeñas variaciones en el conteo del número de enlaces de hidrogeno a lo largo de la simulación se debe a que el análisis se realizó con una distancia de corte de 3 Å, entre el átomo donador enlazado al átomo de hidrógeno y el átomo aceptor que forma el enlace de hidrógeno y un ángulo de corte que contabilizo solo los enlaces de hidrógeno que poseen un ángulo donor-hidrógeno-aceptor entre 180° y 160°. En vista de esto, un enlace de hidrógeno puede incluirse o no en el conteo, dependiendo de su movilidad entre cada estructuras de la trayectoria de la dinámica, quedando fuera del contero en algunas estructuras al no cumplir lo valores de cutoff e incluyéndose en las que si lo cumple.



**Figura 3.5.** Enlaces de hidrógeno entre residuos sistema AP 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

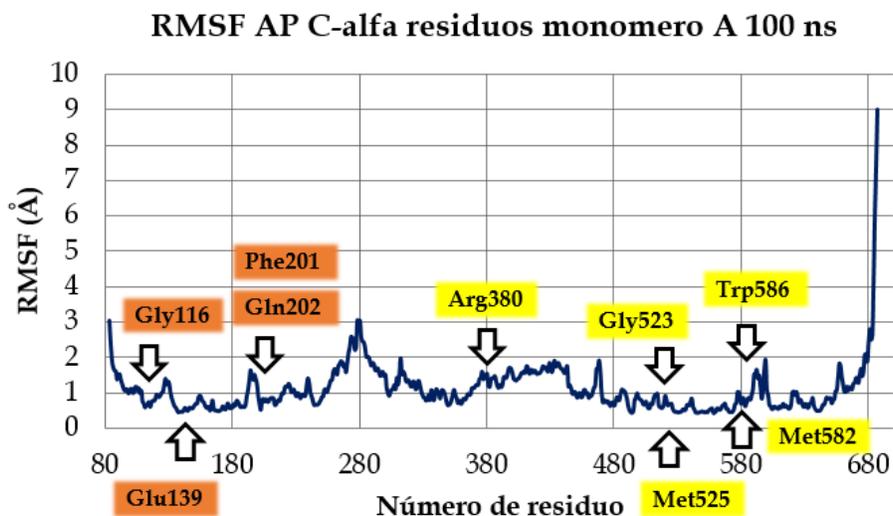
Además, en la Figura 3.6, se presenta el análisis de la estructura terciaria de la enzima mediante el gráfico que representa la variación del radio de giro de la enzima en base a su centro geométrico. El radio de giro da cuenta del grado de compactación de la enzima y al igual que en el conteo de los enlaces de hidrógeno su valor durante la simulación se mantuvo constante con un promedio de  $32,27 \pm 0,02 \text{ \AA}$ , ratificando la estabilidad tanto de la estructura terciaria de la enzima como la representatividad de la simulación que se ha realizado del sistema AP. Por lo tanto, un aumento del radio de giro permitiría inferir que las interacciones no enlazantes entre las cadenas laterales de los aminoácidos de las conformaciones hélices- $\alpha$  y hojas  $\beta$ -plegadas se habrían perdido durante la simulación, provocando la ruptura del plegamiento globular de la enzima, aumentando su diámetro desde su centro geométrico.



**Figura 3.6.** Radio de giro de la enzima AHAS sistema AP 100 ns DM MM.

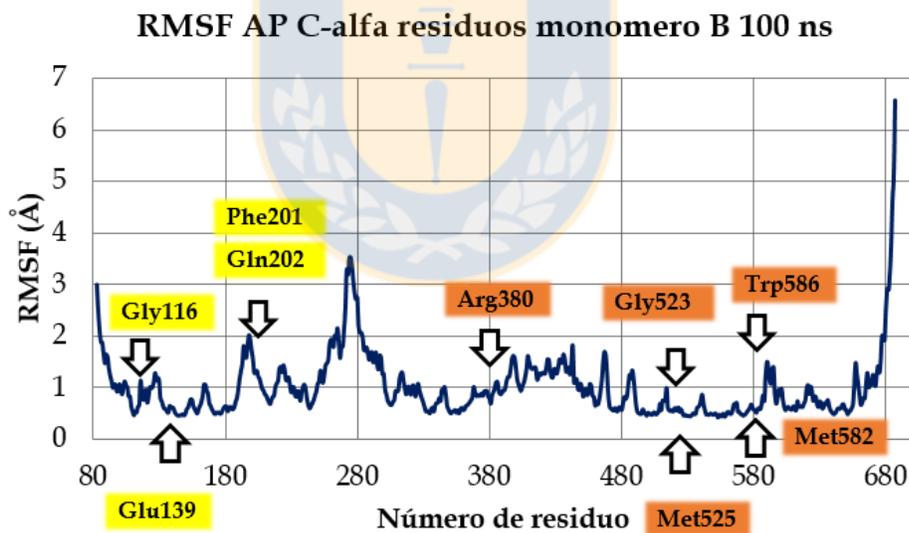
Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a la movilidad de los residuos de la enzima AHAS durante la simulación, en las Figuras 3.7 y 3.8 se presentan graficados los valores de RMSF de cada uno de los carbonos alfa del backbone de los aminoácidos que componen los dos monómeros de la enzima, valores correspondientes a los 100 ns de simulación de dinámica de producción del sistema AP. En los gráficos se aprecia como los carbonos alfa de los aminoácidos polares ubicados en la periferia de la estructura proteica de la enzima, que están en contacto con las moléculas de agua circundantes, son los que presentaron mayor movilidad y por ende valores más altos de RMSF, debido a las interacciones continuas con el solvente, con valores por sobre los 2 Å.



**Figura 3.7.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema AP 100 ns DM MM.

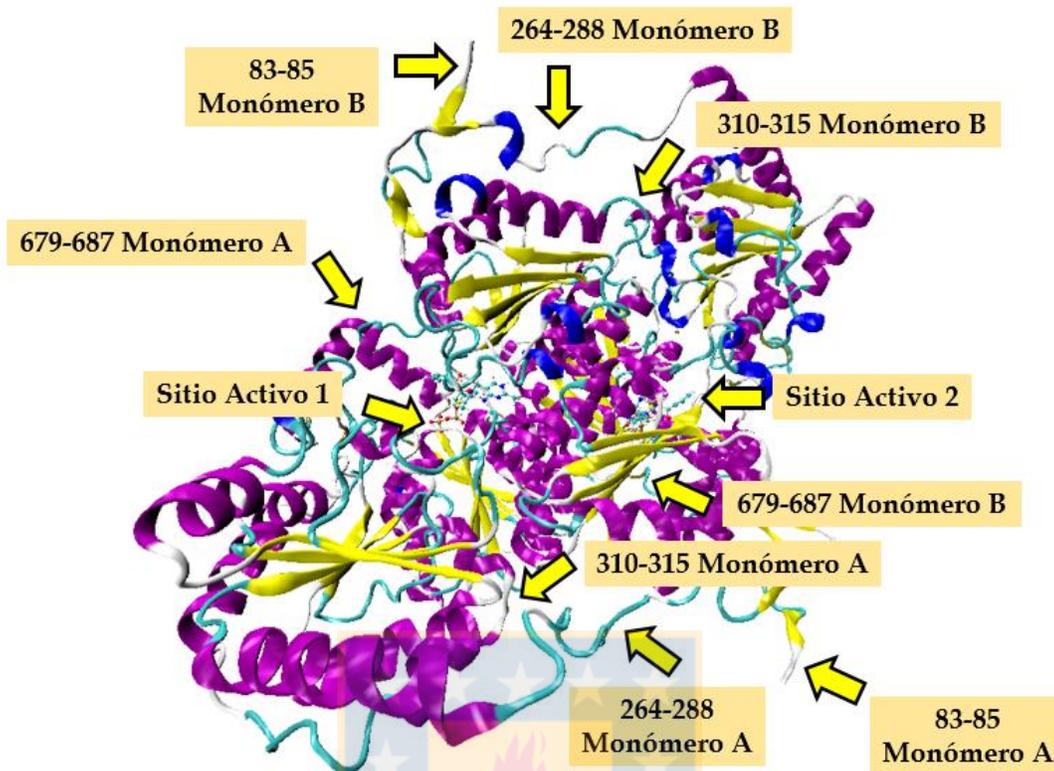
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.8.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema AP 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Tal es el ejemplo de los aminoácidos comprendidos entre las secuencias Thr264-Ser288 y Ile310-Asp315, pertenecientes a zonas de loops del dominio beta, presente en ambos monómeros de la enzima, tal como se muestran en la Figura 3.9 correspondiente a la estructura cuaternaria de la enzima AHAS.<sup>3</sup> A estos se le suman los aminoácidos terminales ubicados en los extremos de ambos monómeros, entre los que se encuentran los aminoácidos Thr598 y Gly658, ambos ubicados en zonas de loops que unen hélices alfa y las secuencias de aminoácidos Pro83-Met85, ubicados al inicio de cada monómero y Arg679-His687 ubicados a su término. Por el contrario, los aminoácidos ubicados en los sitios activos de la enzima, tales como Gly116, Glu139, Phe201, Gln202, Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586, presentaron valores de RMSF menores, cercanos a 1 Å, tabla 3.1. Esto da cuenta de que los aminoácidos de los sitio activos se encuentran más restringidos en su movilidad y desplazamiento, consecuencia de las interacciones no enlazantes específicas que poseen con el complejo HEThDP-BA-AP, que incluyen interacciones específicas con el intermediario HEThDP y con el sustrato benzaldehído. El sitio activo 1, correspondiente al sitio activo en donde el cofactor ThDP se encontraba parcialmente degradado, está conformado por los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201 y Gln202 del monómero B, aminoácidos indicados en color amarillo, Figura 3.8 y los aminoácidos Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586 del monómero A, aminoácidos indicados en color amarillo, Figura 3.7. Por otro lado, el sitio activo 2, está conformado por los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201 y Gln202 del monómero A, aminoácidos en color naranja, Figura 3.7 y los aminoácidos Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586 del monómero B, aminoácidos en color naranja, Figura 3.8.



**Figura 3.9.** Residuos con mayores valores de RMSF señalados en la representación de la estructura cuaternaria de la enzima AHAS.

Fuente: Elaboración propia.

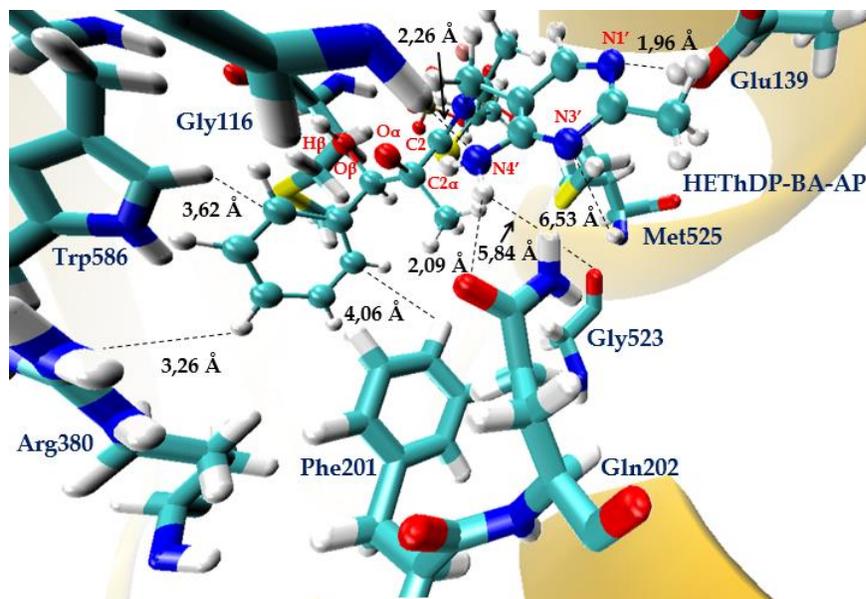
**Tabla 3.1: Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo 1 y 2 del sistema AP en la enzima AHAS para 100 ns de dinámica molecular MM.**

Ubicación	Residuo Sitio Activo1	RMSF (Å)	Ubicación	Residuo Sitio Activo2	RMSF (Å)
Monómero B	Gly116	1,13	Monómero A	Gly116	0,73
	Glu139	0,60		Glu139	0,48
	Phe201	1,55		Phe201	0,69
	Gln202	1,28		Gln202	0,53
Monómero A	Arg380	1,55	Monómero B	Arg380	0,79
	Gly523	0,69		Gly523	0,62
	Met525	0,70		Met525	0,58
	Met582	0,83		Met582	0,51
	Trp586	0,87		Trp586	0,70

Fuente: Elaboración propia.

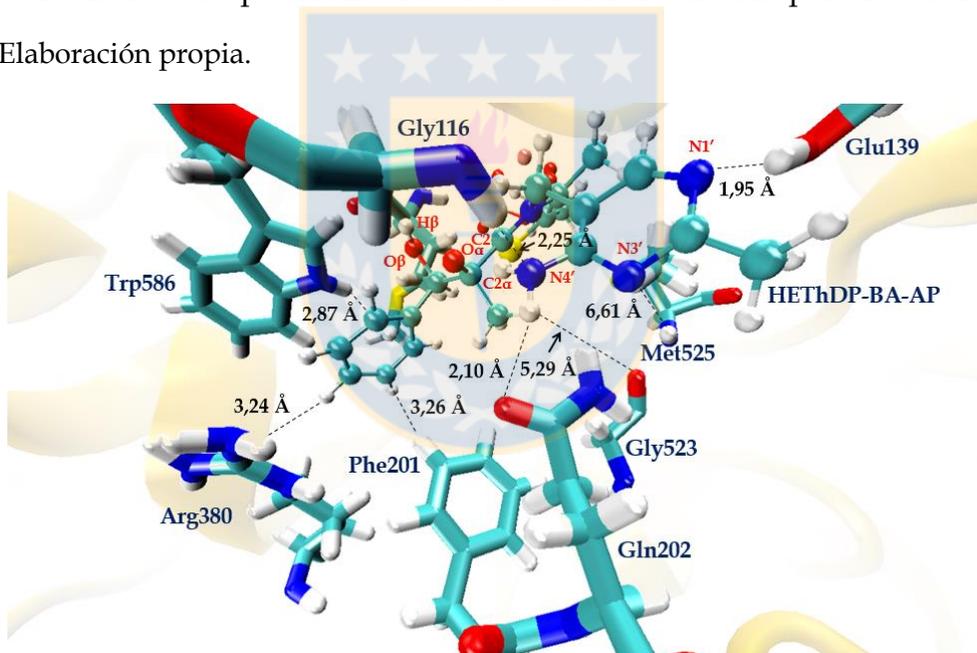
Al comparar los valores de los RMSF de los carbono alfa de los aminoácidos de ambos sitios activos, tabla 3.1, se puede apreciar que los aminoácidos del sitio activo 2 han presentado menor movilidad durante la simulación, indicando una mayor estabilidad en las interacciones no covalentes presentes en el sitio activo. Sin embargo, al analizar visualmente la trayectoria de la simulación, mediante el software VMD, se pudo apreciar que las interacciones residuo sustrato de los aminoácidos Gly116, Gln202, Arg380, Gly523 y Met525 habían variado por mucho de las interacciones reportadas en literatura involucradas en la formación del producto natural (2S)-2-acetolactato (AL), para la tercera etapa del ciclo catalítico.<sup>3-8</sup>

Las moléculas de piruvato y de benzaldehído comparten un grupo carbonilo en su estructura y la formación estereoquímica correcta de R-PAC en la AHAS necesita que el sustrato benzaldehído se oriente de igual manera que lo hace la molécula de piruvato en la formación de AL. Por lo tanto, la Gly116, al igual que en la formación de AL, debió interactuar mediante un enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico del benzaldehído, estabilizando la densidad de carga del oxígeno, provocando así una mayor reactividad del carbono carbonílico al momento de la carboligación con el intermediario HETHDP, debido al aumento del carácter electrofílico del carbono carbonílico,<sup>4</sup> Figura 1.8 página 15. Sin embargo, desde la etapa de equilibrio y durante toda la dinámica de producción, la Gly116 se mantuvo formando un enlace de hidrógeno con el nitrógeno N4' del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-AP, manteniéndose alejado completamente del oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> del benzaldehído, como se observa en las Figuras 3.10 y 3.11, correspondientes a las estructuras promedio del sitio activo 2 del sistema AP para los 100 ns de simulación y para la zona del RMSD entre los 30 y 60 ns de simulación.



**Figura 3.10.** Estructura promedio sitio activo 2 del sistema AP para 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.



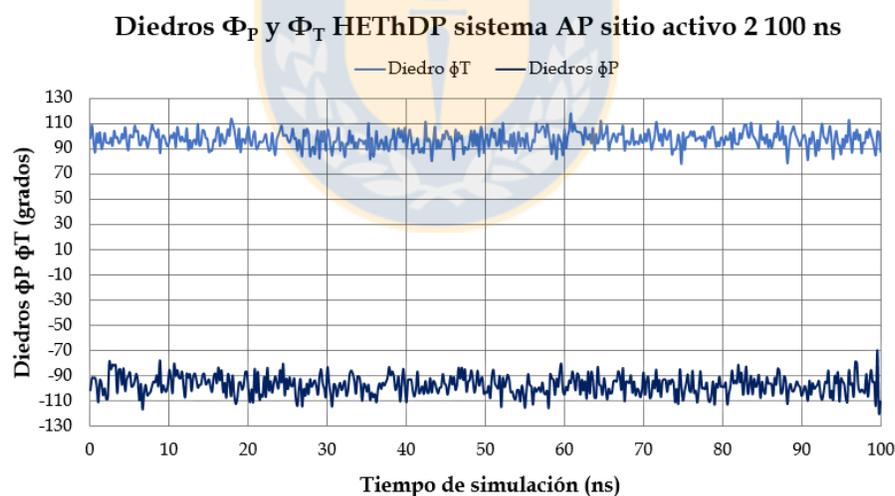
**Figura 3.11.** Estructura promedio sitio activo 2 del sistema AP para el intervalo entre los 30 ns y los 60 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Otra de las interacciones reportadas en literatura para la formación de AL, es la interacción mediante enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el oxígeno  $O_{\alpha}$  del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP, el cual es precisamente el oxígeno desde donde

se propone que ocurre la transferencia del átomo de hidrógeno hacia el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato aceptor.<sup>4,5</sup> Por el contrario, en el sitio activo 2 la Gln202 se ubicó por debajo del anillo de pirimidina, formando un enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del grupo amida de la cadena lateral del residuo y uno de los hidrógenos del grupo amino del anillo de pirimidina, correspondiente al hidrógeno más alejado del anillo de tiazol, Figuras 3.10 y 3.11. En cuanto a la interacción mediante enlace de hidrógeno entre la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina, a la cual se le atribuye la torción de los diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  para mantener la conformación activa tipo V del cofactor ThDP,<sup>3,9</sup> se puede observar que desde el comienzo de la simulación el hidrógeno del backbone de la Met525 se encuentra a distancia superiores a los 6 Å, por lo que el enlace de hidrógeno se ha perdido completamente. A esto se le suma, la pérdida de la interacción por enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico de backbone de la Gly523 y los hidrógenos del grupo amino del anillo de pirimidina del intermediario HETDP-AP, la cual cumple un propósito similar a la interacción Met525-H/N3'-pirimidina.<sup>3</sup> En su lugar, se ha posicionado la Gln202 reemplazando a la Gly523 y formando un enlace de hidrógeno entre el nitrógeno del grupo amida de la Gln202 y el hidrógeno del grupo amino más alejado del anillo de tiazol, quedando el oxígeno carbonílico de la Gly523 a una distancia aproximada de 6,0 Å del hidrógeno del grupo amino. Por último, estudios experimentales de mutaciones sitio dirigidas para la formación de R-PAC en la enzima AHAS, revelan que para la tercera etapa del ciclo catalítico la Arg380 no cumple un rol catalítico importante, debido a que sus mutaciones no disminuyen la formación de R-PAC en forma considerable, en comparación a como lo hace para la formación de AL.<sup>4</sup> Por el contrario, en el sitio activo 2 del sistema AP se observó que la Arg380 se encuentra a una distancia cercana, de aproximadamente 3 Å de distancia, entre el carbono central del grupo guanidinio de la Arg380 y el hidrógeno del anillo de benceno más próximo al residuo, haciendo suponer una interacción  $\pi$ -catión entre el grupo guanidinio de la Arg380 y el anillo de benceno del benzaldehído.

De todas las variaciones de las interacciones no enlazantes entre los aminoácidos y el complejo HETHDP-BA-AP que presenta el sitio activo 2, la principal falencia la originan la pérdida de las interacciones de la Met525 con el nitrógeno N3' y la Gly523 con el hidrógeno del grupo amino, ya que afectan directamente el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  y por ende la actividad del cofactor ThDP. El valor experimental de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  para que en las etapas de activación el cofactor ThDP adopte la conformación activa tipo V son de  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$  respectivamente,<sup>10-12</sup> mientras que los valores en la estructura cristalina 1N0H para el cofactor no degradado, denominado sitio activo 2, son  $-60^\circ$  y  $91^\circ$ , respectivamente.<sup>3</sup> En cambio, el valor promedio de  $\Phi_P$  en el sitio activo 2 del sistema AP para los 100 ns de simulación es de  $-97,3 \pm 0,9^\circ$ , Figura 3.12, mientras que el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_T$  es de  $98 \pm 1^\circ$ , el cual coincide con el valor experimental. Por estos motivos, el sitio activo 2 del sistema AP no fue utilizado para la elección de una estructura de partida para realizar a partir de ella los cálculos de simulación de dinámica molecular QM/MM y la posterior exploración de PES.

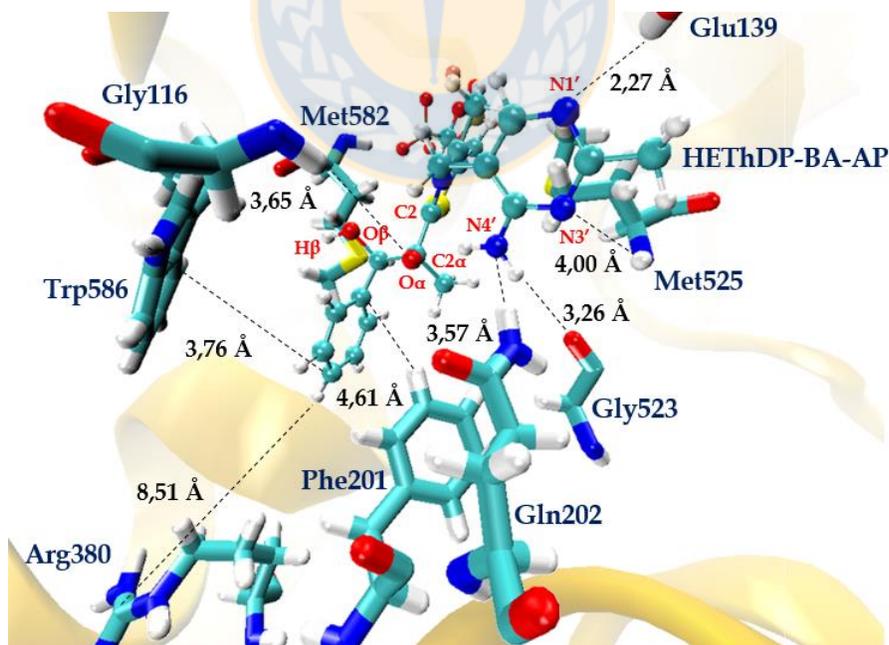


**Figura 3.12.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HETHDP-BA-AP para el sitio activo 2 del sistema AP para los 100 ns de DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

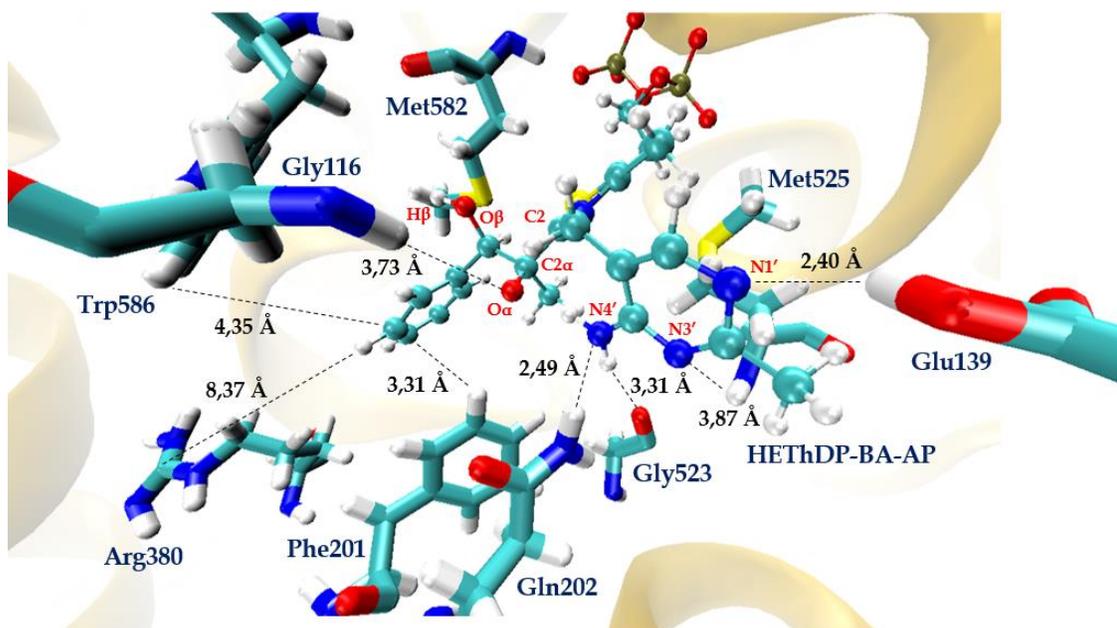
Por el contrario, al visualizar las interacciones no enlazantes del sitio activo 1 para el sistema AP durante la dinámica molecular de producción y compararlas con las

reportadas en literatura, fue posible apreciar que muchas de ellas coinciden. Tal es el caso del enlace de hidrógeno, entre el hidrógeno del backbone de la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina. También se encuentra el enlace de hidrógeno que se ha formado entre el oxígeno carbonílico del backbone de la Gly523 y el hidrógeno del grupo amino más alejado del anillo de tiazol, tal como se muestra Figura 3.13, correspondiente a la estructura promedio del sitio activo 1 para los 100 ns de simulación y en la Figura 3.14, correspondiente a la estructura promedio de la zona de mayor estabilidad conformacional que muestran los RMSD, Figuras 3.1 y 3.3, ubicada en la zona entre los 30 ns y los 60 ns. Los enlaces de hidrógeno se mantuvieron a una distancia promedio de  $4,06 \pm 0,07$  Å, para el caso de la Met525 y el nitrógeno N3' y de  $3,36 \pm 0,07$  Å, para el caso de la Gly523 y el hidrógeno del grupo amino. Los valores de distancias promedio no coinciden con las distancias mostradas en las Figuras 3.13 y 3.14, ya que estas últimas son representación de la distancia entre la posición promedio de los átomos y no de los valores de distancias evaluados para cada una de las estructuras de la simulación.



**Figura 3.13.** Estructura promedio sitio activo 1 del sistema AP para 100 ns DM MM.

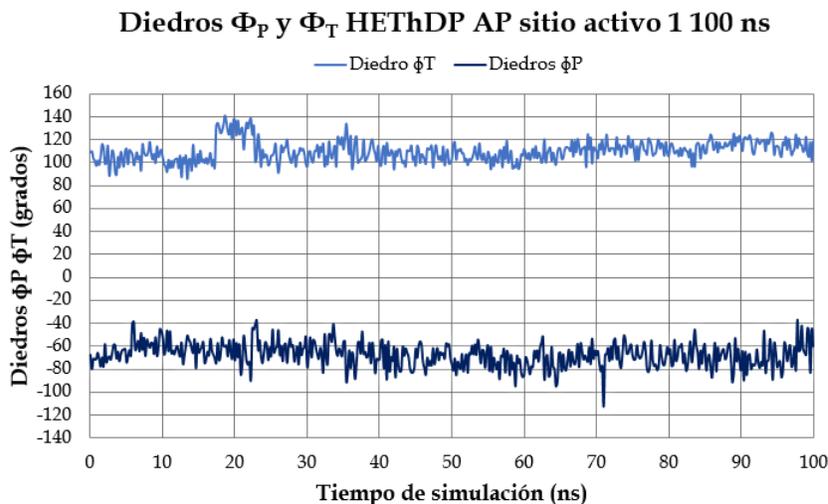
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.14.** Estructura promedio sitio activo 1 del sistema AP para el intervalo entre los 30 ns y los 60 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Como consecuencia de que los enlaces de hidrógeno Gly523-O/H-N4' y Met525-H/N3'-pirimidina se han mantenido en el sitio activo 1 durante toda la dinámica de producción, los valores promedios de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  correspondientes a  $-67,4 \pm 1,3^\circ$  y  $109,8 \pm 1,2^\circ$ , respectivamente, Figura 3.15, muestran mayor consistencia con los valores experimentales de  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$  para la conformación activa tipo V del cofactor ThDP, en donde el ángulo diedro  $\Phi_P$  muestra una mayor exactitud en su valor promedio durante la simulación, en comparación al sitio activo 2.



**Figura 3.15.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HETHDP-BA-AP para el sitio activo 1 del sistema AP para los 100 ns de DM MM.

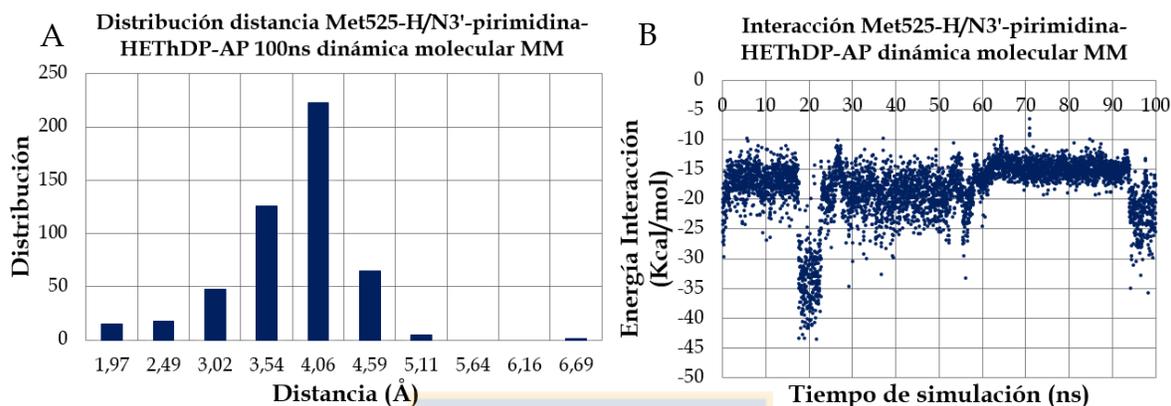
Fuente: Elaboración propia.

Otras de las interacciones no enlazantes que se conservaron en comparación a las reportadas en literatura, es la del enlace de hidrógeno entre el hidrógeno carboxílico del Glu139 y el nitrógeno N1' del anillo de pirimidina. Esta interacción otorgar la actividad al cofactor al ayudar a adquirir la torsión correcta del ángulo diedro  $\Phi_P$ , además de participar en la activación del cofactor ThDP a la forma de iluro y mantener el estado de protonación del anillo de pirimidina,<sup>5,6</sup> en donde la distancia promedio durante la simulación fue de  $2,4 \pm 0,1 \text{ \AA}$ . Se suma a esto la Arg380, la cual también coincide con lo reportado en literatura,<sup>4</sup> ya que no presentó interacción ni con el intermediario HETHDP-AP, ni con el anillo de benceno del benzaldehído, reflejo de ello es la distancia promedio de  $11 \text{ \AA}$ , obtenida desde los centros geométricos del grupo guanidinio y del anillo de benceno, para los 100 ns de simulación. Por otro lado, las interacciones referentes a la Gly116 y Gln202 presentaron interacciones de enlaces de hidrógeno distintos a los reportados en literatura para la formación de producto fisiológico AL. La Gly116 formó un enlace de hidrógeno con el oxígeno desprotonado  $O_\alpha$  enlazado al átomo de carbono  $C2\alpha$ , oxígeno donador desde donde se transfiere el

átomo de hidrógeno  $H_{\beta}$  hacia el oxígeno carbonílico del benzaldehído  $O_{\beta}$ , Figuras 3.13 y 3.14. Mientras que la Gln202 se mantuvo interaccionando mediante un enlace de hidrógeno con el nitrógeno  $N4'$  del grupo amino del anillo de pirimidina. Así, ambos aminoácidos han perdido las interacciones reportadas en literatura y se han desplazado debido al carácter nucleofílico del grupo 4'-amino, ya que la Gln202 favorece la formación del enlace de hidrógeno con el nitrógeno  $N4'$  por sobre la interacción con el oxígeno  $O_{\alpha}$  y como consecuencia, el hidrógeno del backbone de la Gly116 se ha orientado hacia el oxígeno  $O_{\alpha}$ , perdiendo su interacción con el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del benzaldehído. Estas interacciones pueden dar cuenta de que en realidad el estado de protonación del grupo amino del anillo de pirimidina del intermediario HETDP, al momento de la carboligación del sustrato benzaldehído, no correspondería a la forma tautomérica 4'-aminopirimidina (AP), debido a que el carácter nucleofílico del grupo 4'-amino interfiere en la interacción Gln202-H/ $O_{\alpha}$ -HETDP-AP, provocando la pérdida tanto de la interacción reportada para la Gln202, como de la interacción reportada para la Gly116, como consecuencia de la formación del enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el nitrógeno  $N4'$  del grupo amino del anillo de pirimidina. Para una mayor descripción del sitio activo 1 del sistema AP, se presenta un análisis detallado de cada una de las interacciones de los aminoácidos durante los 100 ns de dinámica de producción.

**Met525:** En conformidad a lo reportado en literatura,<sup>3, 9</sup> la Met525 se mantuvo interaccionando con el nitrógeno  $N3'$  del anillo de pirimidina del complejo HETDP-BA-AP mediante un enlace de hidrógeno formado con el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone del aminoácido. La interacción se mantuvo durante toda la simulación, presentando una distancia promedio de  $4,06 \pm 0,07$  Å, Figura 3.16-A y un valor promedio de energía de interacción de  $-18,1 \pm 0,2$  Kcal/mol, Figura 3.16-B, manteniendo la conformación activa tipo V del complejo HETDP-BA-AP y otorgando en consecuencia un valor promedio al ángulo diedro  $\Phi_P$  del intermediario HETDP-AP de  $-67,4 \pm 1,3^{\circ}$  durante la simulación, en donde el valor experimental es de  $\pm 70^{\circ}$ .

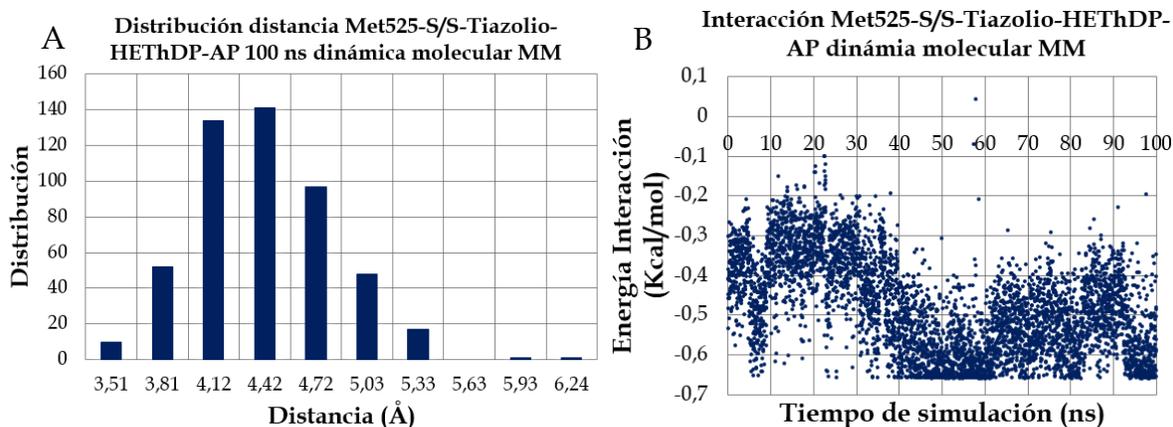
En este sentido, la interacción Met525-H/N3'-HETHDP-AP provoca la torsión del anillo de pirimidina hacia la zona de la Met525, provocando que el ángulo diedro  $\Phi_P$  adopte valores más positivos.



**Figura 3.16.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Met525-H/N3'-pirimidina y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

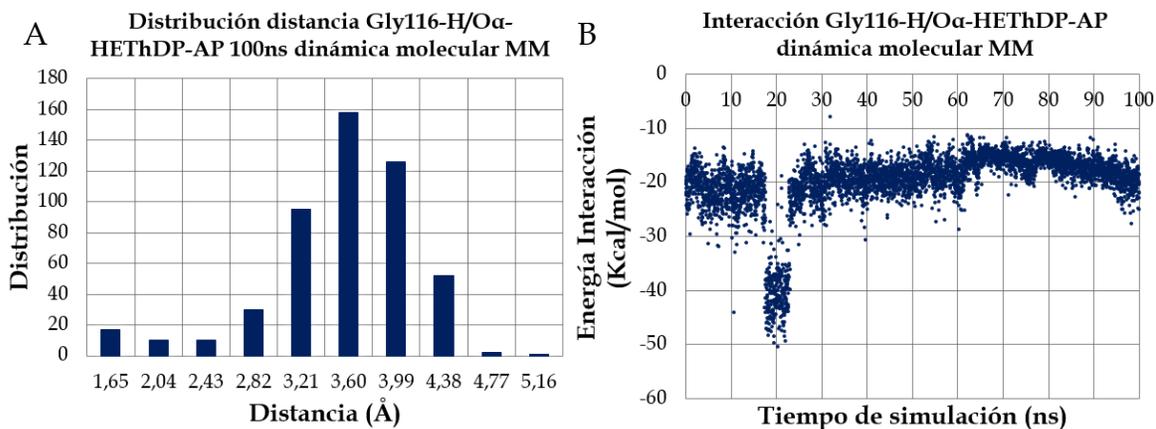
También se observó una orientación entre los átomos de azufre de la cadena lateral de la Met525 y del anillo de tiazolio, donde sus distancias oscilan entre los 4,57 Å y 4,87 Å, con un valor promedio de  $4,56 \pm 0,04$  Å para los 100 ns de simulación, Figura 31-A, mientras la energía de interacción promedio fue de -0,5 Kcal/mol. Sin embargo, a pesar de la distancia, los átomos de azufre se encuentran con una adecuada orientación entre ellos, lo cual podría estar relacionado con que el ángulo diedro  $\Phi_T$  mantenga la conformación activa tipo V del cofactor y adopte un valor promedio de  $110^\circ$ , cercano al valor experimental de  $\pm 95^\circ$ .



**Figura 3.17.** A-Distribución distancia interacción Met525-S/S-tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

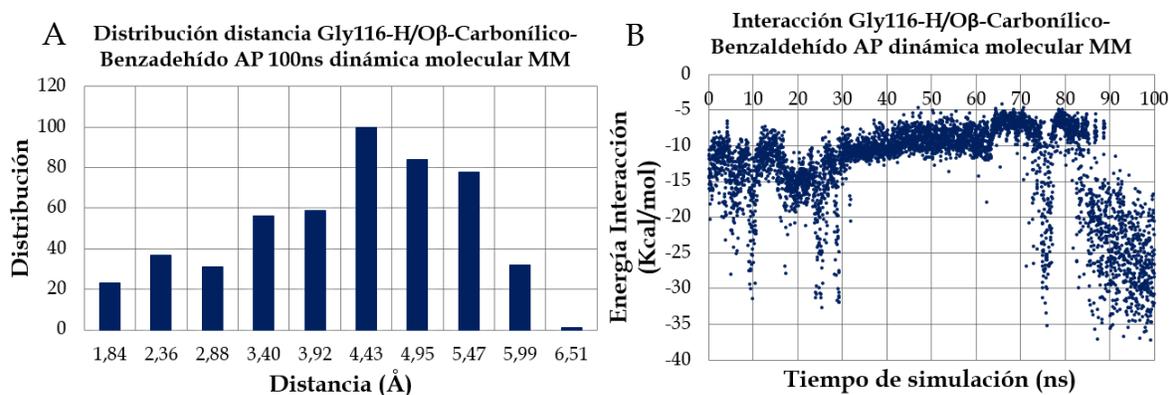
**Gly116:** Al inicio de la dinámica de producción el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Gly116 se mantuvo orientado hacia el oxígeno  $O_{\alpha}$  desprotonado del complejo HETHDP-BA-AP a una distancia de 3,74 Å. Este mismo hidrógeno del backbone del aminoácido también se mantuvo cercano al oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído a una distancia de 3,64 Å, pero sin una orientación correcta. A medida que el tiempo de simulación aumentó hasta aproximadamente los 60 ns, el enlace de hidrógeno entre el hidrógeno del backbone de la Gly116 y el oxígeno  $O_{\alpha}$  desprotonado del complejo HETHDP-BA-AP se conservó con una correcta orientación en casi la mayoría de las estructuras, con una distancia promedio de  $3,74 \pm 0,12$  Å, Figura 3.18-A. Sin embargo, luego de los 60 ns de simulación la distancia del enlace de hidrógeno continuó aumentando, oscilando entre los 4,0 Å y 4,5 Å. A pesar de esto, la energía de interacción promedio para este enlace de hidrógeno durante los 100 ns de simulación fue de  $-19,8 \pm 0,2$  Kcal/mol, Figura 3.18-B, el cual es un valor cercano al valor obtenido para el enlace de hidrogeno Met525-H/N3'-pirimidina el cual se mantuvo a una distancia constante durante toda la simulación.



**Figura 3.18.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\alpha$ -HETHDP-AP B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

En tanto, para los primeros 30 ns de simulación, el enlace de hidrógeno entre el hidrógeno del backbone de la Gly116 y el oxígeno carbonílico O $\beta$  del benzaldehído presentó una distancia promedio de 4,0 Å y solo en algunas estructuras una orientación adecuada con distancia cercanas a los 2,5 Å. Por sobre los 30 ns de simulación la distancia de este enlace de hidrógeno aumentó, presentando un valor promedio de 4,5  $\pm$  0,1 Å para los 100 ns de simulación, Figura 3.19-A. Debido a esto, el valor promedio de la energía de interacción durante la simulación fue de -13,07  $\pm$  0,03 Kcal/mol, Figura 3.19-B, formando un enlace de hidrógeno de menor estabilidad al compararlo con el enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\alpha$ -HETHDP-AP. Por último, durante toda la simulación la Gly116 permaneció alejada del grupo amino del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-AP con una distancia promedio de 5,0 Å y en ninguna de las estructuras se observó una orientación adecuada para realizar un enlace de hidrógeno con el nitrógeno N4' del grupo amino.

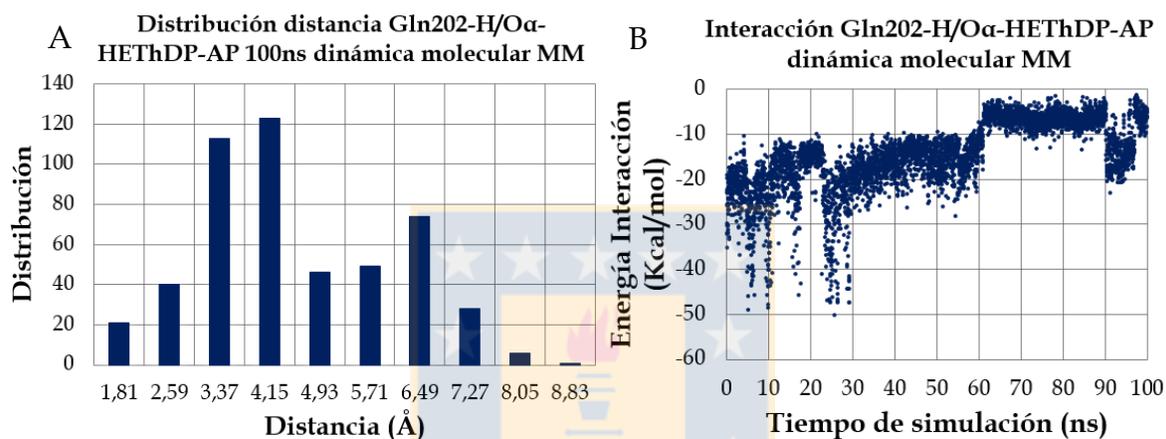


**Figura 3.19. A-Distribución distancia interacción Gly116-H/O $\beta$ -Benzaldehído B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.**

Fuente: Elaboración propia.

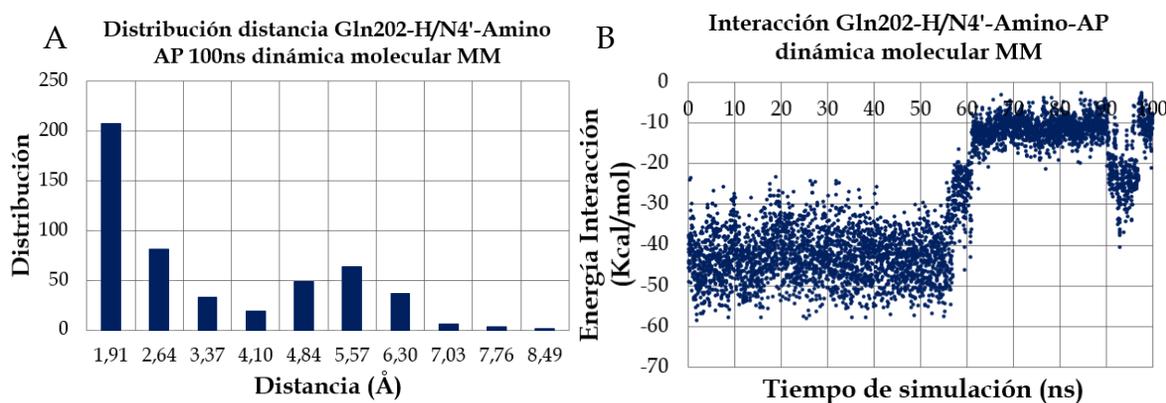
**Gln202:** Al inicio de la simulación la Gln202 se mantuvo interaccionando con el oxígeno O $\alpha$  desprotonado del complejo HETHDP-BA-AP, a través de un enlace de hidrógeno con uno de los hidrógenos del grupo amida de la cadena lateral de la Gln202, con una distancia de 2,55 Å. A medida que la simulación avanzó, la Gln202 cambió su orientación hacia el nitrógeno N4' del grupo amino del anillo de pirimidina, favoreciendo la interacción del enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-amino por sobre la formación del enlace de hidrogeno Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-AP. Muestra de esto son las distancias promedio calculadas para los 100 ns de simulación de  $4,9 \pm 0,1$  Å para la interacción Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-AP y de  $3,8 \pm 0,2$  Å para el enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-amino, Figuras 3.20-A y 3.21-A. En consecuencia, la mayor estabilidad de la interacción Gln202-H/N4'-amino también se ve reflejada en las energías de interacción promedio, en donde la interacción Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-AP presentó un valor de  $-14,43 \pm 0,03$  kcal/mol, Figura 3.20-B, mientras que el enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-amino-HETHDP-AP presentó un valor correspondiente a  $-30,64 \pm 0,03$  Kcal/mol, Figura 3.21-B. Sin embargo, por sobre los 60 ns ambas interacciones se perdieron alcanzando valores de distancias promedio de 6,39 Å y 5,58 Å, respectivamente. Por otro lado, el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  durante los 100 ns de simulación quedó condicionado por la formación del enlace de hidrógeno Gln202-

H/N4'-amino, ya que este provocó la inclinación del anillo de pirimidina hacia la zona de la Gln202, provocando que el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  adopte valores más negativos. Además, durante los 100 ns de simulación el oxígeno carbonílico del grupo amida de la Gln202 se mantuvo alejado de los hidrógenos del grupo amino del anillo de pirimidina, con una distancia promedio de 5,11 Å. Lo mismo ocurrió entre los hidrógenos del grupo amida de la Gln202 y en nitrógeno N3' del anillo de pirimidina con una distancia promedio de 4,6 Å.



**Figura 3.20.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-AP y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

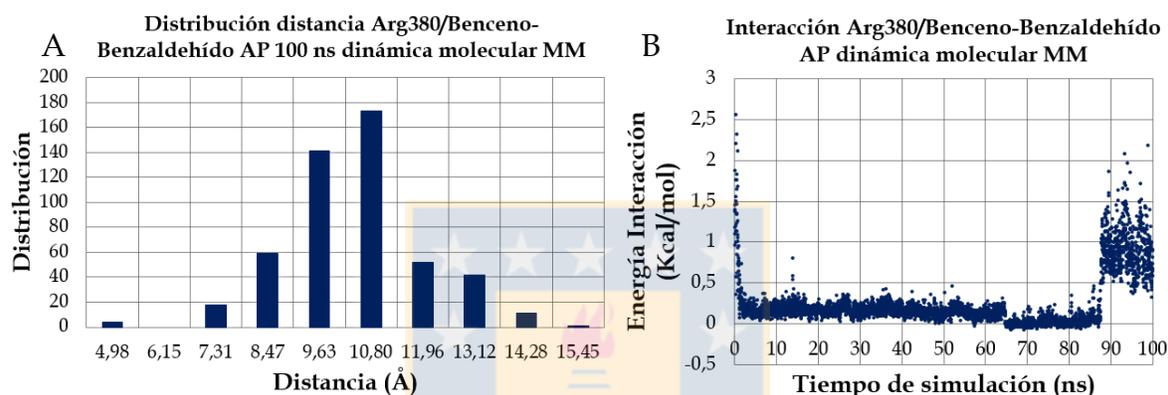
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.21.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-Amino AP y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

**Arg380:** Durante la simulación no se observó interacción entre el grupo guanidinio de la cadena lateral de la Arg380 y el anillo de benceno del benzaldehído. La distancia entre ambos grupos aumentó de los 4,30 Å hasta los 8,70 Å aproximadamente, en donde la distancia promedio para los 100 ns de simulación fue de  $11,0 \pm 0,2$  Å, Figura 3.22-A y la energía de interacción promedio de  $0,24 \pm 0,01$  Kcal/mol, Figura 3.22-B. Tal como indica la bibliografía la Arg380 no tendría un rol catalítico en la formación de R-PAC<sup>3</sup>, lo cual fue lo observado en el sitio activo 1 del sistema AP.

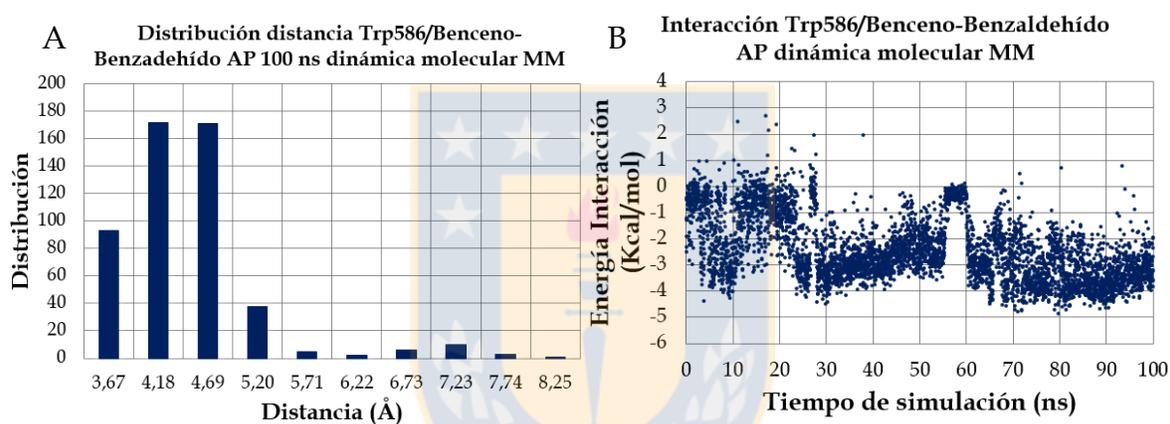


**Figura 3.22.** A-Distribución distancia interacción Arg380/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

**Trp586:** Durante la simulación el Trp586 mantuvo una interacción  $\pi$ -stacking con conformación tipo T entre la cadena lateral del Trp586, correspondiente a un anillo de indol y el anillo de benceno del sustrato benzaldehído, carboligado al intermediario HETHDP-AP. El hidrógeno unido al nitrógeno del anillo de indol del Trp586 se orientó al anillo de benceno del benzaldehído durante la simulación, con distancias que se mantuvieron entre 4,61 Å y 3,84 Å. En donde, la distancia promedio entre los centros geométricos de ambos anillos fue de  $4,73 \pm 0,11$  Å, Figura 3.23-A, mientras que la energía de interacción promedio fue de  $-2,40 \pm 0,03$  Kcal/mol, Figura 3.23-B. Resultados experimentales de mutaciones sitio dirigidas sobre el Trp586 muestran que este residuo es fundamental para la estabilización del sustrato 2-cetobutirato en la formación de

(2S)-2-acetohidrobutirato (AHB) en la enzima AHAS, debido a que se atribuye que el anillo de indol del Trp586 interacciona en mayor medida con el grupo etilo del 2-cetobutirato. Mientras que para la formación de AL y R-PAC su función sería irrelevante, debido a que no tendría interacción ni con el grupo metilo en el caso que el sustrato fuera piruvato, ni con el hidrógeno carbonílico del sustrato benzaldehído.<sup>4,7,8</sup> Sin embargo, a pesar de la baja energía de estabilización de la interacción  $\pi$ -stacking al compararla con las demás interacciones del sitio activo, el anillo de indol del Trp586 se mantuvo orientado durante toda la dinámica molecular hacia el anillo de benceno del benzaldehído, a distancias cercanas en la mayoría de los tramos de la simulación.

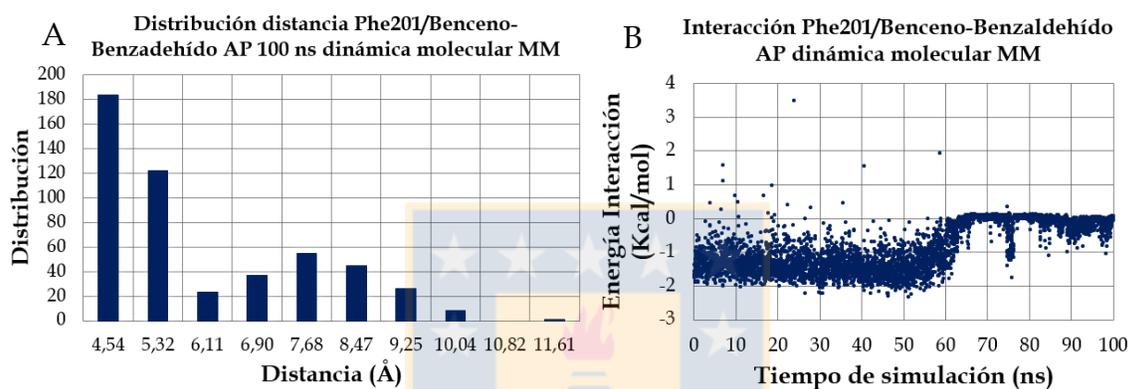


**Figura 3.23.** A-Distribución distancia interacción Trp586/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

**Phe201:** La Phe201, durante los primeros 60 ns se mantuvo constante con distancias cercanas a los 4,5 Å entre los centro geométricos del grupo fenilo de la Phe201 y del anillo de benceno del sustrato benzaldehído, formando una debil interacción  $\pi$ -stacking con conformación tipo T. Posteriormente entre los 60 ns y los 100 ns la distancia entre los anillos aromáticos aumentó oscilando entre los 6,0 Å y los 11 Å. En donde, la distancia promedio para esta interacción fue de  $6,4 \pm 0,2$  Å, Figura 3.24-A y la energía de interacción promedio de  $-0,84 \pm 0,03$  Kcal/mol, Figura 3.24-B. Estudios de mutaciones sitio dirigidas sobre la Phe201 muestran que su importancia radica en

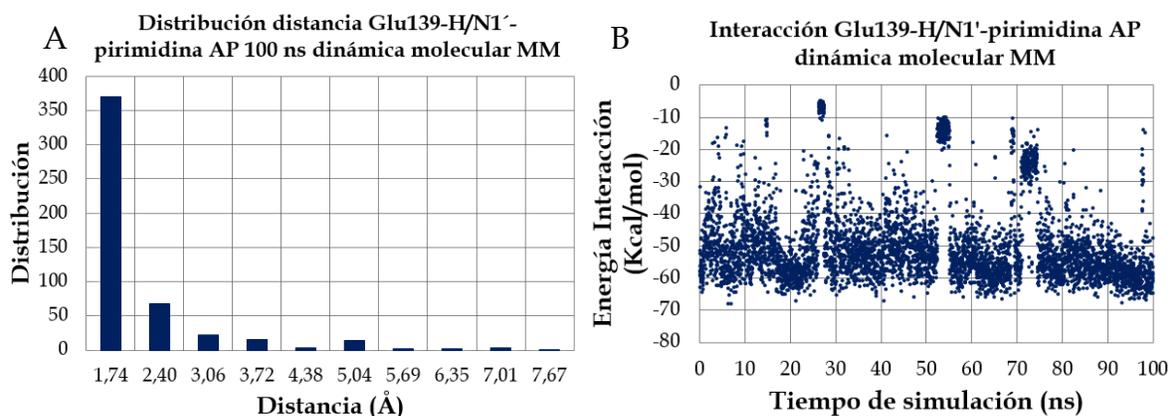
ayudar a la Arg380 a adoptar la conformación correcta al momento de estabilizar al grupo carboxilato de la molécula de piruvato en la formación de AL, pero que en la formación de R-PAC no juegan un rol catalítico importante debido que la Arg380 se encuentra alejada del sustrato benzaldehído.<sup>4</sup> Sin embargo, en la visualización de las estructuras de la dinámica de producción se pudo apreciar que si bien la Arg380 es la que se encuentra a mayor distancia del sustrato, la Phe201 no se alejó del anillo de benceno del benzaldehído sino hasta los 60 ns de simulación.



**Figura 3.24. A-Distribución distancia interacción Phe201/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.**

Fuente: Elaboración propia.

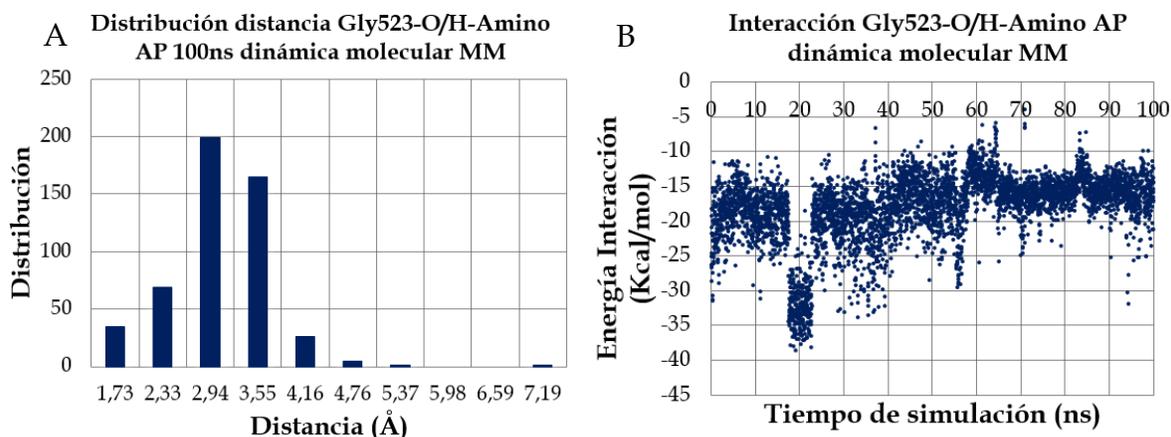
**Glu139:** Durante la simulación se observó que el Glu139 interacciona mediante un enlace de hidrógeno entre el hidrógeno del carboxilato del residuo y el nitrógeno N1' del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-AP, con una distancia promedio de  $2,45 \pm 0,11$  Å, Figura 3.25-A y una energía de interacción promedio es de  $-49,74 \pm 0,45$  Kcal/mol, Figura 3.25-B. La interacción se mantuvo constante y con buena orientación durante toda la simulación lo cual es consistente con lo reportado en literatura.<sup>5,6</sup>



**Figura 3.25.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Glu139-H/N1'-Pirimidina y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

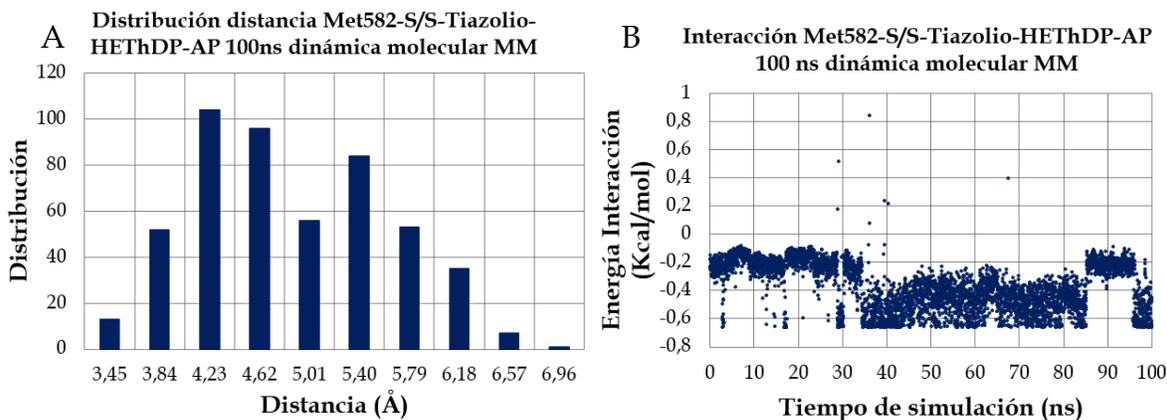
**Gly523:** Durante toda la simulación el oxígeno carbonílico del backbone de la Gly523 interacciona mediante un enlace de hidrógeno con el hidrógeno del grupo amino del anillo de pirimidina más alejado del anillo de tiazolio, dicha distancia se mantuvo prácticamente constante con valores que oscilaron entre los 2,48 Å hasta los 3,38 Å, con una distancia promedio de  $3,36 \pm 0,07$  Å, Figura 3.26-A y una energía de interacción promedio de  $-18,0 \pm 0,2$  Kcal/mol, Figura 3.26-B. Este resultado es consistente con lo reportado en la estructura cristalina 1N0H de la enzima AHAS.<sup>3</sup> Además la interacción por enlace de hidrógeno Gly523-O/H-Amino-HETHDP-AP, de forma similar a lo que ocurre con la interacción Met525-H/N3'-HETHDP-AP, favorece que el ángulo diedro  $\Phi_P$  adopte valores más positivos, debido a la torsión del ángulo diedro  $\Phi_P$  producto de la inclinación del anillo de pirimidina hacia la Gly523.



**Figura 3.26.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly523-O/H-Amino y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

**Met582:** Durante los primeros 30 ns de simulación el metilo terminal de la cadena lateral de la Met582 se mantuvo orientado hacia el grupo flavin del cofactor FAD. Sin embargo, luego de los 30 ns el grupo metilo se alejó del cofactor FAD, debido a que el átomo de azufre de la cadena lateral de la Met582 se orientó hacia el átomo de azufre del anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-AP, aunque con distancias no tan favorables, lo que se ve reflejado en la distancia promedio entre ambos átomos de azufre correspondiente a  $5,05 \pm 0,08$  Å, Figura 3.27-A y la prácticamente nula energía de interacción promedio de  $-0,37 \pm 0,04$  Kcal/mol, Figura 3.27-B. Estos resultados concuerdan con lo reportado en literatura en donde se postula que la Met582 no presenta especificidad sobre la segunda molécula de sustrato en el ciclo catalítico de la enzima AHAS, ya sea piruvato o 2-cetobutirato. Sino que más bien juega un rol estructural ya que participa en la estabilidad de la enzima y la afinidad con los cofactores debido a que se encuentra en una zona hidrofóbica ubicada entre los cofactores ThDP, FAD y el residuo Trp586.<sup>8</sup>



**Figura 3.27.** A-Distribución distancia interacción Met582-S/S-Tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 1 sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 3.2 se muestra un resumen de las distancias promedio obtenidas para las interacciones no enlazantes residuo sustrato de los sitios activos 1 y 2 del sistema AP durante la simulación, además de las energías de interacción promedio para el sitio activo 1, el cual es el sitio activo del sistema AP de mayor concordancia con respecto a las interacciones reportadas en literatura. En este sentido, la mayor energía de interacción en el sitio activo 1 la presentó el enlace de hidrógeno Glu139-H/N1'-HETHDP-AP, el cual es fundamental para la activación del cofactor y para su actividad catalítica al mantener la estabilidad del estado de protonación del grupo amino del anillo de pirimidina.<sup>5,6</sup> A continuación se encuentran las interacciones Gln202-H/N4'-Amino-HETHDP-AP y Gly116-H/O $\alpha$ -HETHDP-AP, las cuales están favorecidas energéticamente por sobre las interacciones reportadas en literatura correspondientes a los enlaces de Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-AP y Gly116-H/O $\beta$ -Benzaldehído,<sup>4,5</sup> debido al carácter nucleofílico del grupo 4'-amino cuando se encuentra bajo la forma de AP. Otras de las interacciones de mayor estabilidad durante la simulación para el sitio activo 1 del sistema AP corresponden a los enlaces de hidrógeno formados entre la Met525-H/N3'-HETHDP-AP y la Gly523-O/H-Amino-HETHDP-AP, las cuales son fundamentales debido a que son las interacciones encargadas de mantener la

conformación activa tipo V del cofactor.<sup>3,9</sup> Por último se encuentra la débil interacción entre el anillo de indol de la cadena lateral de Trp586 y el anillo de benceno del sustrato benzaldehído, interacción no reportada en literatura ya que al Trp586 solo se le atribuye participación cuando el segundo sustrato del ciclo catalítico es 2-cetobutirato.<sup>4,7</sup> En tanto las interacciones Arg380/Benzaldehído, Phe201/Benzaldehído y Met582-S/S-Tiazolio-HETHDP-AP son irrelevantes tanto en la estabilización del sustrato benzaldehído como en la del intermediario HETHDP-AP, lo cual está en concordancia con los resultados reportados en literatura.<sup>4,8</sup>

**Tabla 3.2: Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo 1 y 2 del sistema AP y energías de interacción promedio del sitio activo 1 para 100 ns de dinámica molecular MM.**

Interacción residuo-sustrato	Distancia (Å) sitio activo 2	Distancia (Å) sitio activo 1	Energía (Kcal/mol)* sitio activo 1
Met525-H/N3'-HETHDP-AP	6,56 ± 0,04	4,06 ± 0,07	-18
Met525-S/S-HETHDP-AP	4,41 ± 0,07	4,56 ± 0,04	-0,5
Gly116-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-AP	3,84 ± 0,03	3,74 ± 0,12	-20
Gly116-H/O <sub>β</sub> -Benzaldehído	6,52 ± 0,04	4,50 ± 0,11	-13
Gln202-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-AP	4,71 ± 0,04	4,94 ± 0,17	-14
Gln202-H/N4'-HETHDP-AP	2,61 ± 0,03	3,80 ± 0,20	-31
Arg380/Benzaldehído	5,60 ± 0,06	11,0 ± 0,20	-0,2
Trp586/Benzaldehído	5,00 ± 0,04	4,73 ± 0,11	-2,5
Phe201/Benzaldehído	5,45 ± 0,05	6,40 ± 0,20	-0,8
Glu139-H/N1'-HETHDP-AP	2,00 ± 0,02	2,45 ± 0,11	-50
Gly523-O/H-Amino-HETHDP-AP	5,86 ± 0,05	3,36 ± 0,07	-18
Met582-S/S-Tiazolio-HETHDP-AP	6,46 ± 0,05	5,05 ± 0,08	-0,4

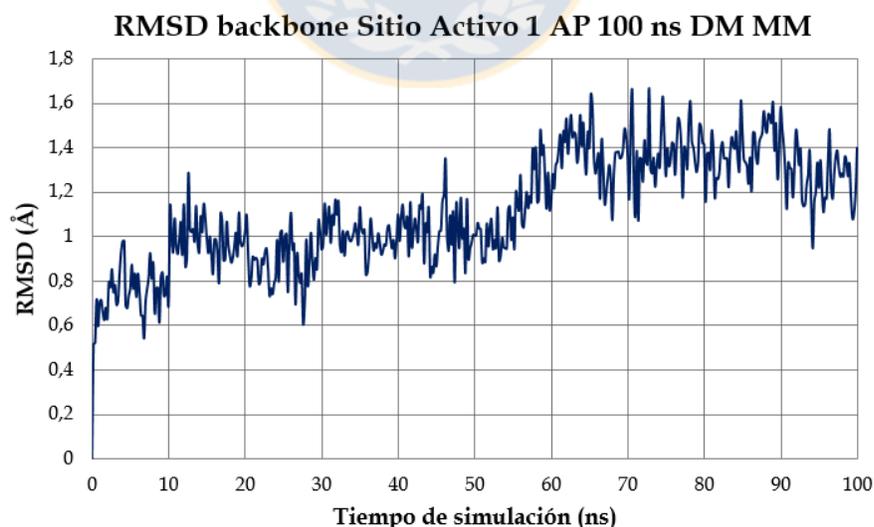
\*Las energías de interacción fueron calculadas en fase gas con una constante dieléctrica de 1 y considerando solo a los átomos involucrados en la interacción, por ejemplo el hidrógeno del carboxilato del Glu139 y el N1' del anillo de pirimidina.

Fuente: Elaboración propia.

Durante la dinámica de producción se observó que varias moléculas de agua de la caja de agua entran y salen del sitio activo 1 en forma reiterada. Durante los 100ns de

simulación moléculas de agua interaccionaron mediante enlaces de hidrógeno con el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-AP entrando y saliendo del sitio activo, siempre de una molécula de agua a la vez, ubicándose entre el oxígeno desprotonado  $O_{\alpha}$  del complejo y el grupo amida de la Gln202, favoreciendo la formación del enlace de hidrógeno Gln202-H/ $N4'$ -Amino-HETHDP-AP en el sitio activo 1 del sistema AP. Otra de las zonas en que se posicionaron las moléculas de agua fue entre el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del benzaldehído y el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-AP, interaccionando mediante enlaces de hidrógeno.

En relación a la estabilidad conformacional del sitio activo 1, el RMSD del backbone de los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201, Gln202, Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586, los cuales componen el sitio activo y rodean tanto al sustrato benzaldehído como al complejo HETHDP-BA-AP, presentó un valor promedio de  $1,12 \pm 0,03 \text{ \AA}$  y una zona de estabilidad conformacional que va desde los 30 ns hasta los 60 ns, al igual que los RMSD de la enzima completa correspondiente a las Figuras 15 y 17. Estructuras posteriores a este tiempo de simulación presentan valores de RMSD por sobre los  $1,2 \text{ \AA}$ , con variaciones que van hasta los  $1,6 \text{ \AA}$ , Figura 3.28.

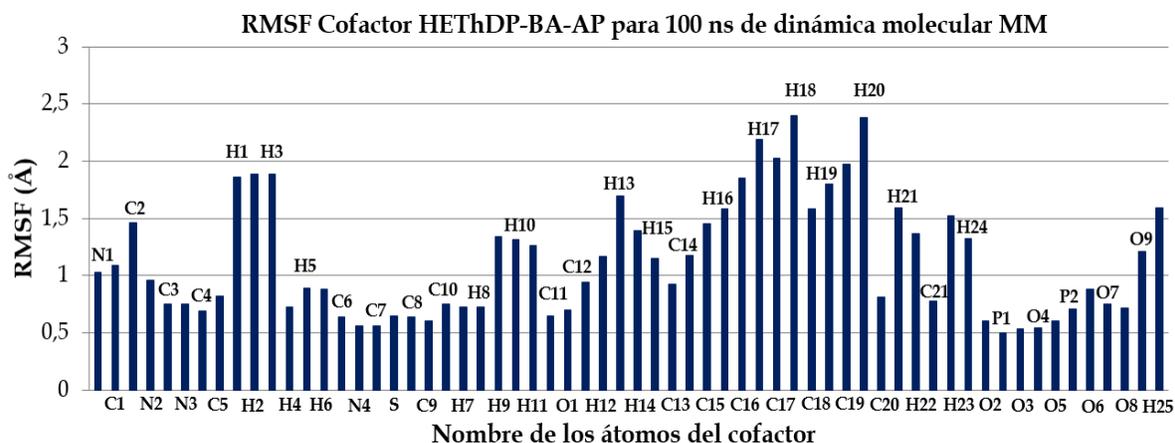


**Figura 3.28.** RMSD del backbone de los aminoácidos del sitio activo 1 del sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

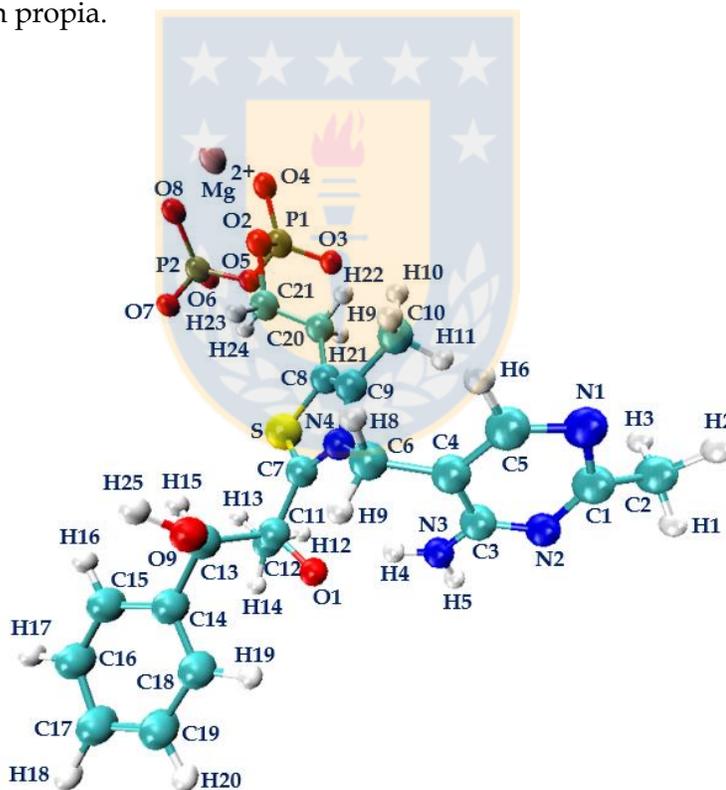
En cuanto al complejo HETHDP-BA-AP del sitio activo 1, el RMSF de los átomos que lo componen, Figura 3.29, muestra que los átomos que experimentaron mayor desplazamiento durante la dinámica de producción y que tiene valores mayores a 1,0 Å corresponden principalmente a los hidrógenos de los grupos metilo, debido a la rotación del enlace carbono-carbono simple. Entre ellos se encuentran el grupo metilo del anillo de pirimidina correspondiente al carbono C2 y sus hidrógenos H1, H2 y H3, los hidrógenos H9, H10 y H11 del grupo metilo enlazado al anillo de tiazolio, los hidrógenos desde el H21 al H24 enlazados a los carbonos C20 y C21 ubicados entre el grupo difosfato y el anillo de tiazolio y el grupo metilo que se encuentra enlazado al carbono C2 $\alpha$ , correspondiente al carbono C12 y sus hidrógenos, Figura 44. Otro de los grupos que presentó gran movilidad es el anillo de benceno del benzaldehído, el cual posee un eje de rotación en el enlace con el carbono carbonílico del benzaldehído, carbono C13. También se suma el hidrógeno H25 enlazado al oxígeno O9 (O $\beta$ ), el cual mostró gran movilidad debido a la interacción con las moléculas de agua circundantes que entran al sitio activo.

Es necesario destacar que los nombres de los átomos en la Figura 3.30 corresponden a nombres designados arbitrariamente al momento de construir el sistema AP para la simulación de la dinámica molecular mecánico clásica y que no son los nombres utilizados comúnmente en literatura para el intermediario HETHDP, los cuales están basados en las reglas de nomenclatura de química orgánica. Ejemplo de ello es el nitrógeno N3 correspondiente al grupo amino del anillo de pirimidina que en realidad corresponde al nitrógeno N4'.



**Figura 3.29.** RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-AP del sitio activo 1 del sistema AP para 100ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.

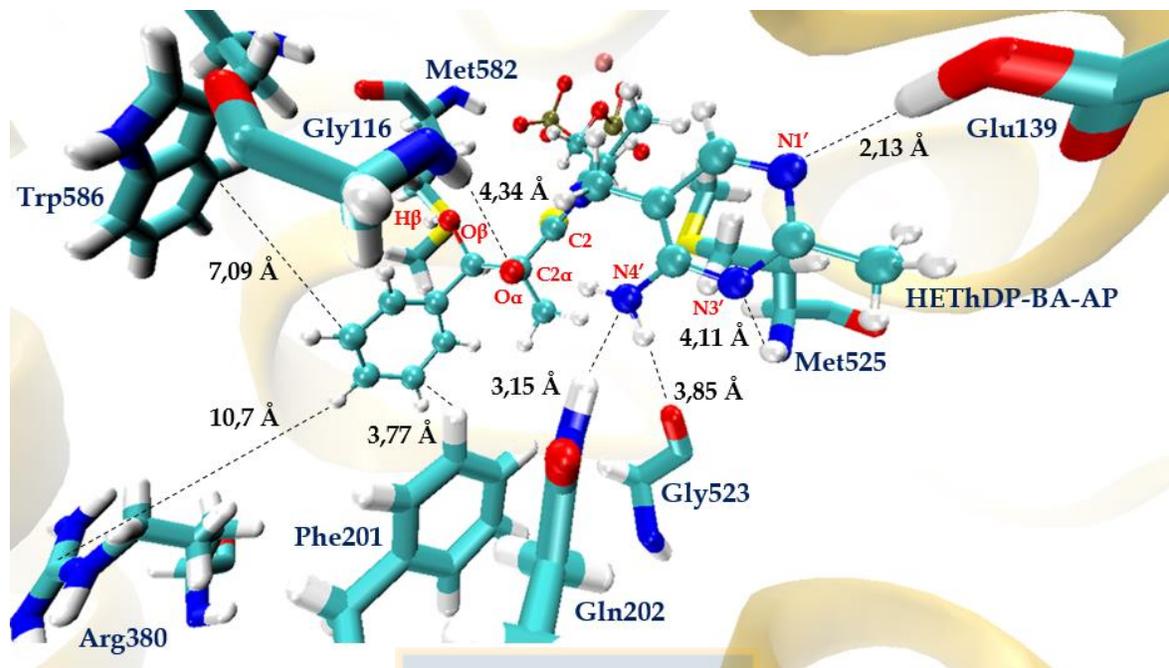
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.30.** Nombre de los átomos del complejo HETHDP-BA-AP del sitio activo 1 del sistema AP para 100 ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.

Fuente: Elaboración propia.

En base a los resultados obtenidos para el sistema AP se ha seleccionado como estructura de partida para los cálculos de dinámica molecular QM/MM a la estructura del sitio activo 1 correspondiente a los 59 ns de simulación, Figura 3.31. El criterio de selección se basó en escoger al sitio activo que presentó la mayor cantidad de las interacciones residuo sustrato reportadas en literatura. Posteriormente se escogió una estructura ubicada entre la zona de estabilidad conformacional que indica tanto el RMSD del backbone de la totalidad de la enzima modelada, Figuras 3.1 y 3.3, como el RMSD del sitio activo 1 del sistema AP, Figura 3.28, cuya zona de estabilidad se encuentra entre los 30 ns y los 60 ns de simulación. Además, como la estructura seleccionada debe ser representativa del sitio activo seleccionado, se escogió a una estructura en concordancia con las interacciones no enlazantes presentadas en las estructuras promedio para los 100 ns de simulación, Figura 3.13 y para la zona de estabilidad conformacional ubicada entre los 30 y los 60 ns, Figura 3.14. En la selección de una de las estructuras de la zona de estabilidad conformacional se priorizó a las que mostraron las interacciones no enlazantes reportadas en literatura que otorgan y mantienen la conformación activa tipo V del intermediario HETHDP. En la estructura representativa seleccionada los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  son  $-68,7^\circ$  y  $103,2^\circ$  y los valores experimentales de la conformación activa tipo V para las etapas de activación del cofactor ThDP son  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ , respectivamente.

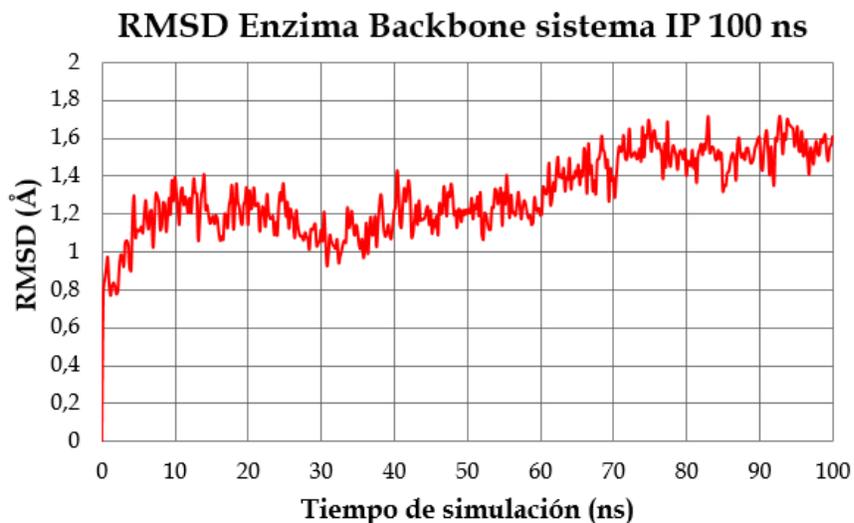


**Figura 3.31.** Estructura del sitio activo 1 del sistema AP correspondiente a los 59 ns de dinámica molecular mecánico clásica.

Fuente: Elaboración propia.

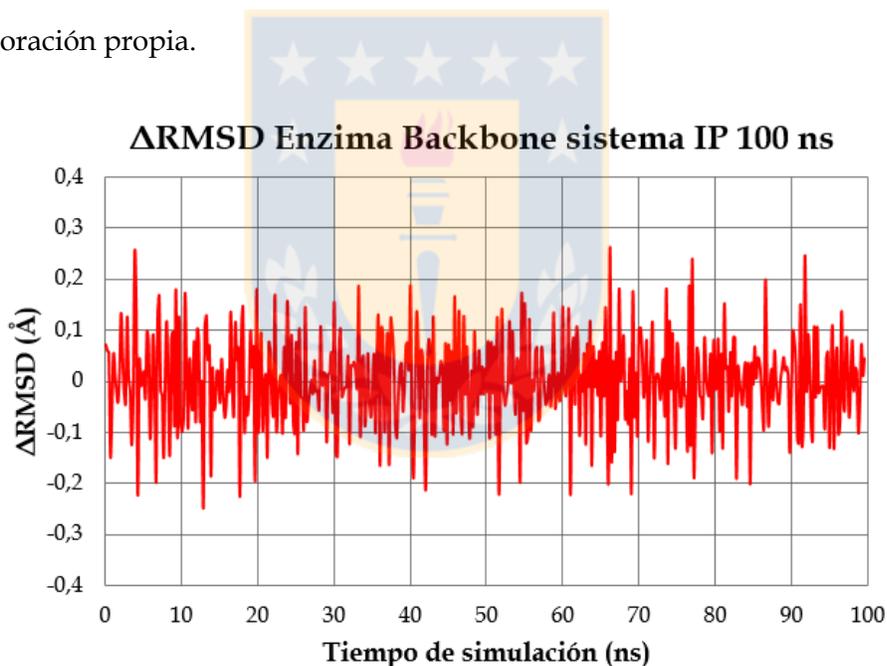
### 3.1.2 Dinámica molecular MM sistema IP

El análisis del RMSD de la dinámica de producción de sistema IP, correspondiente a los backbone de los residuos de la enzima AHAS para los 100 ns de simulación, presentó una zona de estabilidad conformacional ubicada entre los 40 ns y los 60 ns de simulación y un valor promedio de  $1,31 \pm 0,02 \text{ \AA}$ , Figura 3.32. Al igual que en el sistema AP, los valores de RMSD fueron calculados cada 0,2 ns, además si se comparan en ambos sistemas la topología de los gráficos de RMSD versus tiempo de simulación son parecidas, con zonas de estabilidad conformacional ubicadas en tiempos de simulación similares. En tanto los valores del  $\Delta\text{RMSD}$  para los backbones de los residuos del sistema IP, Figura 3.33, indican que en promedio la traslación del sistema no superó los  $0,4 \text{ \AA}$  entre cada estructura de la simulación.



**Figura 3.32.** RMSD backbone de los residuos sistema IP dinámica molecular MM.

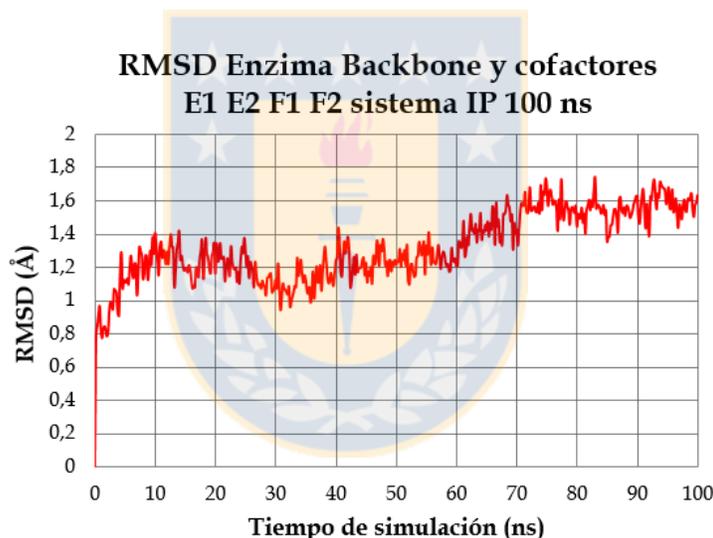
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.33.**  $\Delta$ RMSD backbone de los residuos sistema IP dinámica molecular MM.

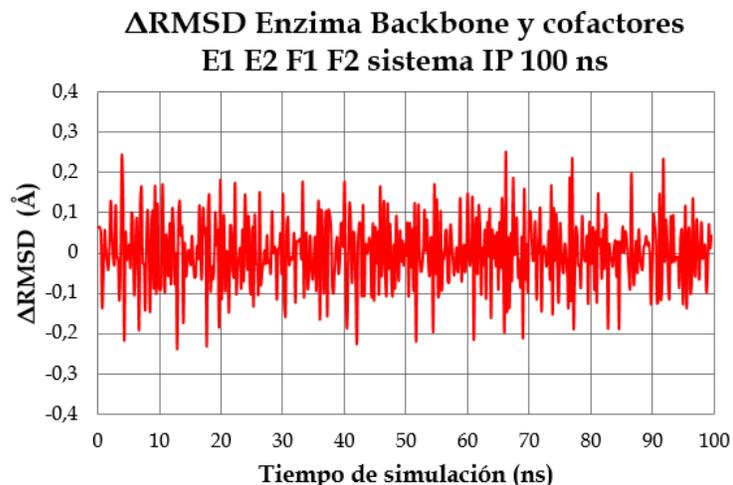
Fuente: Elaboración propia.

Similares resultados se presentan en el gráfico del RMSD, Figura 3.34 y su respectivo  $\Delta$ RMSD, Figura 3.35, en el cuales se incluye, además de los átomos del backbone de la enzima, a los complejos HETHDP-BA-IP (E1 y E2) y cofactores FAD (F1 y F2) pertenecientes a los sitios activos 1 y 2 del sistema IP. La inclusión de los complejos y cofactores aumentó levemente el valor promedio del RMSD a  $1,32 \pm 0,02 \text{ \AA}$ , en comparación al gráfico del RMSD de la Figura 3.32, lo cual da cuenta del movimiento restringido de los cofactores situados en los sitios activos al interior de la enzima. Por otra parte, sus topologías son similares, presentando en ambos gráficos de RMSD una zona de estabilidad conformacional que va desde los 40 ns a los 60 ns. Esta similitud entre los RMSD, tras la inclusión de los cofactores, da cuenta de la conservación de los sitios activos y de la estabilidad del sistema durante la dinámica molecular.



**Figura 3.34.** RMSD backbones, HETHDP-BA-IP y FAD sistema IP 100 ns DM MM.

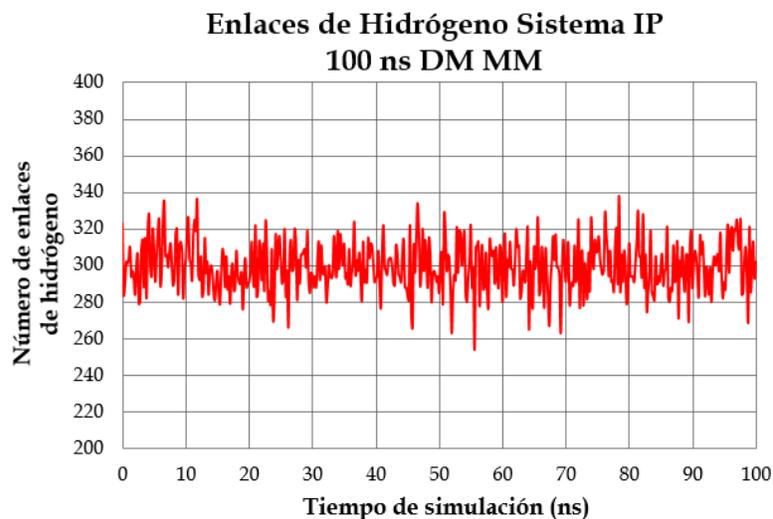
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.35.**  $\Delta$ RMSD backbones, HETHDP-BA-IP y FAD sistema IP 100 ns DM MM.

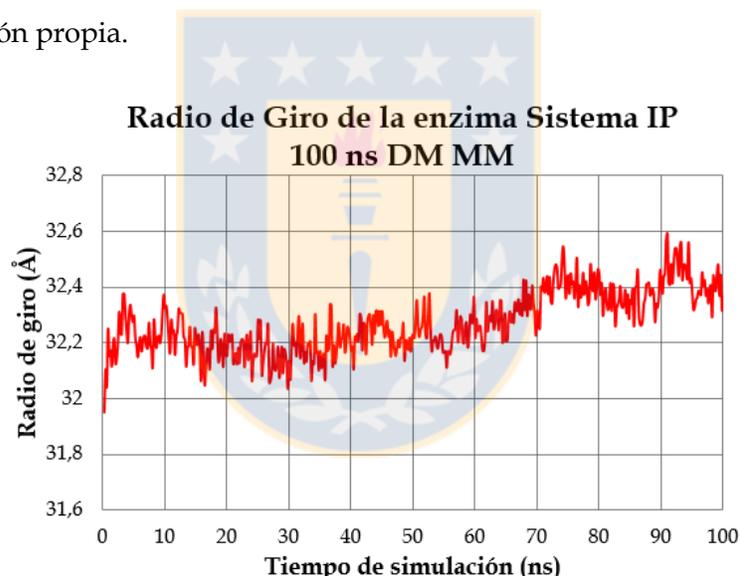
Fuente: Elaboración propia.

Al igual que en el sistema AP, el número de enlaces de hidrógeno entre los residuos que componen a la enzima en el sistema IP se mantuvo constante durante los 100 ns de simulación con un valor promedio de 299 enlaces de hidrógeno, Figura 3.36, dando cuenta de la estabilidad conformacional de las estructuras secundaria y terciaria de la enzima. Además, en la Figura 3.37, se presenta el análisis de la estructura terciaria de la enzima mediante el gráfico que representa la variación del radio de giro de la enzima en el sistema IP durante la simulación en base a su centro geométrico. Al igual que en el conteo de los enlaces de hidrógeno su valor durante la simulación se mantuvo constante con un promedio de  $32,27 \pm 0,01 \text{ \AA}$ , valor idéntico al del sistema AP, ratificando la estabilidad tanto de la estructura terciaria de la enzima como la estabilidad de la simulación que se ha realizado del sistema IP.



**Figura 3.36.** Enlaces de hidrógeno entre residuos sistema IP 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

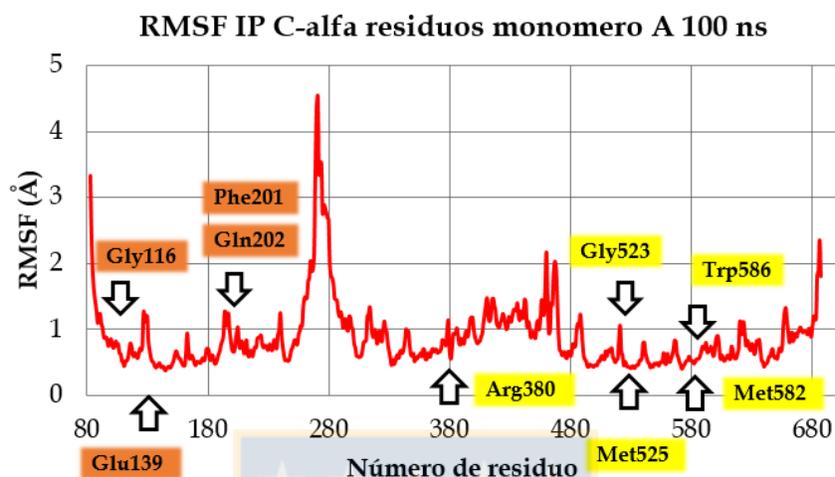


**Figura 3.37.** Radio de giro de la enzima AHAS sistema IP 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

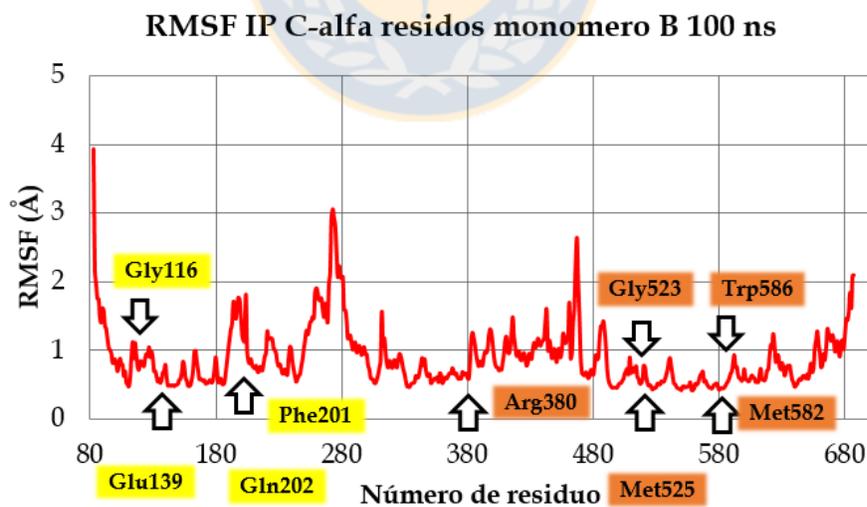
En cuanto a la movilidad de los residuos durante la simulación, en las Figuras 3.38 y 3.39 se presentan los valores de RMSF del carbono alfa de los residuos que componen a los dos monómeros de la enzima en el sistema IP. En ambos gráficos los residuos que rodean a los complejos HETHDP-BA-IP y que componen los sitios activos 1 y 2, en amarillo y naranja respectivamente, muestran valores de RMSF menores a 1 Å,

indicando la baja movilidad de los residuos de los sitios activos en comparación a los aminoácidos rodeados de moléculas de solventes ubicados en la periferia de la enzima y en zonas de loops como los residuos entre la Thr267 y la Gln281.



**Figura 3.38.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema IP 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.39.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema IP 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 3.3 se comparan los valores de RMSF de los carbonos alfa de los sitios activos 1 y 2 de la enzima AHAS para el sistema IP. En donde el sitio activo 1 está compuesto por los residuos Gly116, Glu139, Phe201 y Gln202 del monómero B, en color amarillo en la Figura 3.39 y los residuos Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586 del monómero A en color amarillo en la Figura 3.38. Mientras que el sitio activo 2, está conformado por los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201 y Gln202 del monómero A, aminoácidos en color naranja, Figura 3.38 y los aminoácidos Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586 del monómero B, aminoácidos en color naranja, Figura 3.39. En la tabla III se observa que los valores de RMSF del sitio activo 1 son mayores que los valores de RMSF del sitio activo 2, indicando que la movilidad de los aminoácidos del sitio activo 2 fue menor durante la simulación, debido a las interacciones no enlazantes que se han mantenido a lo largo de la dinámica de producción.

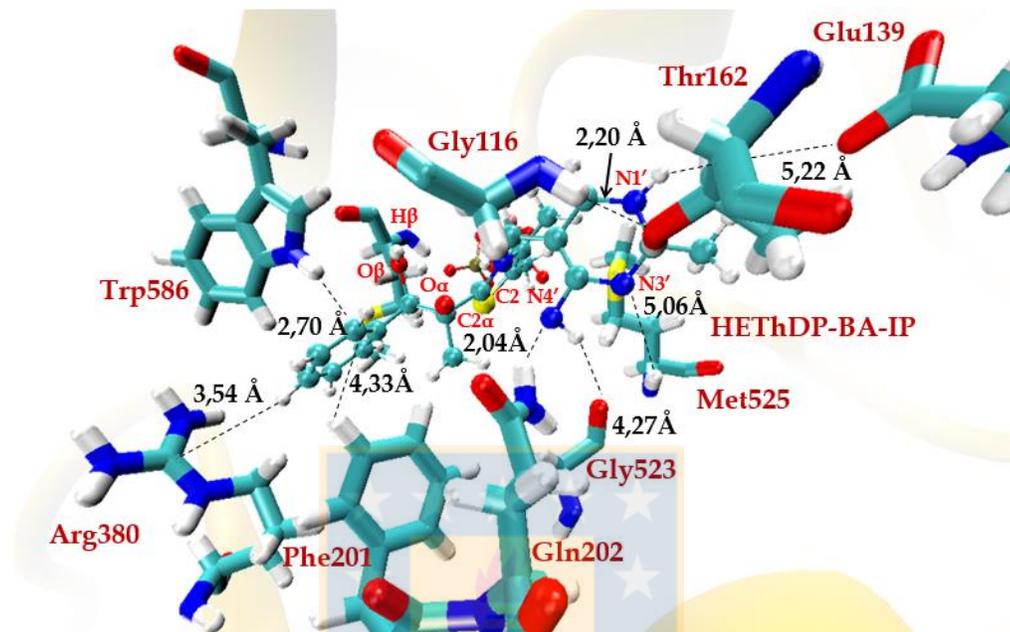
**Tabla 3.3: Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitios activos 1 y 2 del sistema IP en la enzima AHAS 100 ns de dinámica molecular MM.**

Ubicación	Residuo Sitio Activo1	RMSF (Å)	Ubicación	Residuo Sitio Activo2	RMSF (Å)
Monómero B	Gly116	1,11	Monómero A	Gly116	0,80
	Glu139	0,69		Glu139	0,47
	Phe201	1,22		Phe201	0,67
	Gln202	1,14		Gln202	0,68
Monómero A	Arg380	0,66	Monómero B	Arg380	0,60
	Gly523	0,62		Gly523	0,52
	Met525	0,52		Met525	0,49
	Met582	0,49		Met582	0,44
	Trp586	0,57		Trp586	0,52

Fuente: Elaboración propia.

Al analizar visualmente las trayectorias de ambos sitios activos, se ha visto que en el sitio activo 1 interacciones residuos sustratos fundamentales para la actividad del intermediario HETHDP y para la estabilización del sustrato benzaldehído se han perdido desde el inicio de la simulación. Tal es el caso de la interacción Glu139-O/H-N1'-pirimidina, la cual se encuentra a distancias que van desde los 4,09 Å a los 8,32 Å,

con un valor de distancia promedio por sobre los 4,5 Å, tal como se aprecia en la Figura 3.40, correspondiente a la estructura promedio del sitio activo 1 del sistema IP para los 100 ns de simulación.

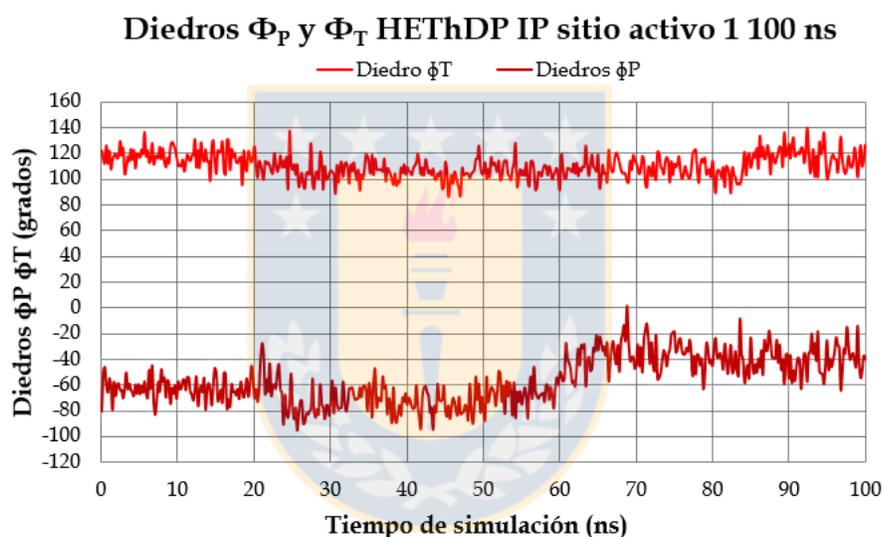


**Figura 3.40.** Estructura promedio sitio activo 1 del sistema IP para 100ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Otra de las interacciones afectadas es el enlace de hidrógeno entre la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina, con distancias que oscilan entre los 4,18 Å a los 6,42 Å. A esta se le suma la pérdida total del enlace de hidrógeno entre la Gly116 y los oxígenos O<sub>α</sub>, enlazado al átomo de carbono C2<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA-IP y O<sub>β</sub>, oxígeno carbonílico del sustrato benzaldehído. En su reemplazo la Gly116 se encuentra interaccionando mediante un enlace de hidrógeno con el oxígeno hidroxílico de la cadena lateral de la Thr162. En tanto, la interacción entre la Gln202 y el oxígeno O<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA-IP se ve reemplazada por la interacción mediante enlace de hidrógeno entre uno de los hidrógenos del grupo amida de la cadena lateral de la Gln202 y el nitrógeno N4' del grupo imino enlazado al anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-IP. Por último, la única interacción que se mantuvo de todas las

interacciones reportadas en literatura fue el enlace de hidrógeno Gly523-O/H-Amino-HEThDP-IP con distancias que oscilan entre los 2,05 Å y los 4,05 Å. A pesar de esto, la pérdida de la interacción Met525-H/N3'-HEThDP-IP ha provocado que el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_P$  sea de  $-56 \pm 2^\circ$ , Figura 3.41. Por otra parte, a pesar de que el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_T$  durante la simulación fue  $111 \pm 1^\circ$ , el cual está en concordancia con el valor experimental  $\pm 95^\circ$ , el sitio activo 1 del sistema IP no posee las interacciones residuo sustrato reportadas experimentalmente, por lo que este sitio activo no presenta estructuras que sean representativas del sistema IP y no pueden utilizarse como estructuras iniciales para los cálculos de dinámica molecular QM/MM.

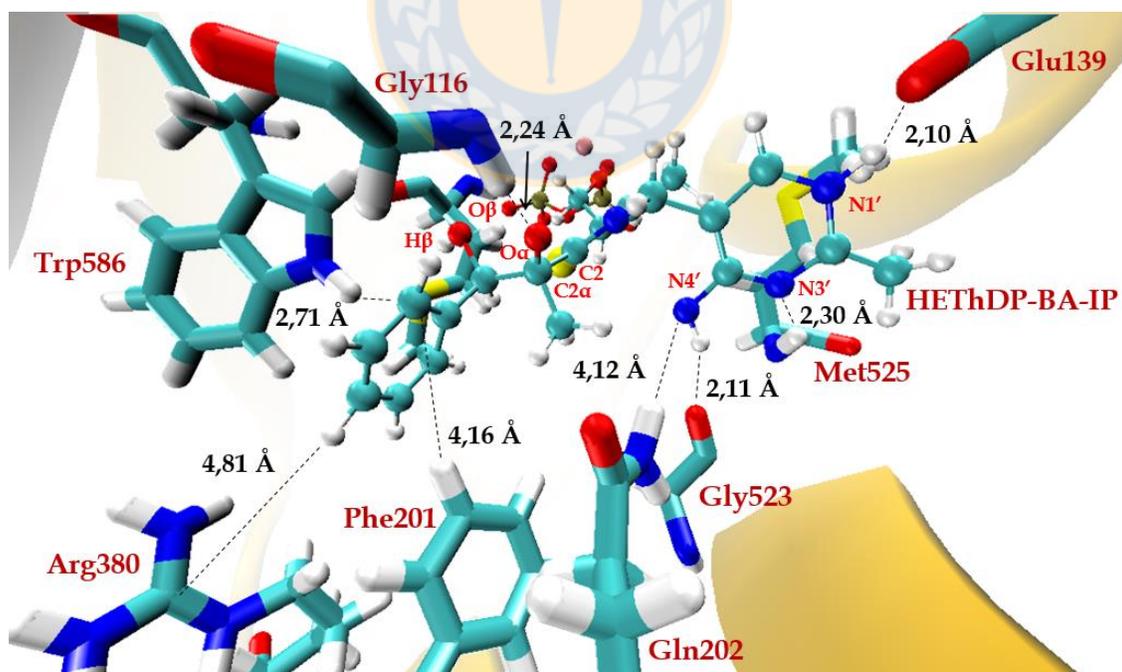


**Figura 3.41.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HEThDP-BA-IP para el sitio activo 1 del sistema IP para los 100 ns de DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

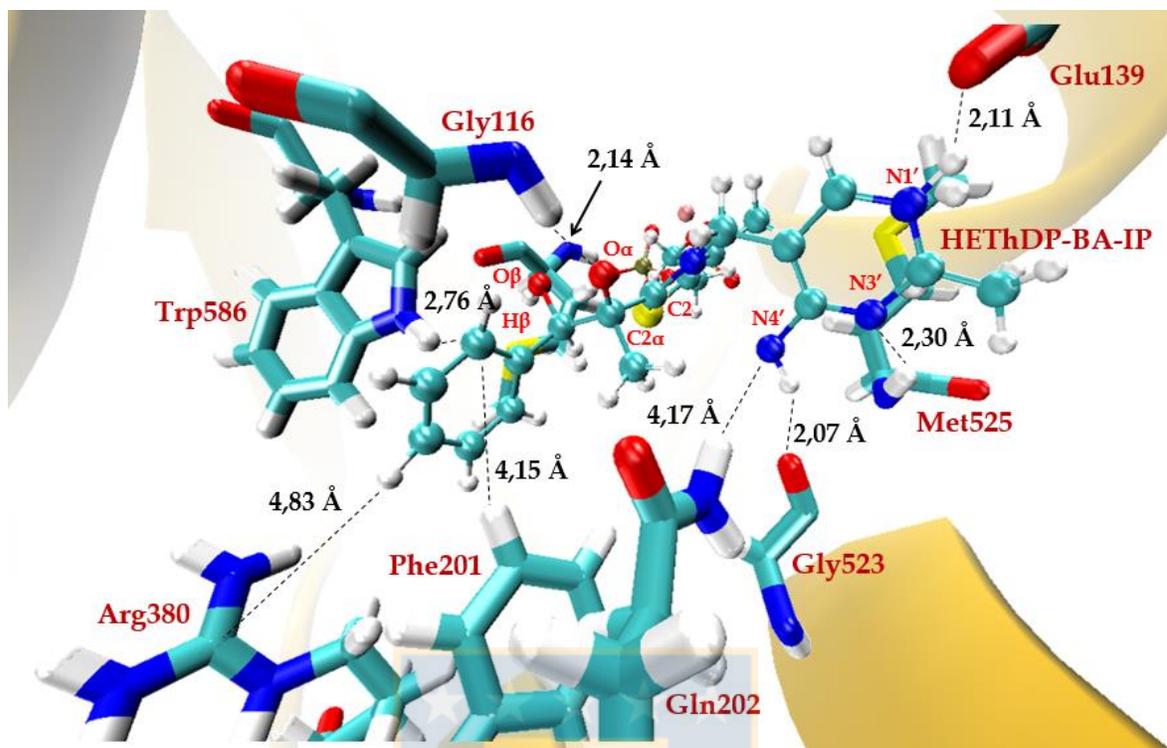
En cambio, al visualizar el sitio activo 2 del sistema IP se observó que todas las interacciones entre los residuos del sitio activo y el anillo de pirimidina del complejo HEThDP-BA-IP se mantuvieron a lo largo de la simulación. Tal es el caso de la interacción mediante enlace de hidrógeno entre los oxígenos del grupo carboxilato del Glu139 con el hidrógeno enlazado al nitrógeno N1' del anillo de pirimidina<sup>5, 6</sup>, interacción que presenta una distancia promedio de  $2,46 \pm 0,03$  Å, como se muestra en

la Figura 3.42 correspondiente a la estructura promedio del sitio activo 2 para los 100 ns de simulación y la Figura 3.43 correspondiente a la estructura promedio del sitio activo 2 para la zona de estabilidad conformacional comprendida entre los 40 ns y los 60 ns presentada en los RMSD de las Figuras 3.32 y 3.34. Otra de las interacciones es el enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del backbone de la Gly523 y el hidrógeno del grupo amino<sup>3</sup>, con una distancia promedio de  $2,11 \pm 0,02$  Å. En tanto, la Met525 a pesar de que su cadena lateral no presentó una correcta orientación hacia el anillo de tiazolio, se observó que la interacción por enlace de hidrógeno entre la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina se mantuvo durante toda la simulación<sup>3, 9</sup>, con una distancia promedio de  $2,30 \pm 0,02$  Å. Sin embargo, a pesar de que las interacciones por enlace de hidrógeno entre los residuos Glu139, Gly523 y Met525 con el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-IP se han mantenido durante la simulación acorde a lo reportado en literatura, el valor de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  se alejan de los valores experimentales de  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ , presentando valores promedio de  $-46,2 \pm 1,2^\circ$  y  $120 \pm 1^\circ$ , respectivamente, Figura 3.44.



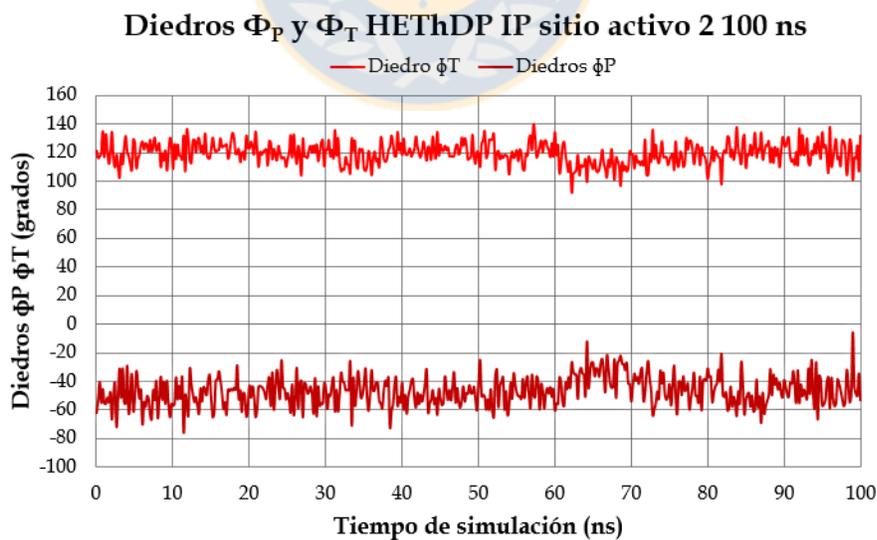
**Figura 3.42.** Estructura promedio sitio activo 2 del sistema IP para 100ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.43.** Estructura promedio sitio activo 2 del sistema IP para el intervalo entre los 40 ns y los 60 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.



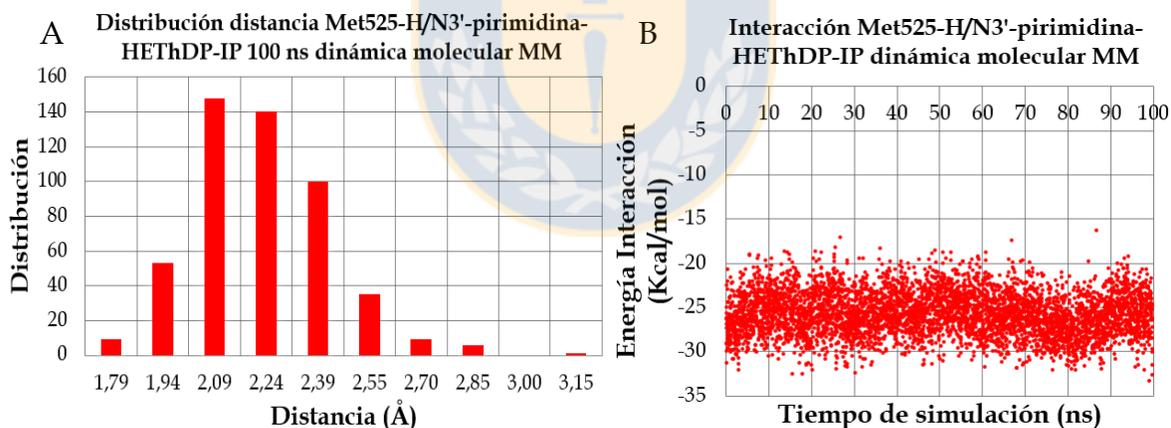
**Figura 3.44.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HETHDP-BA-IP para el sitio activo 2 del sistema IP para los 100 ns de DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

En tanto, al igual que en el sistema AP y producto del carácter nucleofílico del nitrógeno N4' del grupo imino del complejo HETHDP-BA-IP, la interacción por enlace de hidrógeno reportada en literatura entre la Gln202 y el oxígeno O $\alpha$  del complejo HETHDP-BA-IP<sup>4, 5</sup> fue reemplazada por la interacción mediante enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el nitrógeno N4' del grupo imino enlazado al anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-IP, aunque la distancia entre ambos átomos es superior a 3,0 Å y dicho sea de paso, mayor a las distancias observadas en la interacción Gln202-H/N4'-HETHDP-AP del sitio activo 2 del sistema AP. A pesar de esto y como consecuencia de la interacción Gln202-H/N4'-HETHDP-IP, durante la simulación de dinámica molecular, la Gly116 es la que interaccionó mediante un enlace de hidrógeno con el oxígeno O $\alpha$  del complejo HETHDP-BA-IP, presentando una distancia promedio de  $2,65 \pm 0,06$  Å. Es posible que el resultado de estas interacciones puedan dar cuenta de que el estado de protonación del intermediario HETDP, al momento de la carboligación del sustrato benzaldehído en el tercer paso del ciclo catalítico de la enzima AHAS, no correspondería a la forma tautomérica 1',4'-iminopirimidina (IP), debido a que el carácter nucleofílico del grupo 4'-imino interfiere en la interacción Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-IP, provocando la pérdida tanto de la interacción reportada para la Gln202, como de la interacción reportada para la Gly116<sup>4</sup>. Una mayor descripción del sitio activo 2 del sistema IP, se presenta a continuación mediante un análisis detallado de cada una de las interacciones de los residuos durante los 100 ns de simulación.

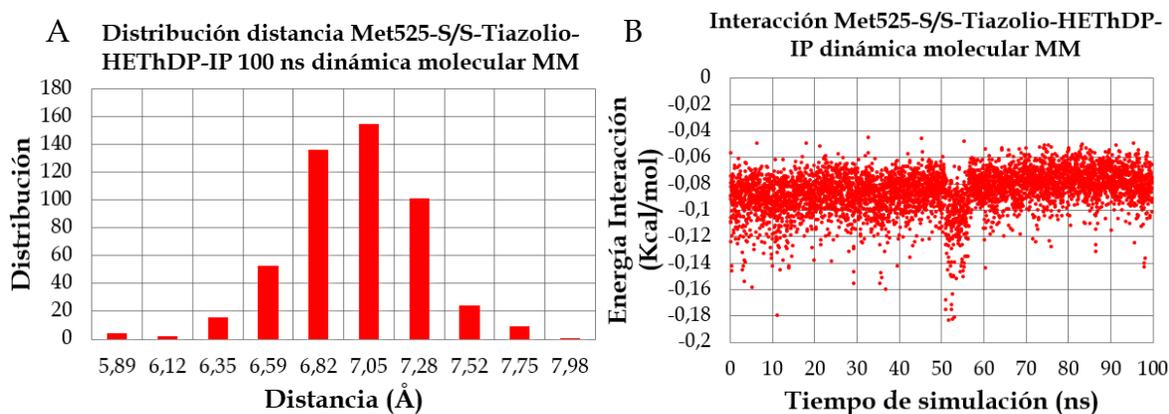
**Met525:** Durante toda la simulación la Met525 mantuvo una interacción mediante enlace de hidrógeno con el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina, con distancias que oscilaron entre los 1,7 y los 3,15 Å y una distancia promedio de  $2,30 \pm 0,02$  Å, Figura 3.45-A, en donde la energía de interacción promedio para el enlace de hidrógeno fue de  $-25,71 \pm 0,03$  Kcal/mol, Figura 3.45-B. A pesar de esto, los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  distan de los valores experimentales de  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$  presentando valores promedio de  $-46,2 \pm 1,2^\circ$  y  $120 \pm 1^\circ$ , respectivamente. En este sentido, durante la simulación de dinámica molecular la cadena lateral de la Met525 no se orientó hacia

el anillo de tiazolio del complejo HETHDP-BA-IP, en su lugar en vez de ubicarse en forma horizontal por detrás del complejo HETHDP-BA-IP, lo hizo de forma vertical interaccionando con el anillo de imidazol de la cadena lateral de la His138 y por el otro extremo con la cadena lateral de la Met555, lo cual pudo haber sido la causa de que el ángulo diedro  $\Phi_T$  se alejara del valor experimental reportado en literatura. Prueba de ello es la distancia promedio de  $7,10 \pm 0,11 \text{ \AA}$ , Figura 3.46-A y la energía de interacción promedio de  $-0,09 \pm 0,03 \text{ Kcal/mol}$ , Figura 3.46-B, entre el átomo de azufre del anillo de tiazolio del complejo HETHDP-BA-IP y el átomo de azufre de la cadena lateral de la Met525. En cuanto al ángulo diedro  $\Phi_P$  la presencia de la interacción por enlace de hidrógeno entre la Met525 y el nitrógeno N3' del complejo HETHDP-BA-IP favorece que los valores del ángulo diedro  $\Phi_P$  durante la simulación hayan sido mayores al valor experimental de  $-70^\circ$ , es decir valores más positivos, sobre todo si la interacción por enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el nitrógeno N4' es debil y posee distancias por sobre los  $3,0 \text{ \AA}$  o que simplemente esta interacción no se encuentre presente.



**Figura 3.45. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Met525-H/N3'-pirimidina y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.**

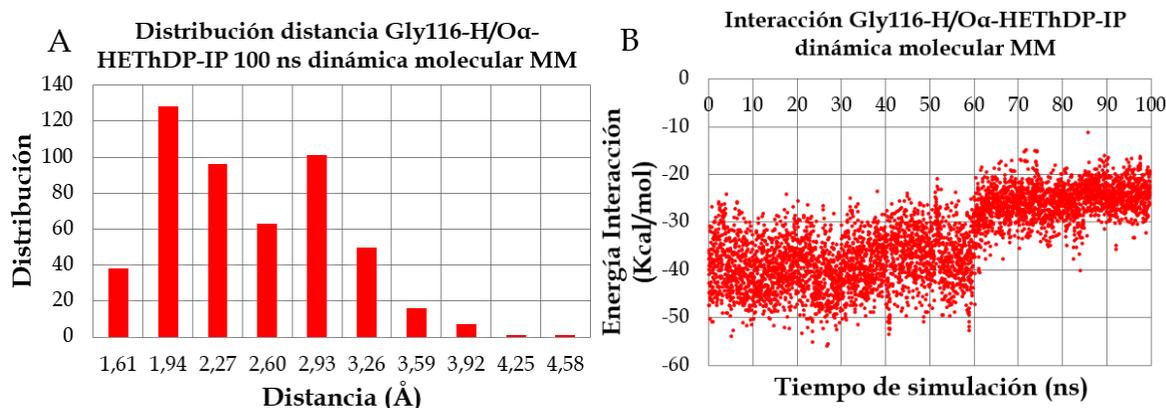
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.46.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Met525-S/S-tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

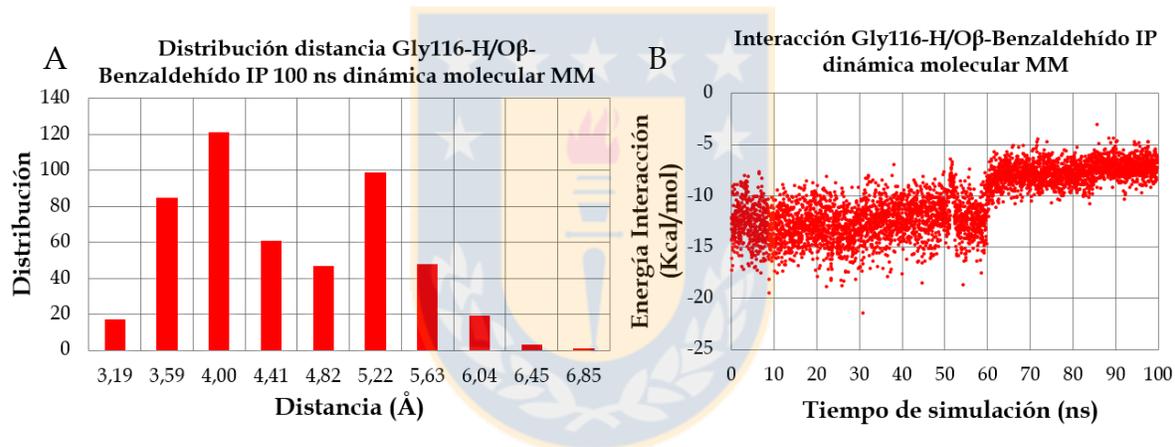
Fuente: Elaboración propia.

**Gly116:** Desde el inicio de la dinámica de producción la Gly116 se mantuvo interactuando mediante un enlace de hidrógeno entre el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone del aminoácido y el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-IP, presentando distancias entre los 1,60 Å a los 4,60 Å, alcanzando una distancia promedio de  $2,65 \pm 0,06$  Å, Figura 3.47-A y una energía de interacción promedio de  $-33,5 \pm 0,3$  Kcal/mol, Figura 3.47-B. Al igual que en el sistema AP, la Gly116 interacciona con el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-IP y no con el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído como se postula en literatura<sup>4</sup> para la formación del producto fisiológico AL. Así, el valor de la distancia promedio entre el hidrógeno del backbone de la Gly116 y el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del benzaldehído fue de  $4,73 \pm 0,09$  Å, Figura 3.48-A, mientras que la energía de interacción promedio fue de  $-10,6 \pm 0,1$  Kcal/mol, Figura 3.48-B.



**Figura 3.47.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\alpha$ -HETHDP-IP y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

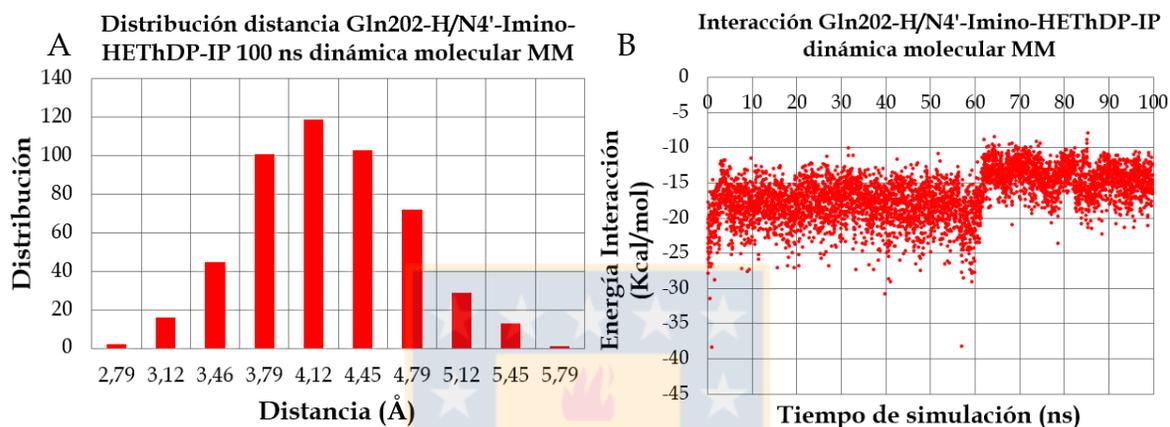


**Figura 3.48.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\beta$ -Benzaldehyde IP y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

**Gln202:** Durante toda la simulación la cadena lateral de la Gln202 se orientó hacia el nitrógeno N4' del grupo imino, formando un enlace de hidrógeno entre uno de los hidrógenos del grupo amida de la cadena lateral de la Gln202 y el nitrógeno N4' del grupo imino, aunque con distancias mayores a las registradas en los sitios activos del sistema AP, con valores por sobre los 3,0 Å, en donde el valor de distancia promedio entre ambos átomos durante la simulación fue de  $4,40 \pm 0,06$  Å, Figura 3.49-A y un

valor de energía de interacción promedio para dicho enlace de  $-16,70 \pm 0,12$  Kcal/mol, Figura 3.49-B. Este valor promedio de energía de interacción refleja la mayor distancia de este enlace de hidrógeno en el sitio activo 2 del sistema IP en comparación a lo observado en el sitio activo 1 del sistema AP, cuyo valor de energía de interacción promedio para la interacción Gln202-H/N4'-HETHDP-AP fue  $-31$  kcal/mol y la distancia promedio de  $3,8$  Å, Tabla 3.2, página 72.

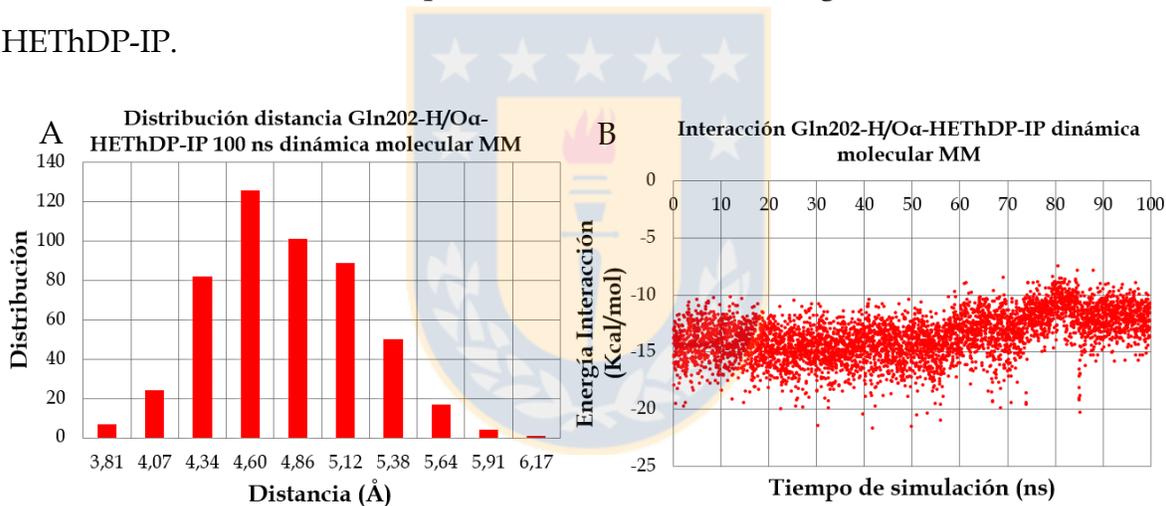


**Figura 3.49.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-Imino IP y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

Es posible que el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_P$  de  $-46,2^\circ$  calculado para la simulación del sitio activo 2 del sistema IP haya sido consecuencia del aumento en la distancia de la interacción Gln202-H/N4'-HETHDP-IP en comparación a lo observado en el sistema AP. Ya que al estar presentes las interacciones por enlace de hidrógeno entre el backbone de la Met525 y el N3' del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-IP y entre el oxígeno carbonílico del backbone de la Gly523 y el hidrógeno del grupo 4'-imino del intermediario HETHDP-IP, estas provocan la torsión del ángulo diedro  $\Phi_P$ , inclinando al anillo de pirimidina hacia la zona en que se encuentran ubicados los residuos Gly523 y Met525, generando que los valores del ángulo diedro  $\Phi_P$  durante la simulación del sistema IP sean mayores en comparación a los valores de  $-67^\circ$  y  $-97^\circ$ , observados en el sitio activo 1 y 2 del sistema AP.

Sin embargo, el resultado de mayor relevancia de la interacción observada de la Gln202 tanto en el sitio activo 2 como en el sitio activo 1 del sistema IP, es que al igual que lo observado en el sistema AP y como consecuencia del carácter nucleofílico del nitrógeno N4' del grupo imino del complejo HETHDP-BA-IP, la Gln202 ha formado un enlace de hidrógeno con el grupo imino del cofactor, el cual prevalece durante la simulación por sobre la interacción de enlace de hidrógeno reportada en literatura<sup>4,5</sup> entre la Gln202 y el oxígeno O<sub>α</sub> del intermediario HETHDP-IP. Prueba de ello es el valor de la distancia promedio correspondiente a  $4,92 \pm 0,05$  Å, Figura 3.50-A y el valor de la energía de interacción promedio correspondiente a  $-13,55 \pm 0,07$  Kcal/mol, para la interacción Gln202-H/O<sub>α</sub>-HETHDP-IP Figura 3.50-B, valores que demuestra la menor estabilidad de esta la interacción en comparación al enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-Imino-HETHDP-IP.

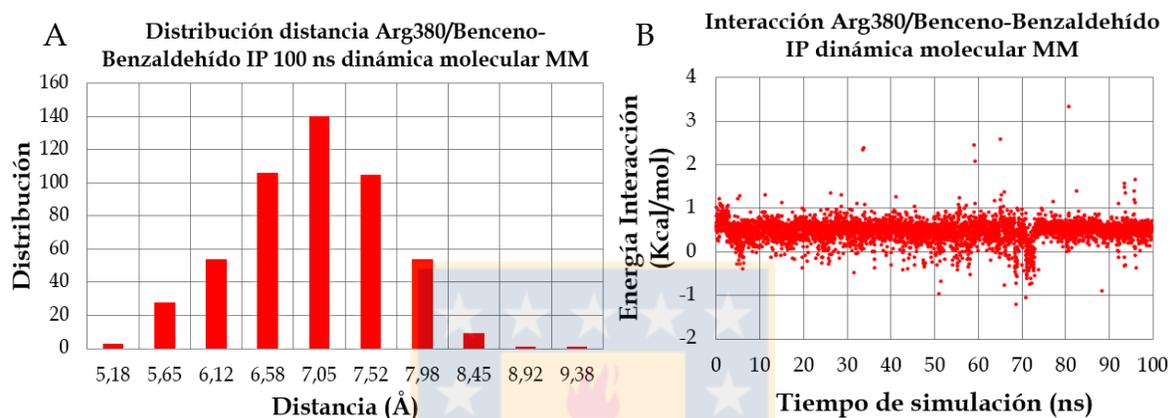


**Figura 3.50.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/O<sub>α</sub>-HETHDP-IP y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

**Arg380:** A diferencia lo observado en el sitio activo 1 del sistema AP, durante la simulación el grupo guanidinio de la cadena lateral de la Arg380, se mantuvo a distancias más cercanas del anillo de benceno del sustrato benzaldehído, a pesar de que la distancia promedio entre los centros geométricos de ambos fue de  $7,22 \pm 0,07$  Å, Figura 3.51-A. Sin embargo, las distancias son menores desde los átomos de hidrogeno

del anillo de benceno hasta el carbono central del grupo guanidinio. A pesar de esto, la energía de interacción promedio fue de  $0,47 \pm 0,01$  Kcal/mol, Figura 3.51-B, repulsión que puede atribuirse a la orientación perpendicular entre el grupo guanidinio y los hidrógenos del benceno. Tal como indica la bibliografía la Arg380 no posee un rol catalítico en la formación de R-PAC,<sup>4</sup> lo cual está en concordancia con lo observado en el sitio activo 2 del sistema IP.

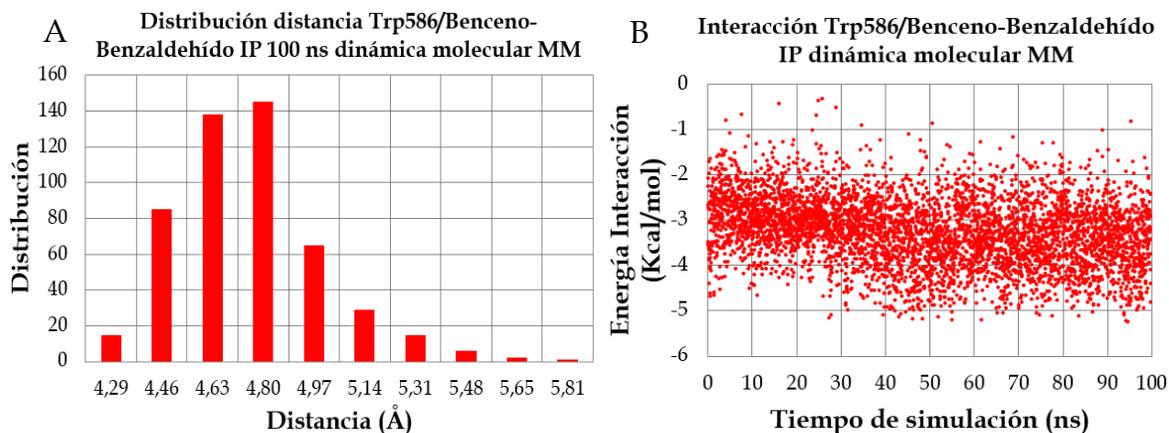


**Figura 3.51.** A-Distribución distancia interacción Arg380/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

**Trp586:** Durante la simulación el Trp586 mantuvo una interacción  $\pi$ -stacking con conformación tipo T entre la cadena lateral del Trp586, correspondiente a un anillo de indol y el anillo de benceno del sustrato benzaldehído, carboligado al intermediario HETHDP-IP. El hidrógeno unido al nitrógeno del anillo de indol del Trp586 se orientó hacia al anillo de benceno del benzaldehído durante la simulación, con distancias que oscilaron entre los 2,0 Å y los 4,7 Å. El valor de la distancia promedio entre los centros geométricos de ambos anillos aromáticos fue de  $4,83 \pm 0,03$  Å, Figura 3.52-A, mientras que la energía de interacción promedio fue de  $-3,25 \pm 0,03$  Kcal/mol, Figura 3.52-B. Al igual que en el sitio activo 1 del sistema AP y en concordancia con lo reportado en literatura,<sup>4,7,8</sup> el anillo de indol del Trp586 en el sitio activo 2 del sistema IP, no mostró interacción con el hidrógeno carbonílico del benzaldehído y a pesar de que si lo hace

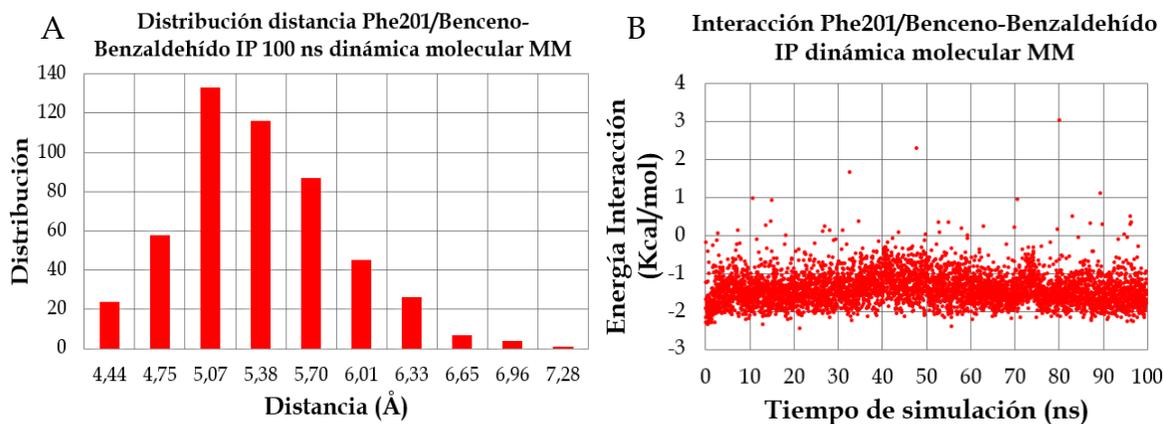
con el anillo de benceno del benzaldehído mediante una interacción  $\pi$ -stacking de baja contribución energética, su rol catalítico no es primordial en la formación de R-PAC.



**Figura 3.52.** A-Distribución distancia interacción Trp586/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

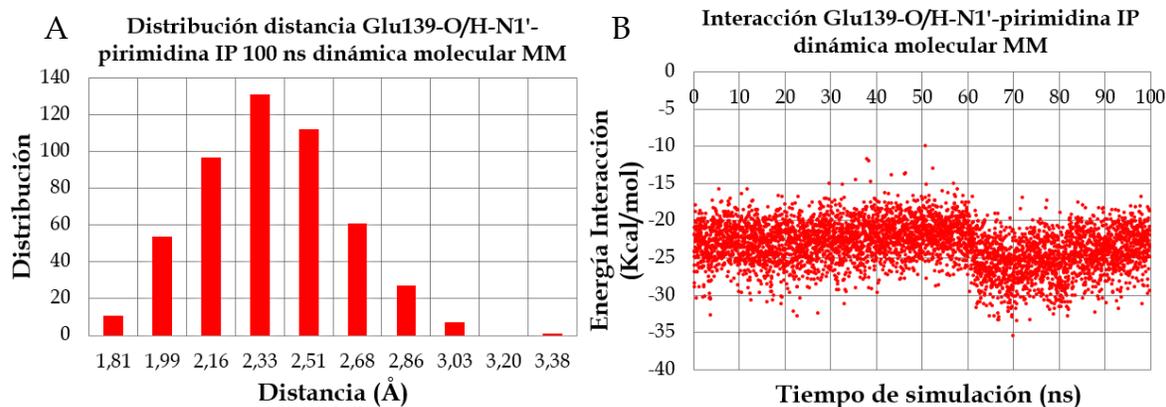
**Phe201:** Durante los 100 ns de simulación, el grupo fenilo de la cadena lateral de la Phe201 mantuvo una interacción  $\pi$ -stacking con conformación paralela desplazada, con el anillo de benceno del sustrato benzaldehído. La distancia promedio desde los centro geométricos de cada anillo aromático fue de  $5,53 \pm 0,06$  Å, Figura 3.53-A y la energía de interacción promedio de  $-1,42 \pm 0,02$  Kcal/mol, Figura 3.53-B. Al igual que en el sitio activo 1 del sistema AP y en concordancia con lo reportado en literatura, el rol catalítico de la Phe201 en el sitio activo 2 del sistema IP no sería primordial en la formación de R-PAC, debido a su rol estructural de mantener a la Arg380 a adoptar la conformación correcta para estabilizar a los sustratos<sup>4</sup>. Sin embargo, durante la simulación la Phe201 se encuentra más cerca y mejor orientada hacia el benzaldehído que hacia la Arg380, cumpliendo un rol similar a la interacción del Trp586 con el sustrato benzaldehído.



**Figura 3.53.** A-Distribución distancia interacción Phe201/Benceno-Benzaldehyde y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

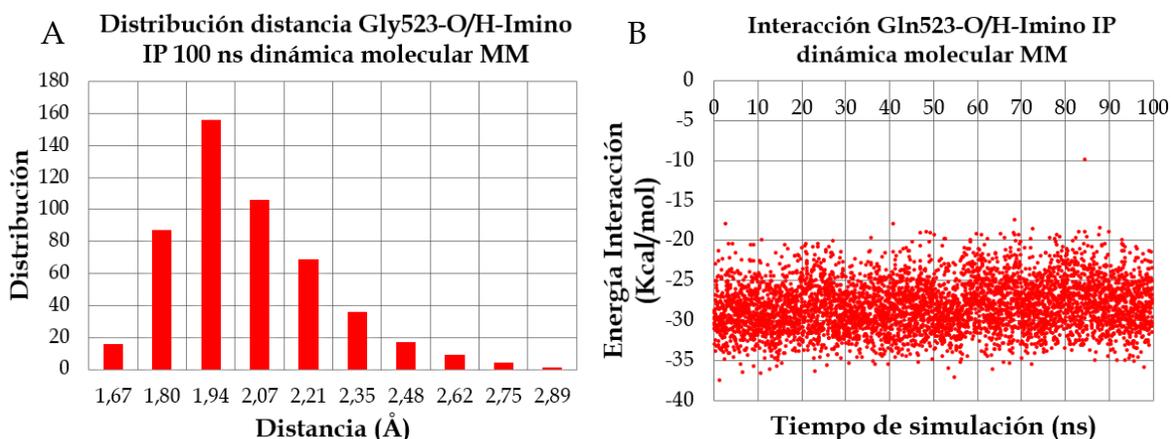
**Glu139:** Durante la simulación el Glu139 interaccionó mediante un enlace de hidrógeno entre el hidrógeno enlazado al nitrógeno N1' del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-IP y los oxígenos del grupo carboxilato de la cadena lateral del aminoácido. Con referencia a uno de los oxígenos la distancia promedio fue de  $2,46 \pm 0,03$  Å, Figura 3.54-A. Mientras que la energía de interacción promedio es de  $-23,4 \pm 0,1$  Kcal/mol, Figura 3.54-B. Esta interacción es fundamental para la estabilización de la forma tautomérica IP, la cual involucra al grupo imino y al anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-IP. Además, el enlace de hidrógeno formado se mantuvo constante y con buena orientación durante toda la simulación, lo cual es consistente con lo reportado en literatura.<sup>5,6</sup>



**Figura 3.54.** **A**-Distribución distancia enlace de hidrógeno Glu139-O/H-N1'-Pirimidina y **B**-Variación energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

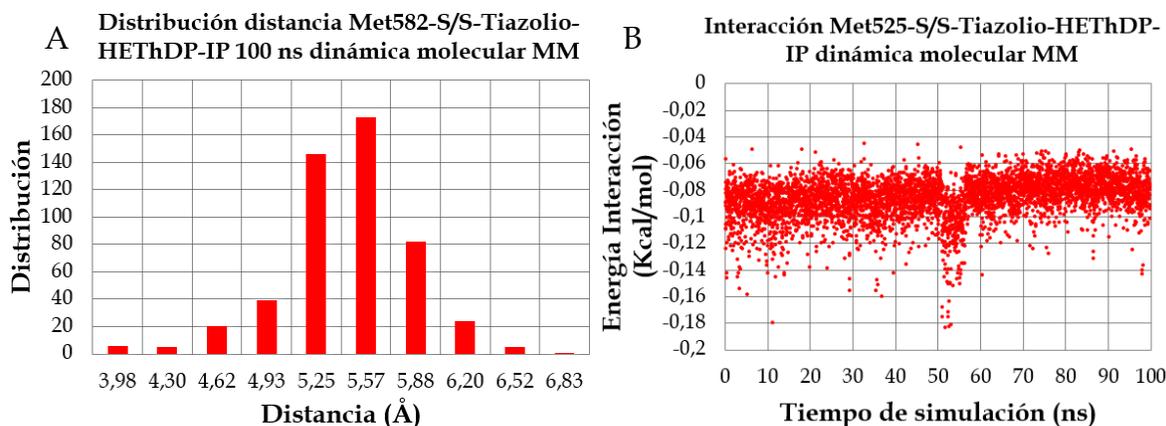
**Gly523:** Al igual que en el sitio activo 1 del sistema AP y en concordancia con lo reportado en la estructura cristalina 1N0H de la enzima AHAS,<sup>3</sup> la Gly523 del sitio activo 2 del sistema IP, mantuvo una interacción durante toda la simulación con el grupo imino del anillo de pirimidina, formando un enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del backbone del aminoácido y el hidrógeno del grupo imino enlazado al anillo de pirimidina. La distancia promedio para este enlace de hidrógeno fue de  $2,11 \pm 0,02$  Å, Figura 3.55-A, mientras que el valor de la energía de interacción promedio fue de  $-28,18 \pm 0,11$  Kcal/mol, Figura 3.55-B. En cuanto al valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_P$ , este presentó una desviación en referencia a los valores reportados experimentalmente, debido principalmente a la gran distancia del enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el nitrógeno N4' del grupo imino y a la presencia de las interacciones de los residuos Gly523 y Met525, las cuales provocan la torsión del ángulo diedro  $\Phi_P$  hacia un valor promedio de  $-46,2^\circ$ , en donde el valor experimental para el ángulo diedro  $\Phi_P$  en la conformación activa tipo V reportado para las etapas de activación del cofactor ThDP es  $\pm 70^\circ$ .<sup>10-12</sup>



**Figura 3.55.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gluy523-O/H-Imino y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

**Met582:** A diferencia de lo observado en el sitio activo 1 del sistema AP, en el sitio activo 2 del sistema IP el grupo metilo terminal de la cadena lateral de la Met582 mostró una orientación hacia el grupo flavin del cofactor FAD durante toda la simulación. Además, el átomo de azufre de la cadena lateral de la Met582 no presentó una orientación favorable con respecto al átomo de azufre del anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-IP, en donde el valor de distancia promedio entre los dos átomos de azufre durante la simulación fue de  $5,60 \pm 0,05$  Å, Figura 3.56-A y su energía de interacción promedio de  $-0,080 \pm 0,005$  Kcal/mol, Figura 3.56-B. Lo reportado en literatura señala que la Met582 solo cumple un rol estructural y no catalítico, debido a que se encuentra en una zona hidrofóbica ubicada entre los cofactores ThDP, FAD y el residuo Trp586, lo cual coincide con los observado en el sitio activo 2 del sistema IP.



**Figura 3.56.** A-Distribución distancia interacción Met582-S/S-Tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

Un resumen de las distancias promedio residuos sustratos de los sitios activos 1 y 2 del sistema IP y de las energía de interacción promedio del sitio activo 2 se muestran en la tabla 3.4. La mayor energía de interacción la presentó el enlace de hidrógeno entre la Gly116 y el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHP-BA-IP, interacción que esta favorecida energéticamente por sobre la interacción reportada en literatura entre la Gly116 y el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído.<sup>4, 5</sup> A continuación se encuentra el enlace de hidrógeno entre la Gly523 y el hidrógeno del grupo imino enlazado al anillo de pirimidina, interacción que está en concordancia con lo reportado en literatura,<sup>3</sup> al igual que la interacción por enlace de hidrógeno entre la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina.<sup>9</sup> Sin embargo, a pesar de que las interacciones Gly523-O/H-Imino-HETHP-IP y Met525-H/N3'-HETHP-IP se mantuvieron estables durante la simulación, el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  se alejó del valor experimental reportado para las etapas del activación del cofactor ThDP, debido a la torsión del anillo de pirimidina producto de las interacciones con los residuos Gly523 y Met525.

En tanto, el valor del ángulo diedro  $\Phi_T$  también se alejó del valor experimental durante la simulación, lo que posiblemente se puede atribuir a la incorrecta orientación de la cadena lateral de la Met525 con respecto al anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-IP. A esto se le suma la gran distancia entre los átomos de azufre de la Met582 y el anillo de tiazolio, lo cual podría complementar el hecho de que el ángulo diedro  $\Phi_T$  haya adoptado valores mayores a los reportados experimentalmente. Otra de las interacciones por enlace de hidrógeno observadas en el sitio activo 2 del sistema IP que está en concordancia con lo reportado en literatura, fue el enlace de hidrógeno entre el Glu139 y el hidrógeno enlazado al nitrógeno N1' del anillo de pirimidina, interacción que es fundamental para la activación del cofactor y para su actividad catalítica al mantener la estabilidad del estado de protonación del grupo imino del anillo de pirimidina.<sup>5, 6</sup> Para el caso de la Gln202 esta se mantuvo realizando un enlace de hidrógeno con el nitrógeno N4' del grupo imino enlazado al anillo de pirimidina, interacción que se encuentra favorecida energéticamente por sobre el enlace de hidrógeno reportado en literatura entre la Gln202 y el oxígeno O $\alpha$  del intermediario HETHDP, debido al carácter nucleofílico del nitrógeno N4' del grupo imino del complejo HETHDP-BA-IP.

Por último se encuentra la debil interacción entre el anillo de indol de la cadena lateral de Trp586 y el anillo de benceno del sustrato benzaldehído, interacción no reportada en literatura ya que al Trp586 solo se le atribuye participación cuando el segundo sustrato del ciclo catalítico es 2-cetobutirato.<sup>4, 7</sup> En tanto las interacciones de la Arg380 y Phe201 no presentaron un rol catalítico en la formación del R-PAC, lo cual está en concordancia con los resultados reportados en literatura,<sup>4, 8</sup> aunque ambos presentaron distancias cercanas al anillo de benceno del sustrato benzaldehído.

**Tabla 3.4: Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo 1 y 2 del sistema IP y energías de interacción promedio del sitio activo 2 para 100 ns de dinámica molecular MM.**

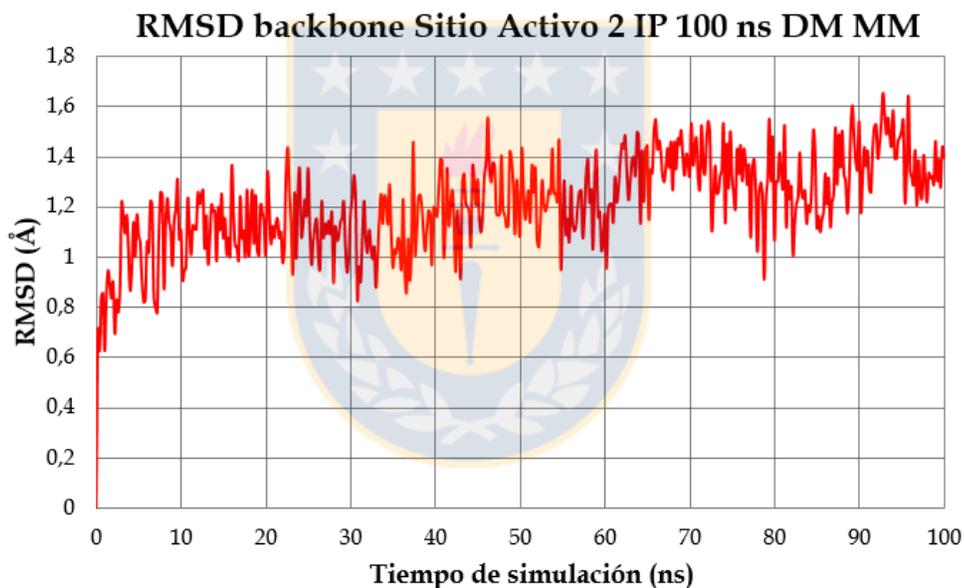
Interacción residuo-sustrato	Distancia (Å) sitio activo 1	Distancia (Å) sitio activo 2	Energía (Kcal/mol)* sitio activo 2
Met525-H/N3'-HETHDP-IP	5,00 ± 0,06	2,30 ± 0,02	-26
Met525-S/S-HETHDP-IP	4,94 ± 0,04	7,10 ± 0,11	-0,1
Gly116-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-IP	5,71 ± 0,05	2,65 ± 0,06	-33
Gly116-H/O <sub>β</sub> -Benzaldehído	7,65 ± 0,07	4,73 ± 0,09	-11
Gln202-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-IP	4,42 ± 0,11	4,92 ± 0,05	-14
Gln202-H/N4'-HETHDP-IP	3,34 ± 0,20	4,40 ± 0,06	-17
Arg380/Benzaldehído	6,18 ± 0,07	7,22 ± 0,07	0,5
Trp586/Benzaldehído	4,93 ± 0,03	4,83 ± 0,03	-3,3
Phe201/Benzaldehído	5,82 ± 0,07	5,53 ± 0,06	-1,4
Glu139-H/N1'-HETHDP-IP	5,84 ± 0,10	2,46 ± 0,03	-23
Gly523-O/H-Imino-HETHDP-IP	3,76 ± 0,10	2,11 ± 0,02	-28
Met582-S/S-Tiazolio-HETHDP-IP	5,93 ± 0,04	5,60 ± 0,05	-0,1

\*Al igual que en el sistema AP las energías de interacción fueron calculadas en fase gas con una constante dieléctrica de 1 y considerando solo a los átomos involucrados en la interacción, por ejemplo el oxígeno del carboxilato del Glu139 y el hidrógeno enlazado al N1' del anillo de pirimidina.

Fuente: Elaboración propia.

De forma similar a lo observado en el sitio activo 1 del sistema AP, en el sitio activo 2 del sistema IP se observó que durante la dinámica de producción moléculas de la caja de agua entraron al sitio activo interaccionando mediante enlaces de hidrógeno con el oxígeno O<sub>α</sub>, el nitrógeno N4' del grupo imino y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-IP, ubicándose alrededor del anillo de pirimidina y entre los oxígenos O<sub>α</sub> y O<sub>β</sub>. Además, hasta los 70 ns de simulación una molécula de agua cristalina se mantuvo estabilizando mediante enlace de hidrógeno al nitrógeno N4' del grupo imino del complejo HETHDP-BA-IP. Similar interacción mostró el grupo carboxilato del Glu139, el cual se mantuvo estabilizado durante toda la simulación mediante un enlace de hidrógeno con una molécula de agua cristalina.

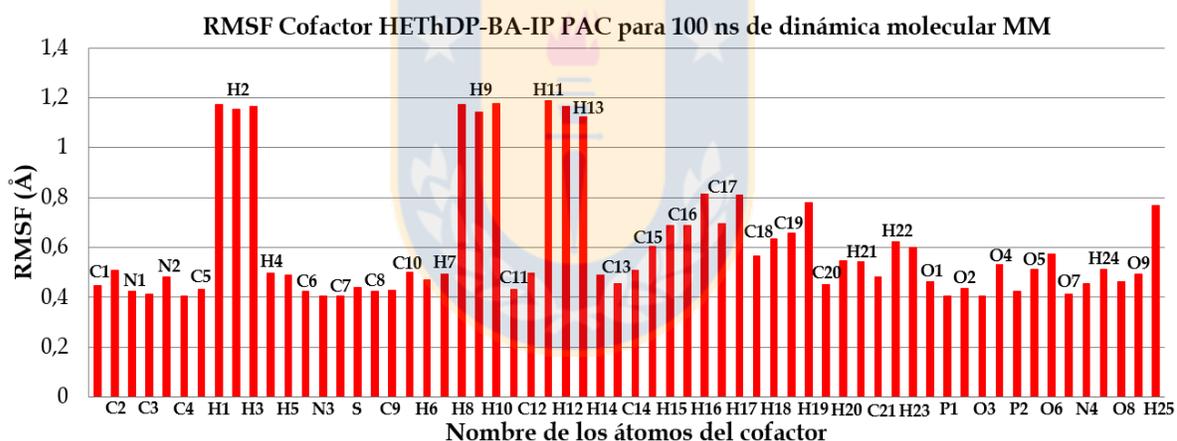
Sobre la estabilidad conformacional del sitio activo 2 del sistema IP, el RMSD del backbone de los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201, Gln202, Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586, los cuales componen el sitio activo y rodean tanto al sustrato benzaldehído como al intermediario HETHDP-IP, presentó un valor promedio de  $1,21 \pm 0,18 \text{ \AA}$  y una zona de estabilidad conformacional prolongada desde aproximadamente los 10 ns hasta los 60 ns, en donde las variaciones de RMSD en dicha zona van desde los  $1,0 \text{ \AA}$  y los  $1,4 \text{ \AA}$ , Figura 3.57. Esta zona de estabilidad conformacional abarca a la zona de estabilidad ubicada entre los 40 ns y los 60 ns de simulación en los RMSD presentados en las Figuras 46 y 48, los cuales incluyen a todos los residuos de la enzima.



**Figura 3.57.** RMSD del backbone de los aminoácidos del sitio activo 2 del sistema IP.

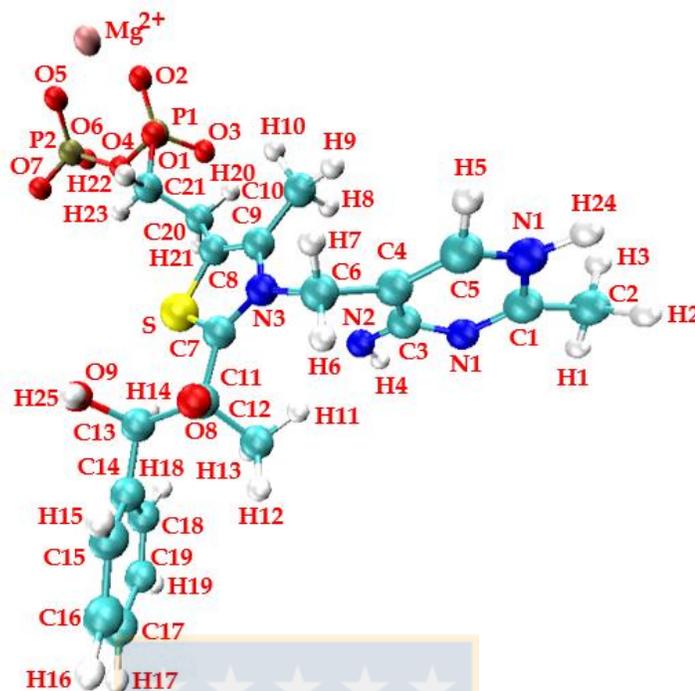
Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a las fluctuaciones de los átomos del complejo HETHDP-BA-IP del sitio activo 2, el RMSF de los átomos que lo componen muestra que al igual que en el sitio activo 1 de sistema AP, los átomos que experimentaron mayor desplazamiento durante la dinámica de producción y que tiene valores mayores a 0,6 Å, Figura 3.58, corresponden principalmente a los hidrógenos de los grupos metilo del complejo, debido a la rotación del enlace simple carbono carbono. Entre ellos se encuentran el grupo metilo del anillo de pirimidina correspondiente al carbono C2 y sus hidrógenos H1, H2 y H3, los hidrógenos H8, H9 y H10 del grupo metilo enlazado al anillo de tiazolio y los hidrógenos H11, H12 y H13 del grupo metilo del enlazado al carbono C2 $\alpha$  correspondiente al carbono C11, Figura 3.59. A estos átomos se suman, aunque con menor movilidad, los átomos del anillo de benceno del sustrato benzaldehído y el hidrógeno H25 enlazado al oxígeno O9 (O $\beta$ ), con valores de RMSF cercanos a los 0,8 Å.



**Figura 3.58.** RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-IP del sitio activo 2 del sistema IP para 100 ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.

Fuente: Elaboración propia.

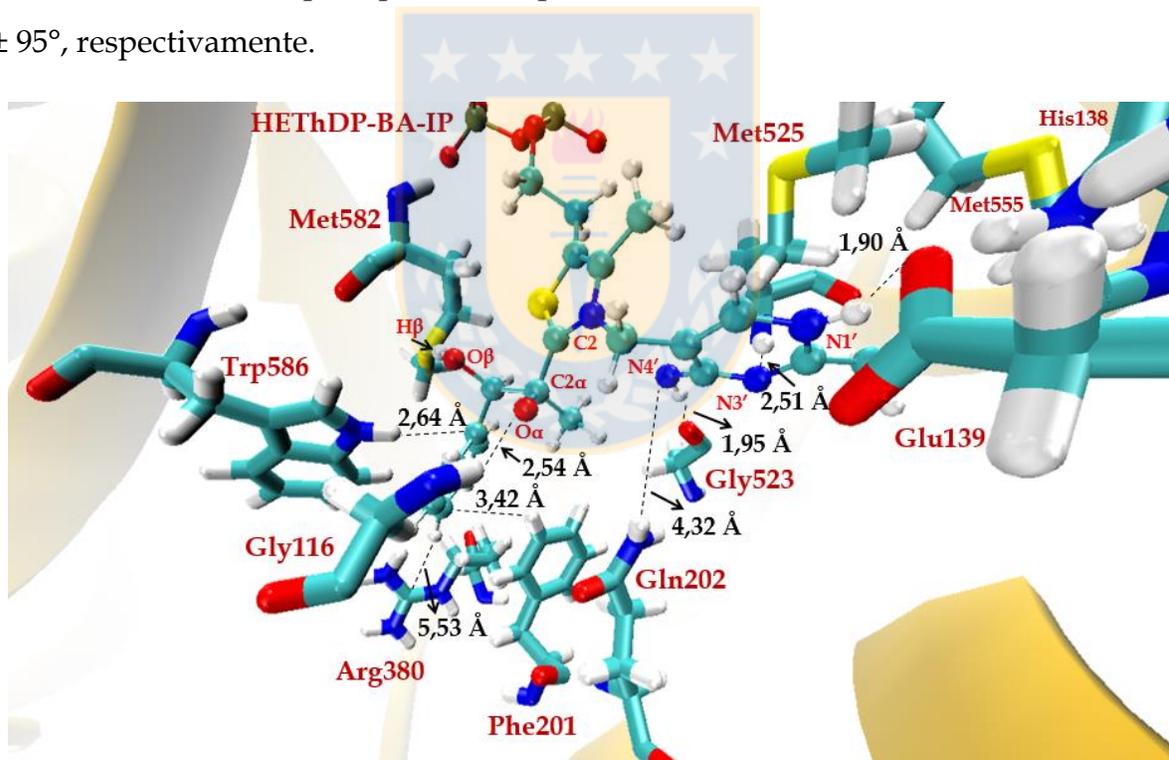


**Figura 3.59.** Nombre de los átomos del complejo HETHDP-BA-IP del sitio activo 2 del sistema IP para 100ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.

Fuente: Elaboración propia.

En base a los resultados obtenidos para el sistema IP se ha seleccionado como estructura de partida para los cálculos de dinámica molecular QM/MM a la estructura del sitio activo 2 correspondiente a los 50 ns de simulación, Figura 3.60. Al igual que en el sistema AP, el criterio de selección fue escoger al sitio activo representativo con las interacciones residuo sustrato acordes a las reportadas en literatura. Posteriormente, se escogió una estructura perteneciente a la zona de estabilidad conformacional que mostró tanto el RMSD del backbone de la totalidad de la enzima modelada, Figuras 3.32 y 3.34, como el RMSD del sitio activo 2 del sistema IP, Figura 3.57, cuya zona de estabilidad se encuentra entre los 40 ns y los 60 ns de simulación. Como la estructura seleccionada debe ser representativa del sitio activo se seleccionó a aquellas que mostraron concordancia con las interacciones intermoleculares presentadas en las estructuras promedio para los 100 ns de simulación, Figura 3.42 y

para la zona de estabilidad conformacional ubicada entre los 40 y los 60 ns, Figura 3.43. Entre las estructuras de la zona de estabilidad conformacional se priorizó a las que mostraron las interacciones reportadas en literatura que otorgan y mantienen a la conformación activa tipo V del intermediario HETHDP. En este sentido, a pesar de que los valores promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del intermediario HETHDP del sitio activo 2 registrados durante la simulación son valores que distan de los valores experimentales, en la estructura seleccionada se observa que las interacciones Met525-H/N3'-HETHDP-IP y Gly523-O/H-Imino-HETHDP-IP se mantienen formando enlaces de hidrógeno que otorgan un valor al ángulo diedro  $\Phi_P$  de  $-60,0^\circ$ , mientras que para el ángulo diedro  $\Phi_T$  el valor es de  $121,2^\circ$ , en donde los valores experimentales de la conformación activa tipo V para las etapas de activación del cofactor ThDP son  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ , respectivamente.

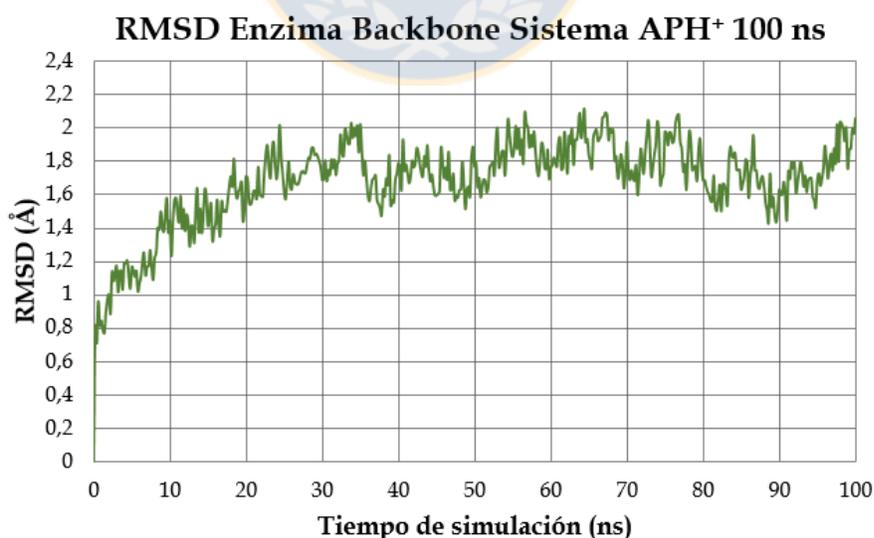


**Figura 3.60.** Estructura del sitio activo 2 del sistema IP correspondiente a los 50 ns de dinámica molecular mecánico clásica.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.3 Dinámica molecular MM sistema APH<sup>+</sup>

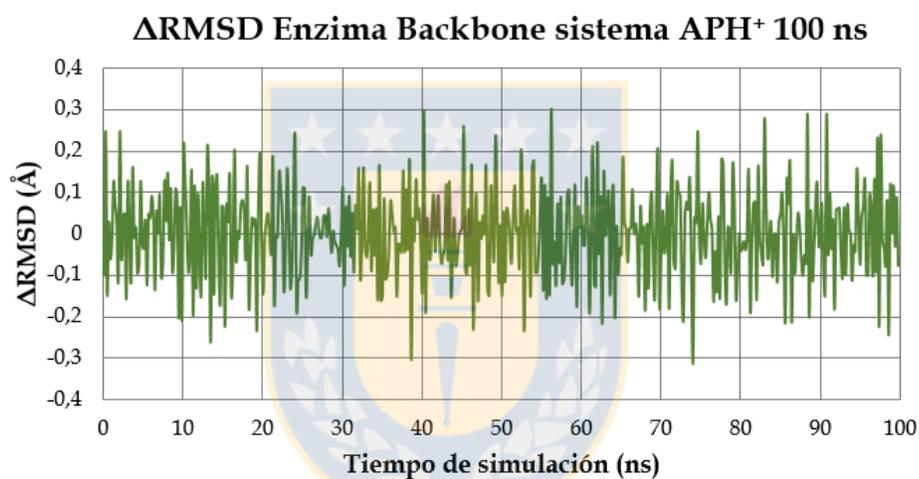
En la Figura 3.61 se muestra el gráfico de RMSD del backbone de los aminoácidos de la enzima AHAS versus el tiempo de simulación correspondiente a 100 ns de dinámica molecular mecánico clásica del sistema APH<sup>+</sup>. Al igual que en los sistemas IP y AP los valores de RMSD para el sistema APH<sup>+</sup> fueron calculados cada 0,2 ns, en donde el valor promedio para los 100 ns fue de  $1,68 \pm 0,03 \text{ \AA}$ , correspondiente al valor promedio más alto al comparar los tres sistemas, indicando que el sistema APH<sup>+</sup> tuvo el mayor desplazamiento durante la dinámica de producción. En la Figura 3.61 se aprecian dos zonas de estabilidad conformacional, la primera entre los 35 ns y los 50 ns y la segunda entre los 52 ns y los 80 ns de simulación, donde la variación de los valores de RMSD se encuentra entre los  $1,6 \text{ \AA}$  y los  $2,0 \text{ \AA}$ . En tanto, en la Figura 3.62 se muestran los valores de  $\Delta\text{RMSD}$  para los átomos del backbone de los aminoácidos del sistema APH<sup>+</sup> para los 100 ns de simulación. Al igual que en los sistemas IP y AP y las variaciones en valor absoluto del  $\Delta\text{RMSD}$  no sobrepasan los  $0,2 \text{ \AA}$ , indicando que el movimiento de los átomos del backbone de la enzima entre cada estructura de la dinámica poseen distancias menores a las  $0,4 \text{ \AA}$ .



**Figura 3.61.** RMSD backbone de residuos sistema APH<sup>+</sup> dinámica molecular MM.

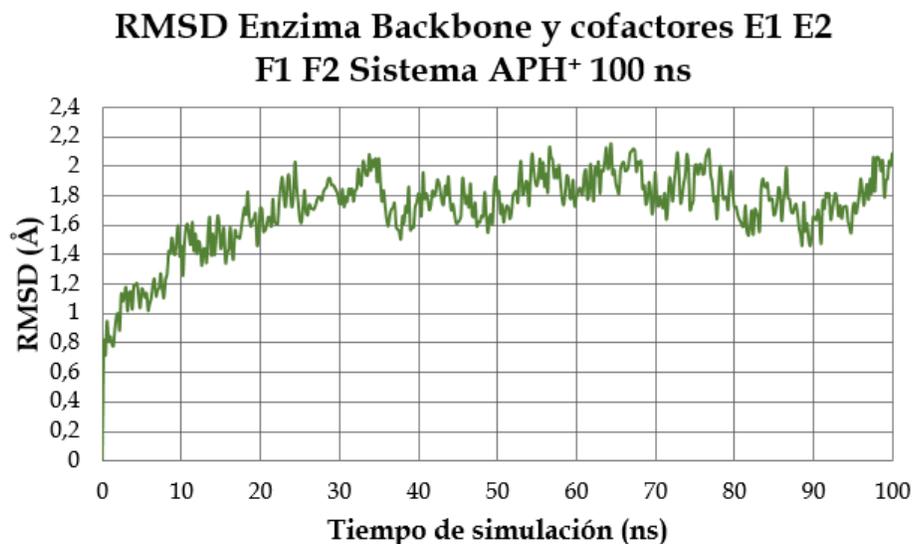
Fuente: Elaboración propia.

Similares resultados se presentan en el gráfico del RMSD, Figura 3.63 y su respectivo  $\Delta$ RMSD, Figura 3.64, en los cuales se incluyó, además de los átomos del backbone de la enzima, a los cofactores FAD (F1 y F2) y los complejos HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> (E1 y E2), de los sitios activos 1 y 2, respectivamente. En comparación al gráfico del RMSD de la Figura 3.61, la inclusión de los cofactores no cambió la topología de la variación del RMSD durante la simulación, manteniendo las zonas de estabilidad y aumentando levemente el valor promedio del RMSD a  $1,71 \pm 0,03 \text{ \AA}$ , lo cual da cuenta del movimiento restringido de los cofactores situados en los sitios activos al interior de la enzima, ratificando la estabilidad de dinámica molecular.



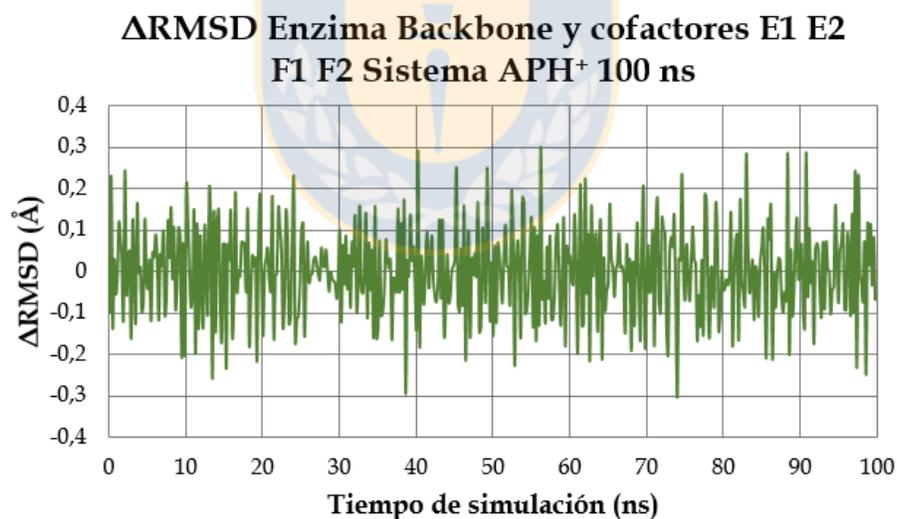
**Figura 3.62.**  $\Delta$ RMSD backbone de residuos sistema APH<sup>+</sup> dinámica molecular MM.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.63.** RMSD backbones, complejos HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> y cofactores FAD sistema APH<sup>+</sup> 100 ns DM MM.

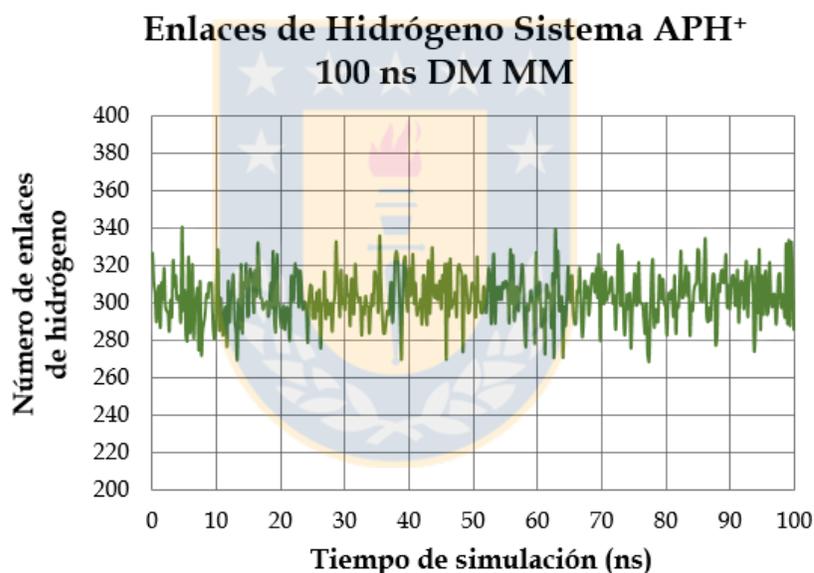
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.64.**  $\Delta$ RMSD backbone, complejos HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> y cofactores FAD sistema APH<sup>+</sup> 100 ns DM MM.

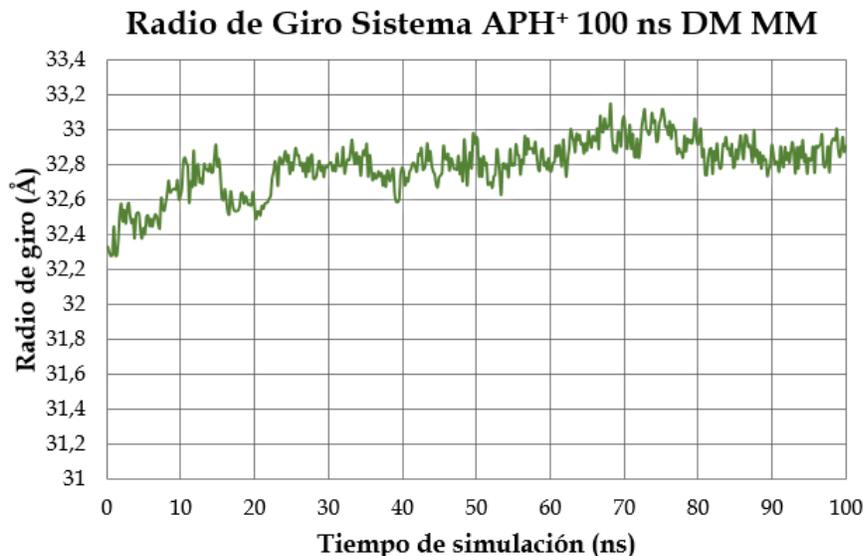
Fuente: Elaboración propia.

Para comprobar la estabilidad de la estructura secundaria y terciaria de la enzima en el sistema APH<sup>+</sup>, en las Figuras 3.65 y 3.66 se presentan los gráficos referentes al número de enlaces de hidrógeno formados entre los residuos de la enzima durante los 100 ns de simulación y la variación del radio de giro de la enzima, respectivamente. En ambos gráficos se aprecia que, al igual que en los sistemas AP e IP, tanto los enlaces de hidrógenos como el radio de giro permanecen constantes durante la dinámica de producción del sistema APH<sup>+</sup>, con un valor promedio de 303 enlaces de hidrógeno y de  $32,80 \pm 0,02 \text{ \AA}$  para el radio de giro. Estos resultados ratifican la estabilidad tanto de las estructuras secundaria y terciaria de la enzima como la estabilidad de la simulación que se ha realizado del sistema APH<sup>+</sup>.



**Figura 3.65.** Número de enlaces de hidrógeno entre residuos del sistema APH<sup>+</sup> durante 100 ns DM MM.

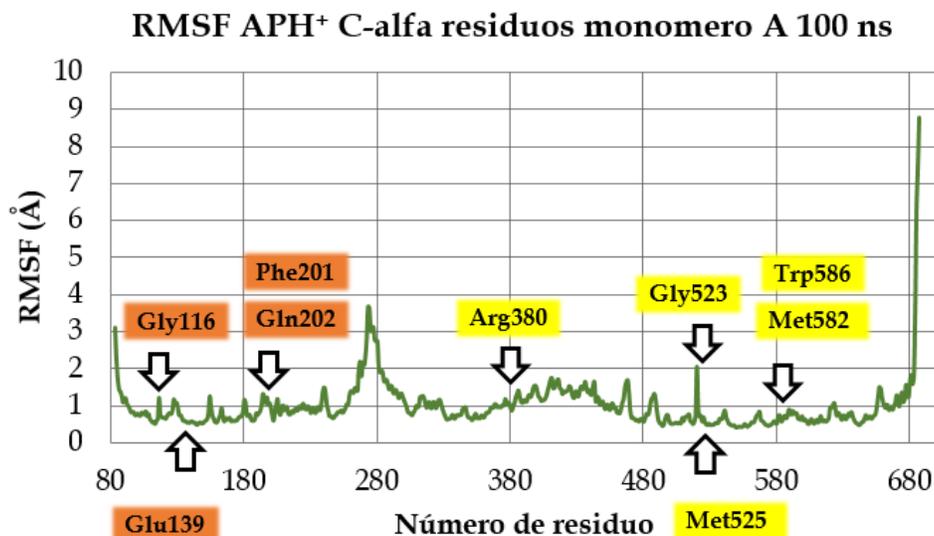
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.66.** Radio de giro de la enzima AHAS sistema APH<sup>+</sup> 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

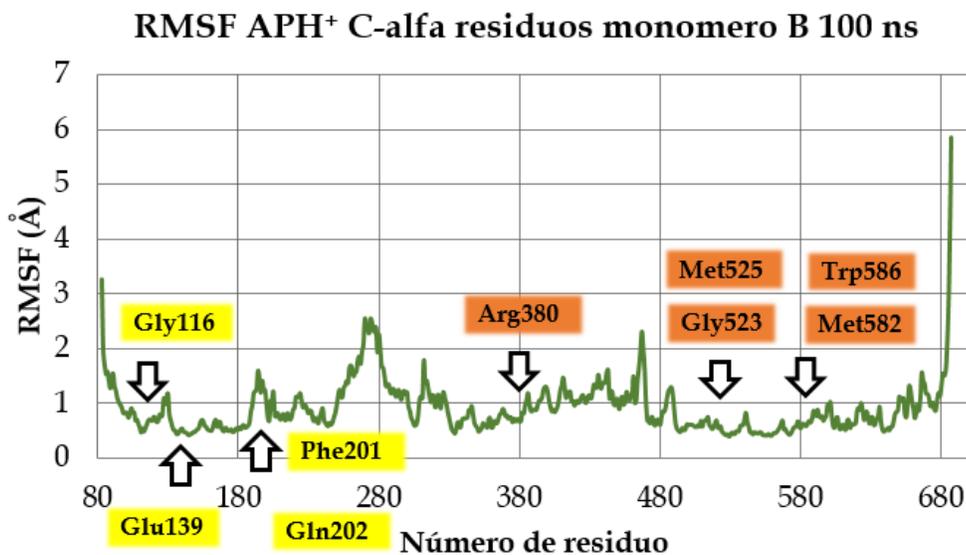
La movilidad de los residuos del sistema APH<sup>+</sup> durante la simulación de dinámica molecular se presenta en los gráficos de RMSF del carbono alfa de los residuos que componen a los dos monómeros de la enzima, correspondiente a las Figuras 3.67 y 3.68. Al igual que en los sistemas AP e IP, en ambos gráficos los aminoácidos que componen los sitios activos 1 y 2, en amarillo y naranja respectivamente, muestran valores de RMSF menores a 1 Å, indicando la baja movilidad de los residuos de los sitios activos en comparación a los aminoácidos rodeados de moléculas de agua circundantes ubicados en la periferia de la enzima y en zonas de loops que unen estructuras secundarias como hélices alfa y hojas beta plegadas. Ejemplo de ello es la secuencia terminal Arg679-His687 de los monómeros de la enzima, la cual presentó la mayor movilidad del sistema al encontrarse en la periferia de la enzima rodeada de moléculas de agua. A esto se le suma la secuencia Ser270-Phe284 la cual conforma un loop entre los dominios alfa y beta en contacto con moléculas de agua, Figura 3.9, sección 3.1.1, página 52, ubicado en la zona externa de la enzima, el cual une una hélice alfa con una hoja beta plegada en el domino  $\beta$  de la enzima<sup>6</sup>.



**Figura 3.67.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema APH<sup>+</sup> 100 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, los aminoácidos ubicados en los sitios activos de la enzima, tales como Gly116, Glu139, Phe201, Gln202, Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586, presentaron valores de RMSF menores, cercanos a 1 Å, tabla 3.5. Su restringida movilidad da cuenta de la estabilidad de los sitios activos del sistema APH<sup>+</sup> durante la simulación, lo cual es consecuencia directa de la presencia y estabilización de las interacciones no enlazantes entre los residuos y los sustratos, referidas principalmente a los enlaces de hidrógeno y las interacciones  $\pi$ -stacking entre anillos aromáticos formados durante la dinámica de producción.



**Figura 3.68.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema APH<sup>+</sup> 100 ns DM MM.

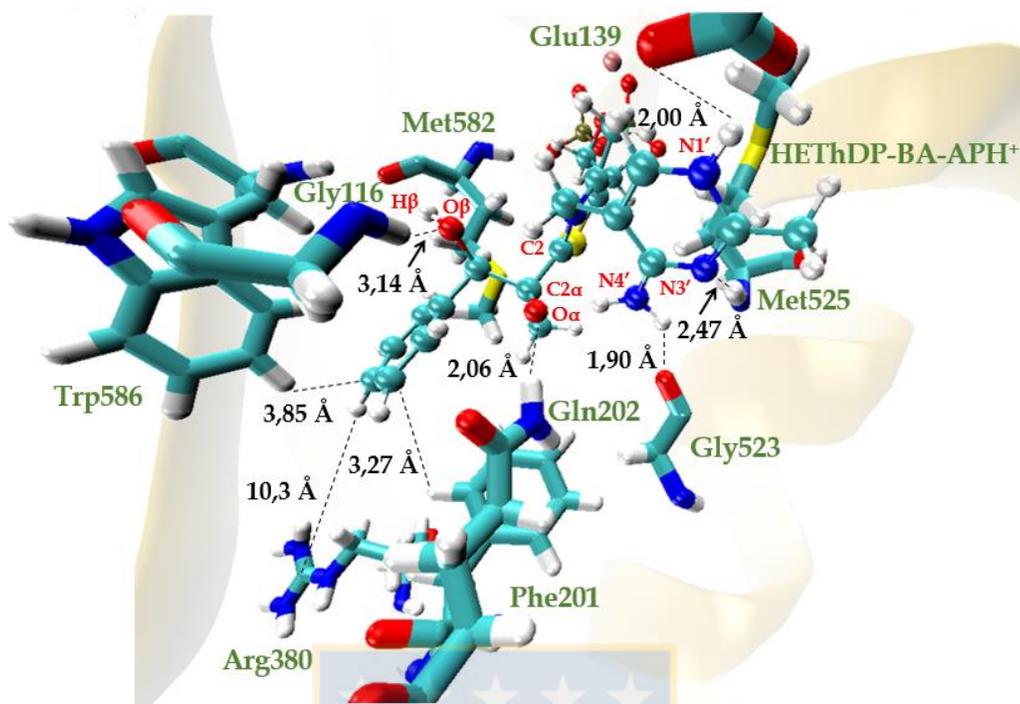
Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.5: Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo 1 y 2 del sistema APH<sup>+</sup> en la enzima AHAS para 100 ns de dinámica molecular MM.**

Ubicación	Residuo Sitio Activo1	RMSF (Å)	Ubicación	Residuo Sitio Activo2	RMSF (Å)
Monómero B	Gly116	0,70	Monómero A	Gly116	1,21
	Glu139	0,53		Glu139	0,59
	Phe201	0,74		Phe201	0,74
	Gln202	0,69		Gln202	0,60
Monómero A	Arg380	0,93	Monómero B	Arg380	0,67
	Gly523	0,63		Gly523	0,59
	Met525	0,69		Met525	0,47
	Met582	0,75		Met582	0,63
	Trp586	0,73		Trp586	0,69

Fuente: Elaboración propia.

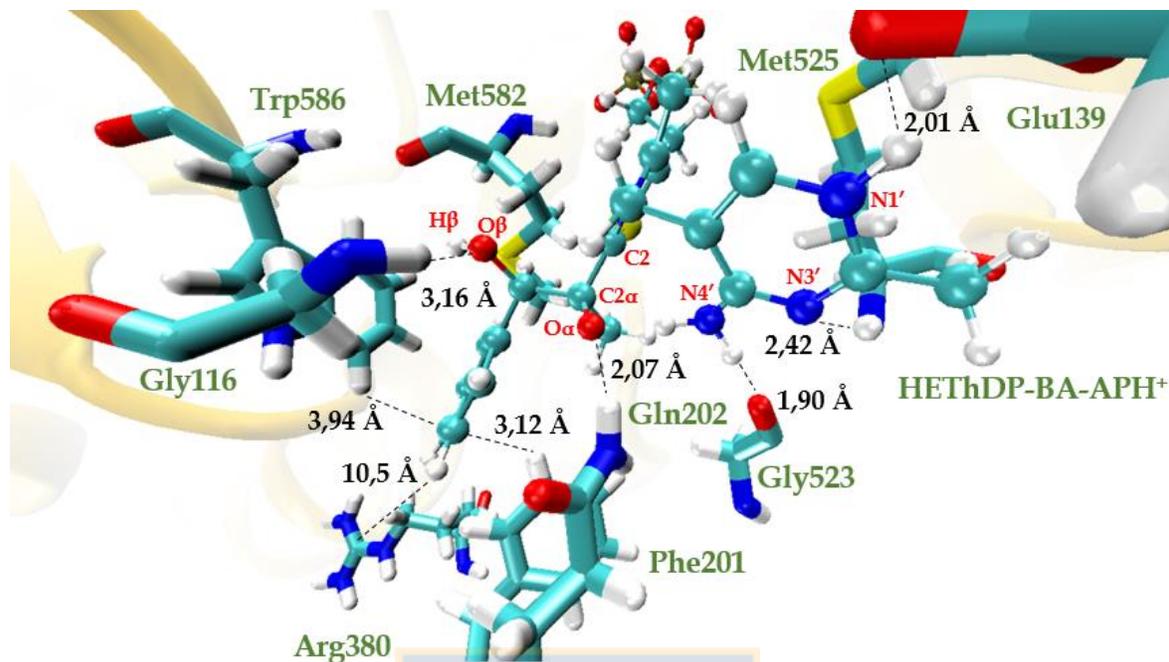
Al comparar los valores de RMSF de los aminoácidos de ambos sitios activos se observa que los residuos del sitio activo 2 han presentado menor movilidad durante la dinámica de producción debido a que sus valores de RMSF son menores que el de los residuos del sitio activo 1, con excepción de la Gly116 que presentó un valor de 1,21 Å en el sitio activo 2 y los aminoácidos Glu139, Phe201 y Trp586 que presentaron valores similares en ambos sitios activos. A pesar de esta diferencia, al visualizar la trayectoria del sistema APH<sup>+</sup>, mediante el software de visualización VMD, se ha observado que a diferencia de lo que ocurre en los sitios activos de los sistemas AP e IP, las interacciones no enlazantes residuo sustrato reportadas en literatura<sup>3-8</sup> han coincidido en su totalidad con las observadas en los dos sitios activos del sistema APH<sup>+</sup>, interacciones que por lo demás se mantienen durante los 100 ns de simulación. En el sitio activo 1, la Gly116 se mantuvo estabilizando la densidad de carga del oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> del benzaldehído mediante un enlace de hidrógeno con distancias entre los 2,01 Å y los 4,23 Å, en donde el oxígeno O<sub>β</sub> se encuentra protonado y el sustrato benzaldehído carboligado al intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, conformando el complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, tal como se muestra en la Figura 3.69 correspondiente a la estructura promedio del sitio activo 1 para los 100 ns de simulación y en la Figura 3.70, correspondiente a la estructura promedio de las dos zonas de mayor estabilidad conformacional que muestran los RMSD, Figuras 3.61 y 3.63, las cuales sumadas comprenden la zona entre los 35 ns y los 80 ns.



**Figura 3.69.** Estructura promedio sitio activo 1 del sistema APH<sup>+</sup> para 100ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Otra de las interacciones reportadas en literatura que se mantuvo en el sitio activo 1 del sistema APH<sup>+</sup> durante la simulación, es el enlace de hidrógeno entre uno de los hidrógenos del grupo amida de la cadena lateral de la Gln202 y el oxígeno O<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, con distancias que oscilaron entre los 1,66 Å y los 2,51 Å. A esta se le suman las interacciones por enlaces de hidrógeno entre: el oxígeno carbonílico del backbone de la Gly523 y uno de los hidrógenos del grupo imino protonado, también denominado catión imonio, enlazado al anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, con distancias que variaron entre los 1,68 Å y los 2,17 Å; la interacción entre el grupo carboxilato de la cadena lateral de la Glu139 y el hidrógeno enlazado al nitrógeno N1' del anillo de pirimidina con distancias comprendidas entre los 1,67 Å y los 2,52 Å y la interacción entre el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Met525 y nitrógeno N3' del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> con distancias que variaron entre los 1,63 Å y los 2,60 Å, durante los 100 ns de simulación.



**Figura 3.70.** Estructura promedio sitio activo 1 del sistema APH<sup>+</sup> para el intervalo entre los 35 ns y los 80 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

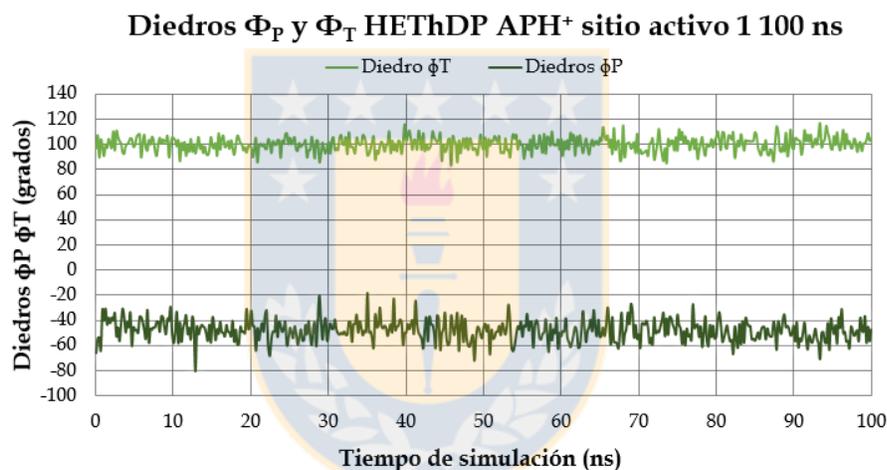
Además las cadenas laterales de los residuos Trp586 y Phe201, correspondientes a un anillo de indol y un grupo fenilo, respectivamente, durante la dinámica de producción se mantuvieron orientados hacia el anillo de benceno del benzaldehído con distancias que variaron entre los 2,92 Å y los 4,66 Å para la interacción  $\pi$ -stacking de conformación tipo T con el Trp586 y entre los 3,17 Å y los 4,46 Å para la interacción  $\pi$ -stacking de conformación tipo T con la Phe201. En base a lo reportado en literatura estudios de mutaciones sitio dirigidas sobre la Phe201 muestran que su importancia radica en mantener a la Arg380 a adoptar la conformación correcta al momento de estabilizar al carboxilato de la molécula de piruvato en la formación de AL,<sup>4</sup> pero que en la formación de R-PAC no juega un rol catalítico importante. Sin embargo, durante los 100 ns de simulación, la Phe201 se mantuvo interaccionando con el benzaldehído al igual que el Trp586, en donde resultados experimentales de mutaciones sitio dirigidas muestran que el Trp586 es fundamental para la estabilización del sustrato 2-

cetobutirato en la formación de (2S)-2-acetohidroxibutirato (AHB) en la enzima AHAS, mientras que para la formación de AL y R-PAC su función sería irrelevante.<sup>4,7,8</sup> Lo cual no fue lo observado durante la dinámica molecular del sistema APH<sup>+</sup>, sino que por el contrario, el Trp586 interacciona con el sustrato benzaldehído estabilizando la densidad de carga del anillo de benceno, al igual que la Phe201 aunque con una energía de estabilización menor. En cuanto a la Arg380, este residuo se mantuvo alejado del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> con distancias entre los 8,47 Å y los 12,6 Å, por lo que no presentó interacción ni con el intermediario HETHDP ni con el sustrato benzaldehído, tal cual indican los resultados experimentales publicados en literatura, que postulan que la Arg380 no tendría un rol catalítico en la formación de R-PAC, lo cual concuerda con lo observado en el sitio activo 1 del sistema APH<sup>+</sup>.

Pese a que todas las interacciones de enlaces de hidrógeno reportadas en literatura entre los residuos Glu139, Gly523 y Met525 del sitio activo 1 del sistema APH<sup>+</sup> y el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> se mantuvieron a lo largo de la simulación, el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_P$  del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> fue de  $-48 \pm 1^\circ$ , Figura 3.71, en donde los valores experimentales reportados para las etapas de activación del cofactor ThDP corresponden a  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$  para los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$ , respectivamente. Es posible que la desviación en el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  durante la simulación en comparación al valor experimental, pueda deberse al carácter electrofílico del grupo imino protonado, catión imonio, el cual está enlazado al anillo de pirimidina. Esto debido a que, según los resultados obtenidos, esta forma tautomérica del anillo de pirimidina favorece la interacción de la Gln202 con el oxígeno  $O_\alpha$  del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, por sobre la interacción entre la Gln202 y el nitrógeno N4', interacción que al parecer solo se ve favorecida cuando el estado de protonación del anillo de pirimidina es AP o IP. En donde la interacción por enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el nitrógeno N4' del intermediario HETHDP provoca que el anillo de pirimidina experimente una torsión hacia la zona en que se encuentra

Gln202 y no hacia la zona en donde esta ubicada la Met525, generando que el ángulo diedro  $\Phi_P$  adopte valores mas negativos producto de interacción con la Gln202.

A pesar de esta desviación del ángulo diedro  $\Phi_P$  durante la simulación en comparación al valor experimental, el complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> del sitio activo 1 del sistema APH<sup>+</sup> mantuvo durante los 100 ns de simulación las interacciones residuo sustrato reportadas en literatura. En cuanto al ángulo diedro  $\Phi_T$  este presentó un valor promedio de  $100,4 \pm 0,7^\circ$  durante los 100 ns de dinámica de producción, valor que se encuentra en concordancia con el valor experimental de  $\pm 95^\circ$  reportado para la conformación tipo V en las etapas de activación del cofactor ThDP.

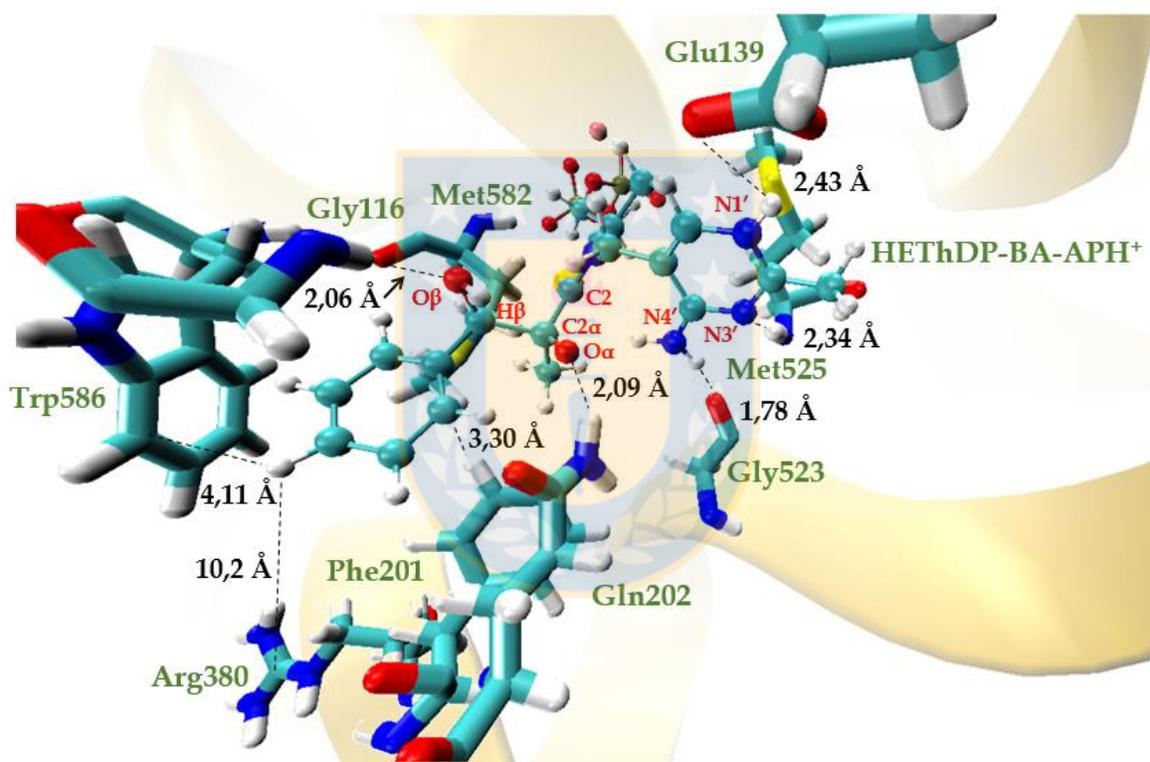


**Figura 3.71.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HETHDP-BA- APH<sup>+</sup> para el sitio activo 1 del sistema APH<sup>+</sup> para los 100 ns de DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Similares resultados se observaron en el sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>, en donde las interacciones residuo sustrato reportadas en literatura se han mantenido durante toda la dinámica de producción.<sup>3-8</sup> La Gly116 se mantuvo interaccionando a través de un enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico  $O_\beta$  del sustrato benzaldehído con una distancia promedio de  $2,20 \pm 0,04 \text{ \AA}$ . Lo mismo ocurrió con el enlace de hidrógeno entre el Glu139 y el hidrógeno enlazado al nitrógeno N1' del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>,

el cual presentó una distancia promedio de  $1,84 \pm 0,02 \text{ \AA}$  y el enlace de hidrógeno entre la Gly523 y uno de los hidrógenos del grupo imino protonado del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, tal como se observa en la Figura 3.72 correspondiente a la estructura promedio de los 100 ns de simulación del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>. Por su parte la Gln202, al igual que el sitio activo 1 y a diferencia de lo que se observó en los sistemas AP e IP, se mantuvo interaccionando mediante un enlace de hidrógeno con el oxígeno O<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> en concordancia con lo reportado en literatura, con una distancia promedio de  $2,13 \pm 0,02 \text{ \AA}$  durante la simulación.

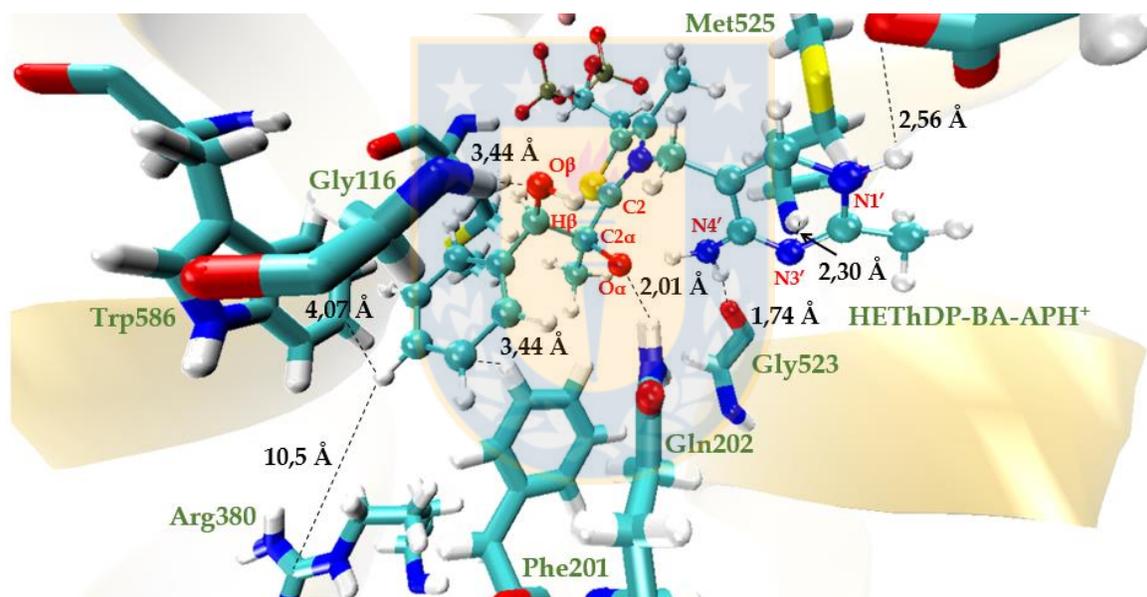


**Figura 3.72.** Estructura promedio sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> para 100ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

Otra de las interacciones presentes en el sitio activo del sistema APH<sup>+</sup> es el enlace de hidrógeno entre el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-APH<sup>+</sup>, interacción que presentó una distancia promedio de  $2,37 \pm 0,02 \text{ \AA}$ . Para el caso del Trp586 y la Phe201,

al igual que en el sitio activo 1 del sistema APH<sup>+</sup>, estos aminoácidos se mantuvieron orientados y con distancias cercanas al anillo de benceno del sustrato benzaldehído, estabilizando la densidad electrónica de los electrones  $\pi$  del anillo de benceno mediante interacciones  $\pi$ -stacking entre los anillos aromáticos de los residuos, como se observa en la Figura 3.73, Figura correspondiente a la estructura promedio de las dos zonas de mayor estabilidad conformacional que se ubican entre los 35 ns y los 80 ns de simulación. En cuanto a la Arg380, este residuo se mantuvo alejado del sustrato benzaldehído y del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, con distancias entre el grupo guanidinio de la cadena lateral de la Arg380 y el anillo de benceno del benzaldehído entre los 9 Å y los 12 Å.



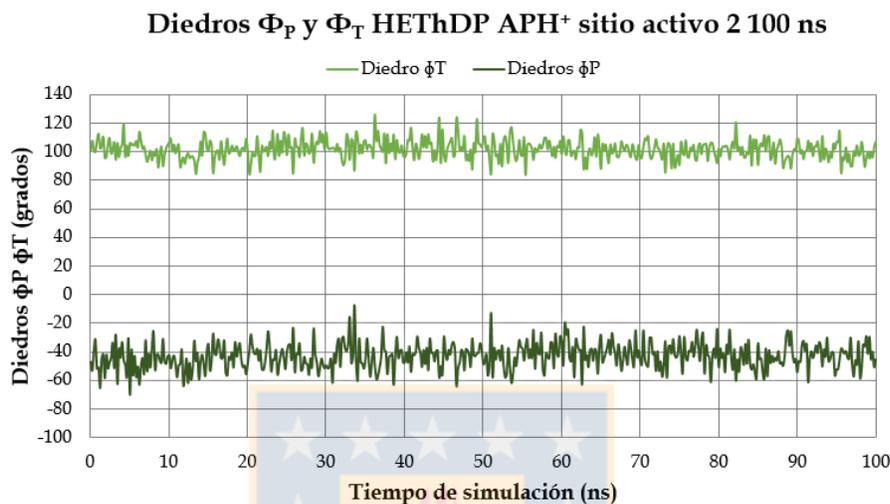
**Figura 3.73.** Estructura promedio sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> para el intervalo entre los 35 ns y los 80 ns DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a los valores promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  para el complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>, estos mostraron valores similares a los registrados en el sitio activo 1 del mismo sistema, consecuencia directa de que en ambos sitios activos las interacciones no enlazantes entre los residuos que

componen el sitio activo, el sustrato benzaldehído y el intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> fueron idénticas entre si y coincidieron por lo demás con las reportadas en literatura. Es así como el ángulo diedro  $\Phi_P$  adoptó un valor promedio de  $-43,37 \pm 1,05^\circ$  durante los 100 ns de simulación, valor promedio que se aleja del valor experimental de  $\pm 70^\circ$ , el cual es necesario para mantener la conformación tipo V en las etapas de activación del cofactor ThDP y del valor experimental de  $-60^\circ$ , presente en el cofactor ThDP del denominado sitio activo 2 de la estructura cristalina 1N0H utilizada para la construcción de los sistemas en estudio. Sin embargo, el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  no cambió la geometría de la conformación activa tipo V del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> durante la simulación, ni tampoco afectó las interacciones no enlazantes residuo sustrato. El valor promedio que adquiere el ángulo diedro  $\Phi_P$  durante la simulación es consecuencia de que las interacciones residuos sustrato reportadas en literatura para los residuos Gly116 y Gln202 se hayan mantenido durante la dinámica de producción en el sistema APH<sup>+</sup>, lo cual se debe al estado de protonación del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, ya que el carácter electrofílico del grupo imonio desfavorece la estabilidad del enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el nitrógeno N4' del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>. Este resultado permite inferir que quizás el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  para el intermediario HETHDP en la tercera etapa del ciclo catalítico de la enzima AHAS debe ser mayor a los  $-70^\circ$  producto de que las interacciones de enlaces de hidrógeno entre los residuos Gly523 y Met525 con el anillo de pirimidina del intermediario provocan la torsión del ángulo diedro  $\Phi_P$ , inclinando al anillo de pirimidina hacia la zona en que se ubican los residuos, generando de esta manera que el ángulo diedro adopte valores un tanto mayores a los  $-70^\circ$ . De esta manera, valores mayores a los  $-70^\circ$  permitirían una conformación activa tipo V del intermediario HETHDP acorde a la cantidad de átomos enlazados al carbono C2 del anillo de tiazolio, ya que las geometrías entre los intermediarios HETHDP e iluro ThDP no debieran presentar valores idénticos para el ángulo diedro  $\Phi_P$  al momento de encontrarse bajo la conformación activa tipo V, debido al mayor tamaño del intermediario HETHDP en la zona de anillo de tiazolio. En cuanto al ángulo diedro  $\Phi_T$ ,

este presentó un valor promedio de  $101,8 \pm 0,8^\circ$  durante los 100 ns de dinámica de producción, tal como se muestra en la Figura 3.74. Valor que se encuentra en concordancia con el valor experimental de  $\pm 95^\circ$  reportado para las etapas de activación del cofactor ThDP.

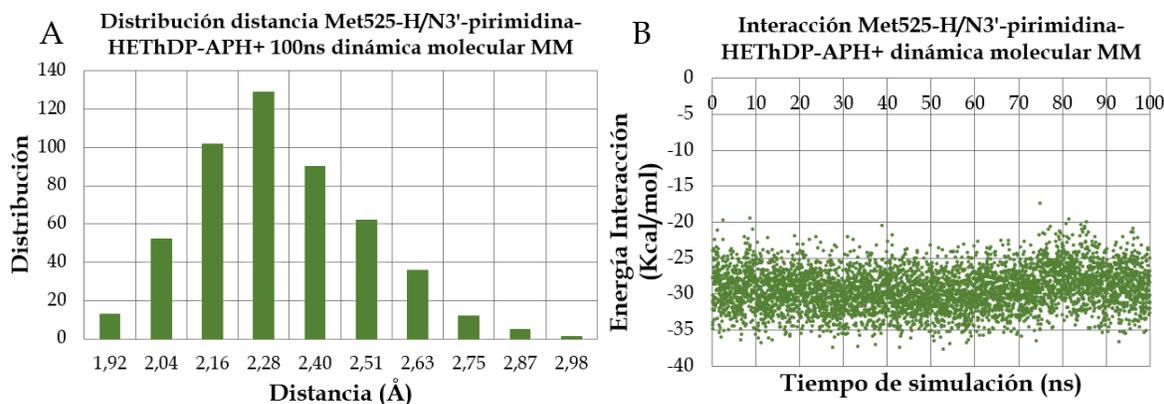


**Figura 3.74.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HETHDP-BA- APH<sup>+</sup> para el sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> para los 100 ns de DM MM.

Fuente: Elaboración propia.

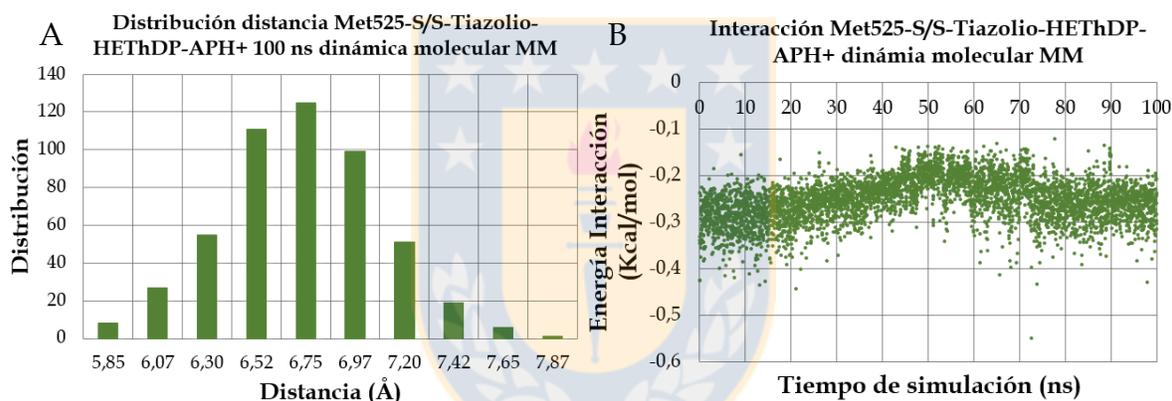
A pesar de que ambos sitios activos presentaron y mantuvieron durante los 100 ns de simulación las interacciones no enlazantes residuo sustrato reportadas en literatura, se ha seleccionado de forma arbitraria al sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> como el sitio activo desde donde se escogió a la estructura representativa del sistema APH<sup>+</sup> para realizar las posteriores simulaciones de dinámica molecular QM/MM. Para una mayor descripción del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>, se presenta un análisis detallado de cada una de las interacciones no enlazantes de los aminoácidos durante los 100 ns de dinámica de producción.

**Met525:** Durante toda la simulación la Met525 mantuvo una interacción mediante enlace de hidrógeno con el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina, con una distancia promedio de  $2,37 \pm 0,02 \text{ \AA}$ , Figura 3.75-A y una energía de interacción promedio de  $-29,34 \pm 0,10 \text{ Kcal/mol}$ , Figura 3.75-B. A pesar de esto, el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_P$  fue  $-43,4 \pm 1,1^\circ$  alejándose del valor experimental de  $\pm 70^\circ$ , lo cual es consecuencia directa de la presencia de las interacciones Met525-H/N3'-HETHDP-APH<sup>+</sup> y Gly523-O/H-Ionio-HETHDP-APH<sup>+</sup> y de la ausencia de la interacción Gln202-H/N4'-HETHDP-APH<sup>+</sup>, interacción que condiciona al ángulo diedro  $\Phi_P$  a valores más negativos cercanos a los  $-70^\circ$ , de acuerdo a lo observado en los sistemas IP y AP. En base a estos resultados, es posible inferir que para que las interacciones residuos sustrato reportadas en literatura se mantengan durante la tercera etapa del ciclo catalítico, el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP debe estar bajo la forma de APH<sup>+</sup> y el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  para la conformación tipo V debería adoptar valores mayores al valor experimental de  $-70^\circ$  reportado para las etapas de activación del cofactor ThDP. En cuanto al ángulo diedro  $\Phi_T$  este presentó un valor promedio de  $101,8 \pm 0,8^\circ$  durante la dinámica de producción, valor que se encuentra en concordancia con el valor experimental de  $\pm 95^\circ$  reportado para las etapas de activación del cofactor y con el valor del ángulo diedro del sitio activo 1 de sistema APH<sup>+</sup>. En este sentido, al igual que lo observado en los sitios activos del sistema IP, la cadena lateral de la Met525 no se orientó hacia el anillo de tiazolio, presentando una distancia promedio entre los átomos de azufre de  $6,84 \pm 0,04 \text{ \AA}$ , Figura 3.76-A y una energía de interacción promedio  $-0,25 \pm 0,01 \text{ Kcal/mol}$ , Figura 3.76-B. En su lugar la cadena se ubicó de forma vertical por detrás del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, cerca del grupo carboxilato del Glu139. Esto da cuenta de que la interacción entre la cadena lateral de la Met525 y el anillo de tiazolio no condiciona el valor del ángulo diedro  $\Phi_T$  ya que en el sistema IP la orientación de la Met525 fue similar y los valores del ángulo diedro si variaron con respecto al valor experimental.



**Figura 3.75.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Met525-H/N3'-pirimidina y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

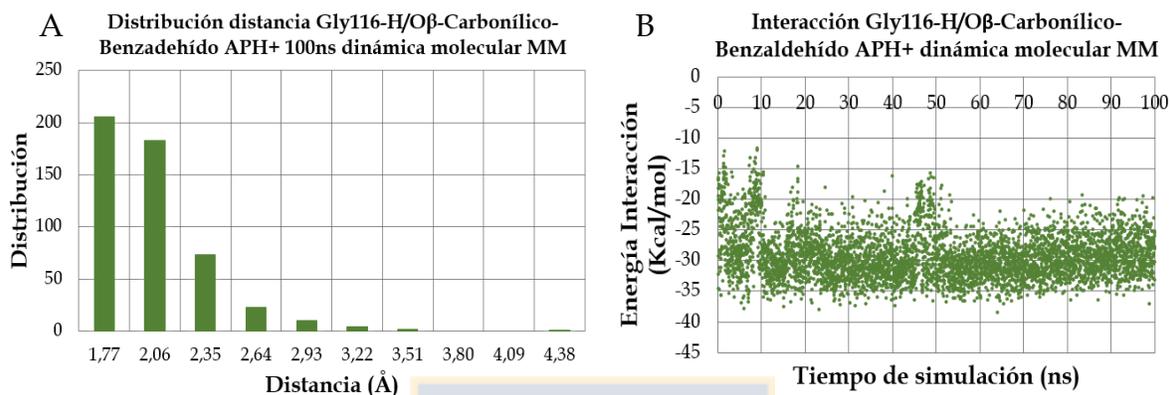


**Figura 3.76.** A-Distribución distancia interacción Met525-S/S-tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

**Gly116:** Desde el inicio y durante toda la simulación de dinámica molecular la Gly116 se mantuvo orientada hacia el oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> del sustrato benzaldehído, formando un enlace de hidrógeno entre el oxígeno O<sub>β</sub> y el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Gly116, con una distancia promedio para los 100 ns de simulación de  $2,20 \pm 0,04$  Å, Figura 3.77-A y un valor de energía de interacción promedio de  $-29,18 \pm 0,14$  Kcal/mol, Figura 3.77-B. Este resultado coincide con lo reportado en literatura para la Gly116<sup>4</sup> y a diferencia de lo observado en los sitios activos de los sistemas AP e IP, el sistema APH<sup>+</sup> fue el único sistema en donde se

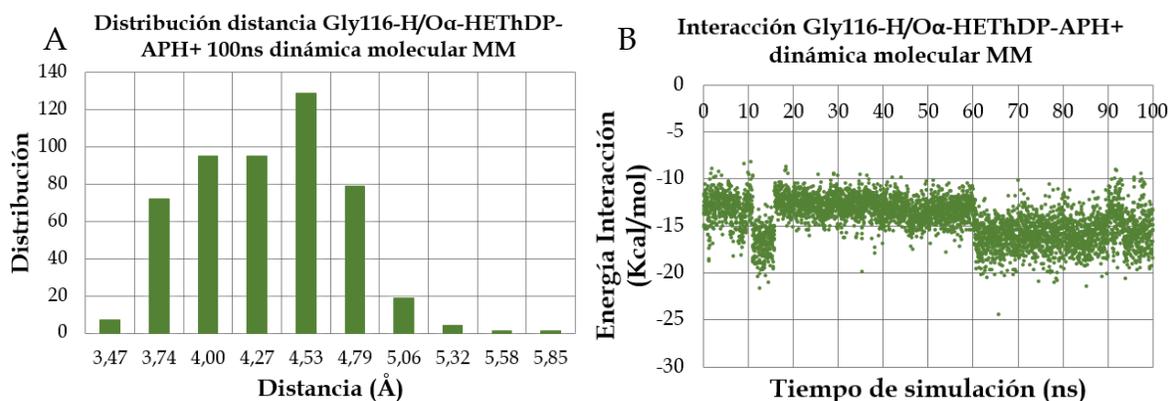
observó esta interacción. En este sentido, el estado de protonación del anillo de pirimidina a la forma de APH<sup>+</sup>, ha provocado que la Gln202 genere una interacción con el oxígeno O<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, por sobre la interacción con el nitrógeno N4' del grupo imonio.



**Figura 3.77. A-**Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O<sub>β</sub>-Benzaldehído y **B-**Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

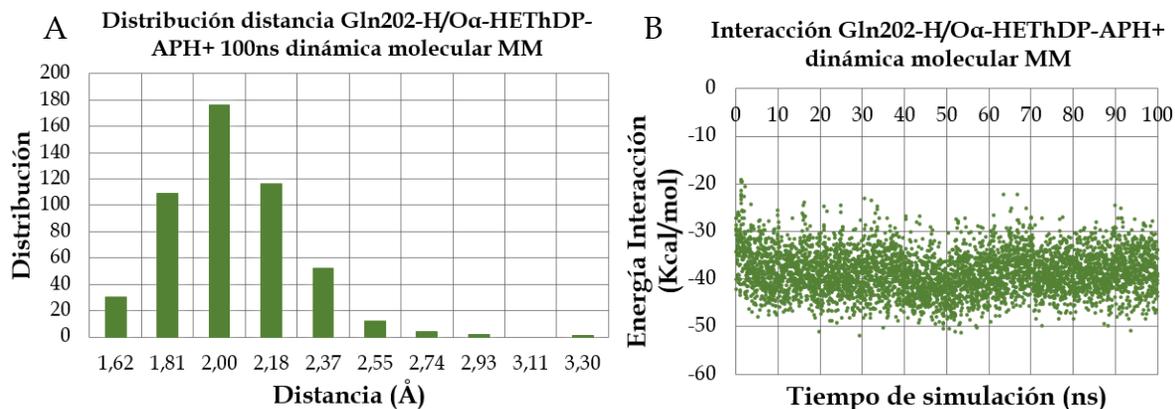
Como consecuencia de la interacción entre la Gln202 y el oxígeno O<sub>α</sub>, durante la simulación la Gly116 se encuentra alejada del oxígeno O<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, lo que favorece la formación del enlace de hidrógeno entre la Gly116 y el oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> del benzaldehído. Prueba de ello es la distancia promedio entre el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Gly116 y el oxígeno O<sub>α</sub> del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, cuyo valor fue de  $4,46 \pm 0,05$  Å para los 100 ns de simulación, Figura 3.78-A y la energía de interacción promedio de  $-14,26 \pm 0,14$  Kcal/mol, representada en la Figura 3.78-B.



**Figura 3.78.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gly116-H/O $\alpha$ -HETHDP-APH+ B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH+.

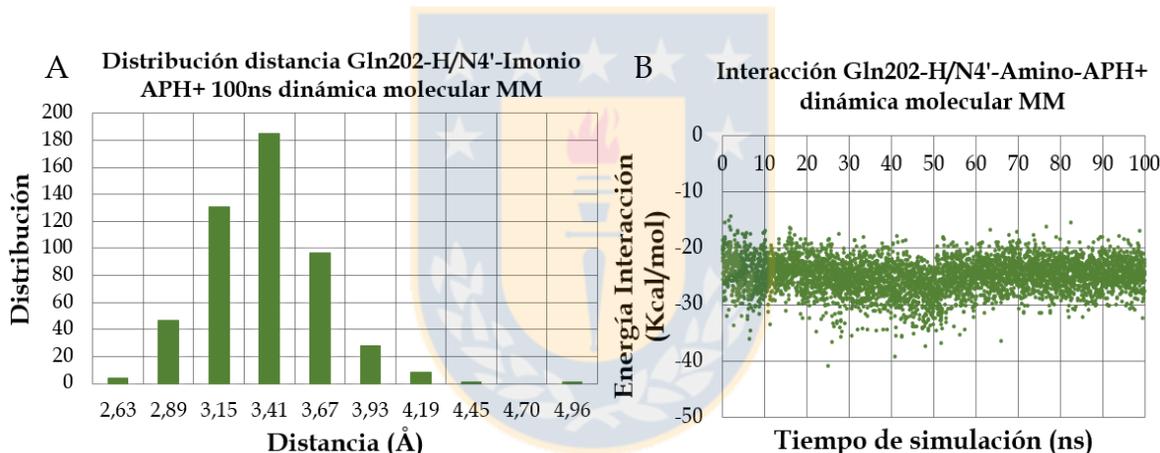
Fuente: Elaboración propia.

**Gln202:** Durante toda la simulación la cadena lateral de la Gln202 se mantuvo orientada hacia el oxígeno O $\alpha$  del complejo HETHDP-BA-APH+, formando un enlace de hidrógeno entre uno de los hidrógenos del grupo amida de la cadena lateral de la Gln202 y el oxígeno O $\alpha$ , interacción que está en concordancia con lo reportado en literatura.<sup>4,5</sup> El enlace de hidrógeno tuvo un valor de distancia promedio para los 100 ns de simulación de  $2,13 \pm 0,03$  Å, representado en la Figura 3.79-A y un valor de energía de interacción promedio de  $-38,60 \pm 0,14$  Kcal/mol, representado en la Figura 3.79-B. Esta interacción por enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el oxígeno O $\alpha$  es consecuencia directa del estado de protonación del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-APH+, ya que el grupo imino protonado, catión imonio, enlazado al anillo de pirimidina, al poseer en teoría un mayor carácter electrofílico que los estados de protonación del anillo de pirimidina en los sistema AP e IP, la interacción de la Gln202 con el nitrógeno N4' del grupo imonio se ve desfavorecida. Debido a esto, la distancia promedio durante la simulación entre uno de los hidrógenos del grupo amida de la Gln202 y el nitrógeno N4' del catión imonio fue de  $3,50 \pm 0,03$  Å, Figura 3.80-A y su energía de interacción promedio de  $-24,91 \pm 0,11$  Kcal/mol, Figura 3.80-B, en donde la orientación entre la Gln202 y el nitrógeno N4' nunca fue favorable.



**Figura 3.79.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/O $\alpha$ -HETHDP-APH<sup>+</sup> y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

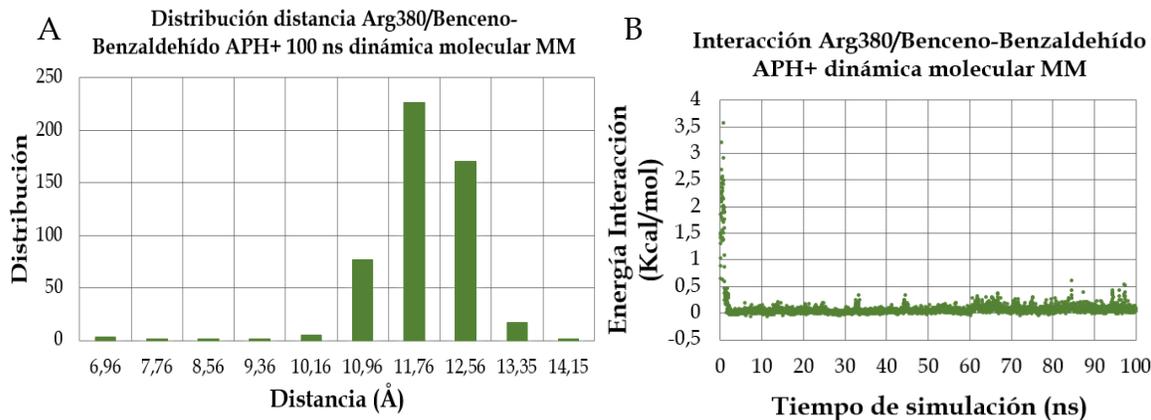


**Figura 3.80.** A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-Iminio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

**Arg380:** Al igual que en los sitios activos seleccionados de los sistema AP e IP, durante la simulación del sistema APH<sup>+</sup>, la ubicación de la Arg380 se encuentra distante tanto del sustrato benzaldehído como del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>. Es así como el grupo guanidinio de la cadena lateral de la Arg380 del sitio activo 2 se encuentra alejado del anillo de benceno del sustrato benzaldehído, con una distancia promedio entre los centros geométricos de ambos grupos de  $12,30 \pm 0,09 \text{ \AA}$ , Figura 3.81-A y una

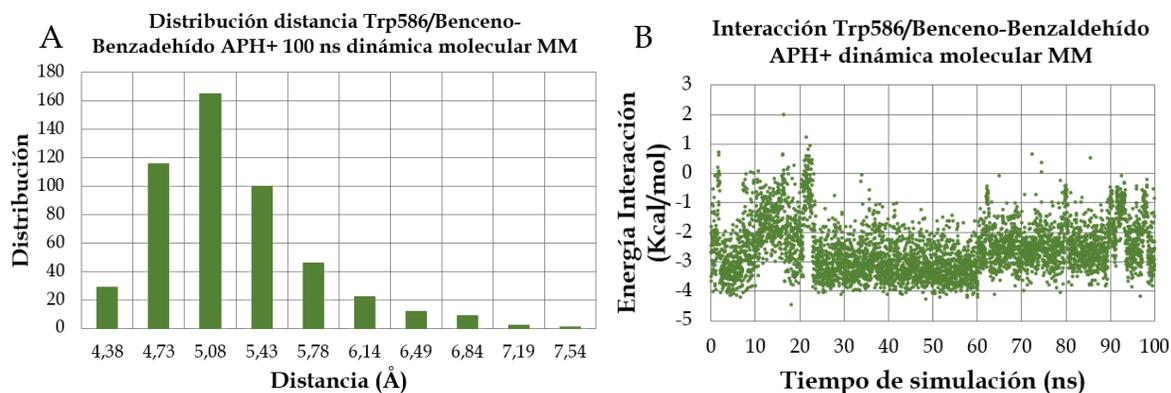
energía de interacción promedio de  $0,08 \pm 0,01$  Kcal/mol, Figura 3.81-B. Tal como se indica en bibliografía la Arg380 no tendría un rol catalítico en la formación de R-PAC<sup>4</sup>, lo cual está en concordancia con lo observado en el sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>.



**Figura 3.81. A-Distribución distancia interacción Arg380/Benceno-Benzaldehído y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.**

Fuente: Elaboración propia.

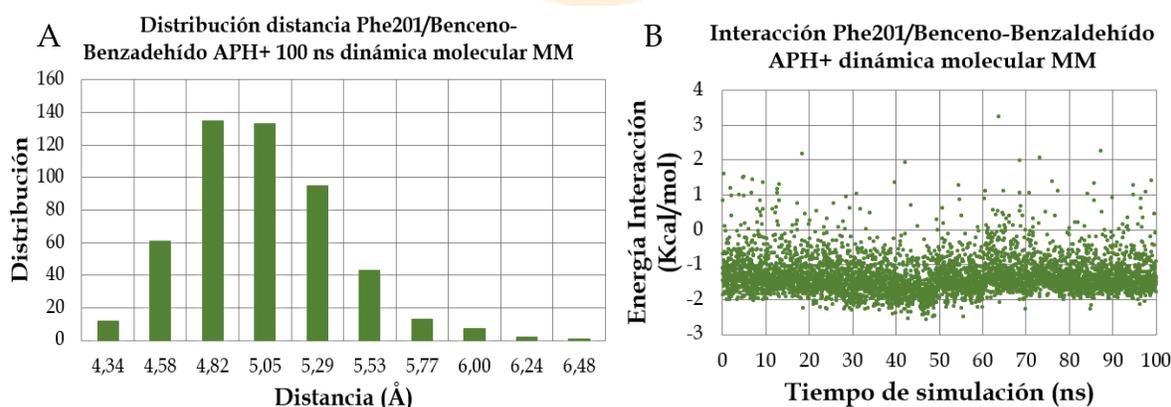
**Trp586:** Durante la simulación el anillo de indol de la cadena lateral del residuo Trp586 se mantiene orientado hacia el anillo de benceno del sustrato benzaldehído. La distancia promedio entre los centros geométricos de ambos anillos aromáticos durante la simulación es de  $5,40 \pm 0,06$  Å, Figura 3.82-A, mientras que la energía de interacción promedio es de  $-2,54 \pm 0,03$  Kcal/mol, Figura 3.82-B. Durante la simulación, los anillos aromáticos de indol y benceno forman una interacción  $\pi$ -stacking, la cual según la visualización de la trayectoria se acomoda en una conformación tipo T. Idéntico resultado fue observado en los sitios activos 1 y 2 de los sistemas AP e IP respectivamente, dando cuenta de que al parecer, a pesar de que los resultados experimentales no atribuyen un rol catalítico al residuo Trp586 en la formación de R-PAC<sup>4,7,8</sup> el anillo de indol del Trp586 si participa en la estabilización de la densidad electrónica de los electrones pi del anillo de benceno del sustrato benzaldehído, otorgando al Trp586 un rol catalítico secundario o de menor relevancia en la formación de R-PAC.



**Figura 3.82. A-**Distribución distancia interacción Trp586/Benceno-Benzaldehído y **B-**Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

**Phe201:** Durante toda la dinámica de producción la cadena lateral de la Phe201, correspondiente a un grupo fenilo, se encuentra orientada hacia el anillo de benceno del sustrato benzaldehído, con una distancia promedio entre los centros geométricos de ambos anillos aromáticos de  $5,16 \pm 0,04$  Å, Figura 3.83-A. De esta manera, la cadena lateral de la Phe201 estabiliza la densidad electrónica del anillo de benceno del sustrato benzaldehído mediante una interacción  $\pi$ -stacking con conformación tipo T entre los anillos aromáticos, la cual presenta una energía de interacción promedio para los 100 ns de simulación de  $-1,32 \pm 0,02$  Å, representada en la Figura 3.83-B.

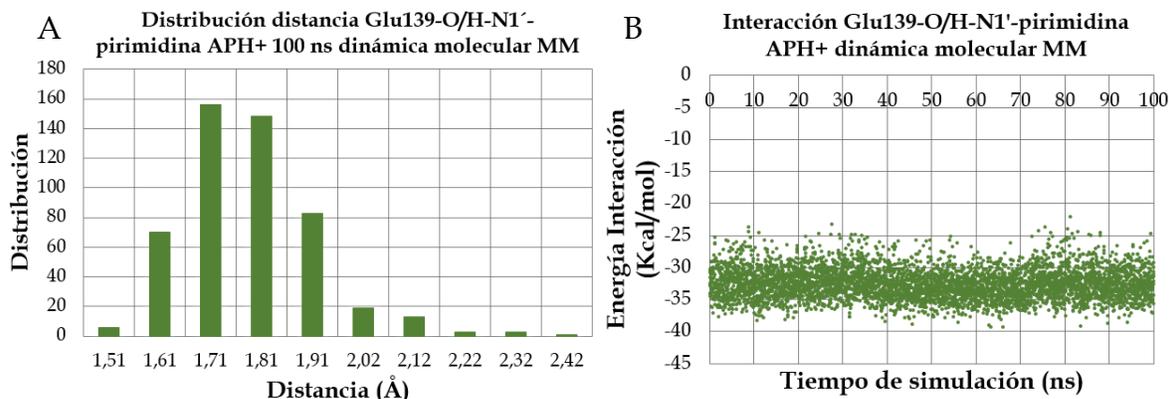


**Figura 3.83. A-**Distribución distancia interacción Phe201/Benceno-Benzaldehído y **B-**Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

Este resultado es similar y concuerda con lo observado tanto en el sitio activo 1 del sistema AP, como en el sitio activo 2 del sistema IP, ya que en ambos sitios activos, la cadena lateral de la Phe201 se encontró a distancias cercanas del anillo de benceno del sustrato benzaldehído, estabilizando la densidad electrónica de los electrones pi del anillo mediante una interacción  $\pi$ -stacking con conformación tipo T. En este sentido, los estudios experimentales de mutaciones sitio dirigidas sobre la Phe201 muestran que su importancia radica en mantener a la Arg380 a adoptar la conformación correcta al momento de estabilizar al grupo carboxilato de la molécula de piruvato en la formación de AL, pero que en la formación de R-PAC no juegan un rol catalítico importante debido que la Arg380 se encuentra alejada del sustrato benzaldehído.<sup>4</sup> Sin embargo, en el sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> al igual que en los sistemas AP e IP, la Phe201 no se encuentra a distancias cercana de la Arg380 a pesar de que este residuo se aleja del benzaldehído durante la simulación, sino que por el contrario la cadena lateral de la Phe201 se encuentra cercana al sustrato benzaldehído formando una interacción  $\pi$ -stacking que participa en la estabilización del sustrato aunque con una energía de estabilización baja debido a la naturaleza de la interacción.

**Glu139:** Al igual que en los sitios activos 1 y 2 de los sistemas AP e IP, respectivamente, durante toda la simulación el Glu139 mantiene una interacción por enlace de hidrógeno entre los oxígenos del grupo carboxilato del residuo Glu139 y el hidrógeno enlazado al nitrógeno N1' del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>. El valor de la distancia promedio durante la simulación en referencia a uno de los oxígenos del grupo carboxilato es de  $1,83 \pm 0,04$  Å, Figura 3.84-A, mientras que el valor de la energía de interacción promedio para el enlace de hidrógeno es de  $-32,54 \pm 0,09$  Kcal/mol, Figura 3.84-B. La presencia de esta interacción concuerda con lo reportado en literatura, interacción que es fundamental para otorgar la estabilidad del estado de protonación del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, ya que estabiliza la deficiencia electrónica que presenta el grupo imonio en el anillo de pirimidina.<sup>5,6</sup>

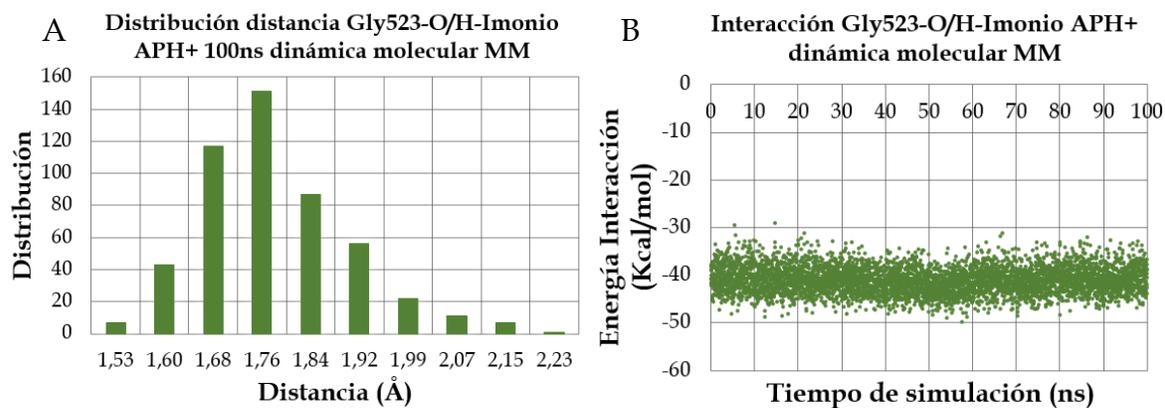


**Figura 3.84.** **A**-Distribución distancia enlace de hidrógeno Glu139-O/H-N1'-Pirimidina y **B**-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

**Gly523:** Al igual que en los sitios activos 1 y 2 de los sistemas AP e IP, respectivamente y en concordancia con lo reportado en la estructura cristalina 1N0H de la enzima AHAS,<sup>3</sup> la Gly523 mantuvo durante los 100 ns de simulación una interacción mediante enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del backbone del residuo y uno de los hidrógenos del grupo imino protonado, catión imonio, enlazado al anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, específicamente el que se encuentra más alejado del anillo de tiazolio, como se aprecia en las Figuras 3.72 y 3.73. La distancia promedio durante la simulación para este enlace de hidrógeno fue de  $1,82 \pm 0,01$  Å, representado en la Figura 3.85-A, mientras que el valor de la energía de interacción promedio fue de  $-41,04 \pm 0,10$  Kcal/mol, Figura 3.85-B. Esta interacción por enlace de hidrógeno, además de estabilizar la deficiencia de densidad electrónica del grupo imino protonado enlazado al anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, está directamente relacionada con el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  favoreciendo a que adopte valores mayores a los  $-70^\circ$ , debido a la inclinación que induce sobre el anillo de pirimidina, provocando la torsión del ángulo diedro  $\Phi_P$ . De esta manera el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  durante la simulación adquirió valores mayores a los referidos tanto en la estructura cristalina 1N0H, en donde el cofactor ThDP se encuentra a la forma de iluro y el valor

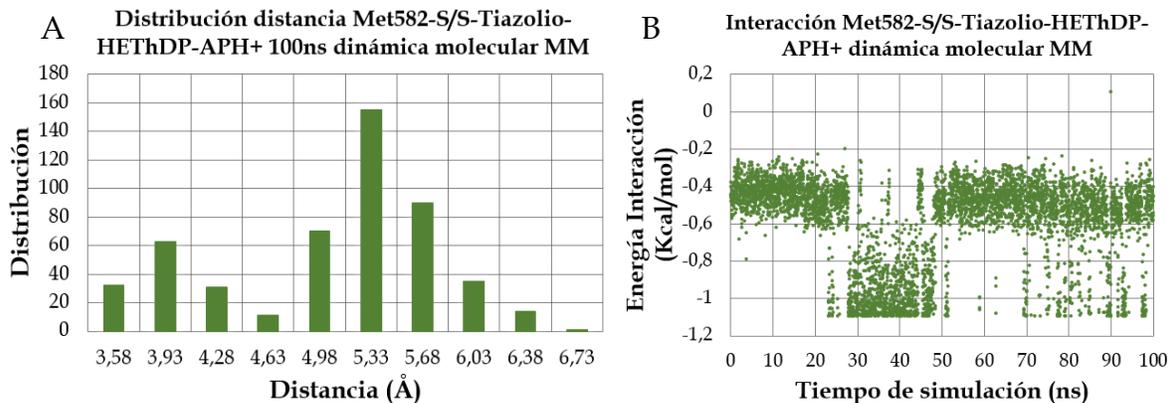
del ángulo diedro  $\Phi_P$  es  $-60^\circ$ ,<sup>3</sup> como para el valor experimental de la conformación tipo V de  $-70^\circ$  para las etapas de activación de cofactor ThDP.<sup>10-12</sup>



**Figura 3.85. A-Distribución distancia enlace de hidrógeno Gluy523-O/H-Ionio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.**

Fuente: Elaboración propia.

**Met582:** Durante los 100 ns de dinámica de producción el átomo de azufre y el grupo metilo terminal de la cadena lateral de la Met582 se mantuvieron distanciados del anillo de tiazolio del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>. La distancia promedio entre el átomo de azufre de la Met582 y el átomo de azufre del anillo de tiazolio fue de  $5,24 \pm 0,08$  Å, representada en la Figura 3.86-A y el valor de la energía de interacción promedio de  $-0,60 \pm 0,01$  Kcal/mol, representada en la Figura 3.86-B. A pesar de esto, el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_T$  fue de  $101,8^\circ$ , valor que está en concordancia con lo reportado en literatura. Estos resultados permiten inferir que la posición de la Met582 en torno al anillo de tiazol no influye en el valor del ángulo diedro  $\Phi_T$ , ya que este puede variar del valor experimental de  $\pm 95^\circ$  sin importar la orientación de la Met582. En este sentido, lo reportado en literatura señala que la Met582 solo cumple un rol estructural y no catalítico, debido a que se encuentra en una zona hidrofóbica ubicada entre los cofactores ThDP, FAD y el residuo Trp586,<sup>8</sup> lo cual coincide con los observado tanto en el sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>, como también en los sitios activos 1 y 2 de los sistemas AP e IP.



**Figura 3.86.** A-Distribución distancia interacción Met582-S/S-Tiazolio y B-Variación de la energía de interacción 100 ns DM sitio activo 2 sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

Las distancias promedio residuos sustratos de ambos sitios activos y las energías de interacción promedio del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>, se muestran en la tabla 3.6. En ella se aprecia que la mayor energía de interacción corresponde al enlace de hidrógeno Gly523-O/H-Imonio-HETHDP-APH<sup>+</sup>, interacción que concuerda con lo reportado en literatura<sup>3</sup> y que además es responsable de la torsión del anillo de pirimidina, influyendo a que el ángulo diedro  $\Phi_P$  adopte valores mayores a los  $-70^\circ$ , sin perder la conformación activa tipo V del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>. Le sigue en estabilidad la interacción por enlace de hidrógeno Gln202-H/O <sub>$\alpha$</sub> -HETHDP-APH<sup>+</sup>, la cual al igual que todas las interacción presentes en el sitio activo del sistema APH<sup>+</sup> concuerda con los resultados experimentales reportados en literatura. Esta interacción es fundamental para estabilizar la densidad electrónica del oxígeno O <sub>$\alpha$</sub>  del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, el cual queda desprotonado una vez producida la transferencia protónica hacia el oxígeno carbonílico O <sub>$\beta$</sub>  del benzaldehído. Además, esta interacción se encuentra favorecida por sobre la interacción Gln202-H/N4'-HETHDP-APH<sup>+</sup> debido al carácter electrofílico del grupo imino protonado o catión imonio, el cual está enlazado al anillo de pirimidina.<sup>4,5</sup> Producto de esta disminución en la estabilización del enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-HETHDP-APH<sup>+</sup>, comparado con lo que se

observó en el sitio activo del sistema AP, la torsión del ángulo diedro  $\Phi_P$  queda condicionado hacia valores mayores a los  $-70^\circ$ , sin perder la conformación activa tipo V del intermediario HETHDP durante la simulación. En base a estos resultados se puede inferir que el estado de protonación del nitrógeno N4', enlazado al anillo de pirimidina, necesario para la formación de R-PAC, debe ser la forma 4'-iminopirimidinio (APH<sup>+</sup>), ya que mantiene las interacciones no enlazantes del sitio activo reportadas en literatura junto con la conformación tipo V del intermediario HETHDP.

**Tabla 3.6: Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo 1 y 2 del sistema APH<sup>+</sup> y energías de interacción promedio del sitio activo 2 para 100 ns de dinámica molecular MM.**

Interacción residuo-sustrato	Distancia (Å) sitio activo 1	Distancia (Å) sitio activo 2	Energía (Kcal/mol)* sitio activo 2
Met525-H/N3'-HETHDP-APH <sup>+</sup>	2,51 ± 0,03	2,37 ± 0,02	-29
Met525-S/S-HETHDP-APH <sup>+</sup>	6,28 ± 0,05	6,84 ± 0,04	-0,3
Gly116-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-APH <sup>+</sup>	4,16 ± 0,04	4,46 ± 0,05	-14
Gly116-H/O <sub>β</sub> -Benzaldehído	3,17 ± 0,06	2,20 ± 0,04	-29
Gln202-H/O <sub>α</sub> -HETHDP- APH <sup>+</sup>	2,10 ± 0,03	2,13 ± 0,03	-39
Gln202-H/N4' - HETHDP-APH <sup>+</sup>	3,30 ± 0,03	3,50 ± 0,03	-25
Arg380/Benzaldehído	12,6 ± 0,1	12,3 ± 0,1	0,1
Trp586/Benzaldehído	5,13 ± 0,05	5,40 ± 0,06	-2,5
Phe201/Benzaldehído	5,34 ± 0,03	5,16 ± 0,04	-1,3
Glu139-H/N1'-HETHDP-APH <sup>+</sup>	2,05 ± 0,02	1,83 ± 0,04	-32
Gly523-O/H-Imonio-HETHDP-APH <sup>+</sup>	1,94 ± 0,02	1,82 ± 0,01	-41
Met582-S/S-Tiazolio-HETHDP-APH <sup>+</sup>	4,96 ± 0,10	5,24 ± 0,08	-0,6

\*Al igual que en el sistema AP las energías de interacción fueron calculadas en fase gas con una constante dieléctrica de 1 y considerando solo a los átomos involucrados en la interacción, por ejemplo el oxígeno del carboxilato del Glu139 y el hidrógeno enlazado al N1' del anillo de pirimidina.

Fuente: Elaboración propia.

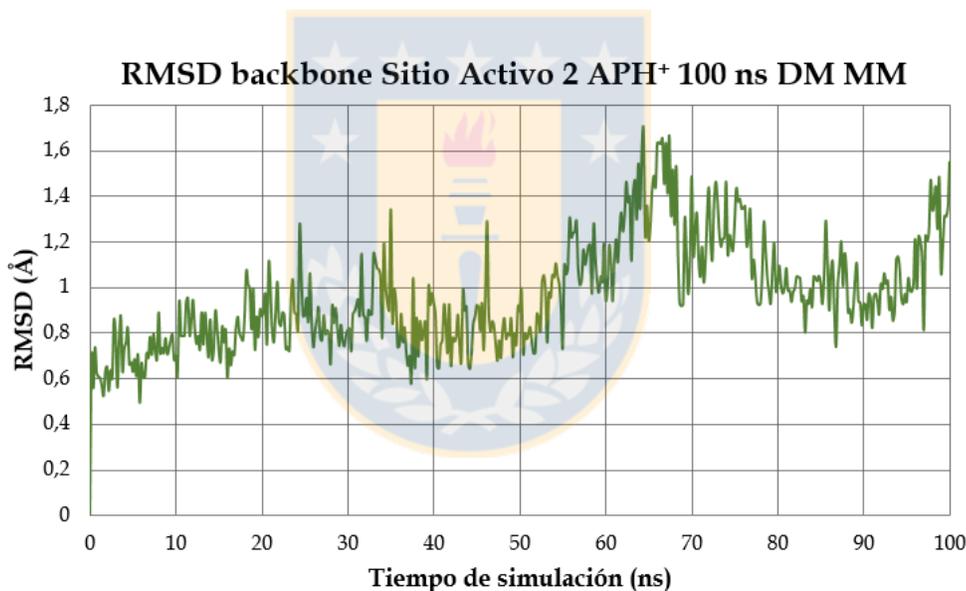
La tercera interacción más estable en el sitio activo del sistema APH<sup>+</sup> corresponde el enlace de hidrógeno Glu139-O/H-N1'-HETHDP-APH<sup>+</sup>, el cual está en conformidad con los resultados reportados en literatura y que por lo demás es fundamental para otorgar la estabilidad del estado de protonación del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>.<sup>5, 6</sup> Con similares energías se encuentran las interacciones por enlace de hidrógeno Gly116-H/O<sub>β</sub>-Benzaldehído y Met525-H/N3'-HETHDP-APH<sup>+</sup>, interacciones que se encuentran en concordancia con lo reportado en literatura.<sup>4,9</sup> Para el caso de la Gly116 y a diferencia de lo que se observó en los sistemas AP e IP, el enlace de hidrógeno que forma con el oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> del benzaldehído se encuentra favorecido energéticamente por sobre la interacción con el oxígeno O<sub>α</sub> del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, debido a la formación del enlace de hidrógeno Gln202-H/O<sub>α</sub>-HETHDP-APH<sup>+</sup>, la cual se mantiene producto del estado de protonación del grupo imonio del anillo de pirimidina. En cuanto a la Met525, esta interacción mantiene la conformación activa tipo V del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, orientando al anillo de pirimidina de tal manera que la torsión del ángulo diedro  $\Phi_P$  adopte valores mayores a -70°, sobre todo si la Gln202 no se encuentra correctamente orientada y con distancias cercanas al nitrógeno N4'. También se observó que la orientación de la cadena lateral de la Met525 no influyó en el valor del ángulo diedro  $\Phi_T$ , ya que en el sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> el valor del ángulo diedro concuerda con el reportado experimentalmente, a pesar de la orientación vertical de la cadena lateral de la Met525, que desfavorece cualquier interacción con el anillo de tiazolio del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>. Por el contrario, a pesar que en el sitio activo 2 del sistema IP la Met525 presentó una orientación similar, el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_T$  varió en 20° del valor experimental. En cuanto a los residuos Phe201 y Trp586, estos presentaron interacciones del tipo  $\pi$ -stacking, específicamente con conformación tipo T, entre los anillos aromáticos de las cadenas laterales de los residuos y el anillo de benceno del sustrato benzaldehído. A pesar de las débiles energías de estabilización promedio que presentaron estos residuos, las cuales son acordes a la naturaleza de las interacciones,<sup>13,14</sup> estos resultados permiten inferir que si

bien la Phe201 y el Trp586 no cumplen un rol catalítico fundamental en la formación de R-PAC tal como se señala en bibliografía,<sup>4,7,8</sup> su participación en la estabilidad del anillo de benceno del sustrato benzaldehído teóricamente ayuda al aumento del carácter electrofílico del carbono carbonílico del benzaldehído, aumentando la reactividad del sustrato y disminuyendo la energía de activación de la reacción. Por último, en conformidad con los resultados reportados tanto en literatura<sup>4,7,8</sup> como en los sitios activo 1 y 2 de los sistemas AP e IP, los residuos Arg380 y Met582 en el sistema APH<sup>+</sup> no presentaron participación en la formación de R-PAC.

Al igual que lo observado en el sitio activo 1 y 2 de los sistemas AP e IP, respectivamente, en el sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> se observó que varias moléculas de agua, que componen la caja de agua en la que se encuentra solvatada la enzima, entran y salen del sitio activo en forma reiterada y alternada. Desde los 20 ns de simulación dos moléculas de agua se posicionan alrededor del residuo Glu139 interactuando mediante enlaces de hidrógeno con los oxígenos del grupo carboxilato. Además desde los 40 ns de simulación moléculas de agua entran y salen del sitio activo, siempre de a una molécula a la vez, posicionándose entre el oxígeno O<sub>α</sub> del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> y el oxígeno carbonílico de la cadena lateral del residuo Gln202, formando enlaces de hidrógeno con ambos oxígenos. Por sobre los 80 ns de simulación se observó que dos moléculas más de agua se ubican alrededor del anillo de pirimidina, pero sin la orientación ni la distancia adecuada para formar enlaces de hidrógenos con alguno de los átomos del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>.

En referencia a la estabilidad conformacional del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> durante la simulación, el RMSD del backbone de los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201, Gln202, Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586, los cuales componen el sitio activo y rodean tanto al sustrato benzaldehído como al intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, presentó un valor promedio de  $0,97 \pm 0,03$  Å, el cual corresponde al menor valor comparado con los valores promedio de 1,12 Å y 1,21 Å de los RMSD de los backbones de los sitios activos 1 y 2 de los sistemas AP e IP, respectivamente. Este resultado indica

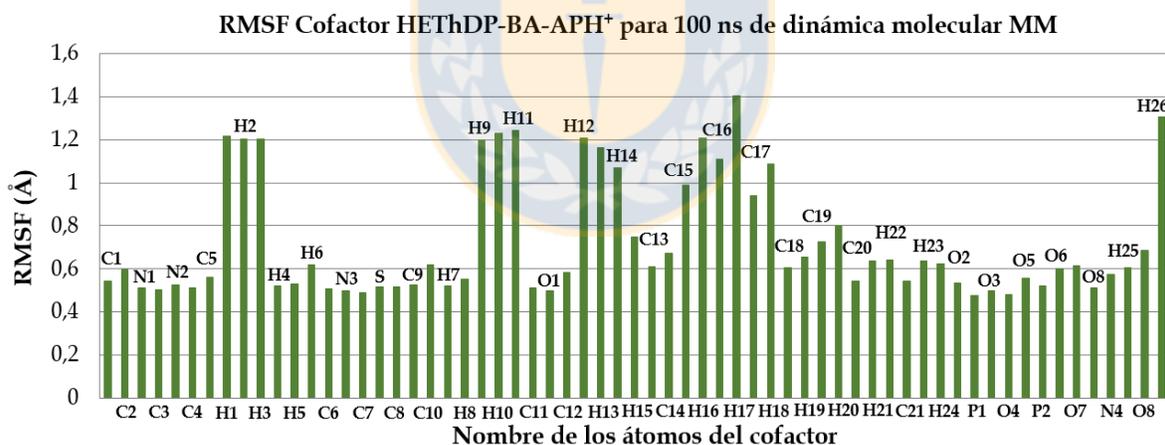
que los aminoácidos del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> presentaron un menor desplazamiento durante la simulación, lo que permite deducir que las interacciones residuo sustrato presentes en el sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> fueron más estables durante la simulación de dinámica molecular en comparación a las de los sistema AP e IP. Además, comprendida entre las zonas de estabilidad conformacional de los RMSD referentes a la totalidad de la enzima del sistema APH<sup>+</sup>, presentados en las Figuras 3.61 y 3.63, el RMSD del backbone de los residuos del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> presentó una zona de estabilidad conformacional que va desde los 35 ns hasta aproximadamente los 55 ns. Estructuras posteriores a este tiempo de simulación presentaron valores de RMSD por sobre los 1,2 Å, con variaciones que van hasta los 1,6 Å, Figura 3.87.



**Figura 3.87.** RMSD backbone de aminoácidos del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>.

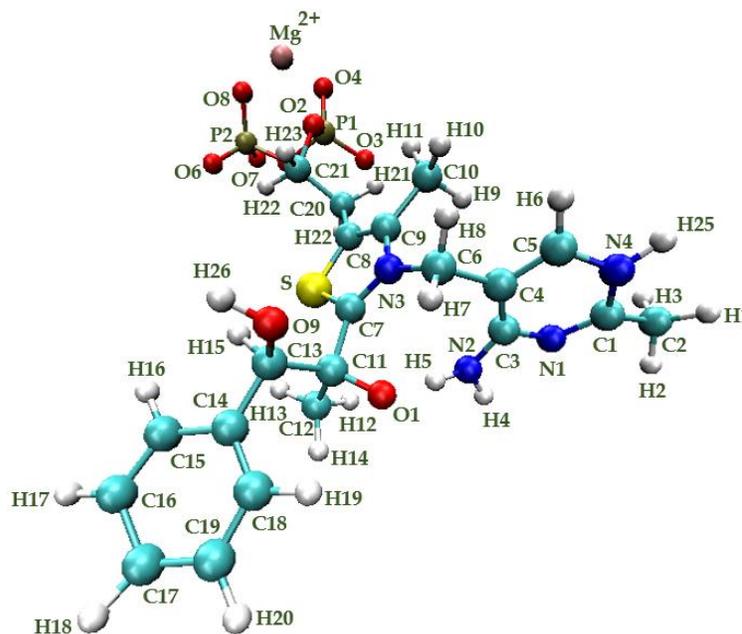
Fuente: Elaboración propia.

En cuanto al complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> del sitio activo 2, el RMSF de los átomos que lo componen, Figura 3.88, muestra que los átomos que experimentaron mayor desplazamiento durante la dinámica de producción y que tiene valores mayores a 0,6 Å corresponden principalmente a los hidrógenos de los grupos metilo del complejo, debido a la rotación del enlace carbono-carbono simple. Entre ellos se encuentran el grupo metilo del anillo de pirimidina correspondiente al carbono C2 y sus hidrógenos H1, H2 y H3, los hidrógenos H9, H10 y H11 del grupo metilo enlazado al anillo de tiazolio y los hidrógenos H12, H13 y H14 del grupo metilo que se encuentra enlazado al carbono C2α correspondiente al carbono C11, Figura 3.89. Otro de los grupos que presentó gran movilidad es el anillo de benceno del benzaldehído, el cual posee un eje de rotación en el enlace con el carbono carbonílico del benzaldehído, carbono C13. También se suma el hidrógeno H26 enlazado al oxígeno O9 (O<sub>β</sub>), el cual mostró gran movilidad debido a la interacción con las moléculas de agua circundantes que entran al sitio activo.



**Figura 3.88.** RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> para 100ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.

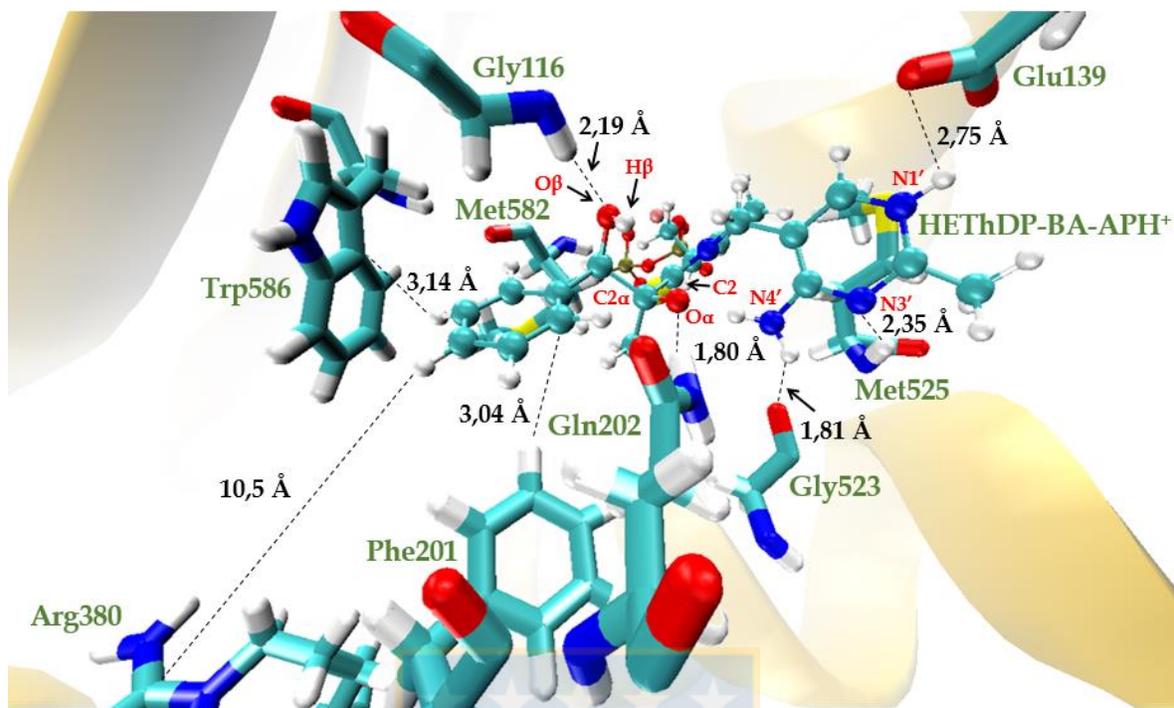
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.89.** Nombre de los átomos del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup> para 100 ns de simulación de dinámica molecular mecánico clásica.

Fuente: Elaboración propia.

En base a los resultados obtenidos para el sistema APH<sup>+</sup> se ha seleccionado como estructura de partida para los cálculos de dinámica molecular QM/MM a la estructura del sitio activo 2 correspondiente a los 50 ns de simulación, Figura 3.90. Al igual que en los sistemas AP e IP, el criterio de selección se basó en escoger al sitio activo que mejor representara las interacciones intermoleculares residuo sustrato reportadas en literatura, sitio activo desde el cual se seleccionó una estructura ubicada entre la zona de estabilidad conformacional que mostró tanto el RMSD del backbone de la totalidad de la enzima modelada, Figuras 3.61 y 3.63, como el RMSD del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>, Figura 3.87, cuya zona va desde los 35 ns hasta los 55 ns de simulación. Además, como la estructura seleccionada debe ser representativa del sitio activo seleccionado, se escogió a una estructura en concordancia con las interacciones no enlazantes presentadas en las estructuras promedio para los 100 ns de simulación, Figura 3.72 y para las dos zonas de mayor estabilidad conformacional ubicadas en el intervalo entre los 35 ns y los 80 ns de simulación, Figura 3.73.



**Figura 3.90.** Estructura del sitio activo 2 del sistema APh<sup>+</sup> correspondiente a los 50 ns de dinámica molecular mecánico clásica.

Fuente: Elaboración propia.

Entre las estructuras de la zona de estabilidad conformacional se priorizó a las que mantuvieron las interacciones no enlazantes residuo sustrato reportadas en literatura que otorgan y mantienen a la conformación activa tipo V del intermediario HETHDP. En este sentido, en la estructura seleccionada las interacciones Met525-H/N3'-HETHDP-APH<sup>+</sup> y Gly523-O/H-Amino-HETHDP-APH<sup>+</sup>, sumando a la mayor estabilidad presentada por el enlace de hidrógeno Gln202-H/O<sub>α</sub>-HETHDP-APH<sup>+</sup> durante la simulación en comparación a la interacción Gln202-H/N4'-HETHDP-APH<sup>+</sup>, han inducido a que el ángulo diedro  $\Phi_P$  presente un valor de  $-48,7^\circ$ , mientras que el valor del ángulo diedro  $\Phi_T$  es  $107,6^\circ$ , en donde los valores experimentales de la conformación activa tipo V para las etapas de activación del cofactor ThDP son  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ , respectivamente.

En resumen, el sistema APH<sup>+</sup> fue el único de los tres sistemas en estudio en donde las interacciones reportadas en literatura para la Gly116 y Gln202 se mantuvieron estables durante los 100 ns de dinámica de producción. La Gly116 se mantuvo formando un enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico del benzaldehído (O<sub>β</sub>), mientras que la Gln202 se mantuvo formando un enlace de hidrógeno con el oxígeno desprotonado del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> (O<sub>α</sub>). La estabilidad energética de estas interacciones no enlazantes puede atribuirse a la única diferencia existente entre los tres sistemas en estudio, correspondiente al estado de protonación del grupo amino del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>. En el sistema APH<sup>+</sup> teóricamente el carácter electrofílico del grupo imino protonado, catión imonio, es menor que en los grupo amino e imino de los sistemas AP e IP, respectivamente. Esta diferencia parece ser la responsable de que en los sitios activos del sistema APH<sup>+</sup>, el enlace de hidrógeno Gln202-H/N4'-HETHDP-APH<sup>+</sup> se haya encontrado desfavorecido energéticamente durante la simulación en comparación a la interacción Gln202-H/O<sub>α</sub>-HETHDP-APH<sup>+</sup>. Además, es posible inferir que la estabilidad de la interacción Gln202-H/O<sub>α</sub>-HETHDP-APH<sup>+</sup> trae como consecuencia, en primer lugar que la Gly116 mantenga con mayor estabilidad energética y mejor orientación la interacción Gly116-H/O<sub>β</sub>-Benzaldehído, en comparación a la interacción entre la Gly116 y el oxígeno O<sub>α</sub>, lo que teóricamente aumenta el carácter electrofílico del carbono carbonílico del benzaldehído, favoreciendo la reactividad del benzaldehído en la formación de R-PAC. En segundo lugar, la baja estabilidad energética de la interacción Gln202-H/N4'-HETHDP-APH<sup>+</sup> junto con la presencia de las interacciones Met525-H/N3'-HETHDP-APH<sup>+</sup> y Gly523-O/H-Imonio-HETHDP-APH<sup>+</sup> han provocado que el ángulo diedro Φ<sub>P</sub> haya adoptado valores mayores a los -70° sin perder la conformación activa tipo V del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>. En tanto, las demás interacciones residuo sustrato Glu139-O/H-N1'-HETHDP-APH<sup>+</sup>, Trp586/Benzaldehído y Phe201/Benzaldehído se mantuvieron estables y con distancias cercanas durante toda la simulación de la dinámica molecular.

### 3.2 Dinámica Molecular QM/MM

En esta sección se presenta el análisis de los resultados obtenidos para los 1000 ps de dinámica molecular de producción QM/MM de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, los cuales se realizaron utilizando el hamiltoniano semiempírico AM1<sup>15,16</sup> para describir a la zona cuántica de cada sistema, la cual está conformada por los átomos del sustrato benzaldehído, los átomos del intermediario HETHDP sin el grupo difosfato y los átomos de la cadena lateral del residuo Glu139. En cada una de las simulaciones, se han utilizado como estructura inicial a las estructuras seleccionadas de las simulaciones de dinámica molecular mecánico clásicas. Las simulaciones de dinámica molecular QM/MM se realizaron con la finalidad de minimizar la energía del sitio activo representativo de cada uno de los sistemas. En ellas se consideraron a los aminoácidos de la enzima, al cofactor FAD, al complejo HETHDP-BA respectivo para cada sistema y las moléculas de gua ubicadas dentro de los 24 Å de zona móvil.

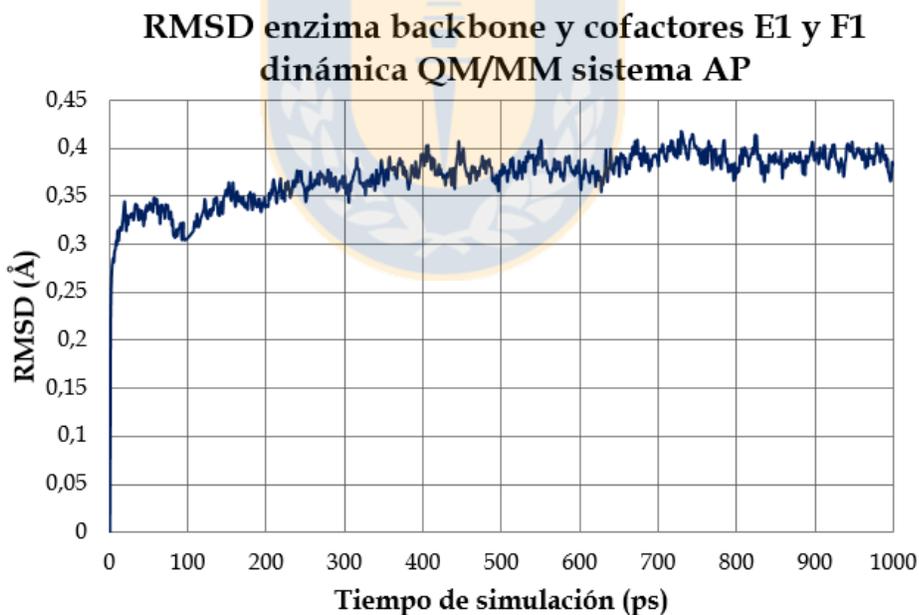
Los análisis realizados a las simulaciones de dinámica molecular QM/MM incluyen cálculos de RMSD para los backbones de los aminoácidos de la zona móvil, en los cuales también se consideró al sustrato benzaldehído y a los cofactores HETHDP (E) y FAD (F), además de cálculos de RMSF de los carbonos alfa de los aminoácidos comprendidos dentro de la zona de móvil. En cuanto a las interacciones no enlazantes presentes durante la simulación entre los residuos y los sustratos del sitio activo representativo de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, se presentan los valores de las distancias promedio de los átomos involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno y de las distancias promedio calculadas desde el centro geométrico para aquellos átomos que conforman grupos funcionales y anillos aromáticos de las cadenas laterales de los residuos involucrados en interacciones  $\pi$ -stacking con el sustrato benzaldehído. Así, las distancias de interacción promedio se relacionaron con la estabilidad de las interacciones no enlazantes residuo sustrato, lo que permitió realizar un seguimiento a las interacciones que fueron observadas previamente en las simulaciones de dinámicas molecular MM. Además se presentan los valores promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$

y  $\Phi_T$  de los complejos HETHDP-BA respectivo del sitio activo de cada sistema. Por último y con el fin de representar la estabilidad conformacional durante la dinámica de producción, se presentan las fluctuaciones y movilidad de los complejos HETHDP-BA respectivos de cada sistema mediante el cálculo del RMSF de todos los átomos que los componen.

### 3.2.1 Dinámica Molecular QM/MM sistema AP

En la Figura 3.91 se presenta el gráfico del RMSD calculado para el esqueleto o backbone de los aminoácidos ubicados dentro de los 24 Å de zona móvil que rodean al sitio activo del sistema AP y que incluye también a los átomos del complejo HETHDP-BA-AP y del cofactor FAD. Para los 1000 ps de simulación, el RMSD presentó un valor promedio de  $0,390 \pm 0,002$  Å y una estabilidad conformacional constante para el sitio activo durante toda la dinámica de producción. Esta disminución en el valor promedio del RMSD obtenido para la simulación de dinámica molecular QM/MM del sistema AP, comparado con los valores promedio obtenidos en los RMSD de la dinámica molecular MM del mismo sistema, Figuras 3.1 y 3.2, sección 3.1.1, se debe en primer lugar a que la cantidad de átomos involucrados en la simulación QM/MM fue menor que los átomos involucrados en la dinámica molecular MM, ya que en la simulación QM/MM la solvatación solo se realizó sobre el sitio activo seleccionado para representar al sistema AP, solvatación que involucró un radio específico de 30 Å de los cuales solo 24 Å fueron considerados como zona móvil para minimizar la energía potencial del sistema, Figura 2.5, sección 2.3, página 33. En cambio, en la simulación de dinámica molecular mecánico clásica no solo se consideró a la enzima completa como zona móvil para minimizar la energía potencial del sistema, sino que también a la caja de agua en la que se encontraba solvatada, provocando un mayor movimiento, flexibilidad y posible traslación de la enzima y los sustratos durante la simulación. Además, al describir a los átomos del complejo HETHDP-BA-AP junto con los de la cadena lateral del residuo Glu139 mediante el hamiltoniano AM1, se han considerado a los electrones de los orbitales de valencia de los átomos de la zona QM, además de

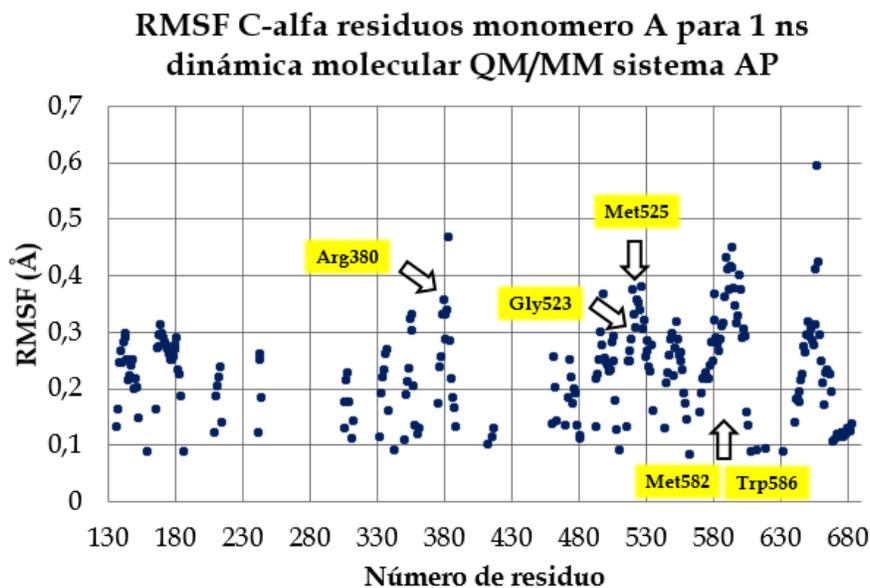
algunos parámetros experimentales referidos a propiedades atómicas y moleculares, permitiendo obtener una mayor minimización de la energía potencial y geometrías moleculares de mayor precisión que las de los métodos MM, además de una mejor descripción de las energías de interacción no enlazantes residuo sustrato durante la simulación.<sup>17-19</sup> De esta manera, la zona de estabilidad conformacional del sitio activo 1 del sistema AP durante la simulación de dinámica molecular QM/MM se delimito desde 200 ps hasta llegar a los 1000 ps de tiempo de simulación, tiempo correspondiente al término de la dinámica de producción. En esta zona de estabilidad el cambio en el valor del RMSD permanece prácticamente constante a medida que aumenta el tiempo de simulación, con una variación de 0,5 Å, por lo que fue esta la zona utilizada para la selección de la estructura representativa del sistema AP en la exploración de la SEP QM/MM del mecanismo propuesto para la formación de R-PAC en la enzima AHAS.



**Figura 3.91.** RMSD backbone residuos, complejo HETHDP-BA-AP y cofactor FAD sistema AP para 1 ns de DM QM/MM.

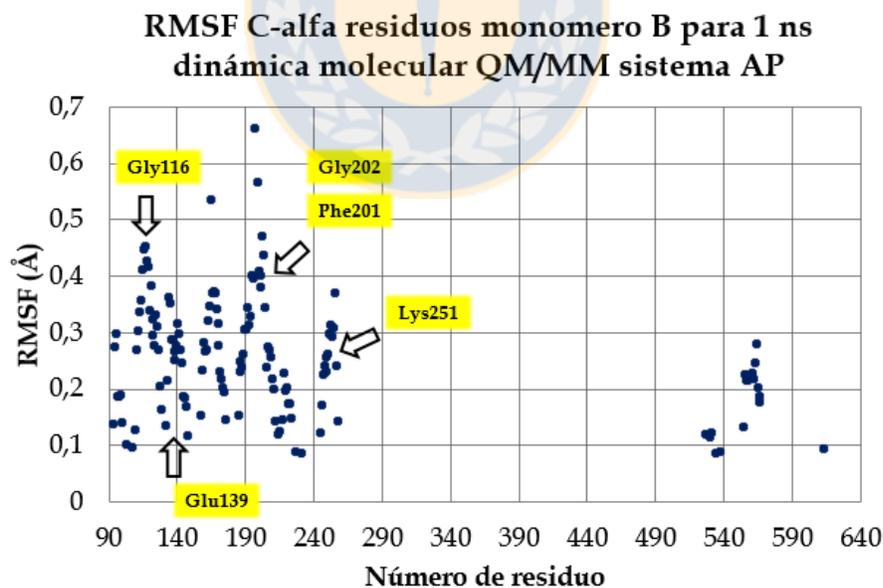
Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a la movilidad y fluctuaciones de los residuos del sistema AP durante los 1000 ps de dinámica de producción QM/MM, en las Figuras 3.92 y 2.93 se presentan graficados los valores de RMSF de los carbonos alfa, pertenecientes al backbone de los aminoácidos que componen los dos monómeros de la enzima AHAS y que se encuentran dentro de los 24 Å de zona móvil del sistema AP. En los gráficos, se aprecia que prácticamente la totalidad de los aminoácidos presentaron una movilidad menor a los 0,5 Å, dando cuenta de la alta estabilidad conformacional del sistema AP durante la simulación y de su relación directa con la estabilidad y perdurabilidad de las interacciones no enlazantes que mantuvieron los residuos entre sí, además de ratificar la validez de la simulación de dinámica molecular QM/MM realizada a este sistema. En la tabla VII se presentan los valores de RMSF para los aminoácidos que rodean al complejo HETHDP-BA-AP y que componen el sitio activo del sistema AP, correspondientes a los residuos Gly116, Glu139, Phe201, Gln202 del monómero B y Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586 del monómero A. En la tabla 3.7 se puede observar la disminución de los valores de RMSF para estos aminoácidos en comparación a los calculados en la simulación de dinámica molecular MM, presentados en la tabla 3.1, sección 3.1.1, página 52. Esta disminución indica que las interacciones no enlazantes residuo sustratos existentes durante la dinámica molecular QM/MM se mantuvieron constantes y sin cambios aparentes, indicando mayor restricción en los movimientos de los residuos y una gran estabilidad de las interacciones no enlazantes residuo sustrato.



**Figura 3.92.** RMSF de los carbonos alfa de los residuos del monómero A sistema AP 1 ns DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.93.** RMSF de los carbonos alfa de los residuos del monómero B sistema AP 1 ns DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.7: Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo del sistema AP en la enzima AHAS para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.		
Ubicación	Residuo Sitio Activo 1	RMSF (Å)
Monómero B	Gly116	0,45
	Glu139	0,27
	Phe201	0,40
	Gln202	0,38
Monómero A	Arg380	0 36
	Gly523	0,31
	Met525	0,35
	Met582	0,37
	Trp586	0,29

Fuente: Elaboración propia.

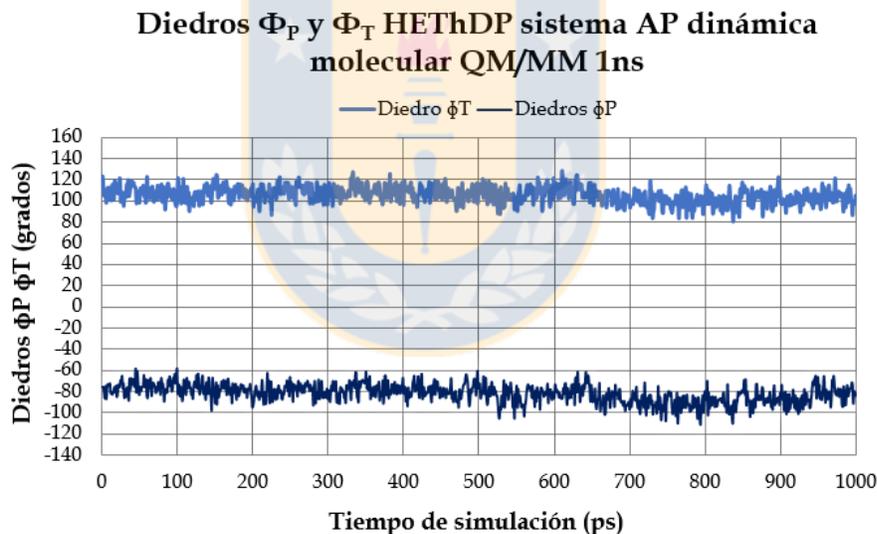
Al visualizar el sitio activo del sistema AP durante la simulación de dinámica molecular QM/MM, se pudo apreciar que la mayoría de las interacciones no enlazantes residuos sustratos presentes en la dinámica de producción MM del sitio activo 1 del sistema AP se han mantenido. Ejemplo de ello es el Glu139, el cual se encuentra protonado realizando una interacción por enlace de hidrógeno con el nitrógeno N1' del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-AP, interacción que es fundamental para mantener la estabilidad del estado de protonación del anillo de pirimidina y que mantuvo una distancia promedio de  $2,58 \pm 0,02$  Å, en concordancia con lo reportado en literatura.<sup>4, 5, 20</sup>

Otra de las interacciones presentes entre el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP y los residuos que lo rodean, es la del enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico de la Gly523 y el hidrógeno del grupo amino más alejado del anillo de tiazolio,<sup>3</sup> con valores de distancia entre los 2,77 Å y los 4,00 Å hasta los 600 ps de simulación. A tiempos de simulación mayores la distancia alcanzó valores de 5,50 Å aproximadamente, pero manteniendo una correcta orientación por parte del oxígeno de la Gly523 hacia el hidrógeno del grupo amino, presentando una distancia promedio de  $4,22 \pm 0,05$  Å.

A esta interacción se suma la interacción por enlace de hidrógeno entre el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-AP, interacción que presentó una distancia promedio de  $4,84 \pm 0,03$  Å. Las interacciones no enlazantes de la Gly523 y la Met525 se encuentran en concordancia con lo reportado en literatura<sup>3,9</sup> y han contribuido a que el ángulo diedro  $\Phi_P$  del complejo HETHDP-BA-AP haya adoptado un valor promedio de  $-81,3 \pm 1,0^\circ$  debido a la torsión que provocan sobre el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP. En tanto el ángulo diedro  $\Phi_T$  presentó un valor promedio de  $105,8 \pm 0,9^\circ$ , tal como se aprecia en la Figura 3.94, correspondiente a las variaciones del ángulo diedro durante la simulación.

En este sentido, a pesar de que los valores promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  se encuentran en concordancia con los valores reportados para la conformación activa tipo V del cofactor ThDP en las etapas de activación del cofactor, valores correspondientes a  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$  respectivamente.<sup>10-12</sup> La interacción mediante enlace de hidrógeno que presenta residuo Gln202 con el nitrógeno N4' del grupo amino del pirimidina durante la simulación, ha provocado que el ángulo diedro  $\Phi_P$  del anillo de pirimidina adopte valores mayormente negativos, debido a la torsión que provoca esta interacción en el anillo de pirimidina, la cual dicho sea de paso va en el sentido opuesto a la que provocan los residuos Gly523y Met525. Además, si se considera que la interacción reportada en literatura es entre la Gln202 y el oxígeno  $O_\alpha$  del intermediario HETHDP y no entre la Gln202 y el nitrógeno N4' del grupo amino, es posible inferir de que además de que el estado de protonación del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP para la formación de R-PAC no ocurriría bajo la forma de AP, el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  para la conformación activa tipo V del intermediario HETHDP en la tercera etapa del ciclo catalítico de la AHAS debería tener valores mayores a los  $-70^\circ$ . La interacción por enlace de hidrógeno entre uno de los hidrógenos del grupo amida de la Gln202 y el nitrógeno N4' del grupo amino, presentó una distancia promedio de  $4,05 \pm 0,04$  Å y al igual que lo obtenido en las dinámicas de producción MM, se

encuentra favorecida por sobre la interacción por enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-AP, la cual presentó una distancia promedio de  $5,38 \pm 0,06 \text{ \AA}$  durante la simulación. La interacción Gln202-H/ $O_{\alpha}$ -HETHDP-AP es necesaria para estabilizar la coordenada de reacción  $R_{H-O}$  en el mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC, coordenada correspondiente a la transferencia protónica del hidrógeno  $H_{\beta}$  desde el oxígeno  $O_{\alpha}$  al oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído. Como consecuencia de la interacción entre la Gln202 y el nitrógeno  $N4'$  del grupo ánimo del complejo HETHDP-BA-AP, la Gly116 se mantuvo orientada durante toda la simulación hacia el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-AP formando un enlace de hidrógeno entre el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Gly116 y el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-AP, presentando una distancia promedio de  $3,60 \pm 0,02 \text{ \AA}$ .



**Figura 3.94.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HETHDP-BA-AP para el sitio activo del sistema AP para 1 ns de DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

En tanto la interacción reportada en literatura para la Gly116 con el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído<sup>4</sup> presentó una distancia promedio de  $5,04 \pm 0,02 \text{ \AA}$  y una orientación inadecuada por parte de la Gly116 que solo se mantuvo orientada hacia el oxígeno  $O_{\alpha}$ . En este sentido, el carácter nucleofílico del grupo amino del anillo de pirimidina bajo la forma de AP, al parecer interfiere en la interacción no enlazante de la Gln202 y el oxígeno  $O_{\alpha}$ , lo cual genera como consecuencia una modificación en la interacción no enlazante de la Gly116.

Por su parte la Arg380 se mantuvo alejada del complejo HETHDP-BA-AP durante toda la simulación con una distancia promedio de  $10,82 \pm 0,03 \text{ \AA}$  entre el centro geométrico del grupo guanidinio de la cadena lateral de la Arg380 y el centro geométrico del anillo de benceno del sustrato benzaldehído, manteniéndose en concordancia con lo reportado en literatura.<sup>4</sup> En cuanto a los residuos Trp586 y Phe201 estos presentaron distancias de interacción promedio de  $7,11 \pm 0,03 \text{ \AA}$  y  $5,60 \pm 0,03 \text{ \AA}$  respectivamente, entre el anillo de indol del Trp586, el grupo fenilo de la Phe201 y el anillo de benceno del sustrato benzaldehído.

Los resultados son concordantes con lo reportado en literatura, lo cual indica que ambos residuos son irrelevantes tanto en la estabilización del sustrato benzaldehído como en la del cofactor HETHDP-AP.<sup>4,7,8</sup> En tanto la cadena lateral de residuo Met582 se mantuvo orientada hacia el anillo de tiazolio del complejo HETHDP-BA-AP con una distancia promedio de  $3,73 \pm 0,02 \text{ \AA}$ . Un resumen de las distancias promedio entre los residuos que rodean e interaccionan con el complejo HETHDP-BA-AP se muestra en la tabla 3.8.

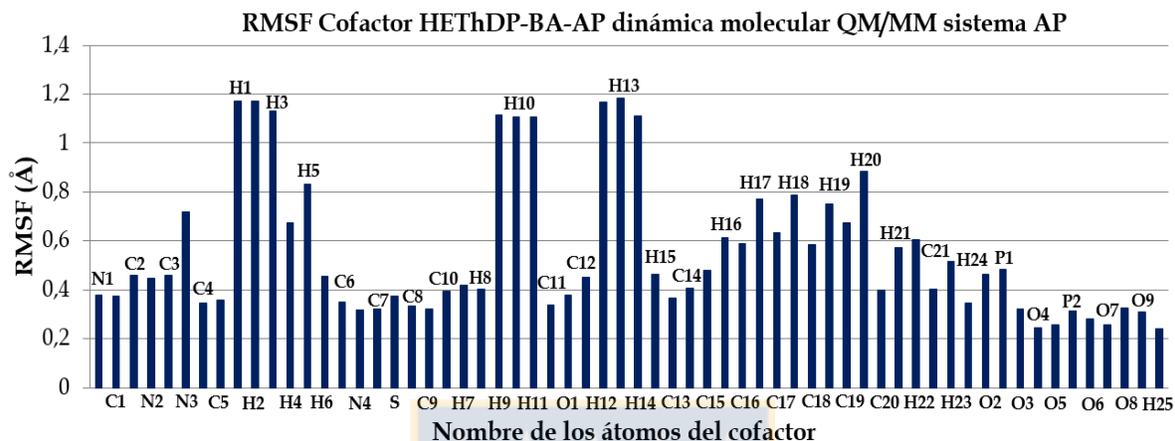
**Tabla 3.8: Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo del sistema AP para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.**

Interacción residuo-sustrato	Distancia promedio (Å)
Met525-H/N3'-HETHDP-AP	4,84 ± 0,03
Met525-S/S-HETHDP-AP	4,41 ± 0,02
Gly116-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-AP	3,60 ± 0,02
Gly116-H/O <sub>β</sub> -Benzaldehído	5,04 ± 0,02
Gln202-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-AP	5,38 ± 0,06
Gln202-H/N4'-HETHDP-AP	4,05 ± 0,04
Arg380/Benzaldehído	10,82 ± 0,03
Trp586/Benzaldehído	7,11 ± 0,03
Phe201/Benzaldehído	5,60 ± 0,03
Glu139-H/N1'-HETHDP-AP	2,58 ± 0,02
Gly523-O/H-Amino-HETHDP-AP	4,22 ± 0,05
Met582-S/S-Tiazolio-HETHDP-AP	3,73 ± 0,02

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3.95 se presenta los valores de RMSF para los átomos del complejo HETHDP-BA-AP para los 1000 ps de simulación de dinámica molecular QM/MM. Al igual que los resultados obtenidos en las simulaciones de dinámica molecular MM las regiones que presentaron mayor movimiento y fluctuaciones durante la simulación QM/MM fueron las pertenecientes a los hidrógenos de grupos alquilo, como los hidrógenos H2, H3 y H4 del grupo metilo enlazado al anillo de pirimidina, los hidrógenos H9, H10 y H11 del grupo metilo enlazado al anillo de tiazolio y los hidrógenos H12, H13 y H14 del grupo metilo del sustrato benzaldehído, los cuales presentaron valores por sobre los 0,6 Å. Otro de los grupos que presentó gran movilidad es el anillo de benceno del benzaldehído, el cual posee un eje de rotación en

el enlace con el carbono carbonílico del benzaldehído, carbono C13. Las pequeñas rotaciones sobre este enlace durante la simulación otorgaron mayor movilidad a los átomos entre los carbonos C14 y C19 y los hidrógenos H16 y H20 que conforman el anillo de benceno, tal como se aprecia en la Figura 3.30, sección 3.1.1, página 75.

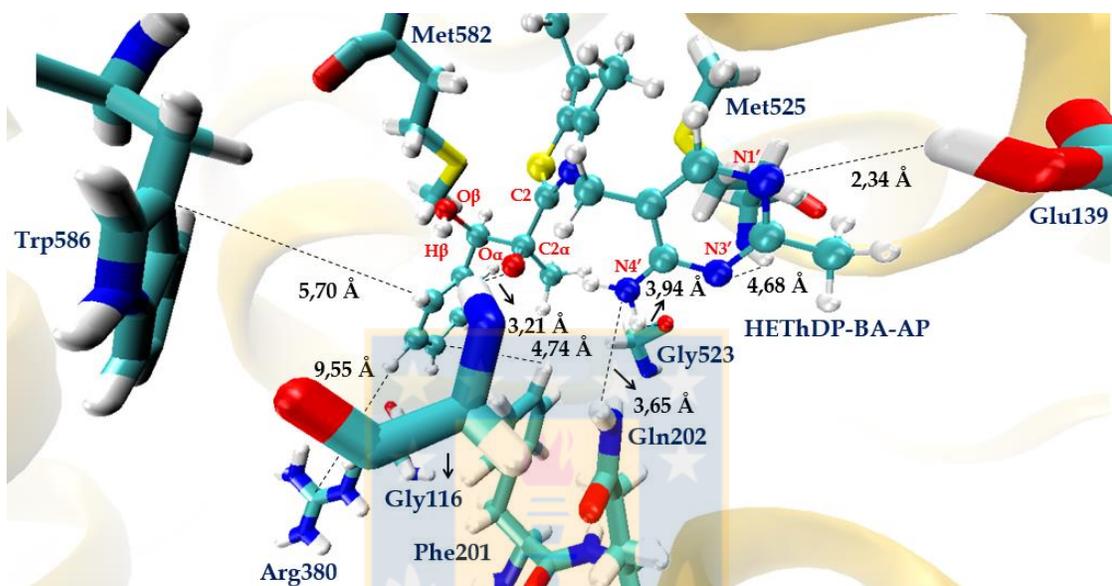


**Figura 3.95.** RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-AP del sitio activo del sistema AP para 1 ns de simulación de dinámica molecular QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

A partir de la trayectoria de la dinámica de producción QM/MM del sistema AP se seleccionó a la estructura correspondiente a los 349 ps de simulación, como estructura inicial para los cálculos de exploración de la PES del mecanismo propuesto. El criterio de selección se basó en considerar a una estructura que presentara interacciones no enlazantes residuo sustrato en concordancia con las reportadas en literatura y que además fuera representativa de las interacciones residuo sustrato intrínsecas del sistema AP, por lo cual fue escogida a una estructura desde la zona de estabilidad conformacional presentada en el RMSD de la Figura 3.91, zona comprendida entre los 200 ps y los 1000 ps de simulación. A este criterio se le sumó la necesidad de seleccionar a un estructura en donde el hidrógeno  $H_{\beta}$  se mantuviera orientado hacia el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-AP y que además presentara una distancia no menor a 2 Å entre el hidrógeno carbonílico  $H_{\beta}$  del sustrato benzaldehído y el oxígeno desprotonado  $O_{\alpha}$  enlazado al átomo de carbono  $C2_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-AP, oxígeno donador

desde donde se transfiere el átomo de hidrógeno  $H_{\beta}$  hacia el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  de sustrato benzaldehído. La estructura seleccionada, representada en la Figura 3.96, presentó valores de  $-69,91^{\circ}$  y  $100,3^{\circ}$  para los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$ , mientras que la distancia entre el hidrógeno  $H_{\beta}$  del sustrato benzaldehído y el oxígeno desprotonado  $O_{\alpha}$  enlazado al átomo de carbono  $C2\alpha$  del complejo HETHDP-BA es de  $2,40 \text{ \AA}$ .



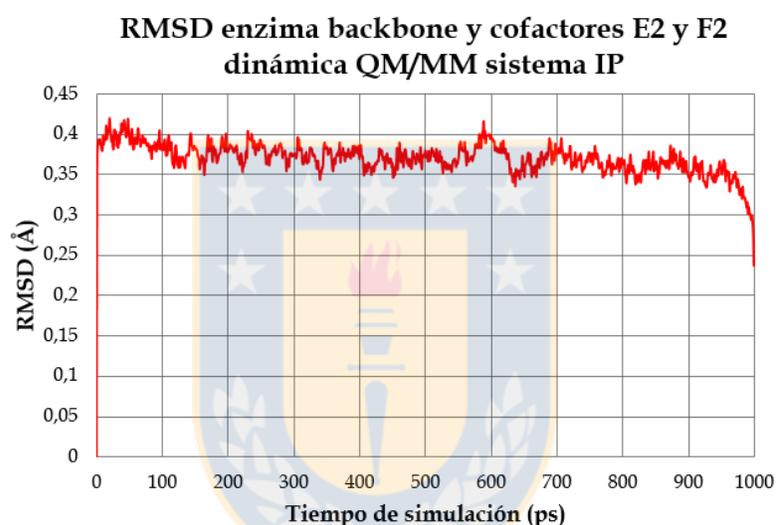
**Figura 3.96.** Estructura representativa del sistema AP correspondiente a los 349 ps de dinámica molecular QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.2.2 Dinámica Molecular QM/MM sistema IP

En la Figura 3.97 se presenta el gráfico del RMSD calculado para el esqueleto o backbone de los aminoácidos ubicados dentro de los  $24 \text{ \AA}$  de zona móvil que rodean al sitio activo del sistema IP y que incluye también a los átomos del complejo HETHDP-BA-IP y el cofactor FAD del sitio activo. Para los 1000 ps de simulación el RMSD presentó un valor promedio de  $0,370 \pm 0,002 \text{ \AA}$  y una estabilidad conformacional constante para el sitio activo durante toda la dinámica de producción. Al igual que en lo observado en la simulación de dinámica QM/MM del sistema AP, se obtuvo una disminución en el valor promedio del RMSD del sistema IP al compararlo con los

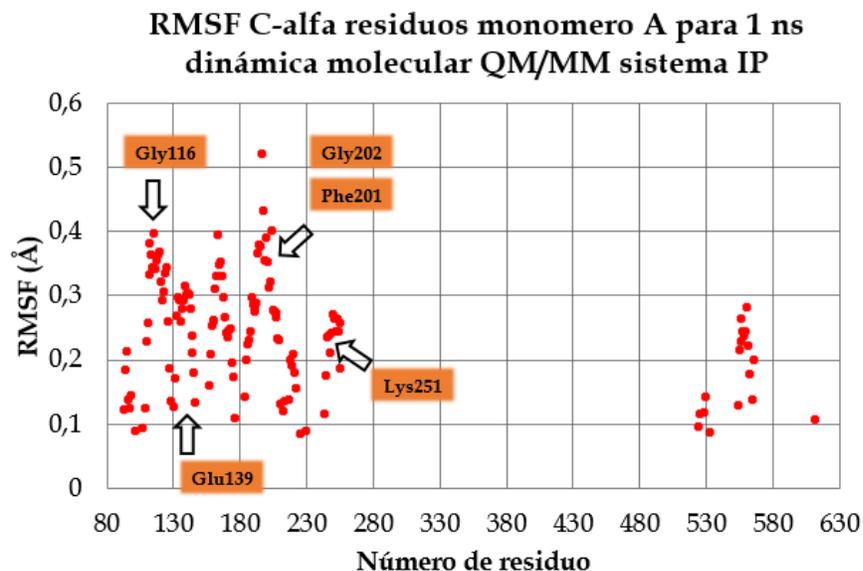
valores promedio obtenidos en los RMSD de la dinámica molecular MM del mismo sistema, Figuras 3.32 y 3.34 sección 3.1.2. Las razones de la disminución del RMSD se deben a la menor cantidad de átomos minimizados en la simulación de dinámica molecular QM/MM, lo cual acompañado de una zona de movilidad restringida a 24 Å y la obtención de geometrías de mayor precisión para los átomos de la zona QM debido a la optimización semiempírica con el hamiltoniano AM1, han contribuido a la estabilidad conformacional de las interacciones no enlazantes entre los residuos de la enzima y las presentes en el sitio activo, durante los 1000 ps de simulación.



**Figura 3.97.** RMSD backbone residuos, complejo HETHDP-BA-IP y cofactor FAD sistema IP para 1 ns de DM QM/MM.

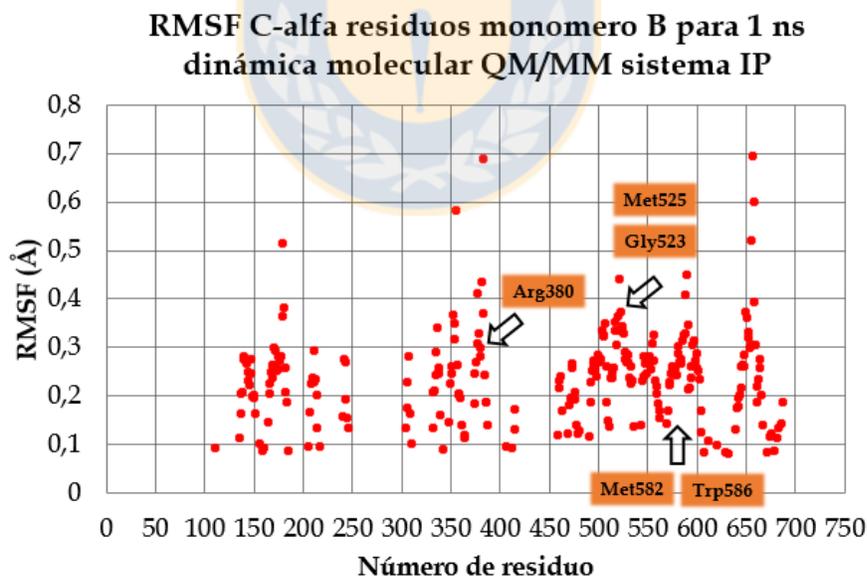
Fuente: Elaboración propia.

En las Figuras 3.98 y 3.99 se aprecian los valores de RMSF de los carbonos alfa de cada uno de los residuos que constituyen los monómeros A y B, respectivamente y que están ubicados dentro de la zona móvil de la esfera de solvatación. En los gráficos se muestra que casi la totalidad de los residuos del sistema IP tuvo una movilidad menor a los 0,5 Å, dando cuenta de la estabilidad conformacional del sitio activo del sistema IP, además de validar la dinámica molecular QM/MM realizada al sistema.



**Figura 3.98.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema IP 1 ns DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.99.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema IP 1ns DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 3.9 se muestran los valores de RMSF de los carbonos alfa para los aminoácidos Gly116, Glu139, Phe201, Gln202 del monómero B y Arg380, Gly523, Met525, Met582 y Trp586 del monómero A, los cuales rodean al complejo HETHDP-BA-IP y que componen el sitio activo del sistema IP. Los valores calculados para los RMSF de estos residuos no superan los 0,4 Å, lo que da cuenta del restringido movimiento de estos residuos debido a la estabilidad de las interacciones no enlazantes residuo sustrato del sitio activo del sistema IP durante la simulación.

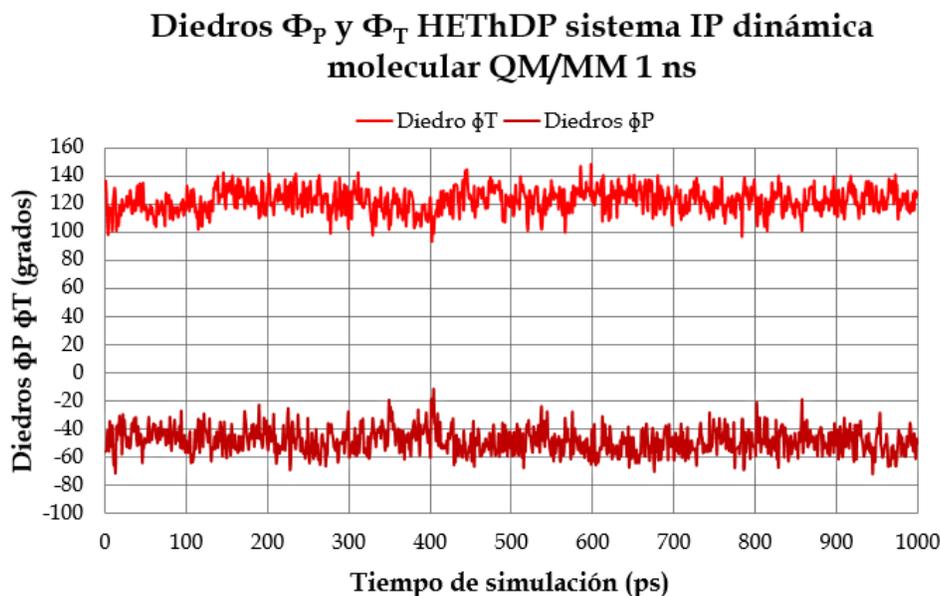
Tabla 3.9: Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo del sistema IP en la enzima AHAS para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.		
Ubicación	Residuo Sitio Activo 2	RMSF (Å)
Monómero A	Gly116	0,40
	Glu139	0,31
	Phe201	0,35
	Gln202	0,31
Monómero B	Arg380	0,28
	Gly523	0,37
	Met525	0,34
	Met582	0,28
	Trp586	0,31

Fuente: Elaboración propia.

Al visualizar las interacciones no enlazantes entre los residuos y el complejo HETHDP-BA-IP se pudo observar que al igual que en la dinámica de producción MM del sitio activo 2 del sistema IP, todas las interacciones entre los residuos del sitio activo y el anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-IP se han mantenido estables a lo largo de la simulación. Tal es el caso de la interacción mediante enlace de hidrógeno entre los oxígenos del grupo carboxilato del Glu139 con el hidrógeno enlazado al nitrógeno N1' del anillo de pirimidina, interacción que presenta una distancia promedio de  $2,40 \pm 0,02$  Å para uno de los oxígenos del Glu139. Otra de las interacciones es el enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del backbone de la Gly523 y el hidrógeno del grupo amino, con una distancia promedio de  $2,72 \pm 0,03$  Å. Se suma además la

interacción por enlace de hidrogeno entre el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina del complejo HETHDP-BA-IP, con una distancia promedio de  $2,64 \pm 0,02$  Å para los 1000 ps de simulación QM/MM.

En cuanto al residuo Gln202 este presentó una interacción por enlace de hidrógeno entre los hidrógenos del grupo amida de la Gln202 con el nitrógeno N4' del grupo imino enlazado al anillo de pirimidina, presentando una distancia promedio de  $4,03 \pm 0,03$  Å durante la simulación, distancia que es similar a la obtenida en los cálculos de dinámica molecular MM del sitio activo 2 del sistema IP. A pesar que esta interacción se encuentra con una distancia promedio por sobre los 3 Å de distancia la orientación del grupo amida se mantiene constante durante toda la simulación. Por otra parte y contrario a lo reportado en literatura, la Gln202 se encuentra a  $5,18 \pm 0,04$  Å del oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-IP y sin la orientación adecuada. Al igual que lo observado en el sistema AP, el carácter nucleofílico del grupo imino del complejo HETHDP-BA-IP ha provocado que la Gln202 pierda la interacción con el oxígeno  $O_{\alpha}$  favoreciendo la interacción con el nitrógeno N4' del anillo de pirimidina. Sin embargo, a diferencia de lo que se observó en las dinámicas de producción del sistema AP, la distancia entre la Gln202 y el nitrógeno N4' es mayor en el sistema IP, por lo cual el anillo de pirimidina no sufre ningún tipo de torsión producto de la interacción con la Gln202, lo cual acompañado de la torsión sobre el anillo de pirimidina del cofactor HETHDP-IP que provocan las interacciones Gly523-O/H-Imino-HETHDP-IP y Met525-H/N3'-HETHDP-IP el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_P$  durante la simulación fue de  $-48,3^{\circ} \pm 0,7^{\circ}$ , mientras que el ángulo diedro  $\Phi_T$  presentó un valor promedio de  $122,2^{\circ} \pm 0,7^{\circ}$ , tal como se observa en la Figura 3.100.



**Figura 3.100.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HETHDP-BA-IP para el sitio activo del sistema IP para 1 ns de DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

Como consecuencia de que la Gln202 se ha orientado hacia el nitrógeno N4' del complejo HETHDP-BA-IP, la Gly116 se mantuvo orientada hacia el oxígeno O $_{\alpha}$  formando un enlace de hidrógeno con el hidrógeno enlazado al nitrógeno del backbone de la Gly116, con una distancia promedio de  $2,11 \pm 0,02$  Å durante la simulación. Esta interacción se encuentra favorecida por sobre la interacción residuo sustrato reportada en literatura<sup>4</sup> entre el mismo átomo de hidrógeno de la Gly116 y el oxígeno carbonílico O $_{\beta}$  del sustrato benzaldehído, interacción que presentó una distancia promedio de  $3,43 \pm 0,03$  Å y una orientación inadecuada por parte de la Gly116 durante la simulación.

Por su parte la Arg380 al igual que lo respetado en las simulaciones de dinámica molecular MM del sitio activo 2 del sistema IP y en concordancia con lo reportado en literatura,<sup>4</sup> se mantuvo alejada del complejo HETHDP-BA-IP, con una distancia promedio de  $7,00 \pm 0,02$  Å el grupo guanidinio de la Arg380 y el anillo de benceno del sustrato benzaldehído. En este sentido, tanto la Phe201 como el Trp586 también mostraron distancias promedio similares a las obtenidas en las dinámicas de producción MM del sitio activo 2 del sistema IP, con valores de  $4,90 \pm 0,02$  Å entre el grupo fenilo de la Phe201 y anillo de benceno del sustrato benzaldehído y de  $4,87 \pm 0,02$  Å entre el anillo de indol del Trp586 y el benzaldehído, distancias que dan cuenta de del tipo  $\pi$ -stacking de conformación tipo T entre los anillos aromáticos. Por último, la Met582 presentó una distancia promedio de  $4,60 \pm 0,04$  Å entre el átomo de azufre de su cadena lateral y el átomo de azufre del anillo de tiazolio del complejo HETHDP-BA-IP, distancia un tanto menor al compararla con la distancia promedio obtenida en la dinámica molecular MM, pero que sin embargo no favorece una mayor estabilización de los sustratos por parte de la Met582, debido a que su cadena lateral se encuentra orientada hacia el cofactor FAD.

En vista a estos resultados, es posible inferir que debido al carácter nucleofílico del nitrógeno N4' del grupo imino, los residuos Gln202 y Gly116 presentaron interacciones no enlazantes que no concuerdan con las reportadas en literatura y que por ende no favorecen la estabilización de los oxígenos  $O_{\alpha}$  y  $O_{\beta}$ , los cuales están involucrados en la coordenada de reacción  $R_{H-O}$  del mecanismo de reacción propuesto. Por lo cual, el estado de protonación del intermediario HETDP, no correspondería a la forma tautomérica 1',4'-iminopirimidina (IP). Un resumen de las distancias promedio de las interacciones residuo sustrato se muestra en la tabla 3.10 para los 1000 ps de dinámica molecular QM/MM del sitio activo del sistema IP.

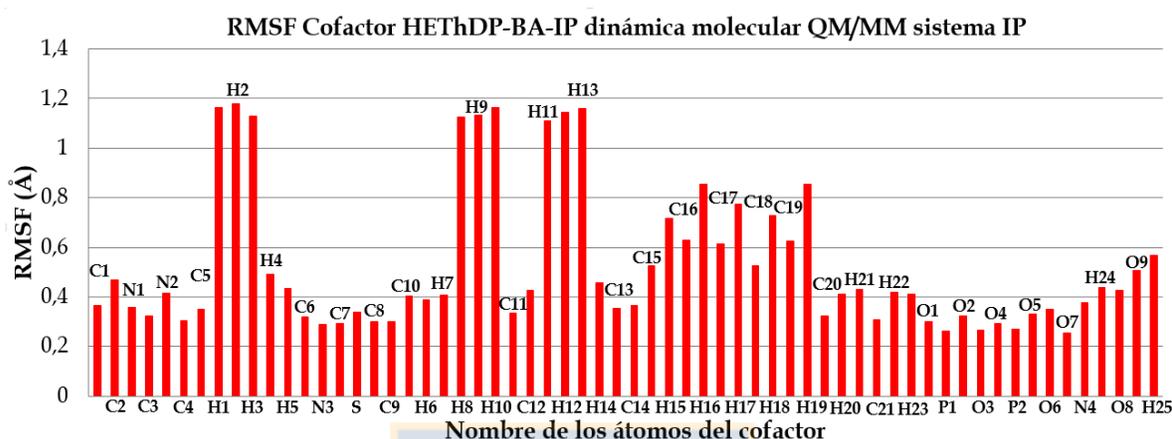
**Tabla 3.10: Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo del sistema IP para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.**

Interacción residuo-sustrato	Distancia promedio (Å)
Met525-H/N3'-HEThDP-IP	2,64 ± 0,02
Met525-S/S-HEThDP-IP	6,92 ± 0,02
Gly116-H/O <sub>α</sub> -HEThDP-IP	2,11 ± 0,02
Gly116-H/O <sub>β</sub> -Benzaldehído	3,43 ± 0,03
Gln202-H/O <sub>α</sub> -HEThDP-IP	5,18 ± 0,04
Gln202-H/N4'-HEThDP-IP	4,03 ± 0,03
Arg380/Benzaldehído	7,00 ± 0,02
Trp586/Benzaldehído	4,87 ± 0,02
Phe201/Benzaldehído	4,90 ± 0,02
Glu139-H/N1'-HEThDP-IP	2,40 ± 0,02
Gly523-O/H-Imino-HEThDP-IP	2,72 ± 0,03
Met582-S/S-Tiazolio-HEThDP-IP	4,60 ± 0,04

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3.101 se presenta los valores de RMSF para los átomos del complejo HEThDP-BA-IP luego de los 1000 ps de simulación de dinámica molecular QM/MM. Al igual que los resultados obtenidos en las simulaciones de dinámica molecular MM del sistema IP, las regiones que presentaron mayor movimiento y fluctuaciones durante la simulación QM/MM corresponden a átomos de hidrógenos de grupos alquilo, debido a la rotación del enlace simple carbono carbono. Entre ellos se encuentran el grupo metilo del anillo de pirimidina correspondiente al carbono C2 y sus hidrógenos H1, H2 y H3, los hidrógenos H8, H9 y H10 del grupo metilo enlazado al anillo de tiazolio y los hidrógenos H11, H12 y H13 del grupo metilo que se encuentra enlazado al carbono C2 $\alpha$  correspondiente al carbono C11, tal como se aprecia en la

Figura 3.59, sección 3.1.2, página 104. A estos átomos se suman, aunque con menor movilidad, los átomos del anillo de benceno del sustrato benzaldehído, con valores de RMSF entre los 0,6 y los 0,8 Å.

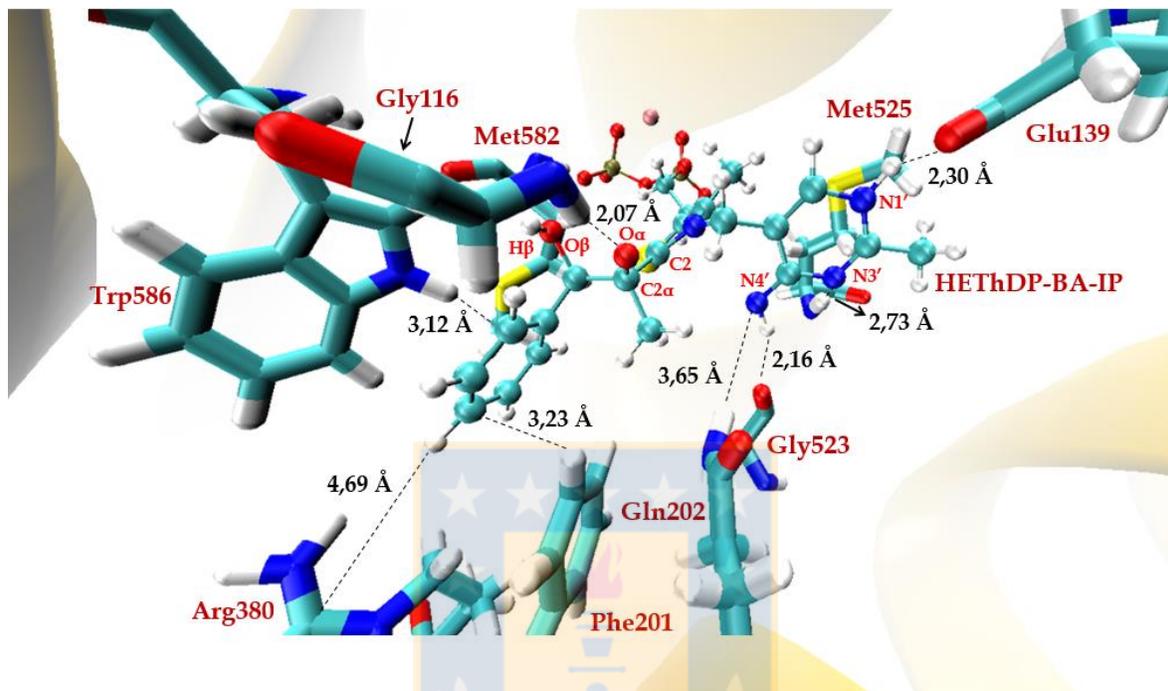


**Figura 3.101.** RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-IP del sitio activo del sistema IP para 1 ns de simulación de dinámica molecular QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

A partir de la trayectoria de la dinámica de producción QM/MM del sistema IP se seleccionó a la estructura correspondiente a los 454 ps de simulación, como estructura inicial para los cálculos de exploración de la PES del mecanismo propuesto. El criterio de selección se basó en considerar a una estructura que presentara interacciones no enlazantes residuo sustrato en concordancia con las reportadas en literatura y que además fuera representativa de las interacciones residuo sustrato intrínsecas del sistema IP, por lo cual fue escogida a una estructura desde la zona de estabilidad conformacional presentada en el RMSD de la Figura 3.97, zona que comprende prácticamente los 1000 ps de simulación. Además se seleccionó una estructura en donde el hidrógeno  $H_{\beta}$  se mantuviera orientado hacia el oxígeno  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-IP y que presentara una distancia no menor a 2 Å entre el hidrógeno carbonílico  $H_{\beta}$  del sustrato benzaldehído y el oxígeno desprotonado  $O_{\alpha}$  enlazado al átomo de carbono  $C2_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-IP. La estructura seleccionada, representada en la Figura 3.102, presentó valores de  $-66,36^{\circ}$  y  $132,6^{\circ}$  para los ángulos

diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$ , mientras que la distancia entre el hidrógeno  $H_\beta$  del sustrato benzaldehído y el oxígeno desprotonado  $O_\alpha$  enlazado al átomo de carbono  $C2\alpha$  del complejo HETHDP-BA es de 2,61 Å.

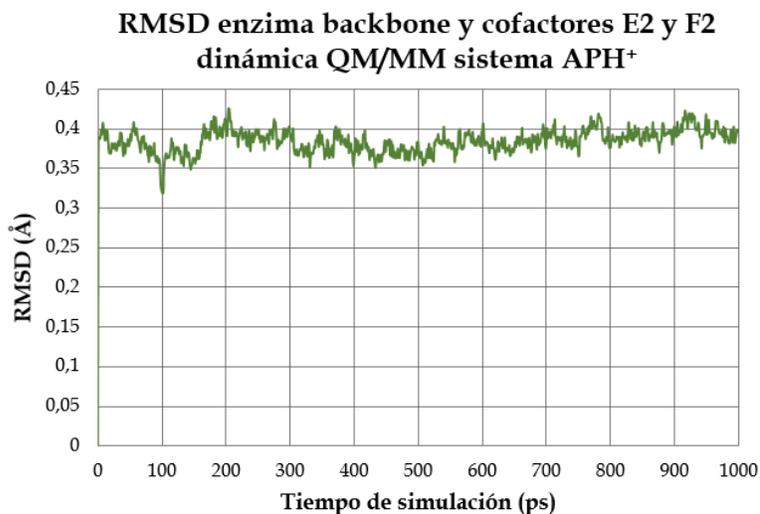


**Figura 3.102.** Estructura representativa del sistema IP correspondiente a los 454 ps de dinámica molecular QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.2.3 Dinámica Molecular QM/MM sistema APH<sup>+</sup>

Durante toda la simulación de dinámica molecular QM/MM del sitio activo del sistema APH<sup>+</sup>, los átomos de la zona móvil presentaron una zona continua de estabilidad conformacional, tal como se aprecia en la Figura 3.103. Con valores de RMSD que variaron entre los 0,05 Å durante los 1000 ps de simulación y un valor de RMSD promedio de  $0,385 \pm 0,02$  Å, valor que se encuentra en concordancia con los valores promedio de los sistemas IP y AP y que indica la estabilidad de las interacciones no enlazantes presentes entre pares de residuos y entre los residuos y los sustratos en el sitio activo del sistema APH<sup>+</sup>.

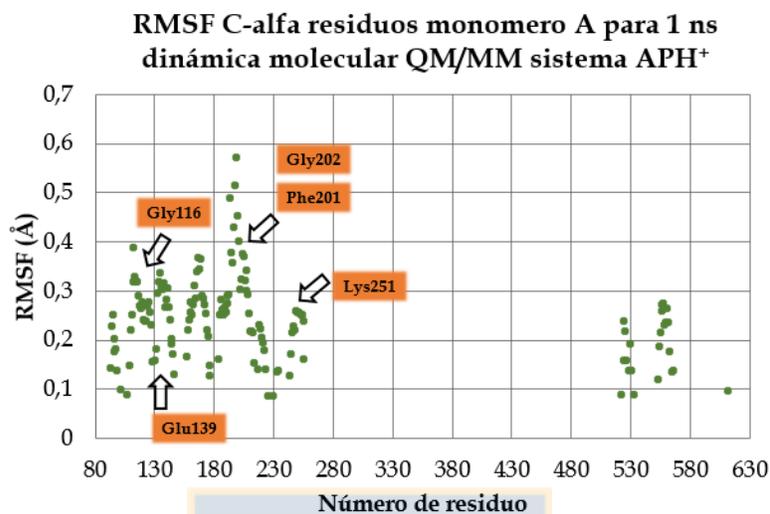


**Figura 3.103.** RMSD backbone y cofactores HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> y FAD sistema AP para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

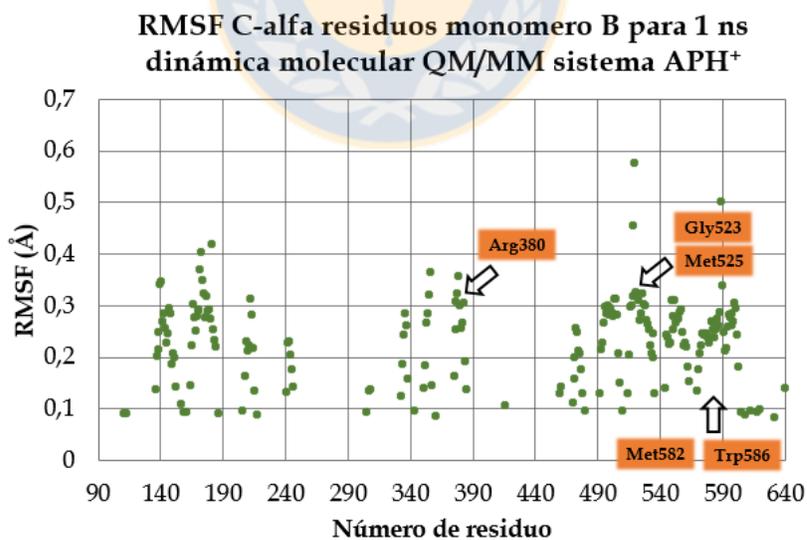
La estabilidad de las interacciones no enlazantes residuo sustrato durante la dinámica molecular QM/MM se ven reflejadas en los valores de RMSF de los carbonos alfa de los residuos de la zona móvil del sistema APH<sup>+</sup>. En la Figura 3.104 se muestran los valores de RMSD para los residuos de la parte móvil que componen el monómero A de la enzima, mientras que en la Figura 3.105 se muestra los valores de los residuos que componen al monómero B. En ambas gráficos es posible apreciar que los valores de RMSF para el sistema APH<sup>+</sup> son menores a los 0,6 Å, indicando la baja movilidad y al escaso desplazamiento de los residuos durante la simulación, lo cual se debe a la estabilidad de las interacciones no enlazantes entre los pares de residuos y entre los residuos y los sustratos del sitio activo, interacciones que por lo demás se ven favorecidas debido a que la simulación de dinámica molecular QM/MM se realizó en un radio de movilidad reducida alrededor del sitio activo y no para la totalidad de la enzima. En la tabla 3.11 se muestran los valores de RMSF durante la simulación para los residuos que componen el sitio activo y que rodean al complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>

valores que se encuentra por debajo de los 0,4 Å y que por lo demás son valores cercanos con los obtenidos en los sistemas IP y AP.



**Figura 3.104.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero A sistema APH<sup>+</sup> 1 ns DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.105.** RMSF de los carbonos alfa del backbone de los residuos del monómero B sistema APH<sup>+</sup> 1 ns DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

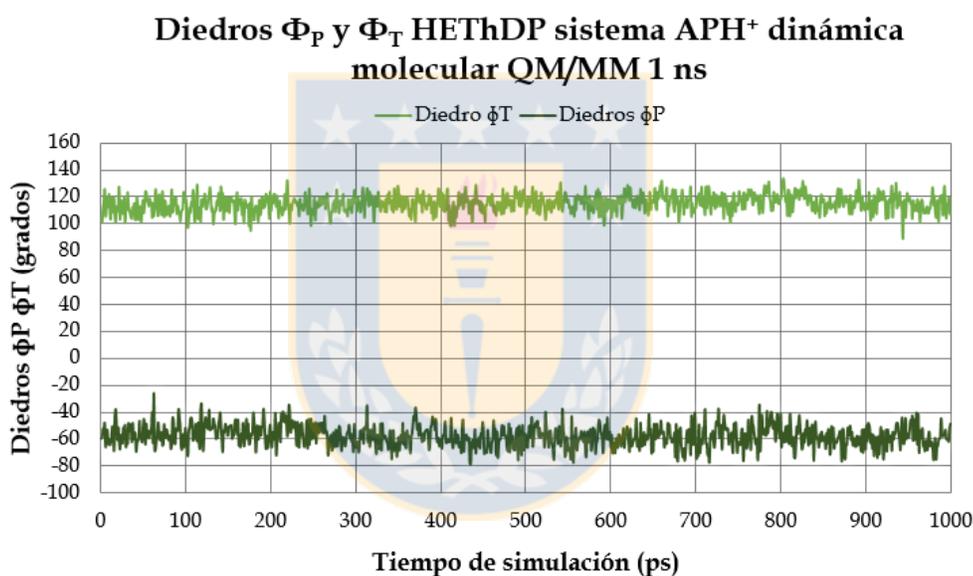
Tabla 3.11: Valores de RMSF para los carbonos alfa de los aminoácidos del sitio activo del sistema APH <sup>+</sup> en la enzima AHAS para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.		
Ubicación	Residuo Sitio Activo 2	RMSF (Å)
Monómero A	Gly116	0,32
	Glu139	0,27
	Phe201	0,40
	Gln202	0,30
Monómero B	Arg380	0,30
	Gly523	0,31
	Met525	0,28
	Met582	0,27
	Trp586	0,27

Fuente: Elaboración propia.

En tanto, las interacciones no enlazantes entre los residuos del sitio activo y el complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> se mantuvieron sin modificaciones significativas en comparación a las obtenidas en la dinámica molecular MM. Mediante la visualización de la trayectoria de la dinámica de producción QM/MM, se observó que todas las interacciones de los residuos se encontraban en concordancia con las reportadas en literatura.<sup>3-8</sup> Los oxígenos del grupo carboxilato del Glu139 se mantuvieron orientados y formado un enlace de hidrogeno con el hidrógeno enlazado al nitrógeno N1' del anillo de pirimidina, con una distancia promedio de  $2,61 \pm 0,02$  Å, estabilizando el estado de protonación del nitrógeno N4' enlazado al anillo de pirimidina.

Por su parte la Met525 mantuvo la interacción por enlace de hidrógeno entre el hidrógeno del backbone de la Met525 y el nitrógeno N3' del anillo de pirimidina, con una distancia promedio de  $2,61 \pm 0,02$  Å. Al igual que la Gly523, la cual mantuvo la interacción por enlace de hidrógeno entre el oxígeno del backbone de la Gly523 y el hidrógeno del grupo imino protonado enlazado al anillo de pirimidina, con una distancia promedio de  $1,87 \pm 0,01$  Å.

En tanto, la Gln202 mantuvo la interacción por enlace de hidrógeno entre los hidrógenos del grupo amida y el oxígeno desprotonado  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, con una distancia promedio de  $1,92 \pm 0,01 \text{ \AA}$ , interacción que se encuentra favorecida por sobre la interacción con el nitrógeno N4' enlazado al anillo de pirimidina, que presentó una distancia promedio de  $3,21 \pm 0,02 \text{ \AA}$ , lo que se atribuye a la mayor electrofilia del grupo imino protonado del anillo se encuentra bajo la forma de 4'-iminopirimidinio (APH<sup>+</sup>). De esta manera el ángulo diedro  $\Phi_P$  presento un valor promedio de  $-57,9 \pm 0,6^{\circ}$  mientras que para el ángulo diedro  $\Phi_T$  fue de  $115,0 \pm 0,5^{\circ}$ , Figura 3.106.



**Figura 3.106.** Valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> para el sitio activo del sistema APH<sup>+</sup> para 1 ns de DM QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

Otra de las interacciones que durante la simulación se mantuvo en concordancia con lo reportado en literatura es la interacción por enlace de hidrógeno entre el hidrógeno del backbone de la Gly116 y el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído, que presentó una distancia promedio de  $2,11 \pm 0,01 \text{ \AA}$  y una orientación adecuada por parte de la Gly116, en contraste con la orientación que presentó hacia el oxígeno

desprotonado  $O_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> en donde la distancia promedio fue de  $4,52 \pm 0,01 \text{ \AA}$ .

En cuanto a la Arg380 este residuo presentó una distancia promedio de  $12,90 \pm 0,02 \text{ \AA}$  desde el centro geométrico del grupo guanidinio de la Arg380 y del anillo de benceno del sustrato benzaldehído en el complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, lo cual concuerda con lo reportado en literatura, que indica que la Arg380 no posee un rol catalítico en la formación de R-PAC en la enzima AHAS.<sup>4</sup>

Por su parte las cadenas laterales de los residuos Trp586 y Phe201, correspondientes a un anillo de indol y un grupo fenilo, respectivamente, durante la dinámica de producción se mantuvieron orientados hacia el anillo de benceno del benzaldehído con interacciones  $\pi$ -stacking de conformación tipo T y con distancias promedio de  $4,24 \pm 0,02 \text{ \AA}$  para el Trp586 y de  $6,26 \pm 0,05 \text{ \AA}$  para la Phe201. Por último, la cadena lateral de la Met582 se mantuvo alejada del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> con una distancia promedio de  $4,06 \pm 0,03 \text{ \AA}$  entre el átomo de azufre de la Met582 y el átomo de azufre del anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>. Un resumen de las distancias promedio de las interacciones durante la dinámica de producción QM/MM del sistema APH<sup>+</sup> se presenta en la tabla 3.12.

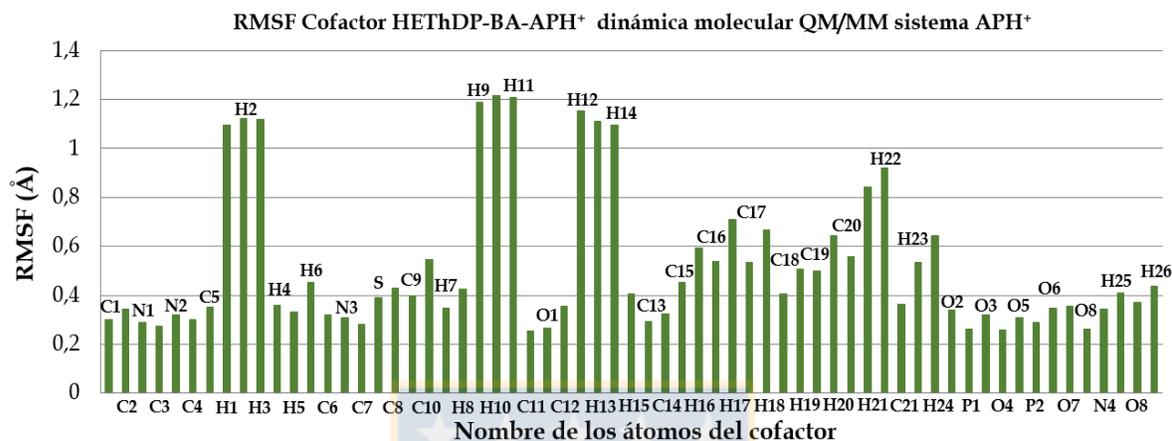
**Tabla 3.12: Distancias promedio para las interacciones de los residuos del sitio activo del sistema APH<sup>+</sup> para 1 ns de dinámica molecular QM/MM.**

Interacción residuo-sustrato	Distancia promedio (Å)
Met525-H/N3'-HETHDP-APH <sup>+</sup>	2,61 ± 0,02
Met525-S/S-HETHDP-APH <sup>+</sup>	6,44 ± 0,03
Gly116-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-APH <sup>+</sup>	4,52 ± 0,01
Gly116-H/O <sub>β</sub> -Benzaldehído	2,11 ± 0,01
Gln202-H/O <sub>α</sub> -HETHDP-APH <sup>+</sup>	1,92 ± 0,01
Gln202-H/N4' - HETHDP-APH <sup>+</sup>	3,21 ± 0,02
Arg380/Benzaldehído	12,90 ± 0,02
Trp586/Benzaldehído	4,24 ± 0,02
Phe201/Benzaldehído	6,26 ± 0,05
Glu139-H/N1'-HETHDP-APH <sup>+</sup>	2,61 ± 0,02
Gly523-O/H-Imonio-HETHDP-APH <sup>+</sup>	1,87 ± 0,01
Met582-S/S-Tiazolio-HETHDP-APH <sup>+</sup>	4,06 ± 0,03

Fuente: Elaboración propia.

El complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> no fue la excepción a lo observado en los complejos de los demás sistemas, en donde el cálculo de RMSF de los átomos que lo componen mostró que las zonas de mayor movilidad durante la simulación de dinámica molecular QM/MM corresponden a los átomos de hidrógeno de los grupos metilos, Figura 3.107. Entre los cuales se encuentra el grupo metilo del anillo de pirimidina correspondiente al carbono C2 y sus hidrógenos H1, H2 y H3, los hidrógenos H9, H10 y H11 del grupo metilo enlazado al anillo de tiazolio y los hidrógenos H12, H13 y H14 del grupo metilo que se encuentra enlazado al carbono C2<sub>α</sub> correspondiente al carbono C11, Figura 3.89, sección 3.1.3, página 138. Además los hidrógenos H21 y H22

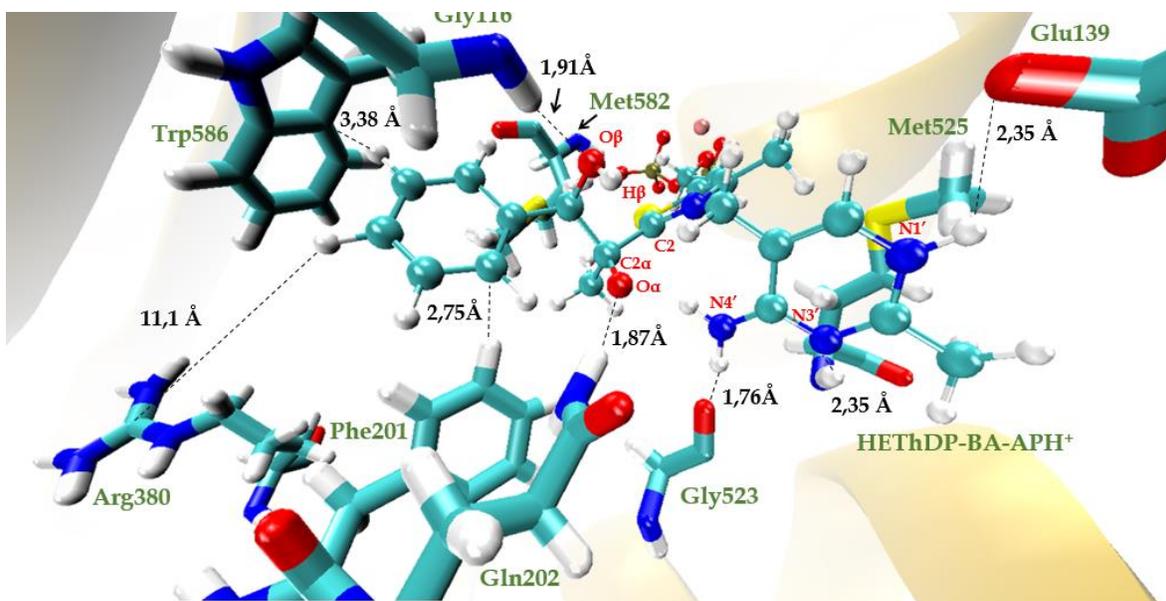
enlazados al carbono C20 presentaron una mayor movilidad debido a la interacción con la cadena lateral del residuo Val497. Por último, se observan fluctuaciones mayores a los 0,6 Å para los hidrógenos H17 y H18 del anillo de benceno del sustrato benzaldehído.



**Figura 3.107.** RMSF de los átomos del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup> del sitio activo del sistema APH<sup>+</sup> para 1ns de simulación de dinámica molecular QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

A partir de la trayectoria de la dinámica de producción QM/MM del sistema IP se seleccionó a la estructura correspondiente a los 477 ps de simulación, como estructura inicial para los cálculos de exploración de la PES. Los criterios de selección de la estructura fueron los mismos mencionados en las secciones 3.2.1 y 3.2.2. En este sentido, la estructura seleccionada del sistema APH<sup>+</sup>, presentada en la Figura 3.108, posee valores de  $-60,8^\circ$  y  $111,7^\circ$  para los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  respectivamente. Además muestra una distancia de 2,50 Å entre el hidrógeno H $_{\beta}$  y el oxígeno desprotonado O $_{\alpha}$  del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>.



**Figura 3.108.** Estructura representativa del sistema APH<sup>+</sup> correspondiente a los 477 ps de dinámica molecular QM/MM.

Fuente: Elaboración propia.

Al igual que lo observado en las simulaciones de dinámica molecular MM, el valor promedio del ángulo diedro  $\Phi_P$  de los complejos HETHDP-BA en las dinámicas moleculares QM/MM, han mostrado una tendencia similar en base a las interacciones residuo sustrato presentes en el sitio activo de cada sistema. En el sistema AP QM/MM, el ángulo diedro  $\Phi_P$  adquirió valores más negativos en comparación a los valores de los sistemas IP y APH<sup>+</sup>, debido al estado de protonación del grupo amino del complejo HETHDP-BA-AP, el cual favorece la interacción por enlace de hidrógeno entre la Gln202 y el nitrógeno N4', induciendo la torsión del anillo de pirimidina hacia valores más negativos. En tanto, los valores para los sistemas IP y APH<sup>+</sup> están inducidos principalmente por las interacciones con los residuos Gly523 y Met525, quienes provocan la torsión del anillo de pirimidina hacia valores de  $\Phi_P$  entre los  $-50^\circ$  y los  $-60^\circ$ , respectivamente, ya que la interacción entre la Gln202 y el nitrógeno N4' en el sistema IP mostró distancia superiores a los 3 Å, mientras que en el sistema APH<sup>+</sup> la Gln202 solo mantuvo interacción con el oxígeno desprotonado O<sub>α</sub> del complejo

HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>. A pesar de esto, los complejos HETHDP-BA de las estructuras representativas obtenidas desde las simulaciones de DM QM/MM de los tres sistemas, han presentado valores cercanos al valor experimental reportado en literatura para la conformación activa tipo V en las etapas de activación del cofactor ThDP correspondiente a  $-70^{\circ}$ ,<sup>10-12</sup> y del valor de  $-60^{\circ}$  presente en la estructura cristalina 1N0H para el cofactor no degradado, denominado sitio activo 2.<sup>3</sup> Por lo que las estructuras, utilizadas como estructuras iniciales en la exploración de PES de cada sistema, se encuentran en concordancia con los valores experimentales.

Resumiendo, el sistema AP en la DM QM/MM los valores promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  fueron  $-81,3 \pm 1,0^{\circ}$  y  $105,8 \pm 0,9^{\circ}$ , respectivamente, mientras que en el complejo HETHDP-BA-AP del sitio activo 1 de la DM MM fueron de  $-67,4 \pm 1,3^{\circ}$  y  $109,8 \pm 1,2^{\circ}$ . En tanto, el complejo HETHDP-BA-AP de la estructura representativa del sistema AP obtenida de la DM QM/MM presentó valores de  $-69,91^{\circ}$  y  $100,3^{\circ}$ . En la DM QM/MM del sistema IP el valor promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  fueron de  $-48,3^{\circ} \pm 0,7^{\circ}$  y  $122,2^{\circ} \pm 0,7^{\circ}$  y para el complejo HETHDP-BA-IP del sitio activo 2 de la DM MM los valores fueron de  $-46,2 \pm 1,2^{\circ}$  y  $120 \pm 1^{\circ}$ , respectivamente. En tanto la estructura seleccionada del sistema IP obtenida de la DM QM/MM presentó valores de  $-66,36^{\circ}$  y  $132,6^{\circ}$ . Por último, en la DM QM/MM del sistema APH<sup>+</sup> el valor promedio de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  fueron  $-57,9 \pm 0,6^{\circ}$  y  $115,0 \pm 0,5^{\circ}$ , mientras que en la DM MM los valores fueron de  $-43,37 \pm 1,05^{\circ}$  y  $101,8 \pm 0,8^{\circ}$ , respectivamente. En tanto de la estructura representativa del sistema APH<sup>+</sup> obtenida de la simulación de DM QM/MM presentó valores de  $-60,8^{\circ}$  y  $111,7^{\circ}$ .

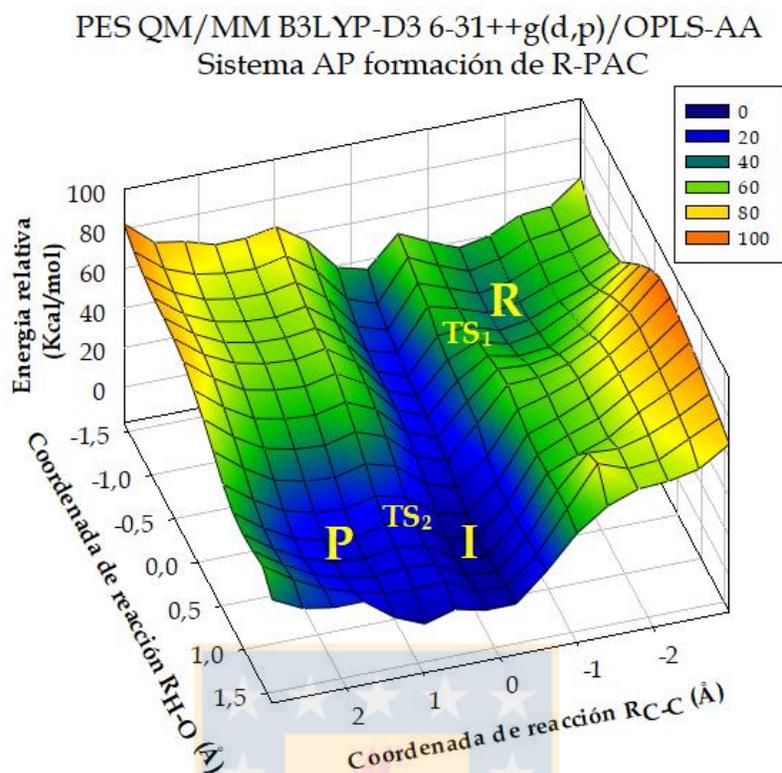
### 3.3 Superficies de energía potencial QM/MM

En esta sección se presenta el análisis de los resultados obtenidos de la exploración de las PES realizadas para los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup> en base al mecanismo de reacción propuesto, el cual involucró a la coordenada asimétrica R<sub>C-C</sub>, coordenada que representa el ataque nucleofílico por parte del carbono C2 $\alpha$  del intermediario HETHDP hacia el carbono carbonílico C $\beta$  del sustrato benzaldehído, además de la ruptura del enlace entre los carbonos C2 y C2 $\alpha$  para la liberación del producto R-PAC y la regeneración del cofactor a la forma de iluro-ThDP. La otra coordenada de reacción del mecanismo denominada R<sub>H-O</sub>, involucró la transferencia protónica del hidrógeno H $\beta$  desde el oxígeno O $\alpha$  del intermediario HETHDP hacia el oxígeno carbonílico O $\beta$  del sustrato benzaldehído. Las PES fueron exploradas desde los -3,0 Å hasta los 3,0 Å para la coordenada asimétrica R<sub>C-C</sub> y desde los -1,6 Å hasta los 1,6 Å en la coordenada asimétrica R<sub>H-O</sub> y se representaron mediante gráficos de tres dimensiones que incluyen en el eje z a la energía potencial de cada una de las estructuras que conforman la PES, energía que se presenta en Kcal/mol y que es relativa en relación a la estructura de menor energía de cada una de las superficies. Además se presentan las PES mediante gráficos de contorno en dos dimensiones, en donde la energía potencial queda representada por las líneas de contorno que cambian a medida que las coordenadas de reacción avanzan. Las estructuras de las PES exploradas fueron en primera instancia optimizadas a nivel semiempírico con el hamiltoniano AM1 para los átomos de la zona QM y el campo de fuerza OPLS-AA para los átomos de la zona MM, los cuales se minimizaron mediante los algoritmos de optimización Steepest-Descent y LBFGSB. Posteriormente se corrigió la descripción de la energía potencial mediante cálculos puntuales de energía sobre cada una de las estructuras optimizadas, utilizando el funcional de intercambio y correlación híbrido de gradiente corregido B3LYP y el set de base 6-31++G(d,p)-D3 que incorpora la descripción de las fuerzas de interacción no enlazantes de Van der Waals mediante las correcciones de Grimme.

Para cada una de las PES exploradas, referentes a la formación de R-PAC bajo los estados de protonación AP, IP y APH<sup>+</sup> del intermediario HETHDP, se presenta el análisis del mecanismo de reacción obtenido mediante la representación de los puntos críticos de las PES correspondientes a estructuras de las zonas de reactantes, estados de transición, intermediarios de reacción y productos. Para estas estructuras se presentan los valores de las distancias de las coordenadas de reacción y los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  involucrados en la reacción. En tanto, las energías potenciales relativas involucradas en cada uno de los pasos de los mecanismos de reacción obtenidos se presentan mediante diagramas de energía.

### 3.3.1 Superficie de energía potencial QM/MM sistema AP

La exploración de la PES QM/MM para la formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo el estado de protonación AP muestra que el mecanismo de reacción para el tercer paso del ciclo catalítico ocurre de forma concertada y es asincrónico entre los valores de las coordenadas asimétricas  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$ , tal como se observa en las Figuras 3.109 y 3.110 correspondientes a la representación de la PES para el sistema AP a través de un gráfico de 3 dimensiones y mediante un gráfico de contorno, respectivamente. De esta manera, la zona de reactantes, denominada con la letra R, se ubicó alrededor de los  $-1,5 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $-1,0 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , mientras que el estado de transición 1 (TS<sub>1</sub>) se ubicó en una zona cercana a los  $-0,8 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $-0,7 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , en donde el estado de transición TS<sub>1</sub> da paso a la formación del intermediario de la reacción en la zona denominada con la letra I, ubicada cerca de los  $0,0 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y  $1,0 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , zona en que el sustrato benzaldehído se encuentra enlazado al intermediario HETHDP-AP y el hidrógeno H <sub>$\beta$</sub>  se encuentra transferido al oxígeno carbonílico O <sub>$\beta$</sub>  del benzaldehído, formándose el complejo HETHDP-BA-AP.

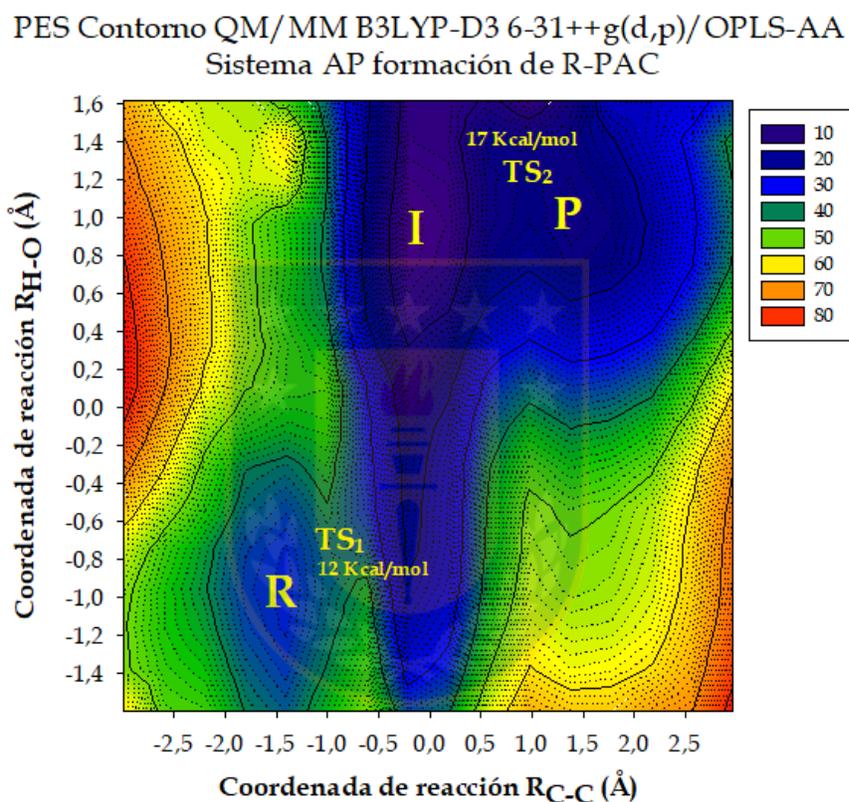


**Figura 3.109.** Superficie de energía potencial 3D QM/MM formación de R-PAC enzima AHAS sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

El estado de transición  $TS_1$  de la PES presentó una barrera de activación de 12 Kcal/mol, tal como se muestra en la Figura 3.110, valor que se encuentra en concordancia y por debajo del valor experimental de 13,8 Kcal/mol reportado en literatura<sup>7</sup> como la energía libre de activación para la formación de AL en la enzima AHAS. Además, la exploración de la PES muestra una segunda zona de estado de transición, indicada como  $TS_2$ , la cual corresponde a la energía de activación necesaria para la ruptura del enlace entre los carbonos  $C2\alpha$  y  $C2$  del complejo HETHDP-BA-AP, provocando la liberación del producto R-PAC y la regeneración del cofactor ThDP a la forma del intermediario iluro-ThDP-AP, etapa del mecanismo de reacción correspondiente al paso 4 del ciclo catalítico de la enzima AHAS. La barrera de activación para el  $TS_2$  fue de 17 Kcal/mol, valor que está en concordancia con la energía

libre de activación de 15 Kcal/mol reportada en literatura<sup>7</sup> para la liberación del producto natural de la enzima AL. El TS<sub>2</sub> se encuentra ubicado a los 0,8 Å en la coordenada R<sub>C-C</sub> y los 1,2 Å para la coordenada R<sub>H-O</sub>. Posteriormente, el TS<sub>2</sub> del mecanismo de reacción da paso a la zona de productos, denominada con la letra P, zona ubicada a los 1,5 Å en la coordenada R<sub>C-C</sub> y los 1,1 Å para la coordenada R<sub>H-O</sub>, en donde el producto R-PAC se encuentra liberado del cofactor ThDP.

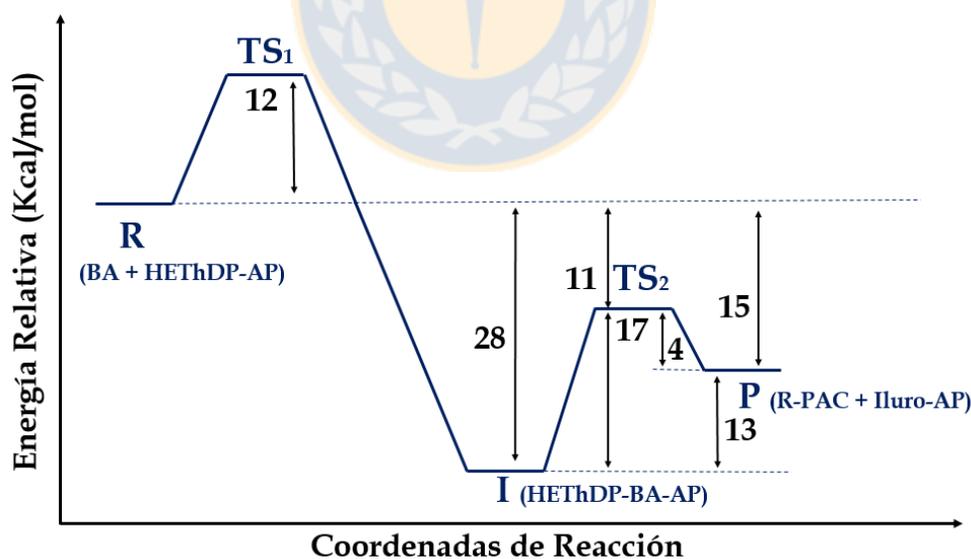


**Figura 3.110.** Superficie de energía potencial QM/MM de contorno para la formación de R-PAC enzima AHAS sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

A pesar que el segundo estado de transición TS<sub>2</sub> posee una energía de activación mayor a la del estado de transición TS<sub>1</sub>, la etapa limitante del mecanismo de reacción corresponde a la barrera de 12 Kcal/mol, debido a que una vez que el intermediario I correspondiente al complejo HETHDP-BA-AP se encuentra formado, la energía potencial del sistema según el mecanismo de reacción se encuentra estabilizada en 28

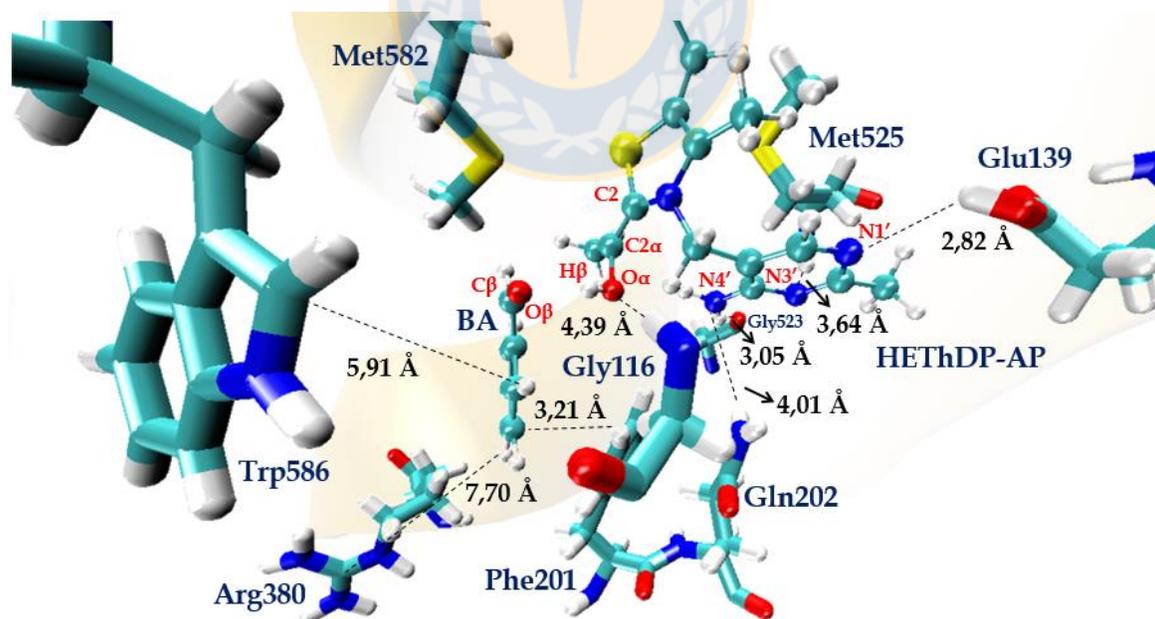
Kcal/mol en comparación a la zona de reactantes, tal como se aprecia en la Figura 3.111 correspondiente al diagrama de energía potencial obtenido desde la exploración de la PES QM/MM del sistema AP. El estado de transición  $TS_2$  se encuentra por debajo de la energía potencial de la zona de reactantes, específicamente 11 Kcal/mol más estable, por lo que no presenta competencia con el estado de transición  $TS_1$  y por consiguiente no es el paso limitante de la reacción. Además, la etapa correspondiente al estado de transición  $TS_2$  pertenece a la energía de activación del paso cuatro del ciclo catalítico de la enzima AHAS y no está relacionada con la energía de activación de 12 Kcal/mol correspondiente al tercer paso del ciclo catalítico. Por último, la exploración de la PES QM/MM del sistema AP muestra que los productos se encuentran estabilizados en 15 Kcal/mol en comparación a la energía potencial de los reactantes, indicando que la reacción de formación de R-PAC es exotérmica y por ende permitida desde un punto de vista termodinámico, lo que concuerda con la estabilidad del ciclo catalítico de la enzima y con los resultados reportados en literatura<sup>21</sup> para la formación de AL en los pasos 3 y 4 del ciclo catalítico de la enzima.



**Figura 3.111.** Diagrama de energía potencial (Kcal/mol) para la formación de R-PAC en la enzima AHAS con el intermediario HETHDP bajo la forma de AP.

Fuente: Elaboración propia.

Al observar la Figura 3.112, la cual muestra a la estructura de menor energía potencial de la zona de los reactantes de la PES, se puede observar que las interacciones no enlazantes residuo sustrato entre el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-AP y los residuos Glu139, Gly523 y Met525 se encuentran en concordancia con las interacciones reportadas en literatura,<sup>3, 5, 6, 9</sup> al igual que la gran distancia que separa a la Arg380 tanto del sustrato benzaldehído como del intermediario HETHDP-AP, lo cual indica que este residuo no participó en la formación de R-PAC<sup>4</sup>. En tanto, las interacciones de los residuos Gly116 y Gln202 mantuvieron las orientaciones hacia el oxígeno O<sub>α</sub> del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP-AP y hacia el nitrógeno N4' del anillo de pirimidina, respectivamente, observadas previamente en los cálculos de dinámica molecular, aunque con distancias cercanas a los 4,0 Å. La Phe201 también mantuvo tanto la orientación como la distancia de su grupo fenilo con el anillo de benceno del benzaldehído, mientras que solo el Trp586 perdió la debil interacción  $\pi$ -stacking entre el anillo de indol y el anillo de benceno del benzaldehído, debido a la gran distancia entre ambos grupos.

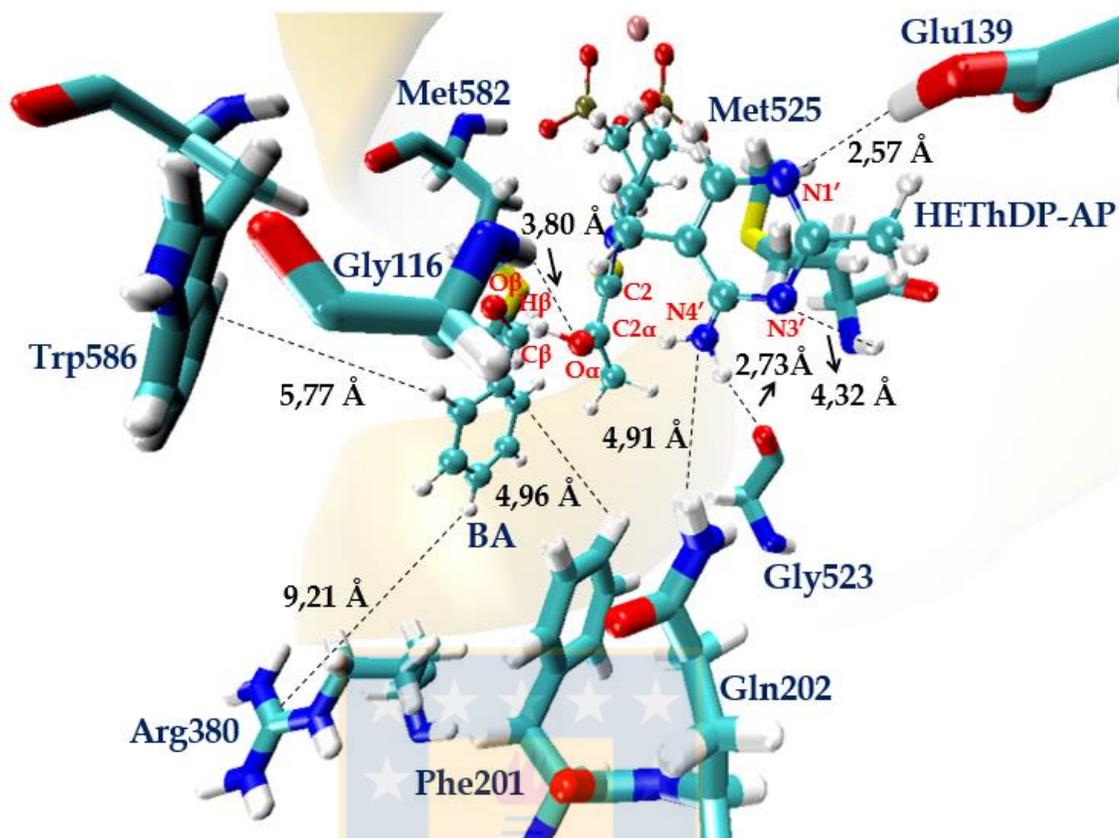


**Figura 3.112.** Estructura zona de reactantes PES QM/MM sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

Esta estructura representativa de la zona de reactantes presentó una distancia de 1,37 Å entre los carbonos C2 $\alpha$  y C2 dando cuenta del carácter de enlace doble entre los carbonos, en donde el anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-AP adoptó la forma de enamina cuando el sustrato se mantuvo a distancias cercanas a los 3,0 Å, ya que la distancia entre el carbono C2 $\alpha$  y el carbonílico C $\beta$  del benzaldehído fue de 2,92 Å. En tanto, la distancia entre el hidrógeno H $\beta$  del grupo hidroxilo del intermediario y el oxígeno carbonílico O $\beta$  del benzaldehído fue de 1,8 Å y la distancia del enlace entre el hidrógeno H $\beta$  y el oxígeno O $\alpha$  fue de 1,0 Å. Por su parte, los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  presentaron valores de -78,6° y 96,0° manteniendo una conformación activa tipo V para el intermediario HETHDP acorde a los valores reportados en literatura para las etapas de activación del cofactor correspondientes a  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ ,<sup>10-12</sup> respectivamente.

La estructura presentada en la Figura 3.113 corresponde a la estructura en la cual los átomos de la zona QM, correspondientes al intermediario HETHDP, el sustrato benzaldehído y la cadena lateral del residuo Glu139, fueron caracterizados como estructura de estado de transición al realizarles un cálculo de frecuencia utilizando una constante dieléctrica de 4,8 tratando de simular el ambiente enzimático y encontrando un valor de frecuencia negativa de -271 cm<sup>-1</sup> correspondiente al stretching de las coordenadas de reacción R<sub>C-C</sub> y R<sub>H-O</sub>. Esta estructura presentó una distancia de 1,44 Å entre los carbonos C2 $\alpha$  y C2 dando cuenta del alargamiento del enlace en comparación a la estructura de la zona de los reactantes, mientras la distancia entre el carbono C2 $\alpha$  y el carbonílico C $\beta$  del benzaldehído fue de 2,3 Å.



**Figura 3.113.** Estructura zona del estado de transición 1 PES QM/MM sistema AP.

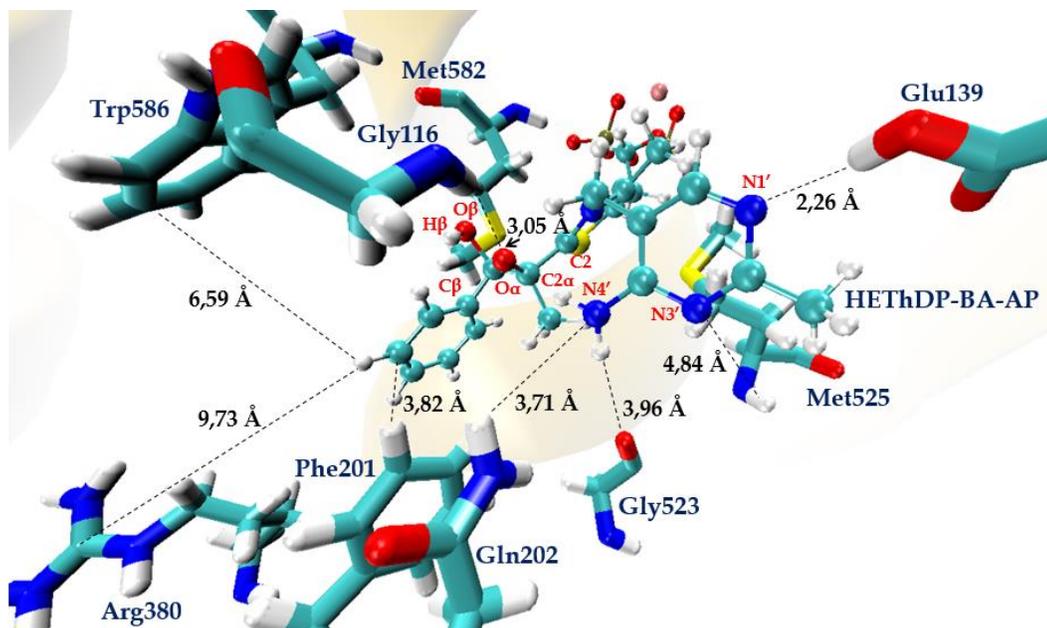
Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a la coordenada  $R_{H-O}$  el átomo de hidrógeno  $H_{\beta}$  presentó una distancia de 1,04 Å con respecto al oxígeno  $O_{\alpha}$  del intermedio HEThDP y de 1,72 Å con el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído. Por su parte las interacciones no enlazantes residuo sustrato, al igual que las observadas en la estructura de la zona de reactantes, se mantuvieron de igual manera en la zona del estado de transición  $TS_1$ , en donde las interacciones entre los sustratos y los residuos Glu139, Phe201, Arg380, Gly523, Met525 y Trp586 se encuentran en concordancia con las interacciones reportadas en literatura,<sup>3, 5, 6, 9</sup> ya que los residuos Phe201, Arg380 y Trp586 no muestran distancias con los sustratos que muestren que juegan un rol catalítico en la estabilización del estado de transición y los residuos Glu139, Gly523 y Met525 han mantenido las interacciones con el anillo de pirimidina otorgando valores para los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  de  $-77^\circ$  y

86°, respectivamente. Valores que también están relacionados con las interacciones que presentaron los residuos Gly116 y Gln202 con el oxígeno  $O_\alpha$  del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP-AP y con el nitrógeno N4' del anillo de pirimidina, respectivamente, aunque esta última con una distancia cercana a los 5,0 Å.

La estructura representativa de la zona del intermediario I, Figura 3.114, correspondiente a la estructura de menor energía potencial de todas las estructuras de la PES del sistema AP, muestra que el sustrato benzaldehído se encuentra enlazado al intermediario HETHDP-AP y el hidrógeno  $H_\beta$  se encuentra transferido y enlazado al oxígeno carbonílico  $O_\beta$  del sustrato benzaldehído, generando el complejo HETHDP-BA-AP, con una distancia de 1,56 Å entre los carbonos  $C2\alpha$  y  $C2$  y los carbonos  $C2\alpha$  y  $C_\beta$ , mientras que la distancia entre el hidrógeno  $H_\beta$  y el oxígeno  $O_\alpha$  desprotonado del intermediario HETHDP fue de 1,9 Å y la distancia del enlace entre el hidrógeno  $H_\beta$  y el oxígeno carbonílico  $O_\beta$  del benzaldehído de 1,0 Å. Al igual que en los demás puntos críticos de la PES del sistema AP analizados hasta el momento, las interacciones no enlazantes residuo sustrato de los residuos que componen el sitio activo no mostraron variaciones en comparación a las observadas durante las simulaciones de dinámica molecular del sistema AP. Aunque para este punto de mínimo local las interacciones de los residuos Gly116 y Gln202 con el oxígeno  $O_\alpha$  y el nitrógeno N4', respectivamente las distancias disminuyeron a 3,0 y 3,7 Å cada una, en comparación a la estructura del  $TS_1$  de la PES. En tanto, los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  fueron de -75° y 97°, respectivamente, encontrándose en concordancia con los valores reportados en literatura para las etapas de activación del cofactor correspondientes a  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ .<sup>10-</sup>

12

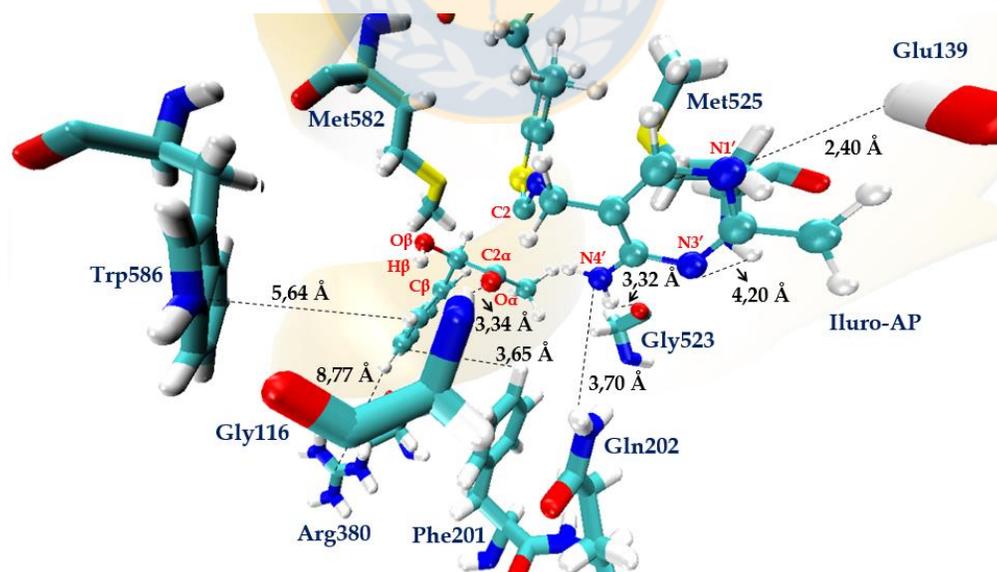


**Figura 3.114.** Estructura zona del intermediario PES QM/MM sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3.115 se presenta la estructura correspondiente al estado de transición  $ST_2$  que involucra la ruptura del enlace entre los carbonos  $C2\alpha$  y  $C2$ , estructura caracterizada para los átomos de la zona QM con una frecuencia imaginaria de  $-117\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al stretching de los átomos la coordenada de reacción  $R_{C-C}$ . Esta estructura presentó una distancia de  $2,4\text{ \AA}$  entre los carbonos  $C2\alpha$  y  $C2$  dando de la ruptura del enlace carbono carbono, mientras la distancia del enlace entre el carbono  $C2\alpha$  y el carbono carbonílico  $C\beta$  del benzaldehído fue de  $1,5\text{ \AA}$ . En cuanto a la coordenada  $R_{H-O}$  el átomo de hidrógeno  $H\beta$  presentó una distancia de  $2,2\text{ \AA}$  con respecto al oxígeno  $O\alpha$  del intermedriao HETHDP y de  $0,9\text{ \AA}$  para el enlace con el oxígeno carbonílico  $O\beta$  del sustrato benzaldehído. Por su parte las interacciones no enlazantes residuo sustrato se mantuvieron de igual forma que las estructuras de los puntos críticos de la PES correspondientes a la zona de reactantes, del estado de transición  $TS_1$  y del intermediario I, en donde los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  fueron de  $-72^\circ$  y  $109^\circ$ , respectivamente.

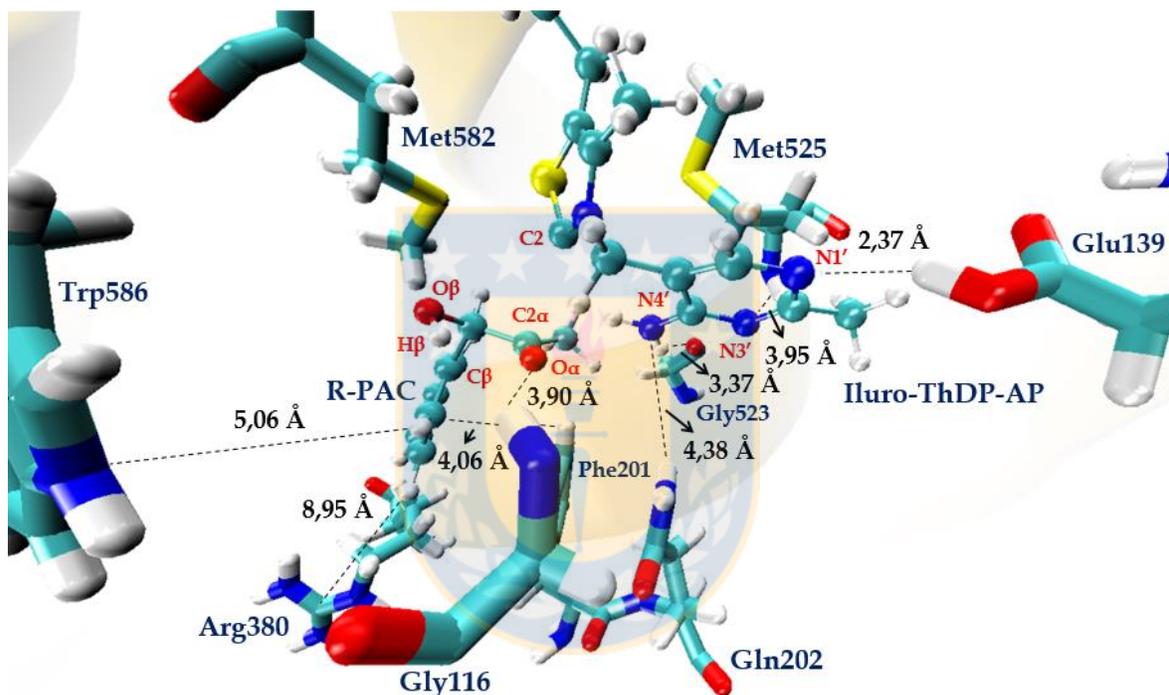
Por ultimo en la Figura 3.116 se presenta la estructura de menor energía potencial ubicada en la zona de los productos de la PES del sistema AP. En ella se puede apreciar que el intermediario se encuentra a la forma de iluro-ThDP-AP y que el producto R-PAC se encuentra liberado del cofactor, en donde las interacciones no enlazantes residuos sustratos no ha sufrido modificaciones en comparación a los demás puntos críticos de la PES del sistema AP. Esta estructura representativa de la zona de productos presentó una distancia de 3,03 Å entre los carbonos C2 $\alpha$  y C2 dando cuenta de la ruptura del enlace de carbono entre los átomos, en donde el anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-AP adoptó la forma de iluro, mientras que la distancia del enlace entre el carbono C2 $\alpha$  y el carbonílico C $\beta$  del benzaldehído fue de 1,51 Å. En tanto, la distancia del enlace entre el hidrógeno H $\beta$  y el oxígeno carbonílico O $\beta$  del benzaldehído fue de 0,95 Å y la distancia entre el hidrógeno H $\beta$  y el oxígeno O $\alpha$  fue de 2,08 Å. Por su parte, los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  presentaron valores de  $-70,2^\circ$  y  $102^\circ$  manteniendo una conformación activa tipo V para el intermediario HETHDP acorde a los valores reportados en literatura para las etapas de activación del cofactor correspondientes a  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ ,<sup>10-12</sup> respectivamente.



**Figura 3.115.** Estructura zona del estado de transición 2 PES QM/MM sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 3.13 se presenta un resumen de los valores de las distancias entre los átomos que conforman las coordenadas de reacción asimétricas  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$  de cada uno de los puntos críticos del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo la forma de AP. Además se presentan los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  durante las etapas del mecanismo de reacción, los cuales se encuentran en todas las etapas en concordancia con los valores reportados en literatura para la conformación activa tipo V del cofactor.



**Figura 3.116.** Estructura zona de productos PES QM/MM sistema AP.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.13: Distancias de las coordenadas de reacción y valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del intermediario HETHDP-AP de la PES QM/MM para la formación de R-PAC.**

Puntos críticos	C2 $\alpha$ -C2 (Å)	C $\beta$ -C2 $\alpha$ (Å)	H $\beta$ -O $\alpha$ (Å)	H $\beta$ -O $\beta$ (Å)	Diedro $\Phi_P$ (°)	Diedro $\Phi_T$ (°)
React.	1,37	2,92	0,97	1,78	-78,6	96,0
TS <sub>1</sub>	1,44	2,27	1,04	1,72	-77,3	86,2
Interm.	1,56	1,56	1,91	1,02	-75,5	97,4
TS <sub>2</sub>	2,36	1,52	2,17	0,94	-72,3	109
Product.	3,03	1,51	2,08	0,95	-70,2	102

Fuente: Elaboración propia.

Durante la exploración de la PES del mecanismo de reacción propuesto del sistema AP se pudo observar que en todos los puntos críticos, la interacción de la Gly116, a pesar de no estar en concordancia con lo reportado en literatura, se mantuvo estabilizando la densidad de carga del oxígeno O $\alpha$  desde donde se produce la transferencia protónica del hidrógeno H $\beta$  hacia el oxígeno carbonílico O $\beta$  del sustrato benzaldehído, quedando el oxígeno O $\alpha$  desprotonado a partir de la formación del intermediario HETHDP-BA-AP correspondiente al intermediario entre los pasos tres y cuatro de ciclo catalítico de la enzima AHAS. Esta interacción es a la que se puede atribuir que a pesar de que la interacción de la Gly116 no esté en concordancia con lo reportado en literatura, haya sido la interacción responsable de que la energía de activación del mecanismo propuesto en el sistema AP fuera muy cercana y menor al valor experimental de 13,8 Kcal/mol reportado para la formación del producto natural AL.<sup>7</sup> En contraste, la Gln202 solo estabilizó y con distancias cercanas a los 4,0 Å en promedio al nitrógeno N4' enlazado al anillo de pirimidina, interacción que no presentó estabilización en las coordenadas de reacción y que no concuerda por lo demás con lo reportado en literatura. En este sentido, el estado de protonación del nitrógeno N4' influyó en la

interacción de la Gln202 con el oxígeno  $O_{\alpha}$  del intermediario HETHDP-AP, provocando que la Gly116 estabilizara al oxígeno  $O_{\alpha}$  y no al oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído.

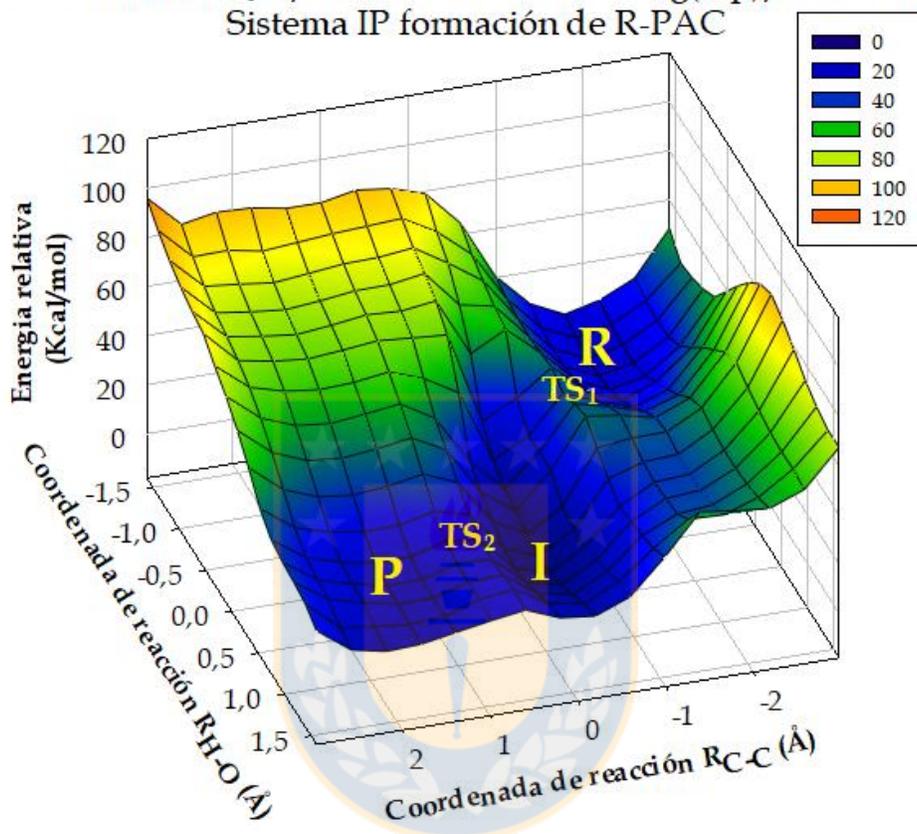
### 3.3.2 Superficie de energía potencial QM/MM sistema IP

La exploración de la PES QM/MM para la formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo el estado de protonación IP, muestra al igual que lo observado en el sistema AP, que el mecanismo de reacción para el tercer paso del ciclo catalítico ocurre de forma concertada y es asincrónico para los valores de las coordenadas asimétricas  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$ , tal como se observa en las Figuras 3.117 y 3.118 correspondientes a la representación de la PES para el sistema IP. En esta exploración de la PES, la zona de reactantes, también denominada con la letra R, se ubicó aproximadamente en los  $-1,8 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $-1,1 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , mientras que el estado de transición 1 ( $TS_1$ ), en el cual se produce la carboligación del sustrato benzaldehído y la transferencia protónica del hidrógeno  $H_{\beta}$ , se ubicó en una zona cercana a los  $-0,8 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $-0,3 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , en donde el estado de transición  $TS_1$  da paso a la formación del intermediario de la reacción en la zona denominada con la letra I, ubicada alrededor de los  $0,0 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $0,6 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , zona en que, al igual que en el mecanismo observado en la PES del sistema AP, el sustrato benzaldehído se encuentra enlazado al intermediario HETHDP-IP y el hidrógeno  $H_{\beta}$  se encuentra formando un enlace con el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del benzaldehído, dando paso al complejo HETHDP-BA-IP.

Posteriormente avanzando por la coordenada asimétrica  $R_{C-C}$  la PES muestra una zona de punto de silla correspondiente al estado de transición  $TS_2$  el cual involucra la ruptura del enlace entre los carbonos  $C2_{\alpha}$  y  $C2$  y se encuentra ubicada alrededor de los  $0,7 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $1,0 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ . Por último se encuentra el punto críticos correspondiente a la zona de los productos, denominada con la letra P, zona ubicada a los  $1,6 \text{ \AA}$  en la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $1,2 \text{ \AA}$  para la

coordenada  $R_{H-O}$ , en donde el precursor R-PAC se encuentra liberado del cofactor ThDP, el cual se regenera a la forma de iluro-ThDP-IP, etapa del mecanismo correspondiente al cuarto paso del ciclo catalítico de la enzima AHAS.

PES Contorno QM/MM B3LYP-D3 6-31++g(d,p)/OPLS-AA  
Sistema IP formación de R-PAC

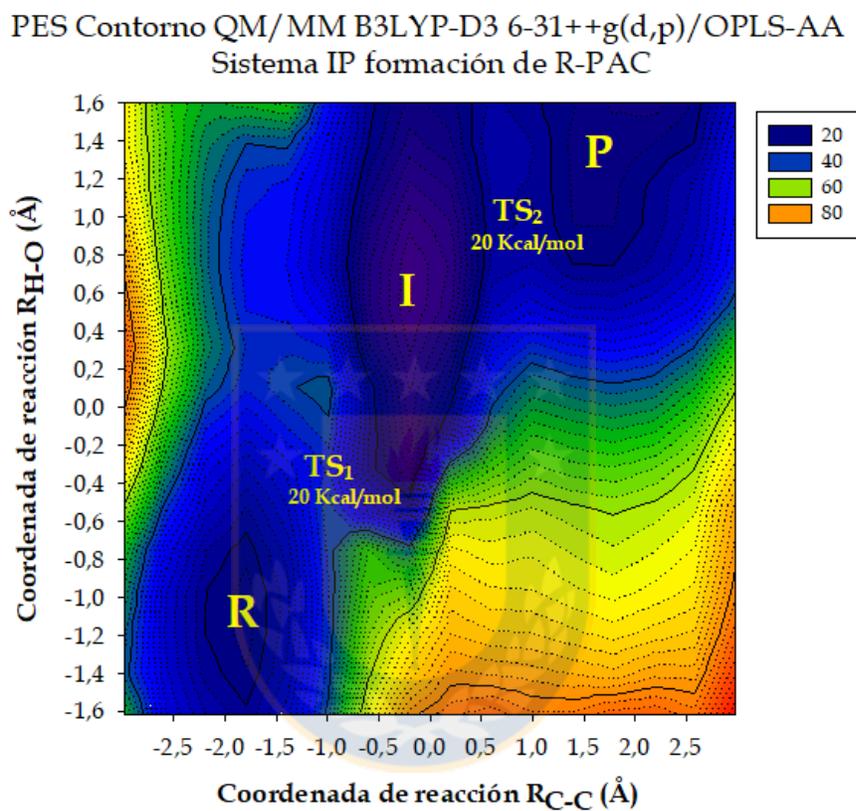


**Figura 3.117.** Superficie de energía potencial 3D QM/MM formación de R-PAC enzima AHAS sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

El estado de transición  $TS_1$  de la PES del sistema IP presentó una barrera de activación de 20 Kcal/mol, tal como se muestra en la Figura 132, valor que se encuentra por sobre el valor experimental de 13 Kcal/mol reportado en literatura<sup>22</sup> para la formación de R-PAC en la enzima AHAS y por sobre la energía de activación de 13,8 Kcal/mol reportada para para la formación del producto fisiológico de la enzima correspondiente a AL.<sup>7</sup> Similar valor de energía de activación en términos de energía

potencial, presentó la estructura caracterizada para el estado de transición  $TS_2$ , valor que se encuentra 5 Kcal/mol por sobre el valor reportado en literatura para la liberación del producto natural de la enzima AL<sup>7</sup> y que al igual que en la PES del sistema AP, el valor de la energía de activación del  $TS_1$  corresponde a la etapa limitante del mecanismo de reacción.

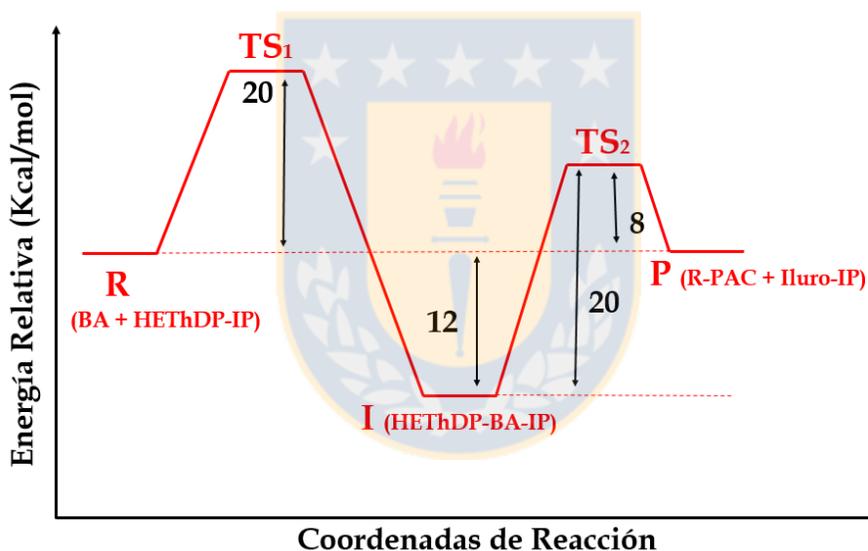


**Figura 3.118.** Superficie de energía potencial QM/MM de contorno para la formación de R-PAC enzima AHAS sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3.119 se muestra el diagrama de energía potencial de las etapas del mecanismo de reacción obtenidas desde la exploración de la PES QM/MM del sistema IP. En él se puede apreciar que una vez que el intermediario I correspondiente al complejo HETHDP-BA-IP se encuentra formado, la energía potencial del sistema se encuentra estabilizada en 12 Kcal/mol en comparación a la zona de reactantes, mientras que el estado de transición  $TS_2$  se encuentra 8 Kcal/mol por sobre la energía

potencial de la zona de reactantes, por lo que no presenta competencia con el estado de transición  $TS_1$  el cual posee una energía potencial de activación de 20 Kcal/mol por sobre la zona de los reactantes y por consiguiente corresponde al paso limitante de la reacción. Por último, la exploración de la PES QM/MM del sistema IP muestra que los productos no se encuentran estabilizados energéticamente, sino que son isoenergéticos en comparación a la energía potencial de los reactantes, indicando que la reacción de formación de R-PAC con el intermediario bajo la forma de IP no se encuentra favorecida cinética ni termodinámicamente en comparación a los resultados obtenidos en la exploración de la PES QM/MM del sistema AP.

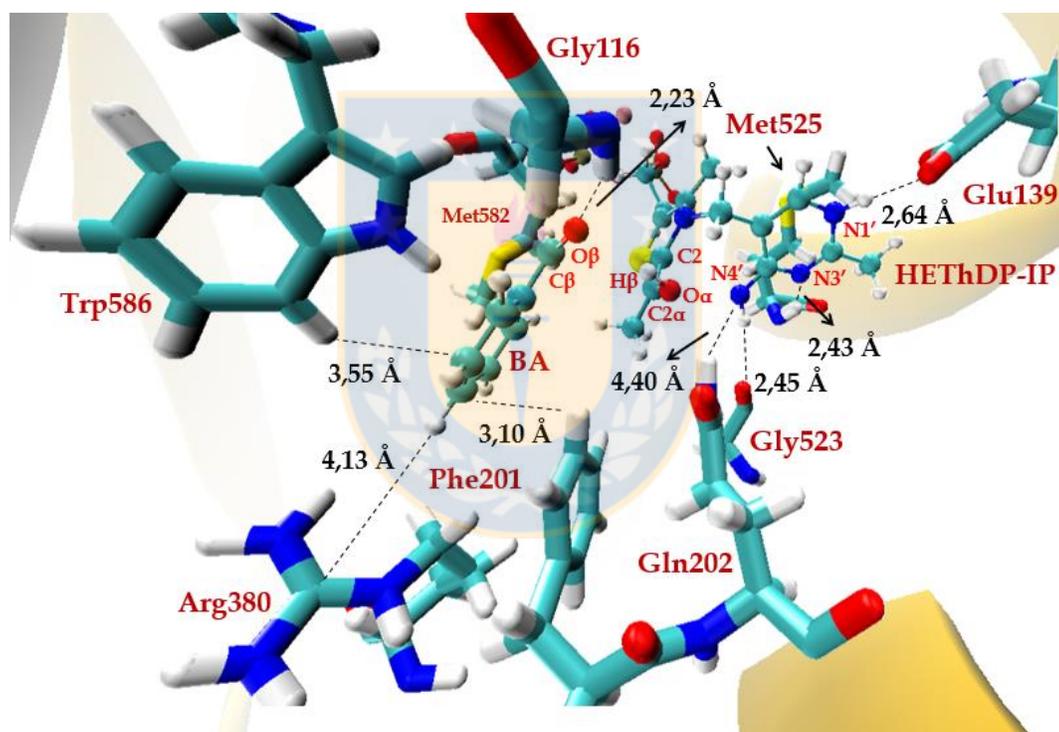


**Figura 3.119.** Diagrama de energía potencial (Kcal/mol) para la formación de R-PAC en la enzima AHAS con el intermediario HETHDP bajo la forma de IP.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3.120 se presenta la estructura representativa de menor energía potencial de la zona de reactantes en la PES QM/MM del sistema IP. Esta estructura muestra que las interacciones reportadas en literatura para los residuos Glu139, Gly523 y Met525 se encuentran en concordancia con las interacciones reportadas en literatura<sup>3,5,6,9</sup>, al igual

que la interacción por enlace de hidrógeno entre el hidrógeno del backbone de la Gly116 y el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído<sup>4</sup>, interacción que presentó una distancia de 2,23 Å, mientras que los hidrógenos del grupo amida de la Gln202 se mantuvieron orientados hacia el nitrógeno  $N4'$  del grupo imino del intermediario HETHDP-IP, aunque con una distancia superior a los 4 Å, pero no mostró orientación con el oxígeno  $O_{\alpha}$  del grupo hidroxilo del mismo intermediario, como se encuentra reportado en literatura para la formación de AL<sup>4,5</sup>, interacción que se ve desfavorecida por el carácter nucleofílico de nitrógeno  $N4'$  cuando el intermediario HETHDP se encuentra bajo la forma de IP.



**Figura 3.120.** Estructura zona de reactantes PES QM/MM sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

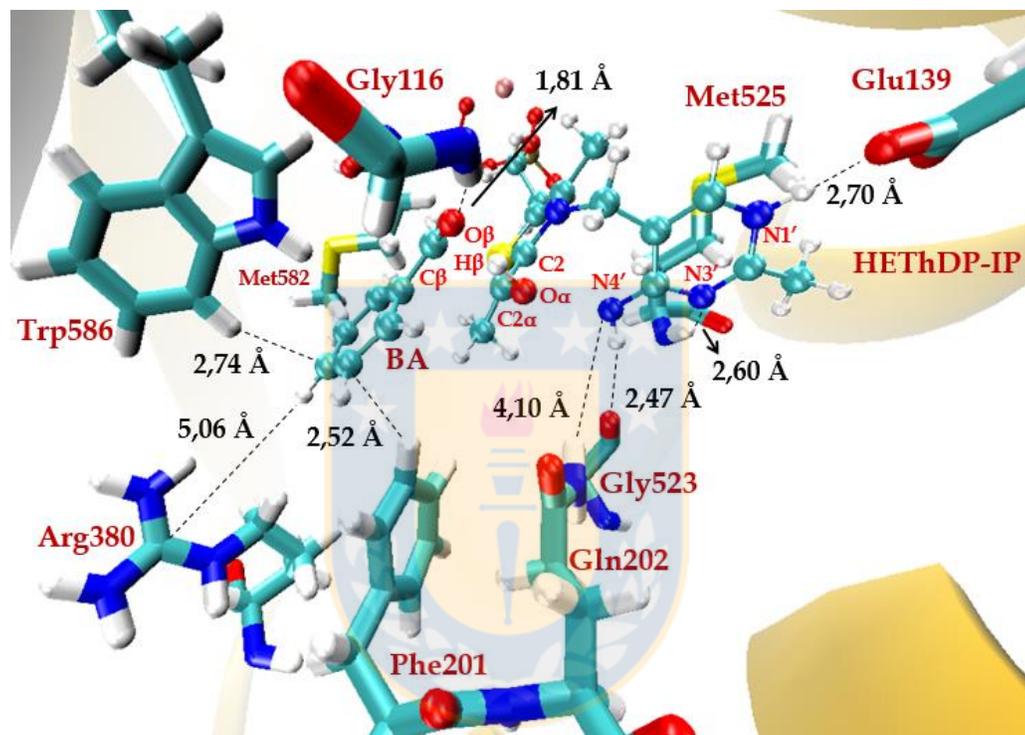
Por otro lado, las distancias entre las cadenas laterales de los residuos Phe201, Arg380 y Trp586 presentaron valores cercanos hacia el anillo de benceno del sustrato benzaldehído, haciendo suponer la estabilización de la densidad electrónica del anillo de benceno por parte de los anillos de indol y del grupo fenilo de los residuos Trp586

y Phe201 respectivamente. Sin embargo, a pesar de la cercanía entre el grupo guanidinio de la cadena lateral del residuo Arg380 y el anillo de benceno, tal como se observó en las simulaciones de dinámica molecular MM del sitio activo 2 del sistema IP la orientación en conformación tipo T de la Arg380 no es la educada, provocando repulsión entre la carga formal positiva del grupo guanidinio y los hidrógenos aromáticos del sustrato benzaldehído.

Esta estructura representativa de la zona de reactantes presentó una distancia de 1,35 Å entre los carbonos C2 $\alpha$  y C2 dando cuenta del carácter de enlace doble entre los carbonos, en donde el anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-IP adoptó la forma de enamina al igual que en la zona de reactantes del sistema AP, en tanto la distancia entre el carbono C2 $\alpha$  y el carbonílico C $\beta$  del benzaldehído fue de 3,20 Å. En cuanto a los valores de la coordenada de reacción R<sub>H-O</sub>, la distancia entre el hidrógeno H $\beta$  del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP-IP y el oxígeno carbonílico O $\beta$  del benzaldehído fue de 2,16 Å y la distancia del enlace entre el hidrógeno H $\beta$  y el oxígeno O $\alpha$  fue de 1,0 Å. Por su parte, los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  presentaron valores de -54,3° y 91,6° manteniendo una conformación activa tipo V para el intermediario HETHDP-IP, en donde el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  quedó condicionado por las interacciones de los residuos Gly523 y Met525, junto con la gran distancia entre la Gln202 y el nitrógeno N4'.

Para la estructura representativa de la zona del estado de transición 1 de la PES QM/MM del sistema IP, representada en la Figura 3.121, se encontró una frecuencia negativa de -477 cm<sup>-1</sup> correspondiente al stretching de las coordenadas de reacción R<sub>C-C</sub> y R<sub>H-O</sub>. Esta estructura presentó una distancia de 1,43 Å entre los carbonos C2 $\alpha$  y C2 dando cuenta del alargamiento del enlace en comparación a la estructura de la zona de los reactantes, mientras la distancia entre el carbono C2 $\alpha$  y el carbonílico C $\beta$  del benzaldehído fue de 2,2 Å. En cuanto a la coordenada R<sub>H-O</sub> el átomo de hidrógeno H $\beta$  presentó una distancia de 1,14 Å con respecto al oxígeno O $\alpha$  del intermediario HETHDP y de 1,44 Å con el oxígeno carbonílico O $\beta$  del sustrato benzaldehído. Por su parte, los

ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  presentaron valores de  $-45,4^\circ$  y  $80^\circ$  manteniendo una conformación activa tipo V para el intermediario HETHDP-IP, con valores para el ángulo diedro  $\Phi_P$  similares a los presentados en las simulaciones de dinámica molecular MM y QM/MM, mientras que el ángulo diedro  $\Phi_T$  se encuentra acorde a los valores reportados en literatura correspondiente a  $\pm 95^\circ$ .<sup>10-12</sup>



**Figura 3.121.** Estructura zona del estado de transición 1 PES QM/MM sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

Según lo observado en la PES QM/MM del sistema IP, representada en la superficie de contorno de la Figura 3.118, se puede apreciar que existe otra zona de posible estado de transición para la formación de R-PAC ubicada a los  $1,7 \text{ \AA}$  en la coordenada  $R_{C-C}$  y a los  $0,2 \text{ \AA}$  en la coordenada  $R_{H-O}$ , zona por la cual el estado de transición involucraría solo a la coordenada de reacción  $R_{H-O}$  en un mecanismo de reacción sustentado basado en la catálisis ácida debido a que solo la protonación del oxígeno carbonílico de sustrato benzaldehído bastaría para que posteriormente la energía potencial de las estructuras

se mantenga estable y no se aprecie barrera energética involucrada para la carboligación del sustrato benzaldehído. Sin embargo, esta zona se descarta como posible zona de punto de silla ya que no presentó frecuencias negativas en ninguna de las estructuras utilizadas en los cálculos realizados, aunque sin embargo las estructuras de la zona en promedio presentaron una energía de activación similar a la zona del TS<sub>1</sub> caracterizado.

En tanto la estructura representativa de la zona del intermediario I, representada en la Figura 3.122 y que corresponde a la estructura de menor energía potencial de todas las estructuras de la PES del sistema IP, muestra que el sustrato benzaldehído y el intermediario HETHDP-IP se encuentran formando el complejo HETHDP-BA-IP, con una distancia de 1,66 Å entre los carbonos C2 $\alpha$  y C2 y de 1,66 Å entre los carbonos C2 $\alpha$  y C $\beta$ , mientras que la distancia entre el hidrógeno H $\beta$  y el oxígeno O $\alpha$  desprotonado del intermediario HETHDP fue de 1,54 Å y la distancia del enlace entre el hidrógeno H $\beta$  y el oxígeno carbonílico O $\beta$  del benzaldehído de 1,06 Å. Al igual que en los demás puntos críticos de la PES del sistema IP analizados hasta el momento, las interacciones no enlazantes residuo sustrato de los residuos que componen el sitio activo no mostraron variaciones en comparación a las observadas durante las simulaciones de dinámica molecular del sistema IP. Los residuos Gly116 y Gln202 mantuvieron interacciones por enlace de hidrógeno con el oxígeno O $\alpha$  y el nitrógeno N4' a distancias de 2,0 y 3,8 Å, respectivamente. En tanto los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  fueron de -53° y 130°, respectivamente, los cuales no concuerdan con los valores reportados en literatura para las etapas de activación del cofactor correspondientes a  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ .<sup>10-12</sup> Lo cual puede deberse a las interacciones no reportadas en literatura de los residuos Arg380, Phe201 y Trp586 con el sustrato benzaldehído que se encuentra unido mediante el enlace con el carbono C2 $\alpha$  al anillo de tiazolio del cofactor, provocando la torsión del ángulo diedro  $\Phi_T$  lo cual se ve favorecido debido a que la Gln202 se encuentra interaccionado, aunque a gran distancia, con el nitrógeno N4' y no con el oxígeno O $\alpha$  del intermediario HETHDP.

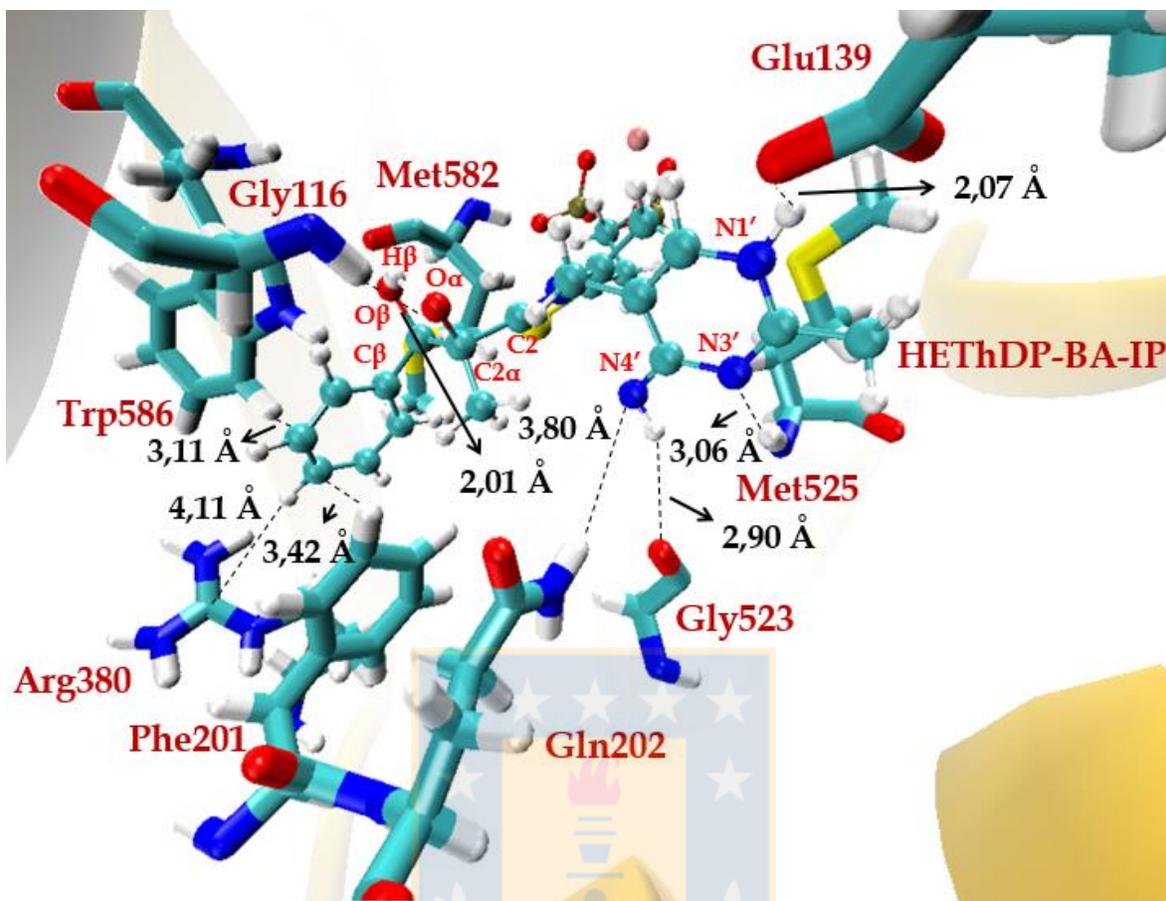
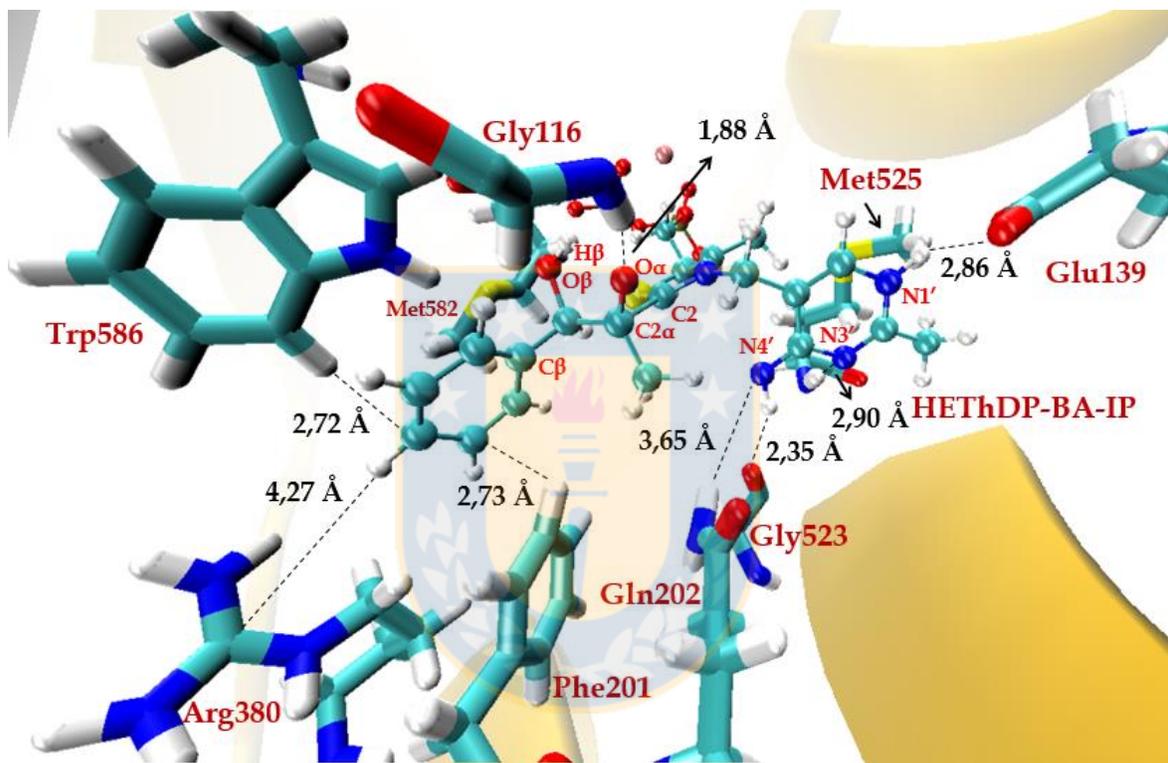


Figura 3.122. Estructura zona del intermediario PES QM/MM sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

La estructura representativa de la zona del estado de transición  $TS_2$  representada en la Figura 3.123 fue caracterizada, para los átomos de la zona QM, con una frecuencia imaginaria de  $-184 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al stretching de los átomos la coordenada de reacción  $R_{C-C}$ . Esta estructura presentó una distancia de  $2,17 \text{ \AA}$  entre los carbonos  $C2\alpha$  y  $C2$  dando de la ruptura del enlace carbono carbono, mientras la distancia del enlace entre el carbono  $C2\alpha$  y el carbono carbonílico  $C\beta$  del benzaldehído fue de  $1,6 \text{ \AA}$ . En cuanto a la coordenada  $R_{H-O}$  el átomo de hidrógeno  $H\beta$  presentó una distancia de  $2,1 \text{ \AA}$  con respecto al oxígeno  $O\alpha$  del intermedario HETHDP y de  $1,0 \text{ \AA}$  para el enlace con el oxígeno carbonílico  $O\beta$  del sustrato benzaldehído. Por su parte las interacciones no enlazantes residuo sustrato se mantuvieron de igual forma que los resultados

obtenidos en las simulaciones de DM, en donde la Gly116 se encuentra interaccionando con el oxígeno  $O_{\alpha}$  y la Gln202 con el nitrógeno  $N4'$ , mientras que los residuos Glu139, Gly523 y Met525 interaccionan con el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-IP y los residuos Phe201, Arg380 y Trp586 lo hacen con el anillo de benceno del benzaldehído, en donde los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  fueron de  $-69^{\circ}$  y  $126^{\circ}$ , respectivamente.



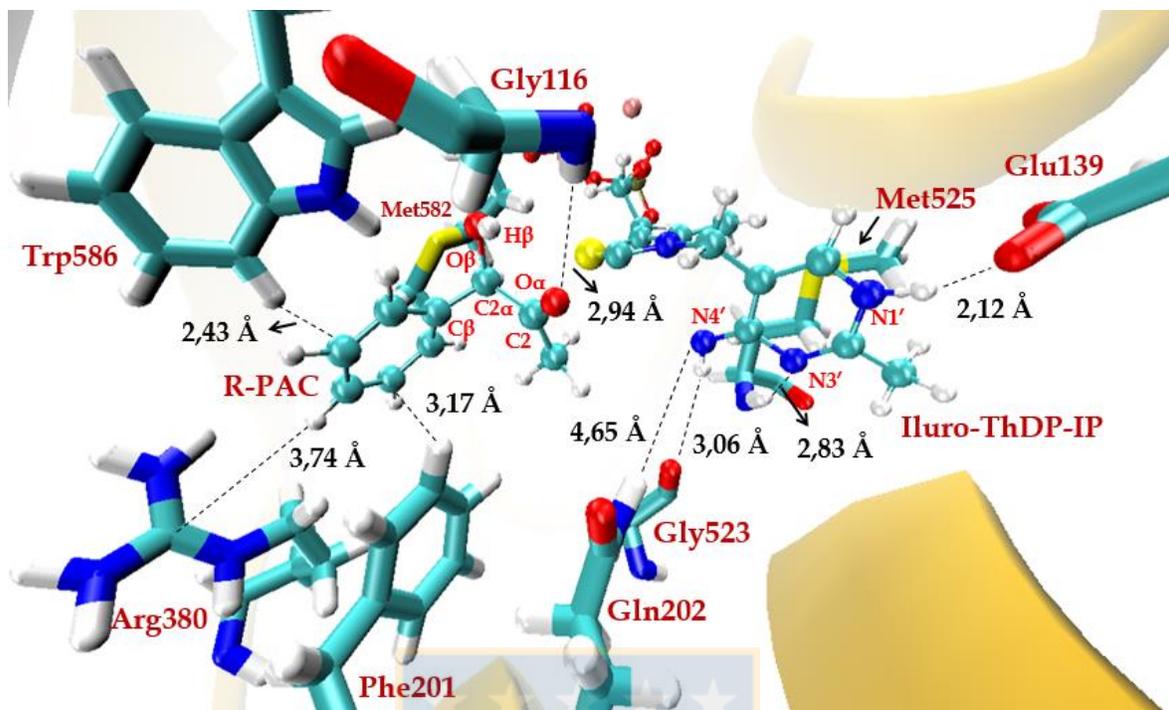
**Figura 3.123.** Estructura zona del estado de transición 2 PES QM/MM sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

Para la zona de los productos de la PES QM/MM del sistema IP se muestra la Figura 3.124 a la estructura de menor energía potencial ubicada aproximadamente en los 1,5 Å para la coordenada  $R_{C-C}$  y a los 1,2 Å para la coordenada  $R_{H-O}$ . En esta zona el intermediario se encuentra a la forma de iluro-ThDP-IP y que el producto R-PAC se encuentra liberado del cofactor, en donde las interacciones no enlazantes residuos sustratos no ha sufrido modificaciones en comparación a los resultados comúnmente

ya observados para el sitio activo del sistema IP en los simulaciones de dinámica molecular MM y QM/MM realizadas, ya que la Gly116 se encuentra interaccionando mediante un enlace de hidrógeno con el oxígeno  $O_{\alpha}$  del intermediario HETHDP-IP y la Gln202 con el nitrógeno N4' del grupo imino enlazado al anillo de pirimidina, mientras que los residuos Glu139, Gly523 y Met525 interaccionan con el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-IP y los residuos Phe201, Arg380 y Trp586 lo hacen con el anillo de benceno del producto R-PAC.

Esta estructura representativa de la zona de los productos del sistema IP presentó una distancia de 2,90 Å entre los carbonos  $C2_{\alpha}$  y  $C2$  dando cuenta de la ruptura del enlace de carbono entre los átomos, en donde el anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-IP adoptó la forma del intermediario iluro-ThDP-IP y el producto R-PAC se encuentra liberado, mientras que la distancia del enlace entre el carbono  $C2_{\alpha}$  y el carbonílico  $C_{\beta}$  del benzaldehído fue de 1,44 Å. En tanto, la distancia del enlace entre el hidrógeno  $H_{\beta}$  y el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del benzaldehído fue de 0,95 Å y la distancia entre el hidrógeno  $H_{\beta}$  y el oxígeno  $O_{\alpha}$  fue de 2,20 Å. Por su parte, los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  presentaron valores de  $-64,4^{\circ}$  y  $100^{\circ}$ , respectivamente, manteniendo una conformación activa tipo V para el intermediario HETHDP acorde a los valores reportados en literatura para las etapas de activación del cofactor correspondientes a  $\pm 70^{\circ}$  y  $\pm 95^{\circ}$ ,<sup>10-12</sup> respectivamente.



**Figura 3.124.** Estructura zona de productos PES QM/MM sistema IP.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 3.14 se presenta un resumen de los valores de las distancias entre los átomos que conforman las coordenadas de reacción asimétricas  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$  de cada uno de los puntos críticos del mecanismo de reacción obtenido para la formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo la forma de IP. Además se presentan los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del intermediario HETHDP-IP para las estructuras representativas de las etapas del mecanismo de reacción, valores que muestran como a medida que las coordenadas de reacción avanzan en la formación del producto R-PAC el ángulo diedro  $\Phi_P$  cambia desde los aproximadamente los  $-50^\circ$  a los  $-70^\circ$  sin que el cofactor pierda la conformación activa tipo V, mientras que el ángulo diedro  $\Phi_T$  mantuvo en la zona de reactantes y productos valores acordes al valor de  $90^\circ$  reportado en literatura.

**Tabla 3.14: Distancias de las coordenadas de reacción y valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del intermediario HETHDP-IP de la PES QM/MM para la formación de R-PAC.**

Puntos críticos	C2 $\alpha$ -C2 (Å)	C $\beta$ -C2 $\alpha$ (Å)	H $\beta$ -O $\alpha$ (Å)	H $\beta$ -O $\beta$ (Å)	Diedro $\Phi_P$ (°)	Diedro $\Phi_T$ (°)
React.	1,35	3,40	1,01	2,16	-54,3	91,6
TS1	1,43	2,24	1,14	1,44	-45,4	79,8
Interm.	1,66	1,56	1,54	1,06	-53,2	130
TS2	2,17	1,59	2,10	1,00	-69,0	126
Product.	2,90	1,44	2,20	0,95	-64,4	100

Fuente: Elaboración propia.

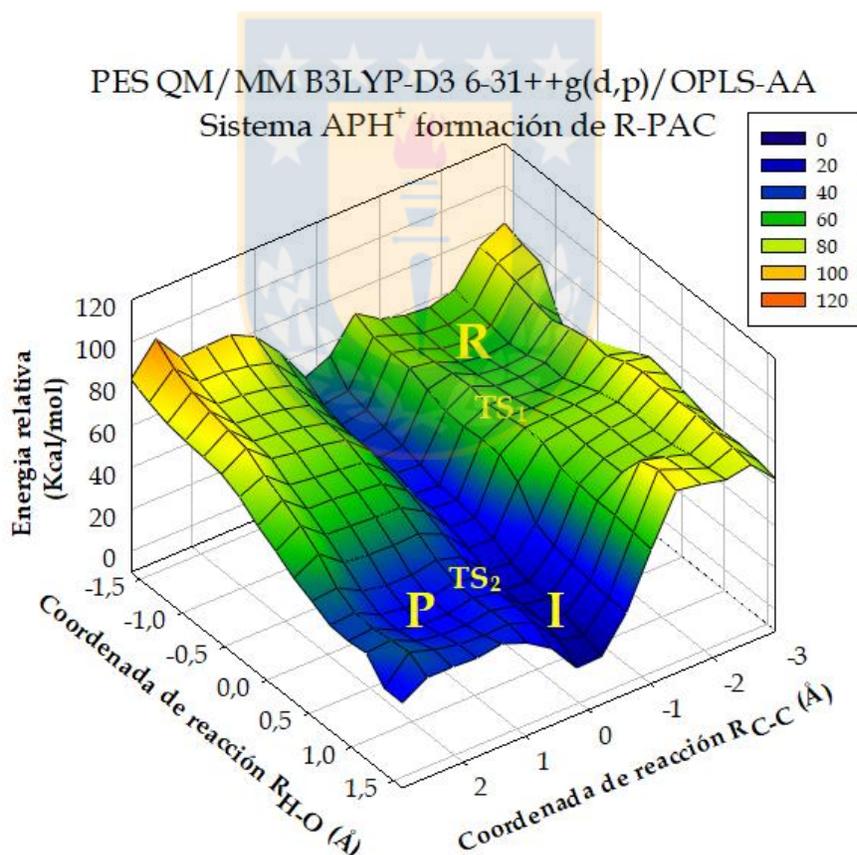
A pesar de que en la zona de reactantes la Gly116 se encuentra interaccionando con el oxígeno carbonílico O $\beta$  del sustrato benzaldehído, interacción residuo sustrato acorde a lo reportado en literatura,<sup>4</sup> en los demás puntos críticos de la PES QM/MM del sistema IP tanto la Gly116 como la Gln202 mantuvieron las interacciones presentadas en la simulaciones de dinámica molecular del sistema IP, en donde la Gly116 se encuentra interaccionado con el oxígeno O $\alpha$  del intermediario HETHDP-IP y la Gln202 con el nitrógeno N4' enlazado al anillo de pirimidina. Al igual que en el sistema AP, estas interacciones se ven favorecidas por sobre las interacciones reportadas en literatura, debido al carácter nucleofílico del nitrógeno N4' del grupo imino cuando el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP se encuentra bajo la forma de IP. Además en todos los puntos críticos de la PES se observó que las cadenas laterales de los residuos Phe201, Trp586 y Arg380 se encuentran a distancias muy cercanas del anillo de benceno del sustrato benzaldehído, en donde la Arg380 se encontraría desestabilizando al sustrato benzaldehído, según resultados similares obtenidos en la DM MM del sistema IP en la sección 3.1.2, tabla V, página 80. Mientras que la Phe201 y el Trp586 se encuentran estabilizando la densidad de carga del anillo de benceno del

sustrato benzaldehído mediante interacciones  $\pi$ -stacking con conformación tipo T entre los anillos aromáticos de los residuos y el benzaldehído. A pesar de esto, la energía de activación para la formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo la forma de IP fue de 20 Kcal/mol, 6 Kcal/mol por sobre el valor reportado en literatura para la formación del producto natural AL,<sup>7</sup> lo cual se puede atribuir a que la mayoría de las interacciones residuo sustrato en el sitio activo no se encuentran acorde a las interacciones reportadas en literatura para la formación de AL, salvo las interacciones entre los residuos Glu139, Gly523 y Met525 y el anillo de pirimidina del cofactor. Además, la reacción no está favorecida termodinámicamente ya que las estructuras de las zonas de los productos no se encuentran en una zona de mayor estabilidad en comparación a las estructuras de la zona de los reactantes de la PES, siendo isoenergéticas ambas zonas, lo cual no favorece la estabilidad termodinámica del ciclo activo de la enzima si es que la reacción de formación del producto R-PAC ocurriera con el intermediario HETHDP bajo la forma de IP. Sin embargo, debido a la similitud del mecanismo de reacción obtenido mediante la exploración de la PES tanto del sistema IP como del sistema AP presentado anteriormente en la sección 3.3.2, se puede inferir que el mecanismo de reacción para la formación de R-PAC ocurriría vía un mecanismo concertado y asincrónico, en donde el ataque nucleofílico del carbono C $2\alpha$  del intermediario HETHDP hacia el carbono carbonílico C $\beta$  del sustrato benzaldehído va acompañado de la transferencia protónica del hidrógeno H $\beta$  desde el oxígeno O $\alpha$  del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP hacia el oxígeno carbonílico O $\beta$  del benzaldehído, aunque con distintos valores para las coordenadas de reacción R $_{C-C}$  y R $_{H-O}$  para cada paso del mecanismo.

### 3.3.3 Superficie de energía potencial QM/MM sistema APH<sup>+</sup>

Al igual que los resultados obtenidos para los sistemas IP y AP, la exploración de la PES QM/MM para la formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo el estado de protonación APH<sup>+</sup> muestra que el mecanismo de reacción para el tercer paso del ciclo catalítico ocurre de forma concertada y es asincrónico entre los valores de las

coordenadas asimétricas  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$ , tal como se observa en las Figuras 3.125 y 3.126 correspondientes a la representación de la PES para el sistema  $APH^+$  a través del gráfico 3D y de contorno, respectivamente. De esta manera, la zona de reactantes, denominada con la letra R, se ubicó alrededor de los  $-1,8 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $-1,0 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , mientras que el estado de transición 1 ( $TS_1$ ) se ubicó en una zona cercana a los  $-0,9 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y los  $-0,3 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , en donde el estado de transición  $TS_1$  da paso a la formación del intermediario de la reacción en la zona denominada con la letra I, ubicada cerca de los  $0,0 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{C-C}$  y  $1,5 \text{ \AA}$  para la coordenada  $R_{H-O}$ , zona correspondiente a la menor energía potencial de todos los puntos críticos de la PES, en la cual se forma el complejo HETHDP-BA- $APH^+$ .

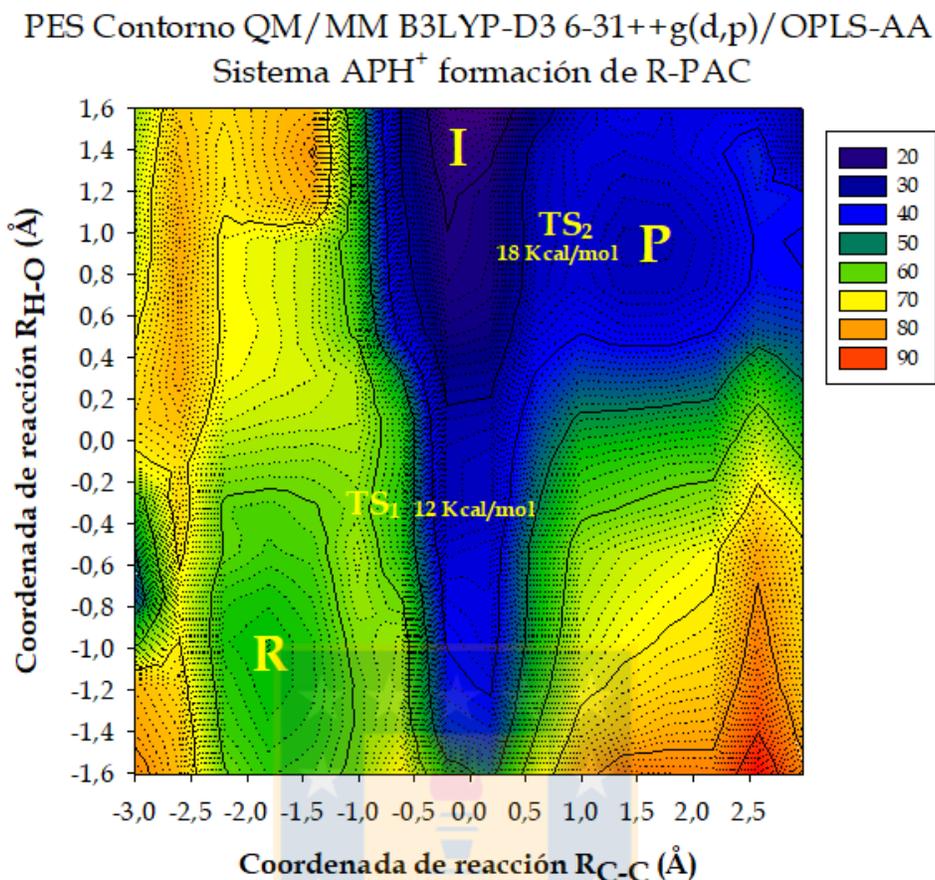


**Figura 3.125.** Superficie de energía potencial 3D QM/MM formación de R-PAC enzima AHAS sistema  $APH^+$ .

Fuente: Elaboración propia.

Al igual que en la PES del sistema AP, el estado de transición TS<sub>1</sub> de la PES del sistema APH<sup>+</sup> presentó una barrera de activación de 12 Kcal/mol, tal como se muestra en la Figura 3.126, valor que es ligeramente menor y que se encuentra en concordancia con el valor experimental de 13,8 Kcal/mol reportado en literatura para la formación de AL en términos de energía libre de activación.<sup>7</sup> Similar resultado se muestra para la segunda zona del estado de transición TS<sub>2</sub> ubicada entre un máximo de energía para la coordenada R<sub>C-C</sub> y en un mínimo de energía a lo largo de la coordenada R<sub>H-O</sub>, estado estacionario que delimita la energía de activación necesaria para la ruptura del enlace entre los carbonos C2 $\alpha$  y C2 del complejo HETHDP-BA-APH<sup>+</sup>, provocando la liberación del producto R-PAC y la regeneración del cofactor ThDP a la forma del intermediario iluro-ThDP-APH<sup>+</sup>, en la etapa del mecanismo de reacción correspondiente al paso 4 del ciclo catalítico de la enzima AHAS.

Esta similitud se debe a que energía de activación para el TS<sub>2</sub> fue de 18 Kcal/mol, valor cercano a la energía libre de activación de 15 Kcal/mol reportada en literatura<sup>7</sup> para la liberación del producto natural de la enzima AL.<sup>7</sup> El TS<sub>2</sub> de la PES del sistema APH<sup>+</sup> se encuentra ubicado a los 0,8 Å en la coordenada R<sub>C-C</sub> y los 1,0 Å para la coordenada R<sub>H-O</sub>. Por último se encuentra el punto crítico correspondiente a la zona de los productos, denominada con la letra P, zona ubicada a los 1,6 Å en la coordenada R<sub>C-C</sub> y los 0,9 Å para la coordenada R<sub>H-O</sub>, en donde el precursor R-PAC se encuentra liberado del cofactor ThDP y el cofactor regenerado a la forma de iluro-ThDP-APH<sup>+</sup>.

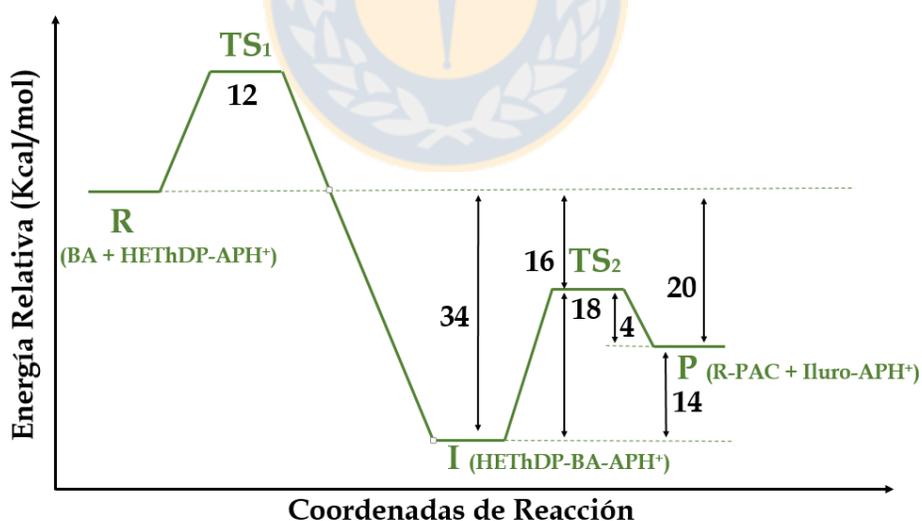


**Figura 3.126.** Superficie de energía potencial QM/MM de contorno para la formación de R-PAC enzima AHAS sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3.127 se muestra el diagrama de energía potencial de las etapas del mecanismo de reacción obtenidas desde la exploración de la PES QM/MM del sistema IP. En él se puede apreciar que una vez que el intermediario I correspondiente al complejo HETHDP-BA-IP se encuentra formado, la energía potencial del sistema se encuentra estabilizada en 34 Kcal/mol en comparación a la zona de reactantes, siendo el sistema con la mayor estabilización de la energía potencial una vez formado el intermediario de la reacción. Al igual que en la PES del sistema AP, el estado de transición TS<sub>2</sub>, presentó una energía de activación de 18 Kcal/mol, que se encuentra por debajo de la energía potencial de la zona de reactantes, específicamente 16

Kcal/mol más estable, por lo que no presenta competencia con el estado de transición  $TS_1$ , el cual es el paso limitante del mecanismo de reacción propuesto, con una energía de activación de 12 Kcal/mol. Además, la exploración de la PES QM/MM del sistema  $APH^+$  muestra que los productos se encuentran estabilizados en 20 Kcal/mol en comparación a la energía potencial de los reactantes, indicando que la reacción de formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo el estado de protonación  $APH^+$  es 5 kcal/mol más exotérmica que cuando ocurre con el intermediario bajo la forma de AP y por ende la zona de los productos se encuentra mayormente estabilizada, lo que indica que la formación de R-PAC en el sistema  $APH^+$  no solo concuerda con las energías de interacción no enlazantes residuo sustrato según los resultados de dinámica molecular presentados hasta el momento, sino que también se encuentra favorecida al otorgar la mayor estabilidad termodinámica al ciclo catalítico de la enzima, junto con una energía de activación teórica en términos de energía potencial menor y muy cercana al valor experimental de 13,8 Kcal/mol reportado en literatura para la formación de AL.<sup>7</sup>

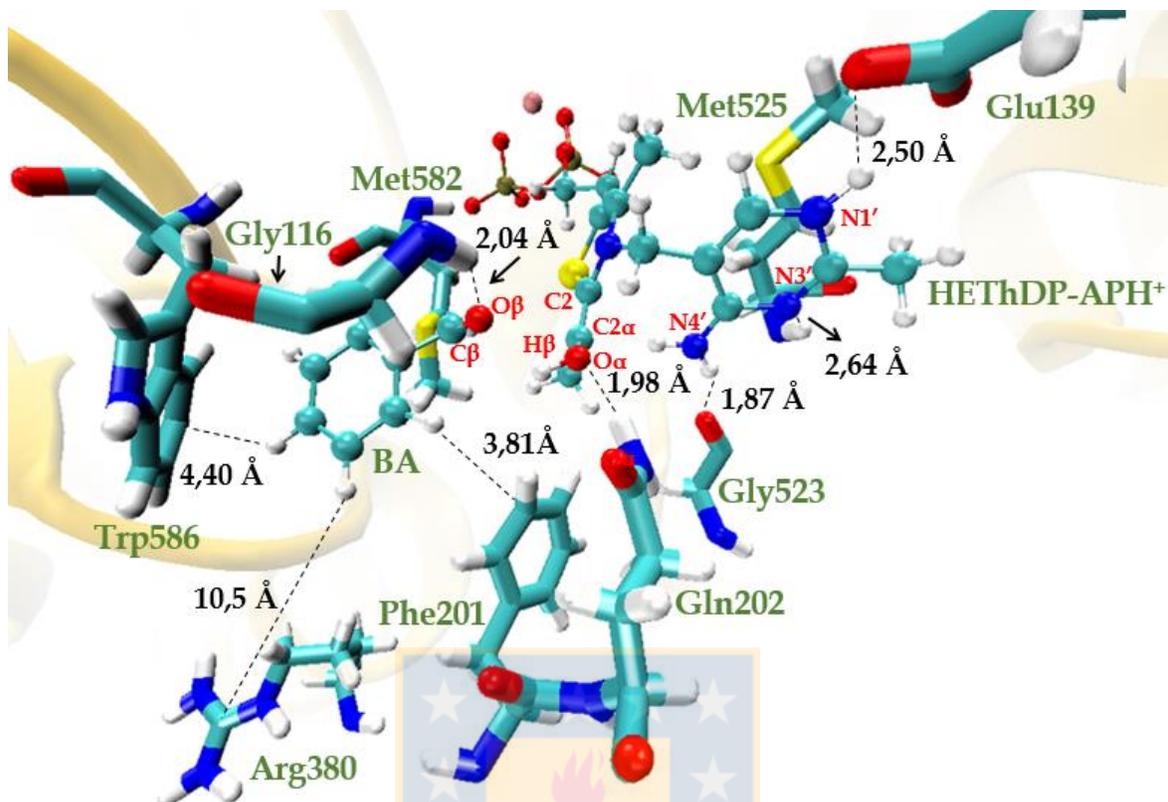


**Figura 3.127.** Diagrama de energía potencial (Kcal/mol) para la formación de R-PAC en la enzima AHAS con el intermediario HETHDP bajo la forma de  $APH^+$ .

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3.128 se presenta la estructura de menor energía potencial de la zona de reactantes, en la cual se aprecia al sustrato benzaldehído con el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  orientado hacia el hidrógeno  $H_{\beta}$  del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, con una distancia de 3,41 Å de distancia entre el carbono carbonílico  $C_{\beta}$  del sustrato benzaldehído y el carbono  $C2_{\alpha}$  del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, mientras que la distancia para el enlace entre los carbonos  $C2_{\alpha}$  y  $C2$  fue de 1,38 Å, dando cuenta del carácter de enlace doble entre los carbonos, en donde al igual que en la zona de reactantes del sistema IP y AP, el anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> adoptó la forma de enamina.

Por su parte, la distancia entre el hidrógeno  $H_{\beta}$  del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> y el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del benzaldehído fue de 1,94 Å y la distancia del enlace entre el hidrógeno  $H_{\beta}$  y el oxígeno  $O_{\alpha}$  fue de 1,00 Å. En cuanto a las interacciones no enlazantes entre los residuos del sitio activo, el sustrato benzaldehído y el intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, estas se encuentran en total concordancia con las interacciones reportadas en literatura para la formación del producto natural AL. Los residuos Glu139, Gly523 y Met525 se encuentran interaccionando mediante enlaces de hidrógeno con el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, mientras que la Gly116 se encuentra orientada y estabilizando mediante enlace de hidrógeno la densidad de carga del oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído.

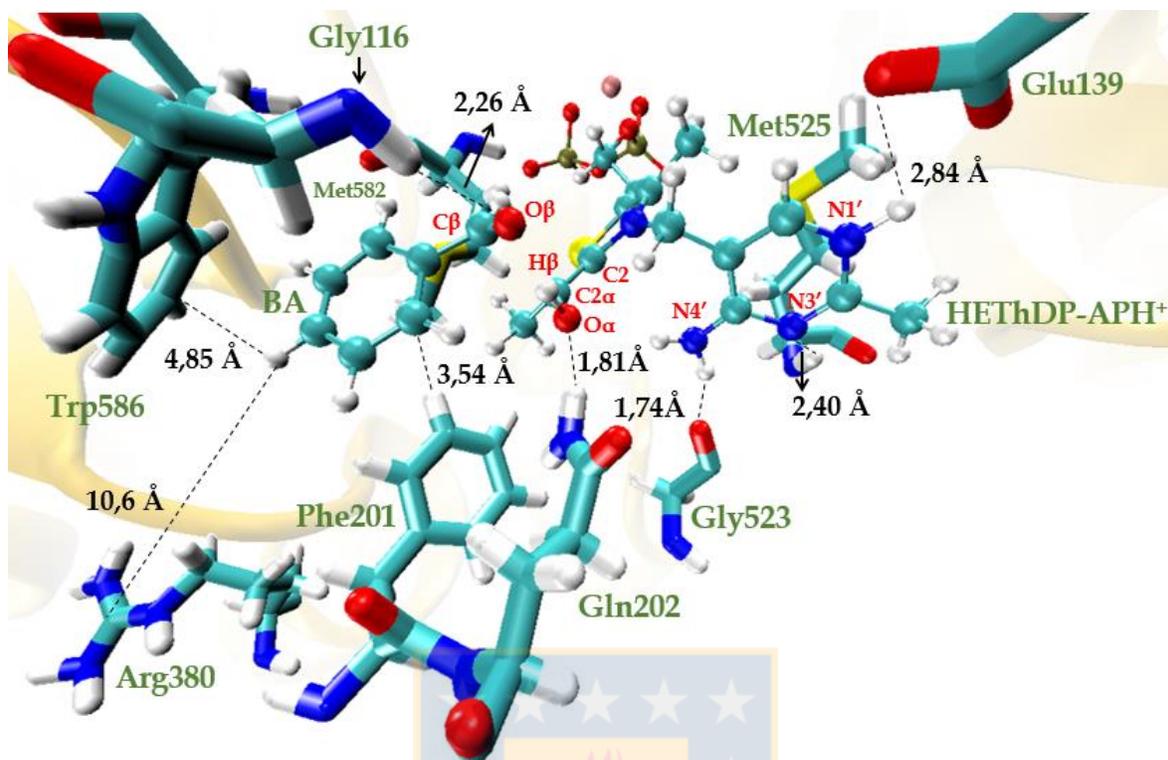


**Figura 3.128.** Estructura zona de reactantes PES QM/MM sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

Por su parte, la Gln202 se encuentra interaccionado mediante enlace de hidrógeno al oxígeno O<sub>α</sub> del grupo hidroxilo del cofactor y la Arg380 se encuentra completamente alejada del sustrato benzaldehído y del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> sin participación en la estabilización del mecanismo de reacción. Por último, la Phe201 y el Trp586 se encuentran interaccionando débilmente con el anillo de benceno del benzaldehído a través de los anillos aromáticos de sus cadenas laterales, mediante interacciones  $\pi$ -stacking de conformación tipo T, aunque es de suponer que con bajas energías de interacción al extrapolar las distancias obtenidas con los resultados presentados en las simulaciones de DM MM del sitio activo 2 del sistema APH<sup>+</sup>, ver tabla 3.6 sección 3.1.3 página 133, interacciones que no se encuentran reportadas en literatura.

La estructura representativa del TS<sub>1</sub> presentada en la Figura 3.129 fue caracterizado a través de la frecuencia negativa de  $-118\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al stretching de las coordenadas de reacción  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$ . Esta estructura presentó una distancia de  $1,42\text{ \AA}$  entre los carbonos  $C2\alpha$  y  $C2$  dando cuenta del alargamiento del enlace en comparación a la estructura de la zona de los reactantes, mientras la distancia entre el carbono  $C2\alpha$  y el carbonílico  $C\beta$  del benzaldehído fue de  $2,27\text{ \AA}$ . En cuanto a la coordenada  $R_{H-O}$  el átomo de hidrógeno  $H\beta$  presentó una distancia de  $1,13\text{ \AA}$  con respecto al oxígeno  $O\alpha$  del intermedio HETHDP-APH<sup>+</sup> y de  $1,47\text{ \AA}$  con el oxígeno carbonílico  $O\beta$  del sustrato benzaldehído. Por su parte, los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  presentaron valores de  $-57,4^\circ$  y  $105^\circ$  manteniendo una conformación activa tipo V para el intermedio HETHDP-APH<sup>+</sup>, con valores para el ángulo diedro  $\Phi_P$  similares a los presentados en las simulaciones de dinámica molecular MM y QM/MM, mientras que el ángulo diedro  $\Phi_T$  se encuentra acorde a los valores reportados en literatura correspondiente a  $95^\circ$ .<sup>10-12</sup> Las interacciones residuo sustrato que estabilizaron al TS<sub>1</sub> son las mismas interacciones reportadas en la descripción del estado de reactantes de la PES del sistema APH<sup>+</sup> y que además han sido presentadas en los resultados de las simulaciones de DM, en donde los residuos Glu139, Gly523 y Met525 se encuentran interaccionando mediante enlaces de hidrógeno con el anillo de pirimidina del intermedio HETHDP-APH<sup>+</sup>, mientras que la Gly116 se encuentra estabilizando mediante enlace de hidrógeno al oxígeno carbonílico  $O\beta$  del sustrato benzaldehído y la Gln202 cumple similar función con el oxígeno  $O\alpha$  del grupo hidroxilo del cofactor. Las únicas interacciones que no han sido reportadas en literatura son las débiles interacciones del tipo  $\pi$ -stacking entre los anillos aromáticos de las cadenas laterales de los residuos Phe201 y Trp586 y el anillo de benceno del sustrato benzaldehído con distancias de  $3,81\text{ \AA}$  y  $4,40\text{ \AA}$ , respectivamente para pares de átomos seleccionados arbitrariamente.

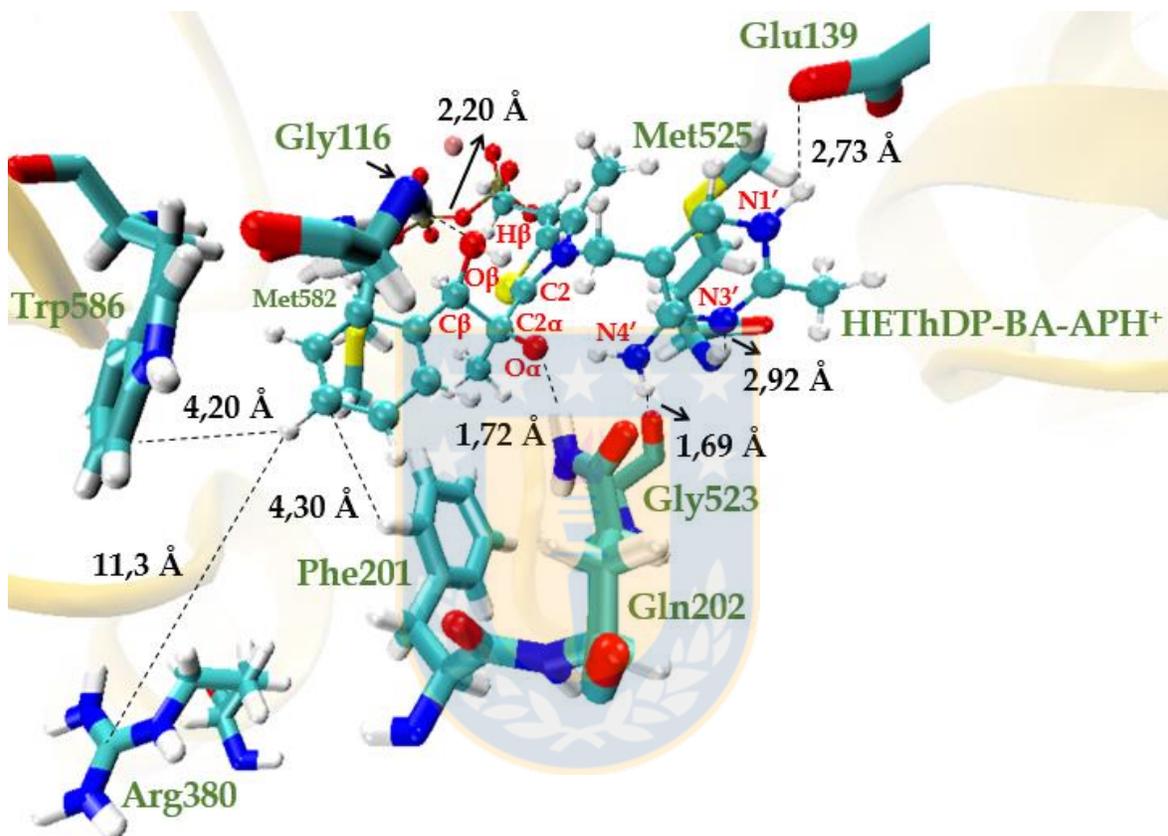


**Figura 3.129.** Estructura zona estado de transición 1 PES QM/MM sistema APh<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

La estructura representativa de la zona del intermediario I, Figura 3.130, correspondiente a la estructura de menor energía potencial de todas las estructuras de la PES del sistema APh<sup>+</sup>, muestra que el sustrato benzaldehído se encuentra enlazado al intermediario HETHDP-APh<sup>+</sup> y el hidrógeno H<sub>β</sub> se encuentra enlazado al oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> del sustrato benzaldehído, formando el complejo HETHDP-BA-APh<sup>+</sup>, con una distancia de 1,54 Å entre los carbonos C2α y C2 y de 1,55 Å entre los carbonos C2α y C<sub>β</sub>, mientras que la distancia entre el hidrógeno H<sub>β</sub> y el oxígeno O<sub>α</sub> desprotonado del intermediario HETHDP fue de 2,5 Å y la distancia del enlace entre el hidrógeno H<sub>β</sub> y el oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> del benzaldehído de 0,94 Å. Al igual que en los demás puntos críticos de la PES del sistema APh<sup>+</sup> analizados hasta el momento, las interacciones no enlazantes residuo sustrato de los residuos que componen el sitio activo no mostraron variaciones en comparación a las observadas durante las

simulaciones de dinámica molecular del sistema APH<sup>+</sup>. En tanto, los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  fueron de  $-62^\circ$  y  $108^\circ$ , respectivamente, en donde el ángulo diedro  $\Phi_P$  mantiene valores mayores a valor de  $-70^\circ$  reportado en literatura,<sup>10-12</sup> al igual que los valores presentados en los cálculos de dinámica molecular QM/MM del sistema APH<sup>+</sup>.

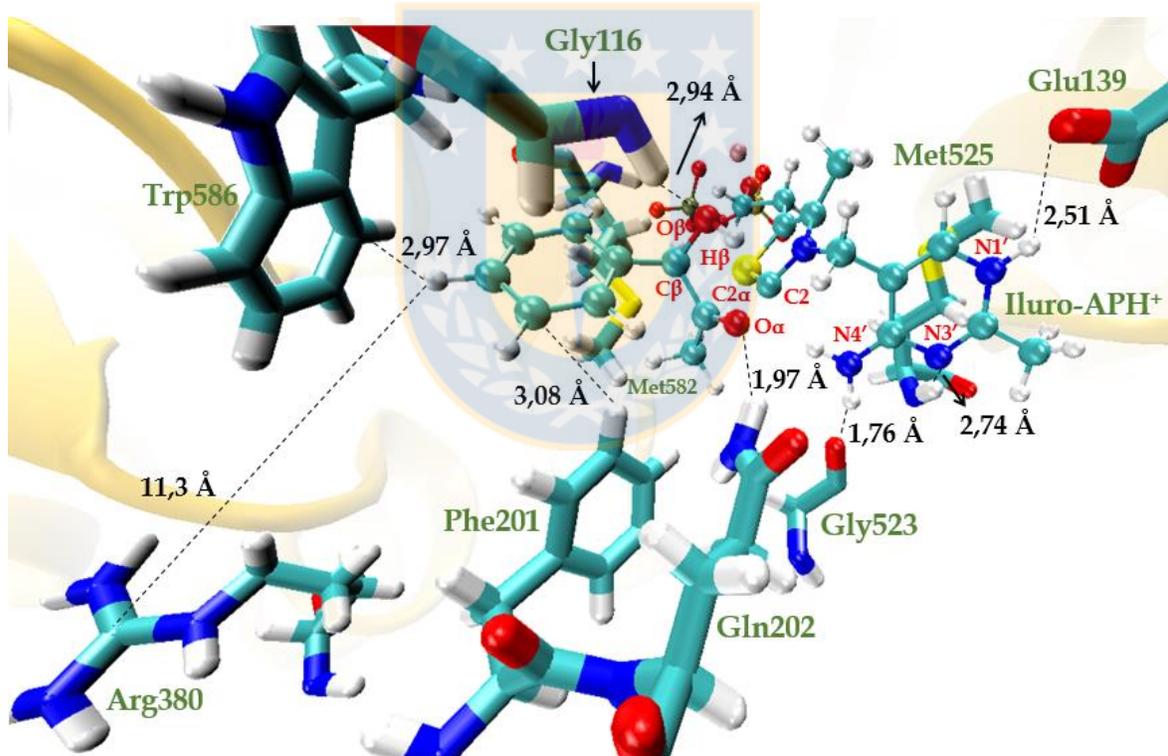


**Figura 3.130.** Estructura zona del intermediario PES QM/MM sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

La estructura representativa del TS<sub>2</sub> presentada en la Figura 3.131 fue caracterizado a través de la frecuencia negativa de  $-236\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al stretching de las coordenadas de reacción  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$ . Esta estructura presentó una distancia de  $2,38\text{ \AA}$  entre los carbonos  $C2\alpha$  y  $C2$  dando cuenta de la ruptura del enlace, mientras la distancia entre el carbono  $C2\alpha$  y el carbonílico  $C\beta$  del benzaldehído fue de  $1,6\text{ \AA}$ . En

cuanto a la coordenada  $R_{H-O}$  el átomo de hidrógeno  $H_{\beta}$  presentó una distancia de 1,92 Å con respecto al oxígeno  $O_{\alpha}$  del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> y de 1,00 Å en el enlace que forma con el oxígeno carbonílico  $O_{\beta}$  del sustrato benzaldehído. Por su parte, los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  presentaron valores de  $-67^{\circ}$  y  $88^{\circ}$  manteniendo una conformación activa tipo V para el intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup>, con valores para el ángulo diedro  $\Phi_P$  más cercanos al valor experimental de  $-70^{\circ}$  reportado para el intermediario iluro, mientras que el ángulo diedro  $\Phi_T$  se encuentra acorde a los valores reportados en literatura correspondiente a  $\pm 95^{\circ}$ .<sup>10-12</sup> En cuanto a las interacciones residuo sustrato, la única variación la presenta la disminución de la distancia entre los residuos Phe201 y Trp586 con el anillo de benceno del R-PAC en comparación a las distancias presentadas en los puntos críticos anteriores de la PES.

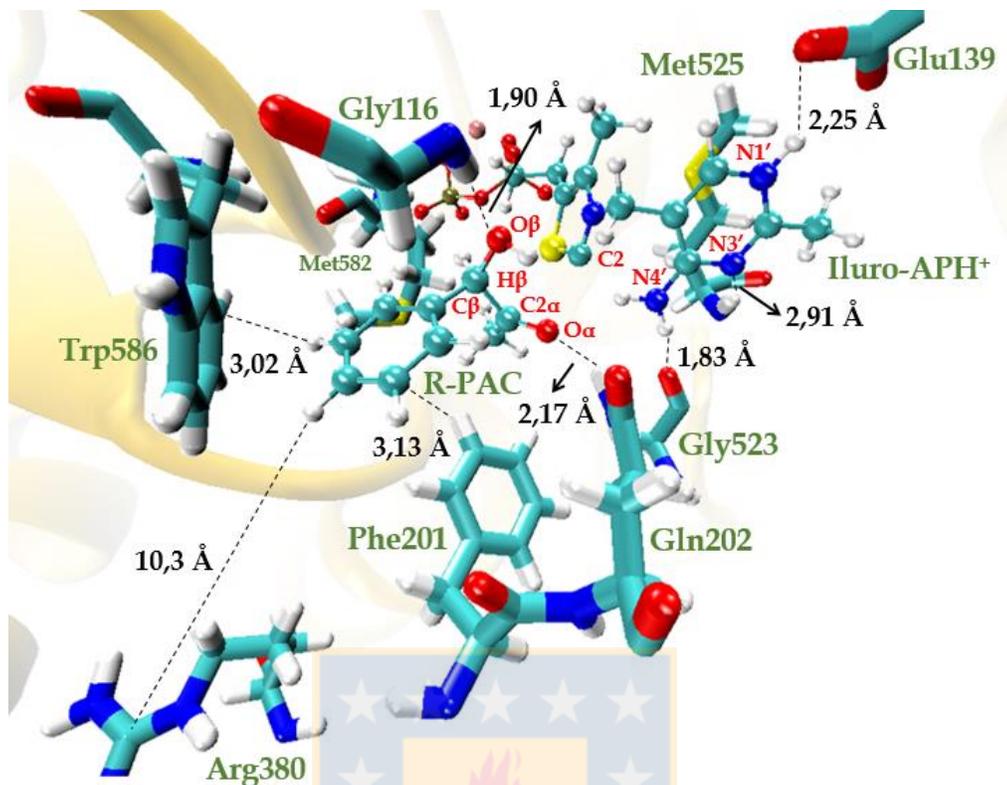


**Figura 3.131.** Estructura zona estado de transición 2 PES QM/MM sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

Por último, en la Figura 3.132 se presenta la estructura de menor energía potencial ubicada en la zona de los productos de la PES del sistema APH<sup>+</sup>. En la Figura se puede apreciar que el intermediario se encuentra a la forma de iluro-ThDP-APH<sup>+</sup> y que el producto R-PAC se encuentra liberado del cofactor, en donde las interacciones no enlazantes se encuentran en concordancia con las interacciones reportadas en literatura<sup>3, 5, 6, 9</sup> y con las interacciones presentadas en las demás zonas de puntos críticos de la PES del sistema APH<sup>+</sup>. En donde, se observa que los residuos Phe201 y Trp586 mantienen distancias aproximadas de alrededor de 3 Å con el anillo de benceno del R-PAC, al igual que en la zona del TS<sub>2</sub> del mecanismo obtenido de la exploración PES APH<sup>+</sup>, lo que permite inferir que la interacción de los residuos Phe201 y Trp586 se intensifican en la etapa de la liberación del producto R-PAC.

Esta estructura representativa de la zona de productos presentó una distancia de 2,98 Å entre los carbonos C2 $\alpha$  y C2 dando cuenta de la ruptura del enlace de carbono entre los átomos, en donde el anillo de tiazolio del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> adoptó la forma de iluro, mientras que la distancia del enlace entre el carbono C2 $\alpha$  y el carbonílico C $\beta$  del benzaldehído fue de 1,59 Å. En tanto, la distancia del enlace entre el hidrógeno H $\beta$  y el oxígeno carbonílico O $\beta$  del benzaldehído fue de 1,00 Å y la distancia entre el hidrógeno H $\beta$  y el oxígeno O $\alpha$  fue de 1,91 Å. Por su parte, los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  presentaron valores de -68,5° y 96° manteniendo una conformación activa tipo V para el intermediario HETHDP acorde a los valores reportados en literatura para las etapas de activación del cofactor correspondientes a  $\pm 70^\circ$  y  $\pm 95^\circ$ ,<sup>10-12</sup> respectivamente.



**Figura 3.132.** Estructura zona de productos PES QM/MM sistema APH<sup>+</sup>.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 3.15 se presenta un resumen de los valores de las distancias entre los átomos que conforman las coordenadas de reacción asimétricas  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$  de cada uno de los puntos críticos del mecanismo de reacción obtenido para la formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo la forma de APH<sup>+</sup>. Además se presentan los valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del intermediario HETHDP- APH<sup>+</sup> para las estructuras representativas de los puntos críticos de la PES, valores que muestran como el diedro  $\Phi_P$  mantuvo la tendencia mostrada en la simulaciones de dinámica molecular del sistema APH<sup>+</sup>, en donde los valores siempre fueron mayores al valor reportado en literatura para las etapas de activación del cofactor ThDP correspondiente a  $-70^\circ$ , resultado que concuerda debido principalmente a la diferente cantidad de átomos que componen al intermediario HETHDP y que se encuentran enlazados al carbono C2 del anillo de tiazolio, en comparación a la estructura del intermediario Iluro que posee

menor cantidad de átomos y por consiguiente menor posibles repulsiones electrostáticas por la cercanía entre átomos de su estructura, Figura 1.6, sección 1.2, página 8. A medida que la reacción avanza, el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$  se va acercando al valor experimental reportado para la conformación tipo V del intermediario iluro, lo que se atribuye a la liberación del producto R-PAC, ya que la liberación del producto podría provocar un reordenamiento en la orientación de los átomos del grupo imino protonado del cofactor y con ello un cambio en el valor del ángulo diedro  $\Phi_P$ . Por su parte el ángulo diedro  $\Phi_T$  mostro concordancia con el valor experimental reportado en literatura correspondiente a  $95^\circ$ , al igual que en todas las estructuras presentadas en los puntos críticos de la PES y en las simulaciones de DM realizadas para el sistema APH<sup>+</sup>.

**Tabla 3.15: Distancias de las coordenadas de reacción y valores de los ángulos diedros  $\Phi_P$  y  $\Phi_T$  del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> de la PES QM/MM para la formación de R-PAC.**

Puntos críticos	C2 $\alpha$ -C2 (Å)	C $\beta$ -C2 $\alpha$ (Å)	H $\beta$ -O $\alpha$ (Å)	H $\beta$ -O $\beta$ (Å)	Diedro $\Phi_P$ (°)	Diedro $\Phi_T$ (°)
React.	1,38	3,41	0,96	1,94	-60,6	84,0
TS1	1,42	2,27	1,13	1,47	-57,3	105
Interm.	1,54	1,55	2,51	0,94	-61,7	108
TS2	2,38	1,58	1,92	1,00	-66,8	88,2
Product.	2,98	1,59	1,91	1,00	-68,5	96,0

La principal diferencia entre el sitio activo de la enzima AHAS con el intermediario bajo la forma de APH<sup>+</sup> en comparación a cuando se encuentra bajo las formas IP y AP, son las interacciones de los residuos Gly116 y Gln202 los cuales mantuvieron los enlaces de hidrógeno con los oxígenos O $\beta$  y O $\alpha$  durante las simulaciones de dinámica molecular y durante todas las etapas del mecanismo de reacción obtenido en la

exploración de la PES, estabilizando la coordenada de reacción  $R_{H-O}$  del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC. Estas interacciones se encuentran favorecidas precisamente por el estado de protonación 4'-iminopirimidinio del anillo de pirimidina del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> ya que la Gln202 no interaccionó mediante enlace de hidrógeno con el nitrógeno N4' cuando este se encuentra a la forma de imino protonado, debido a que teóricamente este grupo, también denominado catión imonio, presenta un mayor carácter electrofílico en comparación al grupo amino del sistema AP y al grupo imino de sistema IP, provocando menor afinidad entre los hidrógenos del grupo aminda de la Gln202 y el grupo imonio, lo que además favorece que la Gly116 no interaccione con el O<sub>α</sub> del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP-APH<sup>+</sup> y que si lo haga mediante enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico O<sub>β</sub> del sustrato benzaldehído en concordancia con la interacción reportada en literatura.

En cuanto a la energía de activación el sistema APH<sup>+</sup> presentó un valor de energía potencial de 12 Kcal/mol el cual es menor y se encuentra en concordancia con lo esperado al compararlo con el valor experimental de 13,8 kcal/mol reportado para la formación de AL en la enzima AHAS,<sup>7</sup> resultado que es idéntico al obtenido para la energía de activación en el sistema AP, en donde el sistema con el intermediario HETHDP bajo la forma de IP queda descartado como posible estado de protonación del anillo de pirimidina para la formación de R-PAC debido a que su energía de activación fue de 20 Kcal/mol. Sin embargo, a pesar de la igualdad entre las energías de activación de los sistemas AP y APH<sup>+</sup>, al comparar las energías potenciales entre los estados de reactantes de las PES exploradas para cada uno de los sistemas se obtuvo que el sistema con el intermediario HETHDP bajo la forma de APH<sup>+</sup> se encuentra alrededor de 100 Kcal/mol más estabilizado que el estado de reactantes del sistema cuando el intermediario HETHDP se encuentra a la forma de AP en la formación de R-PAC. Esta diferencia de estabilidad entre los sitios activos de los sistemas AP y APH<sup>+</sup> en la formación de R-PAC puede atribuirse a las diferencias en las interacciones no enlazantes residuo sustrato presentes en los sitios activos de cada sistema, en donde

solo el sistema APH<sup>+</sup> presentó total concordancia con las interacciones residuo sustrato reportadas en literatura para el sustrato piruvato en la formación del producto natural AL,<sup>3, 5, 6, 9</sup> en donde la molécula de piruvato comparte un grupo carbonilo en su estructura con el sustrato benzaldehído, átomos que precisamente conforman las coordenadas asimétricas R<sub>C-C</sub> y R<sub>H-O</sub> del mecanismo de reacción explorado para la formación de R-PAC y en donde solo las interacciones de los residuos del sitio activo del sistema APH<sup>+</sup> estabilizaron de forma constante, a los átomos de la coordenada R<sub>H-O</sub>, mediante la estabilización de la densidad de carga de los oxígenos O<sub>α</sub> y O<sub>β</sub>, al presentar interacciones para los residuos Gly116 y Gln202 acordes con las interacciones reportadas en literatura para la formación de AL.<sup>4</sup> Además, el sistema con el intermediario HETHDP bajo la forma de APH<sup>+</sup> presentó una mayor estabilización de los productos formados durante la reacción, correspondientes al precursor R-PAC y al cofactor regenerado a la forma del intermediario iluro-ThDP-APH<sup>+</sup>, resultado que se encuentra en concordancia con lo reportado en literatura lo cual sugiere que el estado de protonación del intermediario iluro-ThDP debe ser el APH<sup>+</sup>, el cual es necesario para que se produzca la protonación del oxígeno carbonílico del sustrato piruvato para la formación del intermediario L-ThDP, reacción que corresponde al primer paso del ciclo catalítico de la enzima AHAS.<sup>23, 24</sup>

Es necesario destacar que las estructuras de los estados de transición presentadas para las zonas de puntos de silla de las PES de los tres sistemas, presentaron más de una frecuencia negativa en los cálculos realizados para los átomos de la zona QM. En el caso del estado de transición TS<sub>1</sub> del sistema AP la frecuencia negativa de -271 cm<sup>-1</sup> corresponde a la frecuencia de mayor intensidad comparada con las demás frecuencias negativas obtenidas, similares resultados se obtuvieron en las demás estructuras de estado de transición analizadas. Esto, sumado a que los resultados de los cálculos IRC de cada uno de los estados de transición presentados solo condujeron a uno de los dos puntos críticos, en donde los estados de transición TS<sub>1</sub> de las PES de los tres sistemas solo condujeron hacia la zona de reactantes ya que los cálculos no cumplieron los

criterios de convergencia al momento de realizar la minimización de las coordenadas de reacción hacia la zona del intermediario de la reacción, zona correspondiente a los complejos HETHDP-BA respectivos de cada sistema.

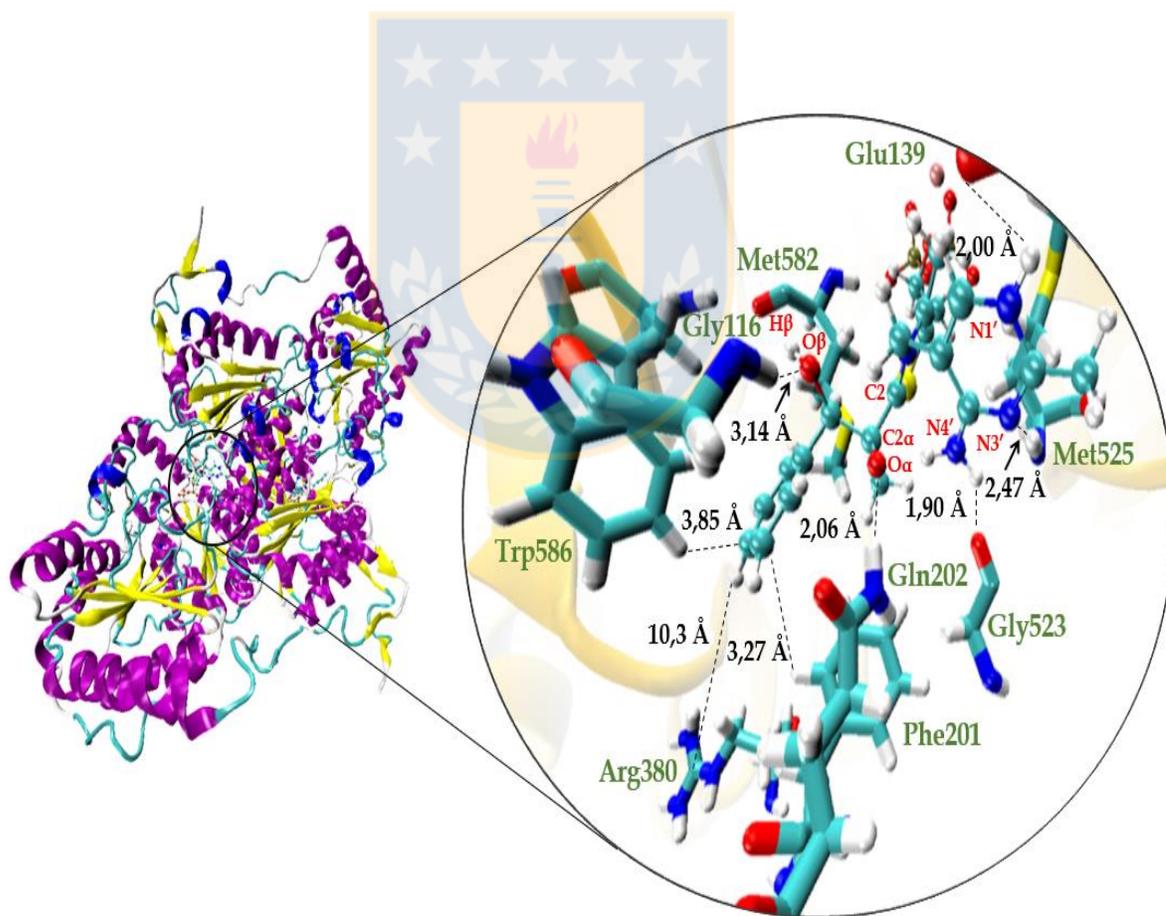
Similar situación presentaron los cálculos de IRC de los estados de transición  $ST_2$  de cada uno de las PES exploradas para los sistemas en estudio, los cuales solo condujeron hacia la zona de los intermediarios de cada PES y los cálculos de minimización de la energía potencial en base a las coordenadas de reacción  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$  no cumplieron los criterios de convergencia para llegar a la zona de los productos. La principal razón de estos resultados se debe a que la caracterización de los estados de transición de las PES QM/MM solo fue posible realizarla extrayendo a los átomos de la zona QM del sitio activo de cada sistema, átomos que conforman una geometría específica en el sitio activo de la enzima para llevar a cabo la reacción, debido a las interacciones no enlazantes residuo sustrato de los residuos altamente conservados presentes en los sitios activos de los sistema, por lo que al encontrarse sin el ambiente enzimáticos en los cálculos de IRC, las geometrías de los átomos de la zona QM de las zonas de estados de transición no fueron las adecuadas para superar la energía de activación y conducir hacia una zona de productos. Por estos motivos, las energías presentadas en base a la exploración de la PES en los sistemas AP, IP y  $APH^+$  son solo energías aproximadas que corresponden a la energía potencial total de las estructuras en cada sistema y que son una representación estimada de las energías entre las zonas de los puntos críticos de las PES, ya que además, en estricto rigor las energías de activación de las PES QM/MM exploradas no son comparables con los valores de las energía de activación experimentales, obtenidas a partir de las constantes de velocidad de las reacciones ya que se encuentran en términos de energía libre de Gibbs y no en termino de energía potencial. A pesar de estos, los resultados se encuentran con una buena aproximación y acorde a lo esperado con respecto a los valores experimentales de las energías de activación para los pasos 3 y 4 del ciclo catalítico de la enzima para la formación de AL en la enzima AHAS.

## Referencias

- [1] A. Karshikoff in *Non-Covalent Interactions in Proteins, Vol.*, Imperial College Press, Londres, **2006**, pp.1-127.
- [2] K. A. Dill *Biochemistry*. **1990**, *29*, 7133-7155.
- [3] S. S. Pang, L. W. Guddat, R. G. Duggleby *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, *278*, 7639-7644.
- [4] S. Engel, M. Vyazmensky, M. Vinogradov, D. Berkovich, A. Bar-Ilan, U. Qimron, Y. Rosiansky, Z. Barak, D. M. Chipman *Journal of Biological Chemistry*. **2004**, *279*, 24803-24812.
- [5] M. Vyazmensky, A. Steinmetz, D. Meyer, R. Golbik, Z. Barak, K. Tittmann, D. M. Chipman *Biochemistry*. **2011**, *50*, 3250-3260.
- [6] A. Bar-Ilan, V. Balan, K. Tittmann, R. Golbik, M. Vyazmensky, G. Hubner, Z. Barak, D. M. Chipman *Biochemistry*. **2001**, *40*, 11946-11954.
- [7] K. Tittmann, M. Vyazmensky, G. Hubner, Z. Barak, D. M. Chipman *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, *102*, 553-558.
- [8] M. Ibdah, A. Barllan, O. Livnah, J. V. Schloss, Z. Barak, D. M. Chipman *Biochemistry*. **1996**, *35*, 16282-16291.
- [9] J. A. McCourt, R. G. Duggleby *Amino Acids*. **2006**, *31*, 173-210.
- [10] A. VonFircks, S. Naumann, R. Friedemann, S. Konig *Journal of Molecular Modeling*. **1996**, *2*, 312-318.
- [11] R. Friedemann, S. Naumann *Journal of molecular structure*. **2003**, *630*, 275-281.
- [12] Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Ermler, M. Sundstrom *Embo Journal*. **1992**, *11*, 2373-2379.
- [13] M. Sinnokrot, E. Valeev, C. Sherrill *Journal of the American Chemical Society*. **2002**, *124*, 10887-10893.
- [14] R. Podeszwa, R. Bukowski, K. Szalewicz *The Journal of Physical Chemistry A*. **2006**, *110*, 10345-10354.
- [15] E. G. Zuebisch *Current Contents/Engineering Technology & Applied Sciences*. **1993**, 8-8.
- [16] M. J. S. Dewar, E. G. Zuebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart *Journal of the American Chemical Society*. **1993**, *115*, 5348-5348.
- [17] C. J. Cramer in *Essentials of Computational Chemistry Theories and Models*, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, West Sussex, **2004**, pp.1-102, 131-201, 249-301, 457-485.
- [18] M. J. Field in *A Practical Introduction to the Simulation of Molecular Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, **2007**, pp.51-105.
- [19] F. Jensen in *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, West Sussex, **2007**, pp.22-264.
- [20] E. J. Delgado, J. B. Alderete, G. A. Jana *Journal of Molecular Modeling*. **2011**, *17*, 2735-2739.
- [21] G. Jana, V. Jimenez, J. Villa-Freixa, X. Prat-Resina, E. Delgado, J. B. Alderete *Computational and Theoretical Chemistry*. **2011**, *966*, 159-166.
- [22] S. Engel, M. Vyazmensky, S. Geresh, Z. Barak, D. M. Chipman *Biotechnology and Bioengineering*. **2003**, *83*, 833-840.
- [23] O. Alvarado, G. Jana, E. J. Delgado *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **2012**, *26*, 977-982.
- [24] I. Lizana, G. A. Jana, E. J. Delgado *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2015**, *55*, 1640-1644.

# Capítulo 4: Conclusiones y proyecciones

---



## 4.1 Conclusiones

A continuación se presentan las conclusiones presentadas a partir de los resultados obtenidos de las simulaciones de dinámica molecular MM y QM/MM realizadas a los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, que representan los posibles estados de protonación del intermediario HETHDP para la formación del producto R-PAC en la enzima AHAS. A esto se suman, los resultados obtenidos de las distancias y de las energías de interacción calculadas para las interacciones no enlazantes residuo sustrato observadas en los sitios activos de los sistemas en estudio durante las simulaciones, además de las energías de activación obtenidas mediante la exploración de las PES QM/MM del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC con los 3 posibles estados de protonación del intermediario HETHDP.

En primer lugar es necesario comentar que las energías de interacción residuo sustrato calculadas en los sitios activos seleccionados para los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup> se realizaron sin considerar el ambiente enzimático que rodea al sitio activo de la enzima, ya que fueron calculadas con una constante dieléctrica igual a 1 simulando que los átomos se encontraban en fase gas. Por esta razón las energías de interacción no enlazantes residuo sustrato calculadas son solo comparables con cálculos efectuados en similares condiciones ya que cuantitativamente sobre estiman los valores de energía al no considerar la estabilización del ambiente enzimático mediante una constante dieléctrica, en donde los valores para las interacciones no enlazantes residuo sustratos correspondientes a enlaces de hidrógenos e interacciones  $\pi$ -stacking se encuentran entre 1 y 5 Kcal/mol. Sin embargo, esta sobre estimación provocó mayor facilidad al momento de comparar las energías de interacción no enlazantes de los residuos durante la simulación.

De los resultados obtenidos desde las dinámicas de producción MM de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, se observó que solo el sistema APH<sup>+</sup> presentó completa concordancia con las interacciones no enlazantes residuo sustrato reportadas en literatura. Estas similitudes fueron observadas en los dos sitios activos del sistema APH<sup>+</sup> durante las

simulaciones, lo cual otorga a la enzima AHAS una mayor eficiencia en la producción de R-PAC, en contraste con lo observado en los sistemas AP e IP, en los cuales además de no observar concordancia de las interacciones no enlazantes de los residuos Gly116 y Gln202 debido al carácter nucleofílico del grupo 4'-amino y 4'-imino de anillo de pirimidina de los complejos HETHDP-BA-AP y HETHDP-BA-IP respectivamente, se observó que solo uno de los sitios activos de los sistemas AP e IP mantuvo las interacciones no enlazantes residuo sustrato fundamentales para estabilizar el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP, mientras que en el otro sitio activo las interacciones se perdieron durante la simulación. Estos resultados permiten inferir que el estado de protonación del intermediario HETHDP en la tercera y cuarta etapa del ciclo catalítico de la enzima AHAS para la formación de R-PAC debe ser el estado de protonación APH<sup>+</sup>, correspondiente al estado de protonación cuando el anillo de pirimidina del cofactor se encuentra con el nitrógeno N1' protonado y el nitrógeno N4' bajo la forma de grupo imino protonado o catión imonio.

En tanto, los resultados obtenidos para las simulaciones de dinámica molecular QM/MM de los sitios activos representativos de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup> muestran que todas las interacciones no enlazantes residuo sustrato entre los aminoácidos del sitio activo cercanos a los complejos HETHDP-BA respectivos, se mantuvieron constantes y sin modificaciones en comparación a las interacciones no enlazantes residuo sustrato observadas en las simulaciones de dinámica molecular MM. Este resultado permite inferir que para cada sistema las interacciones no enlazantes residuo sustrato observadas y las geometrías moleculares obtenidas mediante la minimización de la energía potencial de los sistemas han conducido a mínimos local de energía, en donde las interacciones no enlazantes residuo sustrato obtenidas son representativas de cada sistema.

Para los resultados de la exploración de la PES del mecanismo de reacción propuesto para la formación de R-PAC en la enzima AHAS con el intermediario HETHDP bajo los estados de protonación AP, IP y APH<sup>+</sup>, se obtuvo que el mecanismo de reacción ocurre de forma concertada y de forma asincrónica en cuanto a los valores de las coordenadas  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$ . De esta manera, las PES de los sistemas AP, IP y APH<sup>+</sup>, independiente de las energías de activación obtenidas en cada sistema, mostraron mecanismos de reacción idénticos, en donde el ataque nucleofílico del carbono C2 $\alpha$  del intermediario HETHDP hacia el carbono carbonílico del sustrato benzaldehído se produce mientras el hidrógeno H $\beta$  es transferido desde el oxígeno O $\alpha$  del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP, hacia el oxígeno carbonílico O $\beta$  del sustrato benzaldehído. En donde, los valores de las coordenadas  $R_{C-C}$  y  $R_{H-O}$  durante la formación de R-PAC no avanzaron de forma sincronizada. Un posible mecanismo de reacción mediante catálisis acida en donde el sustrato benzaldehído sea protonado previo al ataque nucleofílico del intermediario HETHDP queda descartado de acuerdo a lo observado en la PES del sistema IP, en donde tal mecanismo a pesar de presentar una energía de activación similar a la del mecanismo concertado en el sistema IP, la zona de estado de transición no presentó estructuras en las cuales se obtuviera una frecuencia de valor negativo que involucrara a los átomos de la coordenada de reacción  $R_{H-O}$ . Al continuar avanzando por las coordenadas de reacción se observó que en los tres sistemas el mecanismo de reacción presentó una zona de estado de transición y en consecuencia una energía de activación para la liberación del producto R-PAC, energía de activación correspondiente al paso cuatro del ciclo catalítico de la enzima AHAS que involucra la ruptura del enlace entre los carbonos C2 y C2 $\alpha$  de los complejos HETHDP-BA del sitio activo representativo de cada sistema. Estos resultados, mostraron que los sistemas AP y APH<sup>+</sup> presentaron energías de activación similares entre ellos para el estado de transición TS<sub>2</sub>, correspondientes a 17 kcal/mol y 18 Kcal/mol, respectivamente, además de ser valores cercanos y en concordancia con el valor experimental de 15 kcal/mol reportado la liberación del producto natural de la enzima correspondiente a

AL.<sup>1</sup> Estos resultados son compatibles con estudios teóricos sobre la exploración de PES del mecanismo de reacción para la formación de AL.<sup>2</sup>

Además, los resultados obtenidos de la exploración de la PES del mecanismo propuesto para la formación de R-PAC en la enzima AHAS, indican que el estado de protonación del intermediario HETHDP con mayor energía de activación fue el sistema IP, el cual presentó una barrera de 20 Kcal/mol. En tanto, los estados de protonación de los sistemas AP y APH<sup>+</sup> presentaron una energía de activación idéntica para la formación de R-PAC, correspondiente a 12 Kcal/mol, en donde la energía de activación experimental, en términos de energía libre para la formación de AL es de 13,8 Kcal/mol.<sup>1</sup> Sin embargo, la comparación de la energía potencial del estado de reactantes de los sistemas AP y APH<sup>+</sup>, se obtuvo que cuando el estado de protonación del intermediario HETHDP corresponde a APH<sup>+</sup> el sistema es aproximadamente 100 Kcal/mol más estable, debido a que las interacciones no enlazantes residuo sustrato se mantuvieron en concordancia con las interacciones reportadas en literatura, en donde las interacciones de los residuos Gly116 y Gln202 se encuentran condicionadas al estado de protonación del nitrógeno N4' para su correcta orientación con los oxígenos del sustrato benzaldehído y del grupo hidroxilo del intermediario HETHDP, respectivamente.<sup>3</sup> Además, al comparar los perfiles de energía potencial para la formación de R-PAC con el intermediario HETHDP bajo los estados de protonación AP y APH<sup>+</sup> se puede observar que el sistema con el estado de protonación APH<sup>+</sup> condujo a una reacción exotérmica en donde la zona de los productos es más estable en comparación a la energía de los reactantes del sistema APH<sup>+</sup>, con una estabilización de 20 Kcal/mol de diferencia para el sistema APH<sup>+</sup>, mientras que el sistema AP presentó una estabilización de 15 Kcal/mol entre la energía de la zona de los productos de la PES QM/MM y la energía de la zona de los reactantes.

En vista a los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se propone que el estado de protonación para la formación de R-PAC en los pasos tres y cuatro del ciclo catalítico de la enzima AHAS ocurre con el anillo de pirimidina del intermediario HETHDP bajo

el estado de protonación 4'-iminopirimidinio (APH<sup>+</sup>), correspondiente al estado de protonación cuando el anillo de pirimidina del cofactor se encuentra con el nitrógeno N1' protonado y el nitrógeno N4' bajo la forma de grupo imino protonado o catión imonio. En este sentido, la hipótesis presentada en la sección 1.4 en la página 13, se encuentra válida en cuanto a que la energía de activación teórica de 12 Kcal/mol obtenida para la formación de R-PAC fue menor y con un valor cercano a la energía de activación de 13,8 Kcal/mol reportada en literatura para la formación del producto fisiológico AL, resultado que al mismo tiempo valida el mecanismo propuesto en la hipótesis el cual involucra la transferencia protónica intermolecular desde el intermediario HETHDP hacia el oxígeno carbonílico del sustrato no fisiológico benzaldehído. Sin embargo, la hipótesis queda refutada en cuanto al estado de protonación del intermediario HETHDP que participa en la formación de R-PAC, debido a que los resultados indicaron que la reacción de formación de R-PAC en la enzima AHAS no ocurre con el intermediario bajo el estado de protonación AP como se propuso en la hipótesis, debido a estudios teóricos basados en cálculos químicos computacionales que se han realizado recientemente para la formación de R-PAC,<sup>4</sup> en donde la exploración de la PES se realizó para los tres estados de protonación del intermediario HETHDP en un modelo clusterizado que considero a los sustratos en fase gas y que concluye que el estado de protonación AP es el que presenta la menor energía de activación, con una barrera de 16 Kcal/mol, en donde la mayor energía de activación la presentó el sistema con el intermediario HETHDP bajo la forma de IP. A estos resultados se suman los estudios de la exploración de la PES QM/MM para la formación del producto natural AL, en los cuales también se concluye que el intermediario HETHDP en el tercer y cuarto paso del ciclo catalítico deber encontrarse bajo la forma de AP. Sin embargo, en los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el intermediario bajo el estado de protonación APH<sup>+</sup> es el encargado de llevar a cabo la reacción de formación de R-PAC en la enzima AHAS, resultados con los que se propone una energía de activación teórica en términos de energía potencial de 12 kcal/mol para la formación de R-PAC.

## 4.2 Proyecciones

Una vez determinado que el estado de protonación del intermediario HETHDP para la formación de R-PAC en el tercer y cuarto pasó del ciclo catalítico de la enzima AHAS corresponde a APH<sup>+</sup>, se propone determinar mediante cálculos de dinámica molecular y exploración de la PES del mecanismo de reacción las mutaciones sitio dirigidas de residuos del sitio activo que favorezcan la formación de R-PAC por sobre la del producto fisiológico AL, el cual involucra una molécula de piruvato como sustrato en el tercer y cuarto paso del ciclo catalítico. Los aminoácidos a mutar no deben afectar la formación del intermediario Lactil-ThDP el cual se forma por el ataque nucleofílico del intermediario iluro-ThDP sobre el sustrato piruvato y por la protonación del oxígeno carbonílico del sustrato desde el grupo imonio del anillo de pirimidina del intermediario iluro cuando este se encuentra bajo la forma de APH<sup>+</sup>.<sup>1, 2</sup> Se deberían mutar los residuos Phe201 por metionina, Arg380 por lisina y Lys251 por alanina, mutaciones reportadas en literatura que provocan la disminución de la formación de AL y el aumento de la actividad específica en la formación de R-PAC.<sup>3</sup> Además se debería probar la mutación el residuo Trp586 el cual según los resultados presentado en la presente tesis mostró orientación de su cadena lateral sobre el anillo de benceno del sustrato benzaldehído, sin jugar un rol catalítico en la estabilización del sustrato, por lo que su mutación por una metionina o cualquier otro aminoácido que estabilice al benceno del benzaldehído también podría favorecer la reactividad del este sustrato y así conseguir disminuir la energía de activación de la reacción.

## Referencias

- [1] K. Tittmann, M. Vyazmensky, G. Hubner, Z. Barak, D. M. Chipman *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, *102*, 553-558.
- [2] G. Jana, V. Jimenez, J. Villa-Freixa, X. Prat-Resina, E. Delgado, J. B. Alderete *Computational and Theoretical Chemistry*. **2011**, *966*, 159-166.
- [3] S. Engel, M. Vyazmensky, M. Vinogradov, D. Berkovich, A. Bar-Ilan, U. Qimron, Y. Rosiansky, Z. Barak, D. M. Chipman *Journal of Biological Chemistry*. **2004**, *279*, 24803-24812.
- [4] O. Alvarado, I. Lizana, G. Jana, I. Tunon, E. Delgado *Chemical Physics Letters*. **2017**, *677*, 30-34.
- [5] O. Alvarado, G. Jana, E. J. Delgado *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **2012**, *26*, 977-982.
- [6] I. Lizana, G. A. Jana, E. J. Delgado *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2015**, *55*, 1640-1644.

