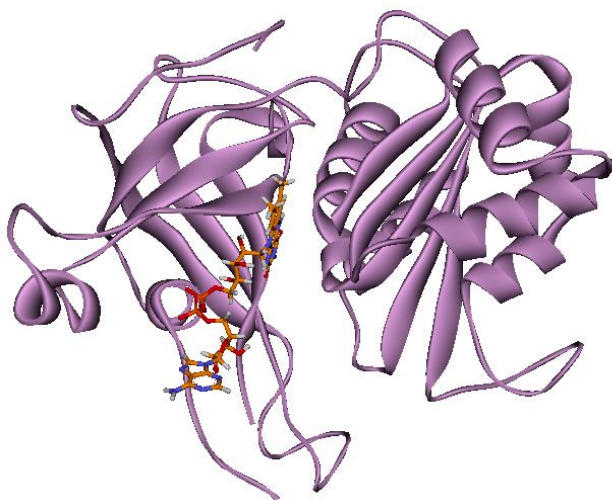


Trabajo Fin de Grado

**Simulación computacional para la predicción de
acoplamiento enzima-sustrato: identificación
del sitio de unión del coenzima en la FNR del patógeno
*Leptospira interrogans***

**Computational simulation for an enzyme-substrate
docking: identification of the coenzyme binding site in the
FNR from the *Leptospira interrogans* pathogen**



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Departamento de Química Física

Curso 2015/2016

Rubén Laplaza Solanas

Dirigido por los Profs.

Milagros Medina Trullenque y M. Asunción Gallardo Jiménez

Agradecimientos

Al Dr. Víctor Polo y a Natalia Serrano por su colaboración y ayuda durante la realización de este trabajo, tanto en aspectos técnicos como teóricos.

Resumen

La actividad catalítica de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa de la bacteria patógena *Leptospira interrogans* (*LepFNR*) comprende la transferencia de electrones entre el coenzima NADPH y aceptores de un solo electrón y bajo potencial. Para ello, en la primera etapa de reacción, debe tener lugar la transferencia de un hidruro desde el anillo de nicotinamida del NADPH y el anillo de isoaloxazina del cofactor FAD de la enzima. Esto requiere una aproximación del carbono 4N (C4N) de la nicotinamida al nitrógeno 5 (N5) de la isoaloxazina por la cara *re* de dicho anillo. Sin embargo, la cara *re* del anillo se encuentra protegida por el aminoácido C-terminal, Tyr314, que interacciona por apilamiento π con la flavina. Por el momento, no se dispone experimentalmente de una estructura cristalográfica del complejo *LepFNR*:NADPH en una disposición catalíticamente competente.

Por similitud con los miembros de la familia tipo plastídico, se ha propuesto un mecanismo en tres etapas para el acoplamiento, en el que el extremo 2'-P-AMP del ligando interaccionaría en primer lugar, induciendo cambios conformacionales en la enzima que permitirían el acceso del anillo de nicotinamida del coenzima al sitio activo. Con objeto de validar esta posibilidad para el acoplamiento, en este trabajo se han utilizado técnicas basadas en mecánica molecular, incluyendo acoplamiento molecular enzima-sustrato y dinámica molecular con campos de fuerzas CHARMM.

A través de las diferentes simulaciones moleculares realizadas se han descrito las principales interacciones de reconocimiento entre NADPH y *LepFNR*, así como los cambios conformacionales producidos por la unión de la mitad 2'-P-AMP del coenzima NADPH. Los resultados computacionales que aquí se aportan indican que la unión del coenzima a *LepFNR* ocurre de forma similar a la descrita en el caso de las FNRs fotosintéticas.

Summary

The catalytic activity of the ferredoxin-NADP⁺ reductase from the pathogenic bacteria *Leptospira interrogans* (*LepFNR*) involves the electron transfer from NADPH and different low potential one electron carriers. This process includes a hydride transfer from the nicotinamide ring of NADPH to the isoalloxazine ring of the enzyme FAD cofactor. In order for this hydride transfer to take place, an approximation must occur between the 4N carbon (C4N) of the nicotinamide ring of NADPH and the 5 nitrogen (N5) of the flavin isoalloxazine ring through its *re* face. However, the *re* face of the isoalloxazine ring is protected by the C-terminal residue, Tyr314, that stacks against the flavin ring through π -stacking interactions. An experimental crystallographic structure for the catalytically competent *LepFNR*:NADPH complex has not been achieved so far.

A three steps mechanism has been proposed for NADPH binding to *LepFNR*, due to the similarity with other plastidic members of the family. In this mechanism, the 2'-P-AMP moiety of the NADPH coenzyme interacts firstly and induces conformational changes in the enzyme, enabling access of the nicotinamide ring to the active site. In order to validate such possibility during the binding process, we have used molecular mechanic methods, including docking and molecular dynamic techniques with CHARMM force fields.

The different molecular simulations carried out have allowed improving our understanding of the recognition interactions between NADPH and *LepFNR*, as well as of the conformational changes produced by the binding of the 2'-P-AMP moiety of NADPH to the enzyme. The computational results here presented further support the fact that *LepFNR* will follow similar mechanisms to those described for the plastidic members of the family in coenzyme binding.

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1.	Flavinas	1
1.2.	Las ferredoxina-NADP ⁺ reductasas.....	2
1.3.	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato	3
1.4.	La bacteria patógena <i>Leptospira Interrogans</i>	4
1.5.	Características estructurales de la <i>LepFNR</i>	4
2.	Planteamiento y objetivo	6
3.	Fundamentos teóricos.....	7
3.1.	Superficies de energía potencial	7
3.2.	Mecánica molecular	7
3.3.	Campos de fuerza	8
3.4.	Acoplamiento molecular	10
3.5.	Dinámica molecular	10
3.6.	Programas utilizados.....	12
4.	Resultados y discusión.....	13
4.1.	Análisis estructural del sitio de unión	13
4.2.	Acoplamiento molecular <i>LepFNR</i> :NADPH.....	15
4.3.	Acoplamiento molecular <i>LepFNR</i> :2'P-AMP.....	16
4.4.	Dinámica molecular del complejo <i>LepFNR</i> :2'P-AMP	19
5.	Conclusiones	23
6.	Bibliografía	24

1. Introducción

1.1. Flavinas

Las flavinas son compuestos químicos derivados de la 7,8-dimetil-isoaloxazina (7,8-dimetilbenzo[g]-pteridina-2,4-(3H,10H)-diona, Figura 1) con diversas modificaciones en los sustituyentes del anillo de isoaloxazina, frecuentemente el nitrógeno 10. En sistemas biológicos se encuentran fundamentalmente en forma de riboflavina o vitamina B₂ y sus derivados, el flavin mononucleótido (FMN) y el dinucleótido de flavina y adenina (FAD, Figura 2). FMN y FAD actúan como cofactores habituales de flavoproteínas y flavoenzimas.

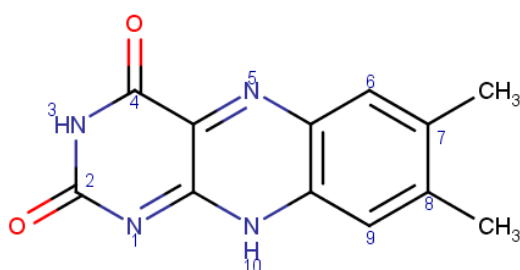


Fig.1: Anillo de 7,8-dimetil-isoaloxazina.

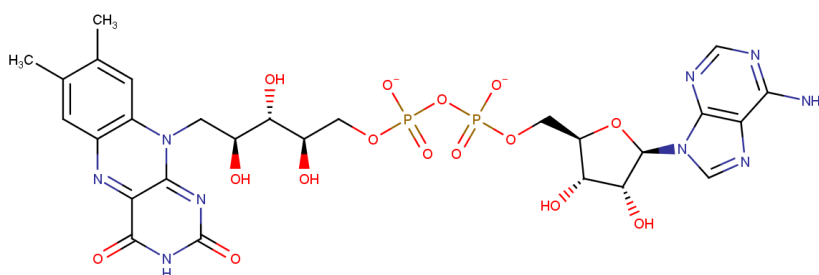


Fig.2: Dinucleótido de flavina y adenina.

El anillo de isoaloxazina está formado por la fusión de un anillo hidrófobo de dimetil-benceno con el anillo hidrófilo de pteridina, compuesto constituido a su vez por los anillos de pirazina y timina (derivado de la pirimidina). La versatilidad del anillo de isoaloxazina proviene de su comportamiento redox, que le permite presentarse en tres estados de óxido-reducción (Fig.3); oxidado (ox) o quinona, radical con un electrón desapareado o semiquinona (sq), y totalmente reducido o hidroquinona (hq).^[1] En general, la estabilización del estado semiquinona en FMN y FAD libres en disolución es mínima. Además, cada estado de oxidación puede presentarse en distintos estados de protonación, dando lugar a formas neutras, aniónicas o catiónicas.

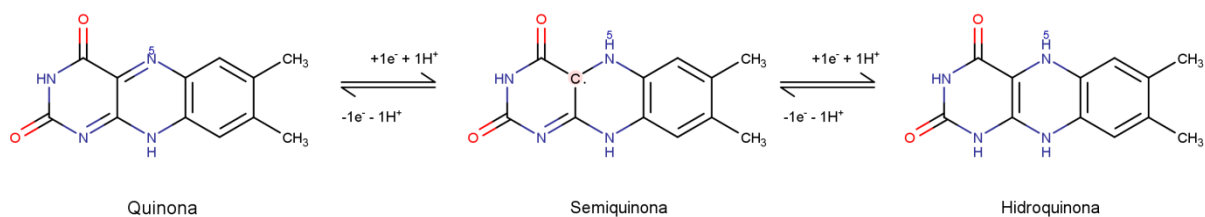


Fig.3: Estados de oxidación en flavinas.

La unión de FMN o FAD como cofactores a apoproteínas se produce en general a través de interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones de apilamiento π). Dichas interacciones modulan las características electrónicas del anillo de isoaloxazina, modificando los potenciales de óxido-reducción de las flavinas libres, y en muchos casos estabilizando su estado semiquinona. Esta característica hace a las flavoproteínas intermediarios redox únicos, capaces de mediar en transferencias de electrones entre intercambiadores obligatorios de un único electrón, como las metaloproteínas, y otros obligatorios de dos electrones, como los coenzimas NADP^+/H y NAD^+/H .^[2]

1.2. Las ferredoxina- NADP^+ reductasas

Las ferredoxina- NADP^+ reductasas (FNR) son óxido-reductasas monoméricas que contienen como grupo prostético una molécula de FAD unido de forma no covalente. Se trata de un tipo de enzimas muy frecuentes en la naturaleza, con participación documentada en procesos tan variados como la fotosíntesis, la hidroxilación de esteroides, la reducción de nitratos, la asimilación de piruvato anaerobio, la desaturación de ácidos grasos, o la regulación de rutas metabólicas.^[3]

La actividad catalítica de las enzimas FNR comprende la transferencia (en algunos casos reversible) de electrones entre el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADPH) y distintos donadores de un solo electrón y bajo potencial, como ferredoxina, flavodoxina, adrenodoxina, hemo-oxigenasa y hierro.^[4]

En la naturaleza, las enzimas con actividad FNR pertenecen a dos familias de proteínas.^[5,6] Una de ellas incluye las adrenodoxina reductasas, algunos homólogos bacterianos, y las NADH -ferredoxina reductasas bacterianas acopladas a oxigenasas. Las enzimas de dicho grupo han sido encontradas principalmente en mitocondrias de organismos eucariotas y en algunas bacterias, por ejemplo de los géneros *Mycobacterium* y *Pseudomonas*.

El otro grupo, comúnmente conocido como la familia de las FNR tipo planta, está compuesto por enzimas que son fácilmente identificadas por la presencia de clústeres de aminoácidos altamente conservados, que se localizan en los dominios de unión del FAD y el NADPH . Este grupo se subdivide en dos clases: las FNR plastídicas y las FNR bacterianas. Las FNR plastídicas presentan números de recambio elevados y adecuados a las necesidades fotosintéticas ($200\text{-}600\text{ s}^{-1}$), mientras que las FNR bacterianas (habitualmente llamadas FPR) son típicamente mucho menos activas, con números de recambio unas 20 a 100 veces menores que sus homólogas plastídicas.^[5]

No hay un grado significativo de homología entre las secuencias de ambos subgrupos de las FNR tipo planta, pero se intuye la existencia de un ancestro común. Curiosamente, y pese a no ser fotosintética, la bacteria *Leptospira interrogans* contiene una FNR plasmídica ^[6], que podría haberse adquirido en un evento de transferencia horizontal de genes, y que a su vez proporcionaría a la bacteria distintas ventajas adaptativas. También se han encontrado FNR plasmídicas en las bacterias *Plasmodium falciparum* ^[7] y *Toxoplasma gondii* ^[8].

1.3. Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato

El dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP⁺ en su forma oxidada, NADPH en su forma reducida, Figura 4) es un coenzima redox de gran importancia biológica en el metabolismo anabólico de todo tipo de organismos vivos. En su forma reducida, generalmente se utiliza como fuente de poder reductor (capacidad de donar electrones y/o aceptar protones) en procesos de biosíntesis. Típicamente, la transformación de NADP⁺ en NADPH, es decir, el almacenamiento de poder reductor en esta molécula, se asocia a la fase luminosa de la fotosíntesis y a la ruta de las pentosas fosfato en animales.

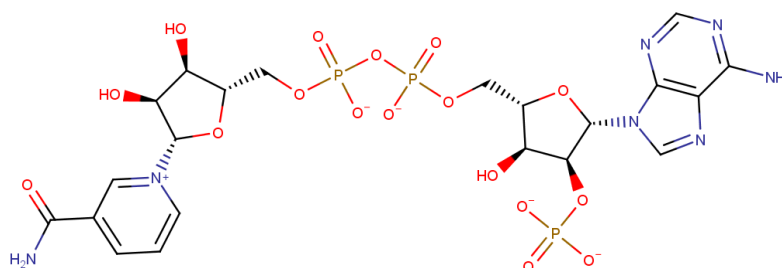


Fig.4: Estructura del NADP⁺. Los ribonucleótidos de nicotinamida y adenina se encuentran unidos por un puente pirofosfato a través de sus extremos 5', estando fosforilada la posición 2' del nucleótido de adenina.

Durante el proceso de óxido-reducción esta molécula se encuentra implicada en un equilibrio redox a través del anillo de nicotinamida, mediante el cual es capaz de aceptar dos electrones y un protón para pasar de su forma oxidada a su forma reducida (transferencia de hidruro, Figura 5).

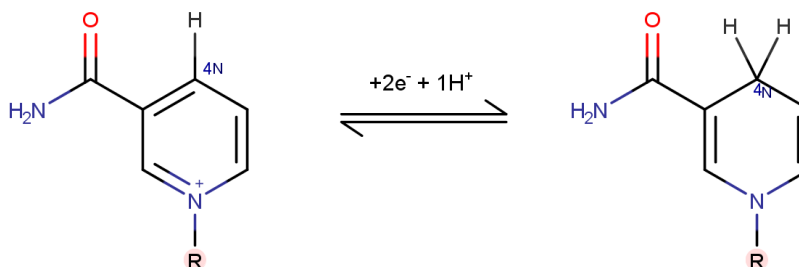


Fig.5: Comportamiento redox del anillo de nicotinamida del NADP⁺.

1.4. La bacteria patógena *Leptospira Interrogans*

Leptospira Interrogans es una bacteria patógena capaz de infectar a los humanos, causando lo que se conoce como leptospirosis o enfermedad de Weil.^[9] Esta enfermedad febril presenta un amplio rango de síntomas, que hacen que sea frecuentemente mal diagnosticada, como fiebre, dolor de cabeza, ictericia, y dolores musculares, articulares y óseos. Complicaciones resultantes de la leptospirosis pueden tener consecuencias más graves, afectando a varios órganos y llegando a causar la muerte. *L. interrogans* infecta análogamente a otros mamíferos, como pueden ser caballos, cerdos, perros, ganado en general, y en especial roedores, los cuales constituyen un reservorio natural para la bacteria.

Su amplia distribución y carácter de zoonosis hacen de la leptospirosis una infección emergente a nivel mundial a medida que la enfermedad se extiende de áreas rurales donde tradicionalmente ha sido significativa hacia comunidades urbanas empobrecidas^[10], con especial prevalencia durante periodos de lluvias e inundaciones.

La presencia de una FNR plastídica en este organismo, muy eficiente, puede ser un elemento importante para la patogenicidad de *L. interrogans*. Se han propuesto diversas funciones específicas para esta FNR en patógenos^[11,12], lo que la convierte en una interesante diana terapéutica. En esta línea, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de UNIZAR se ha iniciado la identificación de moléculas de pequeño tamaño que actúen como inhibidores de esta proteína.

1.5. Características estructurales de la *LepFNR*

La estructura del núcleo de las FNR se encuentra altamente conservada entre las FNR tipo planta. Sin embargo, las proteínas plastídicas y bacterianas, FNR y FPR, presentan diferencias estructurales en el tamaño y la conformación de los bucles en la superficie, en la conformación extendida o plegada del FAD y en el hecho de que las FPR bacterianas presentan una extensión de residuos en el extremo C-terminal con respecto a las plastídicas, la cual contribuye a la estabilización de la forma plegada del FAD.^[13]

La estructura cristalina tridimensional de *LepFNR*^[15] permite identificar bien definidos los dos dominios canónicos de las FNR tipo planta (Fig.6 (A)).^[14] El dominio N-terminal forma un barril- β antiparalelo de seis hebras que contiene el sitio de unión del FAD. El dominio C-terminal se encuentra plegado en forma de un apilamiento $\alpha\beta$, con una lámina β de cinco hebras rodeada por seis hélices α . La pequeña hélice formada en el bucle 76-91 es además una característica singular de la *LepFNR*.

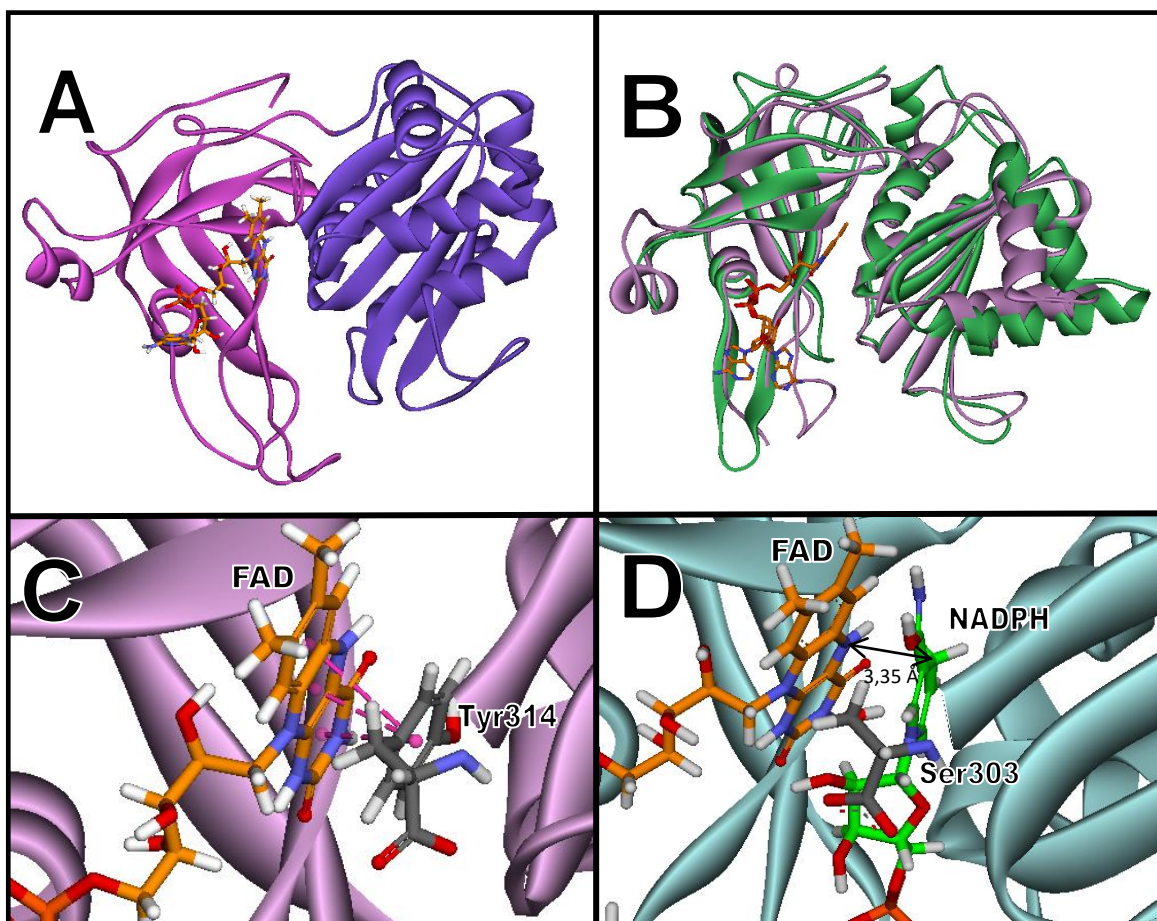


Fig.6: (A) Estructura tridimensional de *LepFNR*. En fucsia se muestra el dominio N-terminal y en morado el dominio C-terminal. (B) Superposición (RMSD 1,2916) de *LepFNR* (fucsia, código PDB: 2RC5) y *Anabaena FNR* (*AnFNR*) (verde, código PDB: 1GJR) (C) Detalle del sitio activo del FAD en *LepFNR* (rosa, código PDB: 2RC5). (D) Detalle del sitio activo del FAD en el complejo Y303S *AnFNR*:NADP⁺ (azul, código PDB: 2BSA). Se indica la distancia entre N5 y C4N. FAD, NADPH y el aminoácido C-terminal se muestran coloreados por tipo de elemento con los carbonos en naranja, verde y gris respectivamente.

Interacciones:

	Van der Waals		Enlace de hidrógeno Pi-dador
	Puente salino		Pi-sigma
	Carga atractiva		Apilamiento Pi-Pi
	Enlace de hidrógeno convencional		
	Alquilo		

A diferencia de lo usual en las FPR bacterianas, el grupo FAD se encuentra en una conformación extendida, encontrándose el anillo de isoaloxazina unido fuertemente por numerosos puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, mientras que el nucleótido de adenina se encuentra mucho menos constreñido. Las cadenas principales de Ser97, Ile115, Lys117 y Leu95 junto con las cadenas laterales de Ser97 y Tyr96 interaccionan directamente con el anillo de flavina, constituyendo el núcleo del sitio activo. La cara *re* del anillo de isoaloxazina se encuentra protegida por un apilamiento π de la cadena lateral de Tyr314, el aminoácido C-terminal, que, a priori, impide el acceso de un sustrato externo al centro redox del enzima. Así, pese a encontrarse en una bacteria *LepFNR* presenta tanto las características estructurales como funcionales (elevado número de recambio) de una FNR plástica y no de una FPR bacteriana.

2. Planteamiento y objetivo

En este momento no se dispone de información estructural que muestre el acoplamiento de NADP^+/H a *LepFNR*. Disponer de un modelo estructural de este acoplamiento proporcionaría información estructural sobre las características químicas del centro catalítico de la enzima en el estado de transición durante la transferencia de hidruro. Esto permitiría tanto una mejor comprensión de su papel en el metabolismo de la bacteria, como facilitar la identificación y desarrollo de xenobióticos que tuvieran *LepFNR* como diana. El diseño de inhibidores adecuados para imposibilitar o reducir la actividad catalítica de la *LepFNR* es una perspectiva definitivamente interesante desde un punto de vista bioquímico, comercial, y social.

Basándonos en la información disponible, parece coherente suponer una conformación enzima-sustrato redox-activa en la cual los anillos de isoaloxazina del grupo prostético FAD y el anillo de nicotinamida del NADPH se encuentren en un apilamiento π , a través del cual la reacción redox pueda tener lugar por transferencia de hidruro. Esta conformación podría alcanzarse, tal y como se ha apreciado en otros sistemas de características similares^[2], a través de un acoplamiento en varios pasos, en el que la interacción del anillo de adenina modifica la conformación de la enzima permitiendo el posterior acceso del anillo de nicotinamida del coenzima al anillo de isoaloxazina del FAD, que en la estructura cristalina disponible para la enzima se encuentra inaccesible.

Por ende, el objetivo de este trabajo es proporcionar modelos de acoplamiento entre *LepFNR* y su coenzima biológico, NADPH, que representen la etapa inicial del acoplamiento, mediante el uso de técnicas de simulación molecular.

3. Fundamentos teóricos

3.1. Superficies de energía potencial

En la modelización computacional es necesario considerar todas las estructuras posibles para una fórmula química dada. La aproximación de Born-Oppenheimer es fundamental a la hora de llevar a la práctica este precepto. La aproximación de Born-Oppenheimer (BO) es la asunción de que el movimiento de los núcleos y el de los electrones pueden ser separados, basándose en que, dadas las enormes diferencias de masa: los electrones pueden responder de manera casi instantánea a una variación en las posiciones de los núcleos.

Basándonos en esta aproximación, en principio es posible caracterizar completamente la superficie de energía potencial (SEP o PES por sus siglas en inglés), que es una hipersuperficie de $3N-6$ dimensiones ($3N-5$ en moléculas lineales) como consecuencia de la tridimensionalidad del espacio Cartesiano, siendo N el número de átomos. Cada estructura posible estará representada por un punto en la SEP, y puede ser definida por un vector función de las coordenadas de cada uno de sus átomos. Para que esta expresión vectorial sea unívoca es necesario cambiar el sistema de coordenadas Cartesianas, de origen arbitrario, lo cual generalmente se hace a través de coordenadas internas de la geometría de la molécula.

Partiendo de la idea de una SEP es posible buscar matemáticamente los mínimos locales, que se corresponden químicamente con estructuras moleculares óptimas (mínimas en energía potencial), así como los puntos silla de primer orden (puntos que son mínimos en todas las coordenadas y máximos en una), que constituyen las mínimas barreras de energía entre mínimos locales. Estos puntos silla pueden asemejarse al concepto químico de estado de transición. La descripción completa de la SEP ofrece, por tanto, una información completa y exhaustiva sobre todas las posibles estructuras químicas y rutas de isomerización de un conjunto de átomos. Sin embargo, la visualización de la SEP completa para conjuntos poliatómicos es muy compleja dado el gran número de dimensiones. Consecuentemente, es habitual realizar representaciones gráficas de la SEP en función de una o dos coordenadas (fijando el resto) para obtener curvas o superficies más fácilmente interpretables. Cabe destacar que la SEP describe un conjunto limitado de átomos (habitualmente una o varias moléculas discretas), mientras que la experimentación tiene lugar con conjuntos extensos de moléculas.

3.2. Mecánica molecular

La obtención de la SEP para un conjunto de átomos dado puede ser abordada de varias formas, típicamente diferenciadas en Mecánica Cuántica (Quantum Mechanics, QM) y Mecánica Molecular (MM).

Los métodos basados en la Mecánica Molecular tienen su origen en la espectroscopia y la termoquímica. La espectroscopia vibracional permite estudiar los distintos estados vibracionales por absorción infrarroja (entre otros métodos más sofisticados), lo cual permite obtener una constante de fuerza del enlace y la distancia de equilibrio entre dos átomos, a partir de la cual se puede extrapolar matemáticamente una función para la energía potencial correspondiente a ese

enlace a través de una expansión de Taylor. En tal caso, podría decirse que se ha parametrizado la energía potencial de un enlace químico a partir de datos experimentales. Basándose en este tipo de desarrollos, se han logrado construir conjuntos de funciones de energía potencial parametrizadas (generalmente a partir de cálculos QM o datos experimentales de moléculas sencillas) que permiten describir la SEP teniendo en cuenta las contribuciones energéticas de los distintos componentes del sistema (enlaces, deformaciones angulares, torsiones, interacciones no enlazantes, etc.). Consecuentemente, es necesario asumir que la energía del sistema puede ser calculada mediante la suma de funciones sencillas parametrizadas. Generalmente se divide a los términos entre aquellos de energía potencial interna o enlazantes (a través de enlaces) y aquellos de energía potencial externa o no enlazantes (entre átomos separados por más de tres enlaces).

Se debe resaltar que, al no tener en cuenta el comportamiento cuántico del sistema, los métodos de MM son incapaces de describir rigurosamente la ruptura y formación de enlaces tal y como los métodos QM pretenden. Sin embargo, al centrarse en el comportamiento físico clásico y obviar la mecánica cuántica, los métodos de MM son matemáticamente considerablemente menos intensivos, y requieren de un número de operaciones mucho menor. Comparativamente, se puede decir que los métodos de MM son significativamente más rápidos, aunque menos rigurosos, que los métodos basados en QM.

De forma descriptiva, se puede decir que los métodos MM representan a las moléculas como un cúmulo de partículas centradas en los átomos que la componen, cada una de ellas con masa, carga y otras propiedades adecuadas al átomo que representan. Estas partículas están conectadas por muelles, y están sujetas a fuerzas inter e intramoleculares, estando todas estas relaciones descritas por funciones parametrizadas. El tipo y número de funciones, así como los parámetros usados en ellas, definen lo que comúnmente se denomina un campo de fuerza. Además del aparato matemático (funciones más o menos complejas, con más o menos términos) es importante destacar que la parametrización suele tener un origen eminentemente experimental y por tanto debe ser adecuada al tipo de trabajo a realizar, ya que se pretende extrapolar resultados en sistemas sencillos y fácilmente manipulables a sistemas más complejos que deban ser modelizados. Este tipo de extrapolaciones se suele realizar bajo la asunción del principio de transferibilidad.

3.3. Campos de fuerza

Un campo de fuerzas es un modelo matemático formado por funciones que describen cómo varía la energía potencial del sistema al cambiar las posiciones de los núcleos respecto a sus posiciones de referencia o equilibrio. La energía potencial total se escribe como la suma de un conjunto de funciones de energía potencial, cada una de las cuales hace referencia a las interacciones entre un pequeño número de átomos en la forma de modelos simples extraídos de la física clásica. Generalmente incluyen funciones para el potencial de estiramiento de enlace, el potencial de apertura/cierre angular, el potencial de torsión de ángulo diedro, el potencial de deformación fuera del plano, y finalmente las distintas interacciones no enlazantes. Dentro estas interacciones se incluyen la energía potencial de interacción electrostática, las interacciones de Van der Waals, y los enlaces de hidrógeno.

Calcular las distintas interacciones no enlazantes, que es fundamental en muchos sistemas, es mucho más costoso que calcular las interacciones entre átomos enlazados. Mientras que los términos de estos últimos aumentan linealmente en número (N) conforme aumenta el sistema, las interacciones no enlazantes aumentan cuadráticamente (N^2), al trabajar con pares de átomos. Como generalmente su magnitud disminuye drásticamente con la distancia entre los átomos implicados, es habitual establecer una distancia de corte a partir de la cual no se computan las posibles interacciones entre dos átomos cualesquiera.

Generalmente los campos de fuerza deben incluir los llamados términos cruzados que representan la influencia cruzada de algunos términos con otros. Por ejemplo, parametrizando de forma simple un enlace como un oscilador armónico resulta imposible tener en cuenta la elongación del enlace que resulta de un cambio angular. Habitualmente es preferible incluir un término cruzado que dependa tanto de la distancia de enlace como del ángulo y que supla esta deficiencia, que desarrollar términos más complejos. Los términos cruzados más importantes son precisamente de este tipo, y recogen el acoplamiento tensión-deformación.

La parametrización de un campo de fuerza es fundamental para determinar su adecuación. Se requieren miles de parámetros para poder definir un campo de fuerza, aun simplificando la forma de los términos notablemente. Para obtener los parámetros, actualmente se utilizan tanto datos experimentales obtenidos a través de diversas técnicas (rayos-X, difracción de neutrones, espectroscopia infrarroja, resonancia magnética, etc.) como resultados de cálculos QM, sin los cuales es imposible cubrir todo el espacio químico. Generalmente los campos de fuerza se parametrizan y optimizan iterativamente, atendiendo a un número reducido de núcleos sobre los que se definen distintos tipos de átomo atendiendo a estados de oxidación, hibridación, etc. Esto implica que, habitualmente, los datos del fichero de entrada para el cálculo con MM requieran información sobre la conectividad.

El cero de energía potencial en un campo de fuerza queda definido por los puntos cero de cada uno de los términos. Para los términos enlazantes, este valor nulo se corresponde generalmente al valor de equilibrio de la referencia paramétrica, esto es, los valores “naturales”. Los términos no enlazantes se anulan a distancia infinita. Por tanto, el punto cero no es sino un sistema hipotético e inalcanzable, en perfecto equilibrio en todos sus términos enlazantes y con átomos separados infinitamente. Consecuentemente, la energía potencial correspondiente a la desviación de los términos enlazantes del equilibrio puede identificarse como la energía estérica, y es en todo caso una energía potencial relativa. La adición de esta energía estérica con la correspondiente a los términos no enlazantes proporciona la llamada energía de campo de fuerza. La consecuencia de mayor importancia de este método es la imposibilidad de comparar rigurosamente valores de energía calculados de esta forma para distintos sistemas, a menos que el cero de energía sea estrictamente idéntico.

Para evaluar el funcionamiento de un campo de fuerza se recurre a cálculos termodinámicos, habitualmente del calor de formación. El cálculo se puede realizar mediante la adición de los valores de calor de formación hipotéticos para cada átomo libre a la energía de campo de fuerza.

El software empleado en la realización de este trabajo, Discovery Studio 4.5^[16], utiliza el programa CHARMM (del inglés “Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics”)^[17,18] versión 39b1, que utiliza un conjunto amplio de campos de fuerza análogamente denominados CHARMM. El conjunto de campos de fuerza CHARMM está orientado a la modelización de sistemas bioquímicos de gran tamaño.

3.4. Acoplamiento molecular

Una aplicación directa de los campos de fuerza de particular interés es la predicción de la fuerza y especificidad con la que una molécula de pequeño o mediano tamaño (comúnmente denominada ligando) puede unirse a una macromolécula biológica. Acoplamiento molecular, ensamblaje molecular, o *docking* es el nombre dado al proceso de evaluación de las energías de interacción entre dichas moléculas en distintas posiciones. Dado el número de átomos implicados en este tipo de acoplamientos, los métodos basados en MM son la opción más viable.

La forma más sencilla de abordar la modelización de un sistema de este tipo es adoptar estructuras rígidas para las moléculas. Así, no es necesario realizar un cálculo de optimización para las distintas geometrías, y simplemente se evalúan las energías de interacción no enlazantes en el campo de fuerzas a partir de una posición de contacto rígido. Este tipo de aproximaciones ignoran importantes factores que influyen en la energía de interacción, como los cambios conformacionales para la adaptación del receptor al ligando, la de-solvatación de la superficie de contacto, y la entropía.

En el desarrollo de este trabajo se utilizan dos algoritmos para llevar a cabo acoplamientos moleculares desde el protocolo *Dock Ligands* del software Discovery Studio 4.5: LibDock^[19] y CDOCKER^[20]. LibDock es un algoritmo de ensamblado de alto rendimiento que genera un conjunto de conformaciones para el ligando utilizando el programa Catalyst. Después, orienta los acoplamientos de forma rápida a partir de puntos polares y apolares. CDOCKER genera conformaciones aleatorias del ligando mediante dinámica molecular en CHARMM. La posición de los ligandos ensamblados se optimiza mediante rotaciones rígidas y un recocido simulado posterior. En ambos casos el receptor macromolecular permanece rígido.

El software utilizado nos permite detectar cavidades de tamaño aceptable para el acoplamiento de ligandos en la estructura rígida de la macromolécula receptora. Una vez fijada una cavidad como un volumen virtual esférico, podemos dirigir el protocolo de ensamblaje a esa región concreta, simplificando el proceso.

3.5. Dinámica molecular

Según la física clásica, el estado de un sistema puede ser completamente descrito especificando las posiciones y momentos de todas las partículas, es decir, 6N coordenadas (siendo N es el número de partículas del sistema) para un espacio tridimensional. El espacio 6N-dimensional definido por estas coordenadas es el conocido como espacio fásico del sistema. En cada instante temporal, el sistema se encuentra en un punto de este espacio fásico. A lo largo del

tiempo, un sistema dinámico describe una cierta trayectoria a lo largo de este espacio, y cada punto del espacio físico determina necesariamente el siguiente punto que ocupará el sistema en ausencia de fuerzas externas. Obtener expresiones analíticas de la posición (q) y el momento (p) en función del tiempo no es posible en la mayoría de sistemas, por lo que se utiliza la aproximación de Euler (Fig.7).

$$q(t+\Delta t) = q(t) + \frac{p(t)}{m} \Delta t$$

$$p(t+\Delta t) = p(t) + m a(t) \Delta t$$

Fig.7: Aproximación de Euler aplicada al cálculo de posición y momento de una partícula, siendo q la posición, p el momento, m la masa, a la aceleración y t el tiempo.

Así, dadas unas posiciones y momentos concretos, y un medio para el cálculo de las fuerzas que actúan sobre cada partícula en cada instante, es posible simular puntualmente la trayectoria en el espacio físico integrando las ecuaciones de movimiento. A partir de la trayectoria, según la hipótesis ergódica, es posible obtener el promedio de cualquier propiedad termodinámica. Una posibilidad usada habitualmente es describir químicamente un sistema, minimizarlo utilizando métodos basados en mecánica molecular, y después asignar momentos iniciales aleatoriamente teniendo en cuenta la relación clásica entre temperatura y momento.

La aplicación del método de Euler requiere recalculer a intervalos de tiempo (frecuentemente llamados pasos de tiempo) definidos. Pasos de tiempo muy cortos hacen que la aproximación sea más precisa, pero aumentan el tiempo de cálculo notablemente al ser costoso recalculer todas las fuerzas. Generalmente, se prefiere trabajar con pasos de tiempo uno o dos órdenes de magnitud inferiores a la moción periódica más rápida del sistema. En biomoléculas, esto presenta un problema, ya que la vibración de un enlace átomo pesado-hidrógeno tiene un periodo de aproximadamente 10^{-14} s, lo cual implicaría pasos de tiempo del orden de 0,1 fs. Para un tiempo de simulación de 10 ns, esto equivale a realizar 10^7 computaciones completas de fuerzas y energía, y sin embargo muchos fenómenos macromoleculares de gran interés ocurren en una escala de microsegundos (Fig.8).

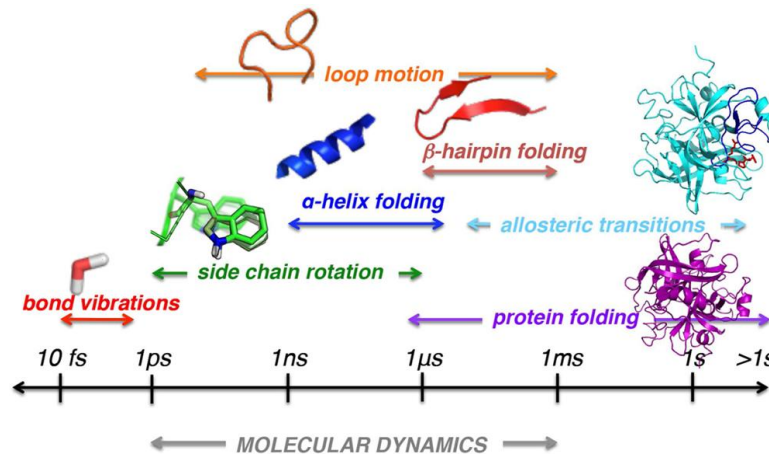


Fig.8: Escala de tiempo aproximada para distintas mociones de proteínas. Extraído de Osuna et al.^[21]

En las dinámicas moleculares realizadas en este trabajo, el paso de tiempo fue fijado a 2 fs. Las simulaciones se realizaron siguiendo el protocolo *Standard Dynamics Cascade* implementado en Discovery Studio 4.5, que realiza distintas operaciones de forma sucesiva: primero realiza dos minimizaciones para optimizar la geometría y refinarla; después simula el calentamiento del sistema hasta 300 K de forma progresiva durante 4 ps, y posteriormente equilibra el sistema a dicha temperatura durante 10 ps, ajustando las velocidades iniciales. Finalmente se realiza una etapa de producción de la dinámica, donde generalmente introduciremos un proceso dinámico significativamente más largo. La última etapa es computacionalmente intensiva en comparación a las anteriores.

En todos nuestros cálculos, para las interacciones no enlazantes el software sólo considera las interacciones entre átomos a menos de 14,0 Å; no computa aquellas a más de 12,0 Å; y trunca progresivamente el valor de aquellas por encima de 10,0 Å mediante una función sigmoidea. Esto evita cambios abruptos.

3.6. Programas utilizados

En la realización de las distintas simulaciones que se presentan en este trabajo se ha empleado el software Discovery Studio 4.5^[16], que constituye una interfaz gráfica para una suite de aplicaciones y utilidades diversas. Algunas de las aplicaciones incluidas son CHARMM, Catalyst, CDOCKER, ZDOCK y DMol³.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis estructural del sitio de unión

La evaluación de los resultados de los distintos cálculos requiere un estudio previo del sitio de unión que permita identificar parámetros (y otros aspectos cualitativos) razonablemente representativos de la calidad de la estructura obtenida.

El estudio experimental y computacional del mecanismo de acoplamiento enzima sustrato en sistemas biológicos similares ha llevado a la proposición de tres etapas bien diferenciadas. Primero tiene lugar el reconocimiento de la región 2'-P-AMP del NADP⁺. Una vez reconocido el ligando, la enzima lo envuelve, sufriendo cambios conformacionales que estrechan la cavidad receptora en torno al 2'-P-AMP y el puente pirofosfato. Finalmente, tendría lugar la etapa de aproximación de los anillos de nicotinamida e isoaloxazina para alcanzar una disposición relativa que permitiría la transferencia de hidruro. Se han resuelto numerosas estructuras tridimensionales de complejos FNR:NADP⁺ en las dos primeras etapas, siendo denominados estos complejos C-I y C-II respectivamente^[23] pero no se ha conseguido obtener la estructura cristalográfica del complejo redox activo, que se ha denominado C-III*. Sin embargo, sí se han logrado resolver estructuras con “geometría redox-activa” en mutantes en los que los aminoácidos C-terminales han sido modificados para facilitar el acoplamiento, a las que se ha denominado C-III.^[24]

Tomando como referencia la estructura resuelta para el C-III (Y303S *AnFNR*:NADP⁺, código PDB: 2BSA) es posible estudiar aspectos clave del acoplamiento que pueden resultar de interés para su extrapolación a nuestro problema. En *AnFNR*, el sitio activo queda acotado por Ser59, Ser80 y Glu301. La modulación del FAD recae en Lys75, Tyr79 y Tyr104, mientras que el trío Ser80, Cys261 y Glu301 tiene un efecto estabilizador en la forma semiquinona del cofactor. El bucle 261-269 juega un importante papel en el reconocimiento del NADP⁺/H y en la colocación del anillo de nicotinamida, siendo la rotación de la cadena lateral de Leu263 relevante para acomodar el puente pirofosfato. Tyr303 y Thr302 se encuentran a distancia de puente de hidrógeno del bucle 261-269 (Arg264 y Glu267 en particular) por lo que se propone un movimiento de estiramiento, siendo la ruptura y re-formación de estas interacciones de gran importancia.^[2]

Respecto a las primeras etapas del acoplamiento, las interacciones clave descritas con el segmento 2'-P-AMP corresponden a Tyr235, capaz de interaccionar tanto por apilamiento π - π como a través de un puente de hidrógeno (2,70 Å) con el fosfato en posición 2'; Gly265, que interacciona por puente de hidrógeno (2,74 Å) con la adenina; y Leu263, que puede establecer interacciones π -alquilo con los dos anillos de la adenina. Arg233 y Arg224 interaccionan electrostáticamente con el fosfato 2', y Ser223 y Gln237 pueden establecer puentes de hidrógeno tanto con el hidroxilo libre del nucleótido monofosfato como con el propio fosfato y con la ribosa respectivamente.

Se ha realizado la identificación de los aminoácidos homólogos en la secuencia de *LepFNR*, a través del alineamiento de las secuencias (Fig.9). Tyr235 se corresponde con Tyr247, parte de una región muy conservada. Gly265 se corresponde con Gly277, como parte de un bucle 261-269 relativamente similar pero un aminoácido más largo en *LepFNR* (272-281). Parte de esa discrepancia es la ausencia de un residuo homólogo a Leu263, ya que en la posición análoga se

encuentran Gly274 y Pro275 (Fig.10). Arg233 y Arg224 se corresponden con Arg235 y Arg245, y Ser223 con Ser234. Cabe destacar, también, que Arg264 tiene como homólogo a Lys276. En definitiva, la variación más significativa entre *AnFNR* y *LepFNR* es la que afecta al bucle 261-269/272-281, que varía en composición y longitud. Gln237 tiene a Ser249 como homólogo, lo cual implica una pérdida de tamaño considerable. El aminoácido Arg100 encuentra como homólogo Lys117, siendo este aminoácido importante por su localización en el dominio N-terminal y su posible contribución a la estabilización del puente pirofosfato.^[25]

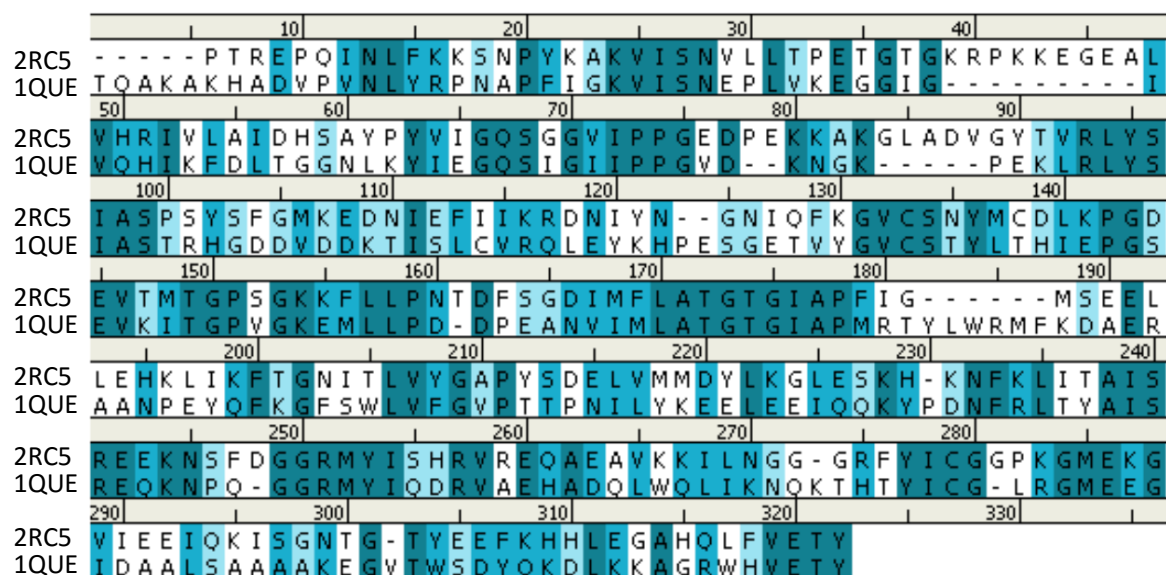


Fig.9: Alineamiento de secuencias de *LepFNR* (2RC5) y *AnFNR* (1QUE). El color indica el grado de similitud entre cada pareja de aminoácidos alineados: azul marino para homólogos exactos, azul oscuro para similitud fisicoquímica elevada, azul claro para bajo grado de similitud fisicoquímica, y blanco para ningún parecido.

Para evaluar la validez y representatividad de las estructuras calculadas, se monitoriza especialmente la posición relativa de Tyr247, Gly277, Lys117, y por supuesto Tyr314, cuya posición respecto al anillo de isoaloxacina debe variar progresivamente para posibilitar cualquier conformación redox-activa.

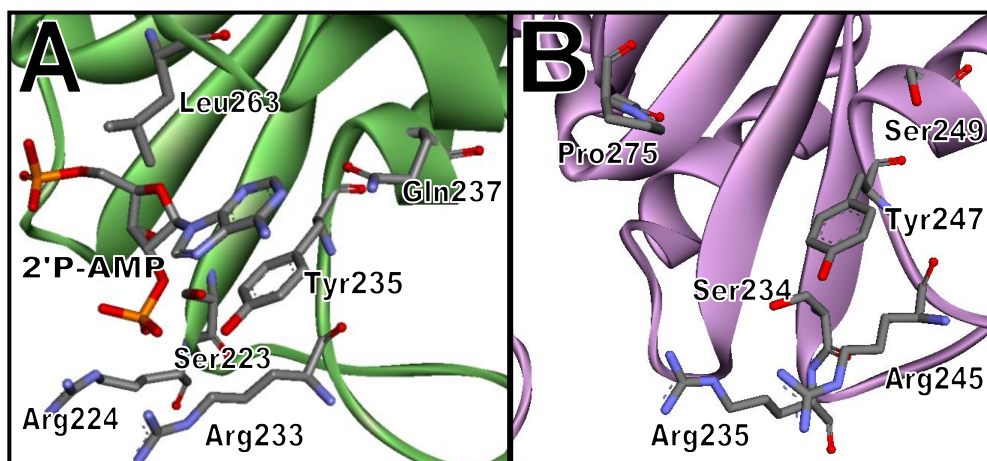


Fig.10: (A) Sitio de unión del extremo 2'-P-AMP en *AnFNR* (verde, código PDB: 1GJR). (B) Sitio de unión del extremo 2'-P-AMP en *LepFNR* (rosa, código PDB: 2RC5). Los aminoácidos más significativos y el fragmento 2'-P-AMP están coloreados por elemento con los carbonos en gris.

4.2. Acoplamiento molecular *LepFNR*:NADPH

Como primera aproximación, se realiza el acoplamiento enzima sustrato entre el NADPH y *LepFNR* (subunidad A del fichero 2RC5, al que se le han retirado moléculas de agua e iones cristalográficos y se ha protonado) dirigiendo el ligando al sitio de unión definido para el 2'-P-AMP, a través del algoritmo LibDock. El fichero de salida nos proporciona 135 poses posibles para el ligando, todas ellas no productivas, flexionadas hacia el exterior sin penetrar hacia el sitio activo de la enzima. La mayoría de las mismas presentan una orientación invertida, de forma que el extremo del mononucleótido de nicotinamida (NMN) se dispone hacia el sitio de unión previamente identificado para el extremo 2'-P-AMP, y el extremo 2'-P-AMP se orienta hacia el centro redox-activo (Fig.11 (A)). En las que presentan una orientación adecuada, la mayoría presenta una inversión horizontal en el extremo 2'-P-AMP, quedando el grupo amino orientado hacia la enzima. Esto dificulta un mayor grado de acercamiento. Sólo tres poses presentan una orientación coherente con lo esperado en ese aspecto (Fig.11 (B)), pero sus puntuaciones según la función de evaluación propia del algoritmo de acoplamiento (LibDockScore) son buenas.

Se realiza un análisis estadístico de las interacciones no enlazantes para procesar la información obtenida. Los aminoácidos con interacciones favorables (Fig.11 (C)) en más poses son Lys117 (127), Arg235 (99), Gly274 (90), Pro206 (85) y Pro275 (77). Por otra parte, los aminoácidos que presentan interacciones desfavorables en más poses son Tyr314 (35), Asp119 (34), Thr175 (22), Arg235 (16) y Lys117 (11). Esto revela que los aminoácidos Lys117 y Arg235 son relativamente polémicos: son facilitadores de un número elevado de poses, pero también pueden dificultar ciertas aproximaciones de encaje rígido. También permite confirmar la relevancia de los aminoácidos Gly274 y Pro275, parte del bucle 272-281. Pro206 se postula como un estabilizador de la parte media del ligando a través de puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas. Sólo 56 conformaciones cuentan con interacciones favorables con Tyr247, la mayoría mediante puentes de hidrógeno débiles ($>4 \text{ \AA}$); y ninguna con Gly277. Arg41 tiene un notable peso estadístico debido al plegamiento hacia el exterior del extremo del ligando orientado hacia el dominio N-terminal, presente en un gran número de poses, y que se produce también en la estructura cristalográfica de complejo *LepFNR*:NADP⁺ catalíticamente no competente (código PDB: 2RC6) presentada en Nascimiento et. al.^[13]

La combinación favorable de residuos con mayor número de poses encontradas es la de Lys117, Gly174, Thr175, Arg235 y Gly274, que responde a un 6,67% de las 135 conformaciones obtenidas. Esto se corresponde con una tendencia general a ensamblar el ligando muy flexionado, casi plegado, en la cavidad entre el sitio redox-activo y el sitio de unión predicho para el extremo 2'-P-AMP. Esta tendencia es razonable teniendo en cuenta la falta de flexibilidad del receptor.

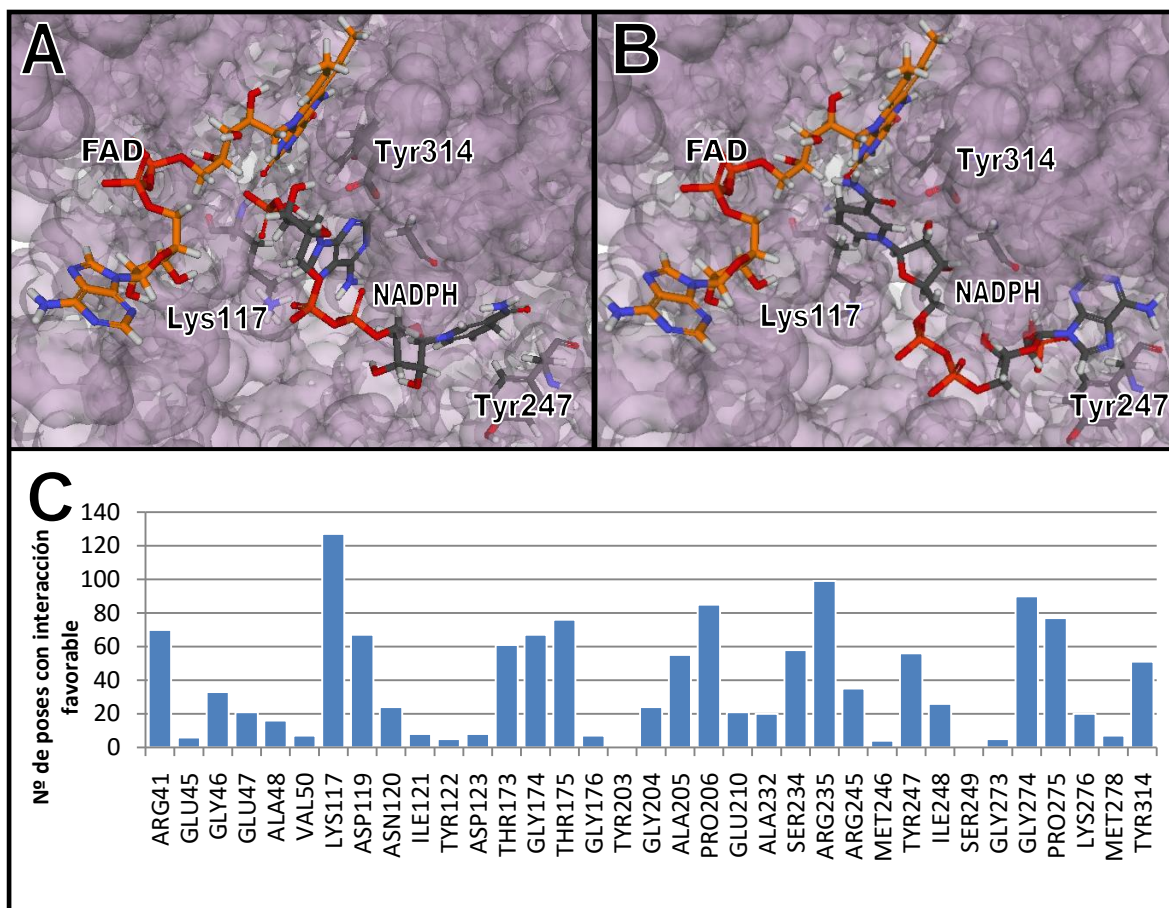


Fig.11: (A) Pose invertida de mayor puntuación LibDockScore, resultado del acoplamiento NADPH:*LepFNR*. Nótese la orientación del ligando. (B) Pose no invertida de mayor puntuación LibDockScore resultado del acoplamiento NADPH:*LepFNR*. *LepFNR* se muestra como superficie de Van der Waals rosada; NADPH y aminoácidos relevantes están coloreados por elemento con los carbonos en gris y FAD con los carbonos en naranja. (C) Histograma de poses obtenidas con interacciones favorables frente a los residuos de *LepFNR*.

Los resultados pormenorizados del acoplamiento ponen de manifiesto el impedimento que supone Tyr314 para un acoplamiento productivo, así como la problemática que supone la falta de un sitio de unión riguroso para el extremo NMN, que conduce a la predicción de un gran número de interacciones impropias de una conformación potencialmente redox-activa. Las poses obtenidas, incluso en los casos más coherentes, están lejos tanto desde el punto de vista espacial como conformacional de ser productivas.

4.3. Acoplamiento molecular *LepFNR*:2'P-AMP

4.3.1. Vía LibDock

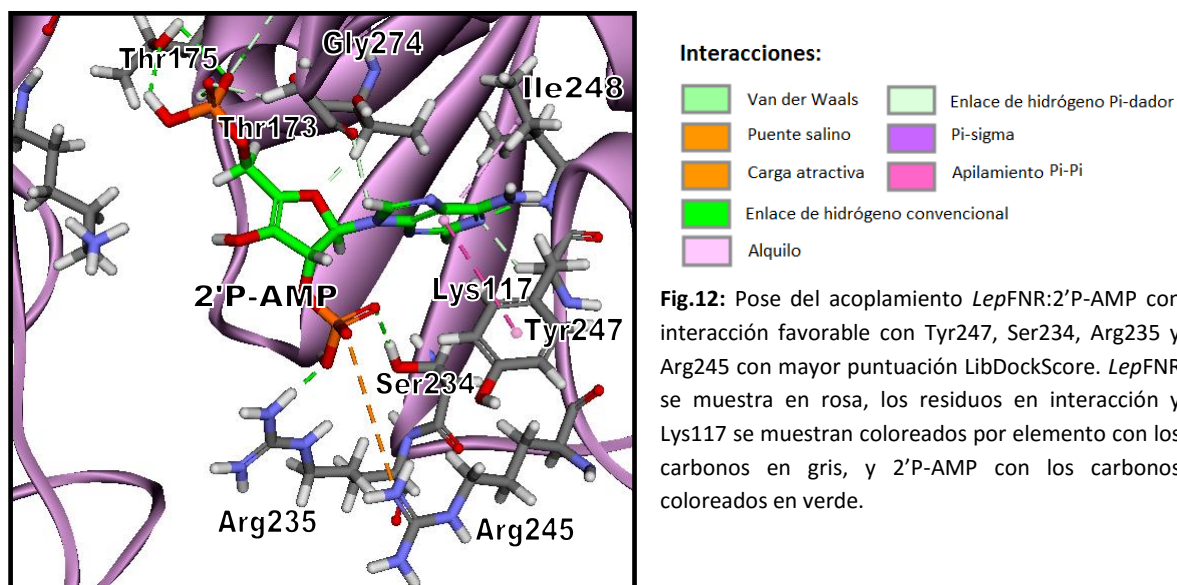
En pos de obtener resultados más representativos, se realiza el acoplamiento enzima sustrato entre el segmento 2'P-AMP de la molécula de NADPH, y *LepFNR* (subunidad A del fichero 2RC5, al que se le han retirado moléculas de agua e iones cristalográficos y se ha protonado) dirigiendo el ligando al sitio de unión definido para el 2'P-AMP, a través del algoritmo LibDock. El fichero de salida proporciona 889 poses posibles para el ligando. La mayoría de las poses obtenidas, las de mayor puntuación LibDockScore inclusive, presentan una orientación invertida,

en la que el anillo de adenina se orienta hacia la región interdominio y el extremo 5'P de la ribosa se dispone hacia el sitio de unión 2'P-AMP.

Se realiza un análisis estadístico de las interacciones no enlazantes para procesar la información obtenida. Los aminoácidos con interacciones favorables en más poses son Lys117 (778), Thr175 (663), Pro206 (645), Gly274 (627) y Gly174 (604). Por otra parte, los aminoácidos que presentan interacciones desfavorables en más poses son Tyr314 (169), Thr173 (154), Thr175 (125), Ile248 (33) y Lys117 (29). Aun habiendo reducido notablemente el tamaño del ligando, la importancia de la posición de Lys117 es acentuada. Gly274 y Pro206 son, de nuevo, residuos clave en la interacción, y Tyr314 es el impedimento más importante.

La región 173-176 parece tener efectos opuestos. Thr175 presenta interacciones favorables en 663 poses, íntegramente de tipo puente de hidrógeno; Gly174 también presenta un gran número de poses con interacciones favorables de puente de hidrógeno. Sin embargo, un análisis más refinado permite corroborar que dichas poses son mayoritariamente del tipo invertido, y corresponden a la estabilización de 2'P que a su vez mantiene la adenina en la región interdominio.

Sólo 188 poses estiman interacciones favorables con Tyr247, y ninguna con Gly277. La triada Ser234, Arg235 y Arg245 tiene cierta relevancia estadística, con 123 poses que interaccionan favorablemente con los tres residuos. Un total de 101 poses interaccionan con dicha triada y además con Tyr247, lo cual es un indicativo razonable de su calidad. Entre dichas poses, las dos de mejor puntuación según la función de puntuación LibDockScore están orientadas de forma coherente, con el grupo amino de la adenina hacia el exterior (Fig.12).



La posición del ligando para las poses coherentes es poco compacta. El espacio entre el bucle 272-281 y la tétrada de Ser234, Arg235, Arg245 y Tyr247 es lo bastante grande como para tolerar posiciones casi verticales del ligando en las que la interacción adenina-Tyr247 es de apilamiento π en T, a 4,86 Å en la pose de mayor puntuación LibDockScore.

4.3.2. Minimización *In Situ*

El software ofrece la posibilidad de realizar una minimización energética *in situ* de las poses obtenidas utilizando CHARMM. Esto permite flexibilizar los ligandos y la esfera de coordinación del receptor enzimático, manteniendo el resto de la enzima rígida. A través de este protocolo, las 889 poses obtenidas tras el acoplamiento vía LibDock se minimizaron individualmente. Esto permite un nuevo estudio estadístico cualitativo sobre las predicciones realizadas por el software y un mayor grado de representatividad en las poses coherentes previamente determinadas.

El número de poses con interacciones favorables con Ser235, Arg235 y Arg245 asciende hasta 149, de las cuales 114 además muestran interacciones favorables con Tyr247. Gly277 sigue sin mostrar interacciones favorables en ninguna pose. Esto sugiere que el acercamiento del bucle 272-281 al ligando es pobre en las poses obtenidas, y que las interacciones entre ambos se concentran en la zona opuesta a Tyr247 que comprende los aminoácidos Pro275, Gly274 y Gly273.

Las dos poses aceptables de mayor puntuación LibDockScore divergen considerablemente en la minimización a pesar de partir de posiciones fijas prácticamente idénticas. La pose de mayor puntuación minimizada, que se denomina **[A]**, (Fig.13 (A)) forma un puente de hidrógeno a 1,84 Å con Tyr247 a partir de su fosfato 2', lo cual estabiliza el AMP en una posición más alejada del bucle 272-281. Sin embargo, la pose de menor puntuación, que se denomina **[B]** (Fig.13 (B)), se aleja de Tyr247 hasta interactuar a través de un apilamiento π a 5,03 Å, pero presenta interacciones tanto con el bucle 272-281 (especialmente con Gly274) como con la región 173-176. Lys117 juega un papel fundamental en la estabilización del 5'P en ambos casos, pero más significativamente en el primero.

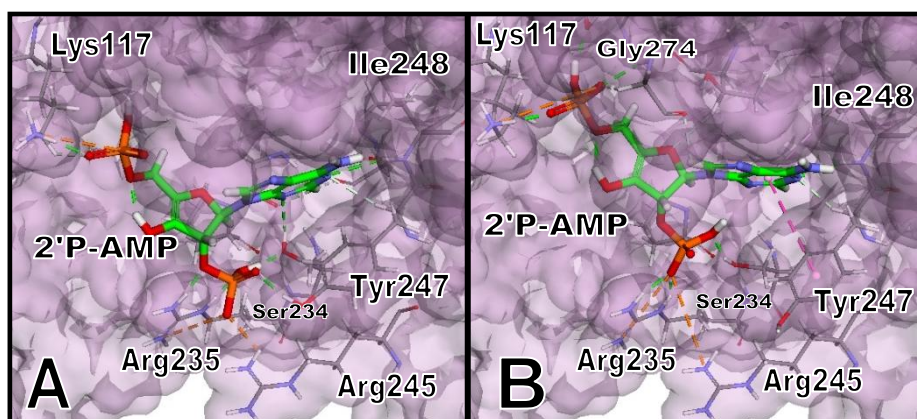


Fig.13: (A) Pose [A] minimizada (B) Pose [B] minimizada. *LepFNR* se muestra como superficie de Van der Waals semitransparente rosada, los residuos en interacción y 2'-P-AMP se muestran coloreados por elemento con los carbonos en gris y en verde respectivamente.

Se calcularon las energías de enlace entre cada ligando y el receptor utilizando un modelo de Born generalizado (constante dieléctrica $\epsilon_r=80$) para tener en cuenta de forma implícita el solvente acuoso. Para la pose **[A]** se obtiene una energía de enlace de 9,83 kcal/mol, mientras que para la pose **[B]** este valor es de 14,87 kcal/mol. Esta diferencia se compensa a nivel de complejo, siendo el primero 17,54 kcal/mol más estable que el segundo. En cualquier caso, la minimización y flexibilización del sitio de unión sólo actúa como un paso de refinamiento acotado del acoplamiento rígido inicial, y consecuentemente sigue sin poder estimar grandes cambios conformacionales en la enzima.

4.4. Dinámica molecular del complejo *LepFNR*:2'P-AMP

4.4.1. Dinámica molecular estándar en vacío

Partiendo de las poses refinadas a través del protocolo de minimización, se estudió el efecto global del acoplamiento del fragmento 2'P-AMP en la conformación global de la enzima a través de un cálculo de dinámica molecular en vacío. En este caso, se utilizaron los parámetros por defecto del software y se asigna un tiempo de 10 ps a la etapa de producción de la dinámica.

Los efectos de la dinámica, pese a su brevedad, son visibles en ambas estructuras. La pose **[A]** deriva en la estructura **[A']** (Fig.14 (A)) a través de la dinámica, estabilizándose 101,00 kcal/mol durante el proceso, pero mostrando todavía una tendencia a estabilizarse en el punto final del proceso. **[A']** muestra un apilamiento π de Tyr314 con el anillo de isoaloxazina, especialmente con el anillo de pirazina a 3,85 Å. Curiosamente, se observa cierta inclinación en la posición del residuo frente al apilamiento estrictamente paralelo observado en la estructura rígida, que está favorecida por una interacción π -alquilo con el grupo metilo en posición 8 de la isoaloxazina. La desviación, de aproximadamente 30°, coincide con el flanco del triciclo por el que se introduce el grupo NMN en las estructuras C-III.

La estructura derivada de la pose **[B]** se denomina **[B']** (Fig.14 (B)) y presenta un comportamiento análogo, pero la distancia de apilamiento π entre Tyr314 y el anillo de pirazina central es de 3,49 Å y muestra un grado casi inapreciable de apertura lateral. La estabilización en este caso es de 104,92 kcal/mol, aunque una vez más la dinámica no logra estabilizar la energía, y por tanto alcanzarla conformación de equilibrio.

En el entorno del fragmento 2'P-AMP, **[A']** y **[B']** difieren sensiblemente, aunque podemos afirmar en ambos casos que no se aprecia una reducción significativa del espacio libre en torno a la adenina. En **[A']** se puede apreciar la pérdida del puente de hidrógeno entre Tyr247 y el grupo 2'P a favor de interacciones de apilamiento π con los dos anillos de la adenina, a 4,70 y 4,95 Å, respectivamente. Pro275 se dispone a 2,36 Å de 5'P. El papel de Lys117, Ser234, Arg235, Arg245 e Ile248 permanece aproximadamente inalterado respecto a **[A]**. Por otra parte, **[B']** muestra una interacción de apilamiento π en T con una distancia de 4,94 Å entre la adenina y Tyr247, y presenta una interacción π -azufre entre Met278 y el anillo de imidazol de la adenina a 5,33 Å. Esta última interacción, sumada al puente de hidrógeno ya visto en **[B]** con Gly274, constituye una evidencia de interacciones más completas entre el bucle 272-281 y el fragmento 2'P-AMP. Análogamente, la interacción con el resto de aminoácidos estudiados permanece inalterada.

Las observaciones realizadas resultan parcialmente confusas. **[B']** presenta una posición del fragmento 2'P-AMP más próxima al bucle 272-281 que **[A']**, lo cual le permite establecer interacciones con los residuos presentes, pero es esta última estructura la que permite atisbar un efecto significativo en la posición de Tyr314, que permanece prácticamente inalterado en **[B']**. En cualquier caso, se precisa un proceso dinámico más complejo que permita incluir efectos del medio biológico y lograr una mayor estabilización de las estructuras.

4.4.2. Dinámica molecular estándar con solvente implícito

Se realizó una dinámica estándar para las estructuras de partida **[A]** y **[B]** teniendo en cuenta el disolvente de forma implícita mediante el método de Born Generalizado con volumen

molecular (GBMV) disponible en el software. Se utilizaron los parámetros por defecto del software (constante dieléctrica $\epsilon_r=80$ para el solvente) y se asigna un tiempo de 10 ps a la etapa de producción de la dinámica. Las estructuras obtenidas a partir de [A] y [B] se denominan [A''] (Fig.14 (C)) y [B''] (Fig.14 (D)) respectivamente.

La estabilización producida durante la dinámica es de 29,32 kcal/mol para [A''] y de 60,51 kcal/mol para [B''], en ambos casos sin estabilizarse totalmente. Tanto [A''] como [B''] muestran apilamiento π entre Tyr314 y el anillo de isoaloxazina a 4,03 Å y 4,41 Å respectivamente. En [B''] se observa un deslizamiento del anillo de isoaloxazina respecto a la posición de Tyr314, que es prácticamente idéntica en ambas conformaciones, y que parece ser la causa de la mayor distancia de la interacción. En ambos casos los ciclos se sitúan en planos prácticamente paralelos.

El fragmento 2'-P-AMP en [A''] presenta interacciones tanto con Gly274 (puente carbono-hidrógeno, ya visto en [A]) como con Pro275 (interacción π -alquilo con el anillo de imidazol). Tyr247 interacciona por apilamiento π a 4,64 Å y no forma puente de hidrógeno. En [B''] Tyr247 si presenta interacciones tanto de apilamiento π con la adenina (4,06 Å) como de puente de hidrógeno con 2'-P, situándose el ligando en una posición muy distinta a la observada en [B']. Sin embargo, las interacciones entre el ligando y el bucle 272-281 quedan reducidas a un débil puente de carbono hidrógeno entre Gly274 y la estructura carbonada de la pentosa.

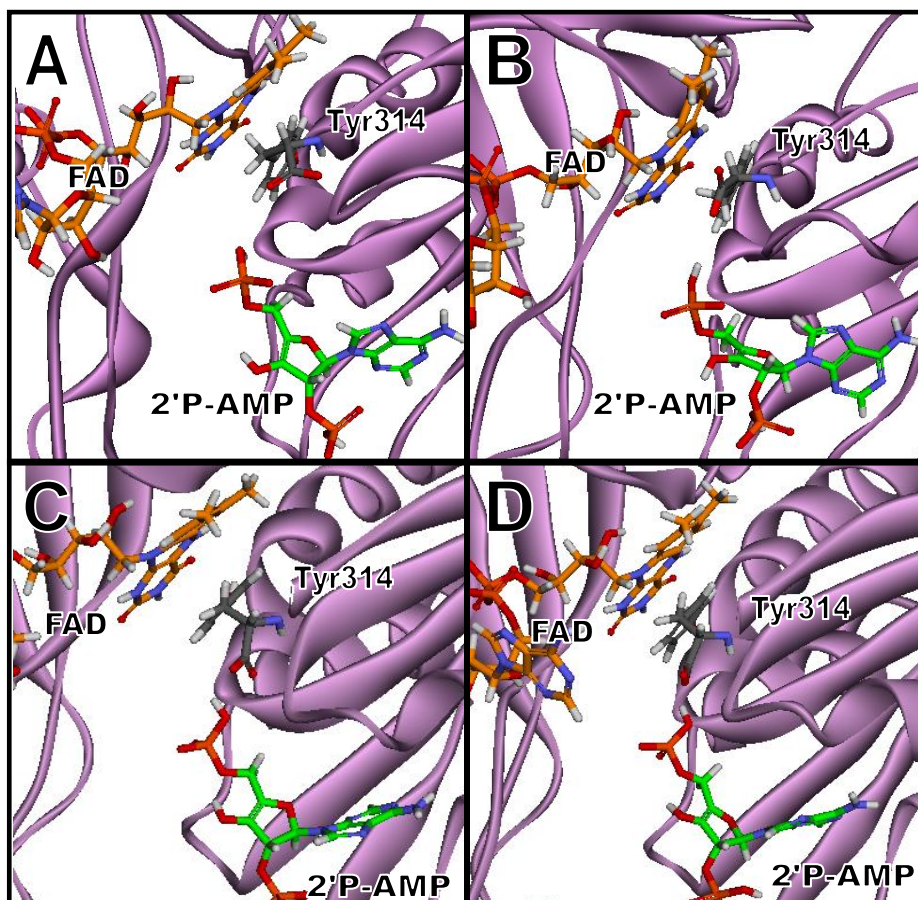


Fig.14: (A) Estructura final de la dinámica de la pose [A], denominada [A']. (B) Estructura final de la dinámica de la pose [B] denominada [B']. (C) Estructura final de la dinámica de la pose [A] denominada [A'']. (D) Estructura final de la dinámica de la pose [B] denominada [B'']. *LepFNR* se muestra en rosa; 2'-P-AMP, FAD y Tyr314 se muestran coloreados por elemento con los carbonos en verde, naranja y gris respectivamente.

En ambos casos, el volumen de la cavidad definida entre el bucle 272-281 y la triada Arg235-Arg245-Tyr247 se reduce notablemente en comparación a [A'] y [B']. La computación

implícita del medio acuoso conduce a encajes más coherentes para la región 2'-P-AMP pero no permite ver desplazamiento alguno en Tyr314.

4.4.3. Dinámica molecular estándar con solvente explícito

La alternativa al modelo implícito es someter la estructura del complejo a un protocolo de solvatación y realizar la dinámica posteriormente, incluyendo en el cálculo de manera explícita y singular las moléculas de solvente.

Se utilizó como estructura de partida la pose coherente de mayor puntuación LibDockScore obtenida vía LibDock, que se minimiza individualmente para producir una estructura **[C]** a través del protocolo por defecto de minimización del software. **[C]** se solvata rodeando la enzima de un octaedro truncado de moléculas de agua y contraiones. Se utilizan condiciones de frontera periódicas (PBC, del inglés "Periodic Boundary Conditions"), estando las moléculas de agua a distancias iniciales >10 Å de la frontera. Se realizó la dinámica estándar. Se pretende lograr una estabilización máxima para el sistema, por lo que el tiempo de la etapa de producción de la dinámica se aumenta a 1000 ps. Se denomina a la estructura final resultante de la dinámica completa **[C*]**.

La dinámica produce una estabilización neta de 487,00 kcal/mol de energía potencial, de principio a fin. La representación de los promedios de valores de energía para varias conformaciones consecutivas frente al tiempo de simulación permite ver cómo esta disminución se produce de manera aproximadamente logarítmica (Anexo 1, Fig.16). Consecuentemente, aunque la tendencia no está totalmente estabilizada tras la dinámica ya que presenta una gran dispersión, se puede apreciar cómo la variación respecto al tiempo ha disminuido notablemente. A lo largo de la dinámica se encuentran mínimos puntuales con energías potenciales muy inferiores a **[C*]**, con diferencias del orden de 100 kcal/mol a través de varios pasos. Las conformaciones producidas durante los últimos 200 ps de la dinámica apenas presentan tendencia a la estabilización neta (Anexo 1, Fig.17), por lo que se estudian distintas conformaciones producidas en la dinámica atendiendo a su interés estructural.

Se encuentran numerosas conformaciones que muestran cierto grado de desplazamiento en Tyr314 a lo largo de la dinámica. Dos de ellas, denominadas **[C1]** y **[C2]** (Fig.15 (A) y Fig.15 (C)) son particularmente bajas en energía potencial (del orden de 280 kcal/mol más estables que **[C*]**), se producen durante el periodo final de la dinámica, y además se diferencian en tan solo 10 kcal/mol de energía potencial. Ambas muestran interacciones entre Tyr314 y el anillo de isoaloxazina, pero las distancias son elevadas y la posición relativa de los anillos favorece una hipotética entrada del anillo de nicotinamida. En **[C1]** la interacción se produce a más de 4 Å (Fig.15 (B)) y el anillo se encuentra desplazado geométricamente hacia el interior. En **[C2]** la interacción se produce a 4,21 Å de distancia (Fig.15 (D)), y el anillo se encuentra tanto parcialmente desplazado como desviado del plano paralelo aproximadamente 20°. Este tipo de conformaciones no se dan hasta transcurrida la mayor parte de la dinámica (Anexo 1, Fig.18).

Para evaluar el efecto de las moléculas de agua explícitas en el desplazamiento de Tyr314, se realizó una dinámica en condiciones idénticas y en la ausencia de 2'-P-AMP. Se corrobora que el desplazamiento es sensiblemente menor, y que las distancias de interacción sólo superan los 4 Å

en casos estrictamente puntuales en los que generalmente se aprecia una inclinación del anillo de tirosina hacia el interior, contraria a lo observado en [C2].

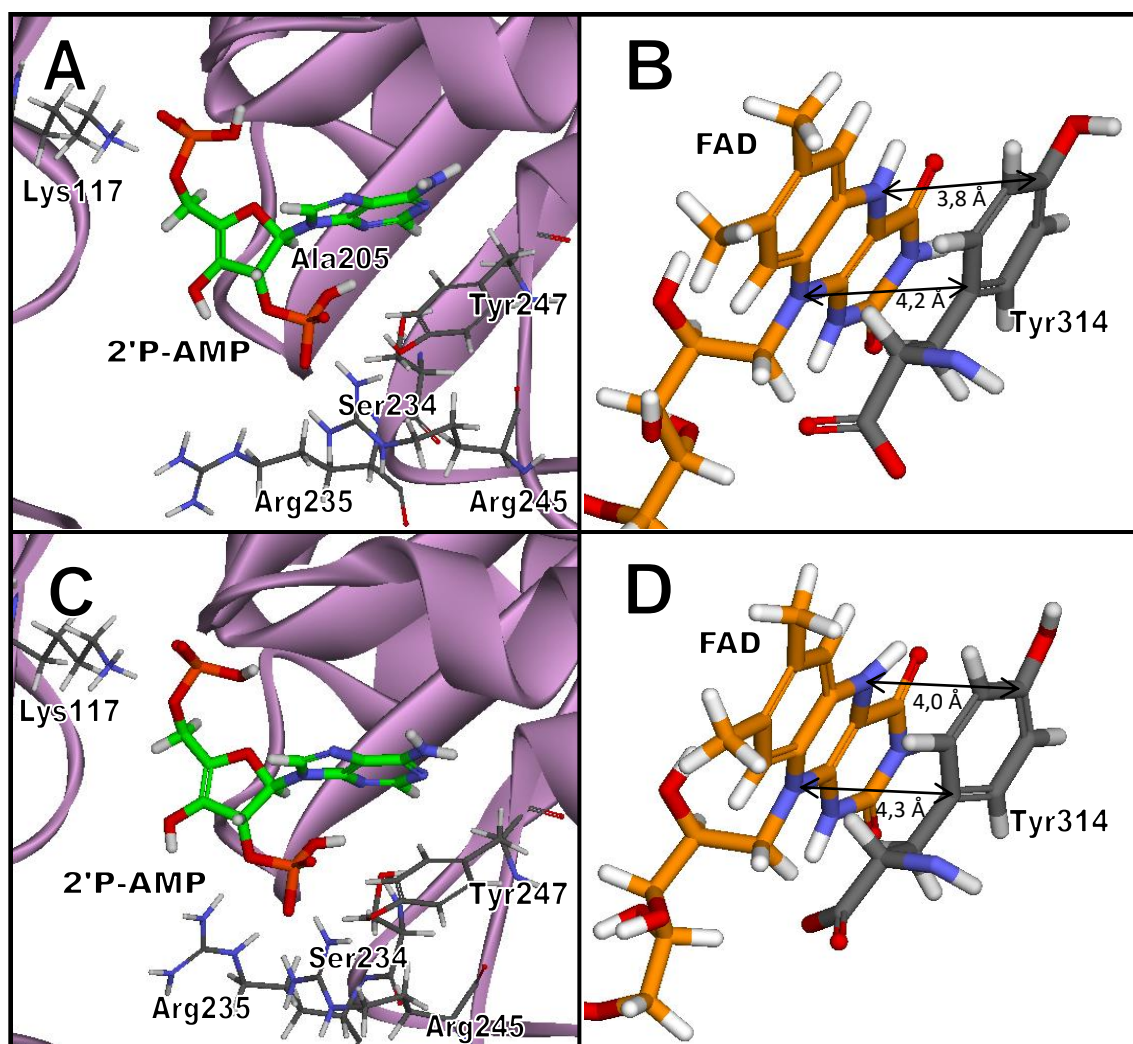


Fig.15: (A) Posición del fragmento 2'-P-AMP en la estructura [C1]. (B) Posición relativa de Tyr314 respecto al anillo de isoaloxazina de FAD en [C1] (C) Posición del fragmento 2'-P-AMP en la estructura [C2]. (D) Posición relativa de Tyr314 respecto al anillo de isoaloxazina de FAD en [C2]. *LepFNR* se muestra en rosa, los aminoácidos relevantes, 2'-P-AMP y FAD se muestran coloreados por elemento con los carbonos en gris, verde y naranja respectivamente. Nótese que las estructuras no muestran las moléculas de agua presentes.

La presencia de moléculas de agua afecta al entorno del fragmento 2'-P-AMP, en especial mediante interacciones con el hidroxilo libre de la pentosa y con los grupos fosfato, relativamente expuestos y accesibles al solvente. Esto dificulta el análisis de las interacciones entre la enzima y el ligando.

5. Conclusiones

Se ha estudiado la interacción entre *LepFNR* y la molécula de NADP^+/H , prestando especial atención al sitio de unión del extremo 2'-AMP del coenzima. Las simulaciones presentadas constatan la importancia del 2'P en el mecanismo de reconocimiento de la enzima, a través de interacciones con un grupo bien definido de aminoácidos. Las interacciones y la posición del 2'P, pese a aportar relativamente escasa información posicional, constituyen una referencia constante y robusta en acoplamientos moleculares y dinámicas del complejo *LepFNR*:2'P-AMP. La interacción con Tyr247, aparentemente intuitiva, ha probado ser relativamente más difícil de encontrar, en parte por el abanico de interacciones que ofrece pero especialmente por el exceso de espacio en la cavidad receptora. Esto hace de esperar un mayor estrechamiento de la cavidad para obtener un C-II adecuado.

La variación de longitud y composición del bucle 272-281 con respecto a los bucles correspondientes en otros miembros de la familia le confieren características aparentemente genuinas. Primero, según los resultados obtenidos, sus interacciones se dividen en dos zonas separadas: el extremo exterior del bucle, que interacciona a través de Gly274 y Pro275; y el extremo interior, desde el que sólo se han podido identificar interacciones con Met278. Estructuralmente, estas son las dos regiones del bucle que habitualmente se encuentran más próximas a la cavidad inferior, estando el arco central del bucle doblado hacia el lado contrario. La segunda observación de relevancia es la falta de participación de Gly277, que teóricamente debía jugar un papel importante por analogía a Gly265 en *AnFNR*. El grado en el que estos factores están relacionados puede ser un aspecto fundamental de la singularidad de *LepFNR* de cara al acoplamiento con el 2'P-AMP. La mera longitud añadida podría ser relevante, así como la inadvertida presencia de Lys280 en lugar de Glu268, que podría interaccionar con Gly277 y modificar su disponibilidad. Gly277 es un aminoácido vital en cualquier caso dada su presumible interacción de puente de hidrógeno con Thr313.

Por otra parte, pese al corto tiempo de las simulaciones de dinámica molecular, estas permiten atisbar un desplazamiento en la posición de Tyr314, derivado exclusivamente del ensamblaje del segmento 2'P-AMP. Los resultados obtenidos apuntan a una posición en la que Tyr314 se encuentra inclinada respecto al plano paralelo al anillo de isoaloxazina, produciéndose una apertura angular orientada hacia el anillo pirimidínico de la flavina; y simultáneamente se encuentra desplazada respecto al tríciclo hacia el interior del espacio interdominio. Esto contribuye a avalar la hipótesis de que la interacción enzima-2'P-AMP induce cambios conformacionales que permitirán el posterior acceso del extremo NMN al sitio activo de la enzima, produciéndose por tanto el acoplamiento del coenzima de forma bipartida.

Es de esperar que mayores tiempos de simulación en las dinámicas moleculares produzcan una mayor apertura del sitio de unión de la mitad NMN del coenzima. No obstante, partiendo de la conformación obtenida en las dinámicas aquí empleadas debería reemplazarse la molécula de 2'P-AMP por NADPH, y partiendo de esta estructura realizar una dinámica dirigida que aproximara el anillo de nicotinamida a la cara *re* de la isoaloxazina. Esto permitiría evaluar la nueva conformación adquirida por Tyr314, así como la orientación relativa de los anillos de nicotinamida, flavina y Tyr314 en una conformación catalíticamente competente.

6. Bibliografía

- [1] F. Müller en *The Chemistry and Biochemistry of Flavins*, Vol.1, CRC Press, Boca Raton, 1991, 1–71.
- [2] I. Lans, Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, 2012.
- [3] M. Medina, *FEBS J*, 2009, 276, 3942–3958.
- [4] N. Carrillo, E.A. Ceccarelli, *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270, 1900–1915.
- [5] E.A. Ceccarelli, A.K. Arakaki, N. Cortez, N. Carrillo, *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1698, 155–165.
- [6] D.L. Catalano-Dupuy, M.A. Musumeci, A. López-Rivero, E.A. Ceccarelli, *PLoS ONE*, 2011, 6(10).
- [7] Y. Kimata-Ariga, G. Kurisu, M. Kusunoki, S. Aoki, D. Sato, et al., *J Biochem*, 2007, 141, 421–428.
- [8] N. Thomsen-Zieger, V. Pandini, G. Caprini, A. Aliverti, J. Cramer, et al., *FEBS Lett*, 2004, 576, 375–380.
- [9] B. Adler, A. de la Peña-Moctezuma, 2010, 140, no. 3–4, 287–296.
- [10] A.J. McBride, D.A. Athanazio, M.G. Reis, A.I. Ko, *Curr Opin Infect Dis*, 2005, 18, 376–386.
- [11] F. Seeber, *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2003, 3, 99–109.
- [12] F. Seeber, A. Aliverti, G. Zanetti, *Curr Pharm Des*, 2005, 11, 3159–3172.
- [13] A.S. Nascimento, D.L. Catalano-Dupuy, A. Bernardes, M. Neto, M.A.M. Santos, E.A. Ceccarelli, I. Polikarpov, *BMC Structural Biology*, 2007, 7, 69.
- [14] A. Aliverti, V. Pandini, A. Pennati, M. de Rosa, G. Zanetti, *Arch Biochem Biophys*, 2008, 474, 283–291.
- [15] M. Milani, E. Balconi, A. Aliverti, E. Mastrangelo, F. Seeber, et al., *J Mol Biol*, 2007, 367, 501–513.
- [16] *Discovery Studio 4.5*, Accelrys, Inc.: 10188 Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA 92121, USA, 2014.
- [17] B. Brooks, R. Bruccoleri, B. Olafson, D. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J Comput Chem*, 1983, 4, 187–217.
- [18] A. D. MacKerell Jr., B. Brooks, C. L. Brooks III, L. Nilsson, B. Roux, Y. Won, M. Karplus, P. Schleyer et al., *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, 1998, 1, 271.
- [19] S.N. Rao, M.S. Head, A. Kulkarni, J.M. Lalonde, *J Chem Inf Model*, 2007, 47, 2159–2171.
- [20] G. Wu, D. H. Robertson, C. L. Brooks, M. Vieth, *J Comput Chem*, 2003, 24, 1549–1562.
- [21] S. Osuna, G. Jiménez-Osés, E.L. Noey, K.N. Houk, *Accounts of Chemical Research*, 2015, 48, no. 4, 1080–1089.
- [22] C.J. Cramer en *Essentials of computational chemistry: Theory and Models*, Wiley, Chichester, 2004.
- [23] J.A. Hermoso, T. Mayoral, M. Faro, C. Gómez-Moreno, J. Sanz-Aparicio, M. Medina, *J Mol Biol*, 2002, 319, 1133–1142.
- [24] J. Tejero, I. Pérez-Dorado, C. Maya, M. Martínez-Júlvez, J. Sanz-Aparicio, C. Gómez-Moreno, J.A. Hermoso, M. Medina, *Biochemistry*, 2005, 44, 13477–13499.
- [25] A. Sánchez, Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, 2013.

Anexo I:

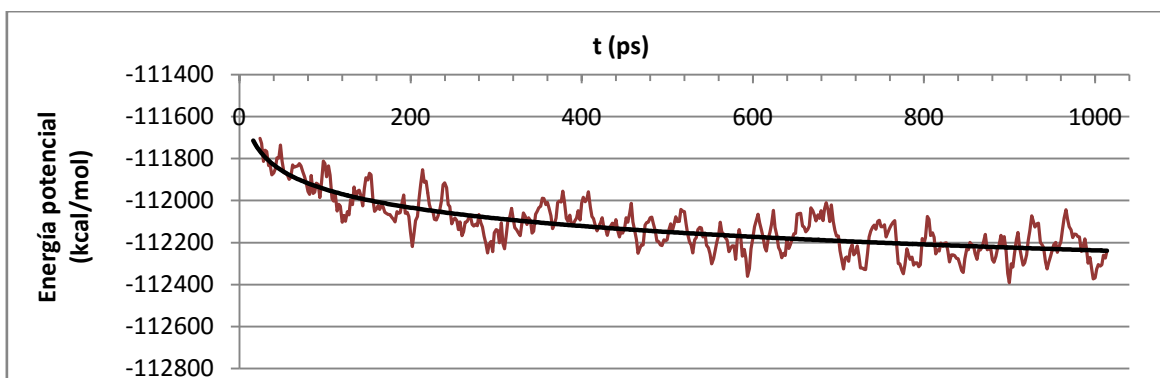


Fig.16: Media móvil de cinco periodos de la energía potencial (kcal/mol) del sistema frente al tiempo de producción de la dinámica.

■: Media móvil de cinco periodos de energía potencial (kcal/mol)

■: Ajuste logarítmico ($y = -126,4\ln(x) - 111363$)

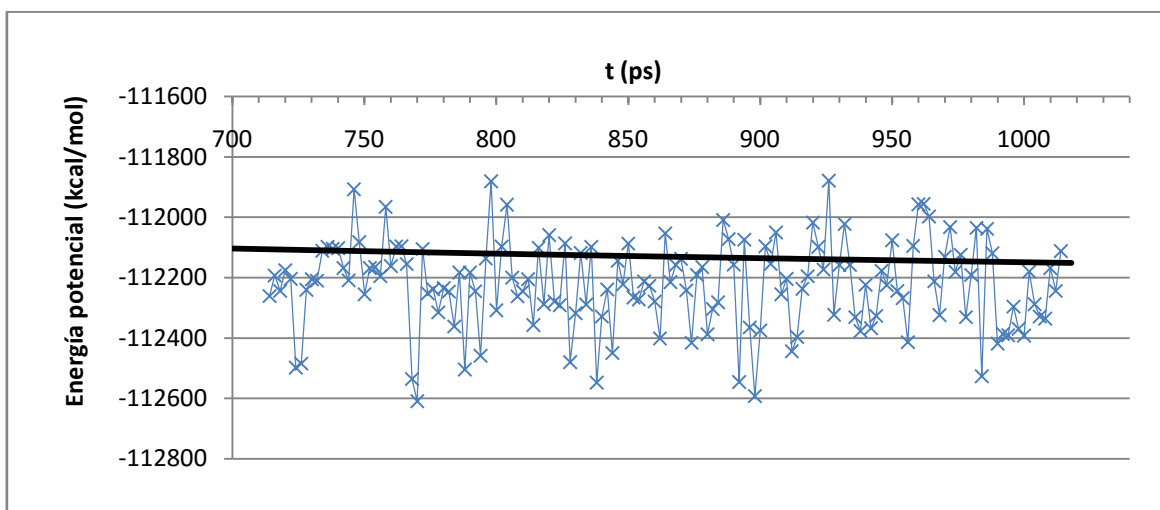


Fig.17: Valores puntuales de energía potencial (kcal/mol) del sistema a lo largo de los últimos 300 ps de la producción de la dinámica.

■: Valores puntuales de energía potencial (kcal/mol)

■: Ajuste logarítmico ($y = -126,4\ln(x) - 111363$)

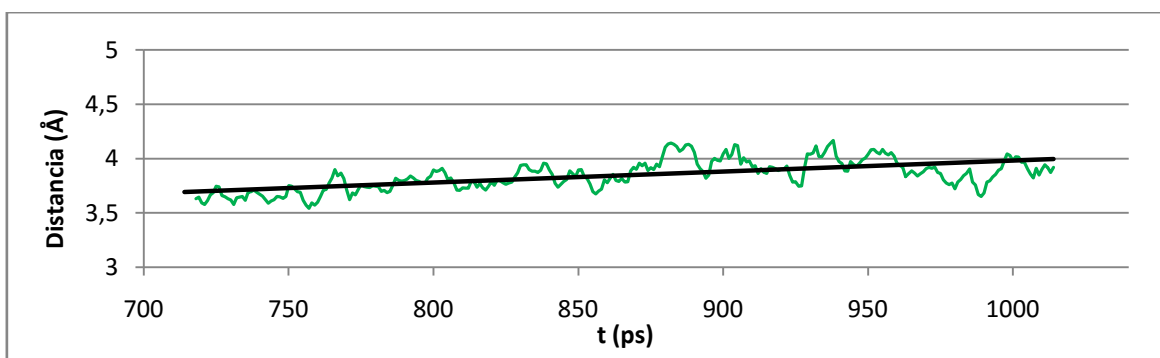


Fig.18: Media móvil de cinco periodos de la distancia (Å) entre N10 de la isoaloxazina y C1 de Tyr314 a lo largo de los últimos 300 ps de la producción de la dinámica.

■: Media móvil de cinco periodos de la distancia entre N10 de la isoaloxazina y C1 de Tyr314 (Å)

■: Ajuste lineal ($y = 0,001x + 2,9678$)

