



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación del acoplamiento molecular en la proteína
silvestre y mutantes de LAO de la enterobacteria
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium
para la unión de ligandos no endógenos

Tesis para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Presenta: ESTRELLA ABIGAIL MUNGUÍA GONZÁLEZ

Director: DR. JULIO LENIN DOMÍNGUEZ RAMÍREZ

OCTUBRE, 2019



AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos eternos a todos aquellos que me han acompañado en mi desarrollo profesional. Agradecimientos especiales a mi mamá, a mi papá y a mi hermana por su apoyo incondicional, en todos los aspectos de la vida, con ellos, con sus enseñanzas y con la educación que me han brindado soy la persona que hoy en día soy. Mi más profundo agradecimiento es para el Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez quien fue director de este proyecto de tesis y a quien agradezco haberme brindado la oportunidad de trabajar con él, además de darme acceso a las herramientas necesarias para llevar a cabo la metodología de dicho proyecto, gracias por sus asesorías y por el tiempo que dedicó para explicarme lo necesario. También agradezco a la Dra. María de Lourdes Guerrero Ontiveros y a la Dra. Norma Angélica Caballero Concha, quienes dedicaron tiempo para revisar este proyecto y quienes fueron sinodales de la presente tesis, gracias por todas las correcciones realizadas, argumentos y preguntas pues eso me llevo a mejorar mi trabajo y desempeño. Finalmente, agradezco a todos los profesores que me han impartido y compartido de sus conocimientos, gracias a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y muchas gracias a mis amigos y conocidos que de alguna manera me han apoyado para seguir desarrollándome en este aspecto de mi vida.

<3

ÍNDICE

Agradecimientos	1
Índice	2
Índice de figuras	3
Índice de gráficas	4
Índice de tablas	5
Resumen	7
Introducción	9
Antecedentes	14
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivos	17
Diseño metodológico	18
Resultados	32
Discusión	59
Conclusión	61
Referencias bibliográficas	62
Anexo	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Espacio periplásmico en bacterias Gram negativas	9
Fig. 2. Proteína de unión periplásmica	10
Fig. 3. Histidinas	21
Fig. 4. Molécula de agua en la interacción receptor – ligando de la estructura 1LAF . .	24
Fig. 5. Molécula de agua en la interacción receptor – ligando de la estructura 1LAG . .	25
Fig. 6. Molécula de agua en la interacción receptor – ligando de la estructura 1LAH . .	26
Fig. 7. Molécula de agua en la interacción receptor – ligando de la estructura 1LST . .	27

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Valores ΔG de 1LAF mutación Ser69Ala y ligandos no endógenos	55
Gráfica 2. Valores ΔG de 1LAG mutación Ser69Ala y ligandos no endógenos	57
Gráfica 1A. Conjunto de gráficas que muestran valores de interacción 1LAF mutado . .	65
Gráfica 2A. Conjunto de gráficas que muestran valores de interacción 1LAG mutado .	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteína LAO	11
Tabla 2. Residuos que conforman a LAO	12
Tabla 3. Ligandos prueba	20
Tabla 4. Elementos de programación para llevar a cabo docking	31
Tabla 5. Valores de ΔG entre receptores silvestres y ligandos endógenos	33
Tabla 6. Diferencia de ΔG en estructuras silvestres	34
Tabla 7. Efecto de la adición de agua en 1LAH e HisD	35
Tabla 8. Efecto de la adición de agua en 1LAG e His+	36
Tabla 9. Efecto de la adición de agua en 1LAH e His+	37
Tabla 10. Efecto de la adición de agua en 1LST e His+	38
Tabla 11. Valores de ΔG entre 1LAF mutado y ligandos endógenos	39
Tabla 12. Diferencia de ΔG entre 1LAF silvestre y 1LAF mutado	40
Tabla 13. Efecto de la adición de agua en 1LAF mutación Phe52Ala – Arg	42
Tabla 14. Efecto de la adición de agua en 1LAF mutación Tyr14Ala – Arg	43
Tabla 15. Efecto de la adición de agua en 1LAF mutación Leu117Ala – Orn	44
Tabla 16. Efecto de la adición de agua en 1LAF mutación Phe52Ala – Orn	45
Tabla 17. Valores de ΔG entre 1LAG mutado y ligandos endógenos	47
Tabla 18. Diferencia de ΔG entre 1LAG silvestre y 1LAG mutado	48
Tabla 19. Efecto de la adición de agua en 1LAG mutación Phe52Ala – His+	50

Tabla 20. Efecto de la adición de agua en 1LAG mutación Tyr14Ala – His+	51
Tabla 21. Efecto de la adición de agua en 1LAG mutación Tyr14Ala – Orn	53
Tabla 22. Efecto de la adición de agua en 1LAG mutación Asp161Ala – Orn	54
Tabla 23. Efecto de la adición de agua en 1LAF mutación Ser69Ala – Ile	56
Tabla 24. Efecto de la adición de agua en 1LAG mutación Ser69Ala – Glu	58

RESUMEN

Las proteínas de unión periplásmicas (PBP) se encuentran en el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas. Las PBP forman sistemas de transporte periplásmicos y actúan como receptores iniciales del transporte activo de sustratos. Una vez que el sustrato se ha unido a la PBP, esta interactúa con un transportador transmembranal; el cual, mediante hidrólisis de ATP introduce el ligando al citoplasma celular. Los transportadores transmembranales pertenecen a la familia de ATPasas ABC y están involucrados en la resistencia a antibióticos.

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium, expresa la PBP LAO de la que se han determinado cinco estructuras tridimensionales de la secuencia silvestre, mediante la técnica de cristalografía de rayos X: 1LAF, 1LAG, 1LAH, 1LST y 2LAO. A excepción de 2LAO, estas estructuras contienen los ligandos arginina, histidina, ornitina y lisina, todas en conformación cerrada. 2LAO está vacía y en conformación abierta.

En el presente estudio empleamos la PBP LAO como modelo *in silico* para comprender cómo ocurre el acoplamiento receptor LAO con sus ligandos, la especificidad de sus interacciones y el efecto generado por la adición de moléculas de agua en estos parámetros. Dichos experimentos nos permitirán conocer de manera más detallada el sitio de reconocimiento de ligandos endógenos y nuevos ligandos y postular a LAO como posible elemento de reconocimiento de un biosensor.

En este estudio, realizamos la evaluación del acoplamiento molecular entre receptores y ligandos de la proteína LAO, generamos mutaciones en seis diferentes residuos de aminoácidos de los receptores para evaluar su participación en la unión de ligandos endógenos y no endógenos. Tanto en los receptores silvestres como en los mutados, añadimos moléculas de agua con el fin de conocer el efecto que éstas ejercen en la interacción.

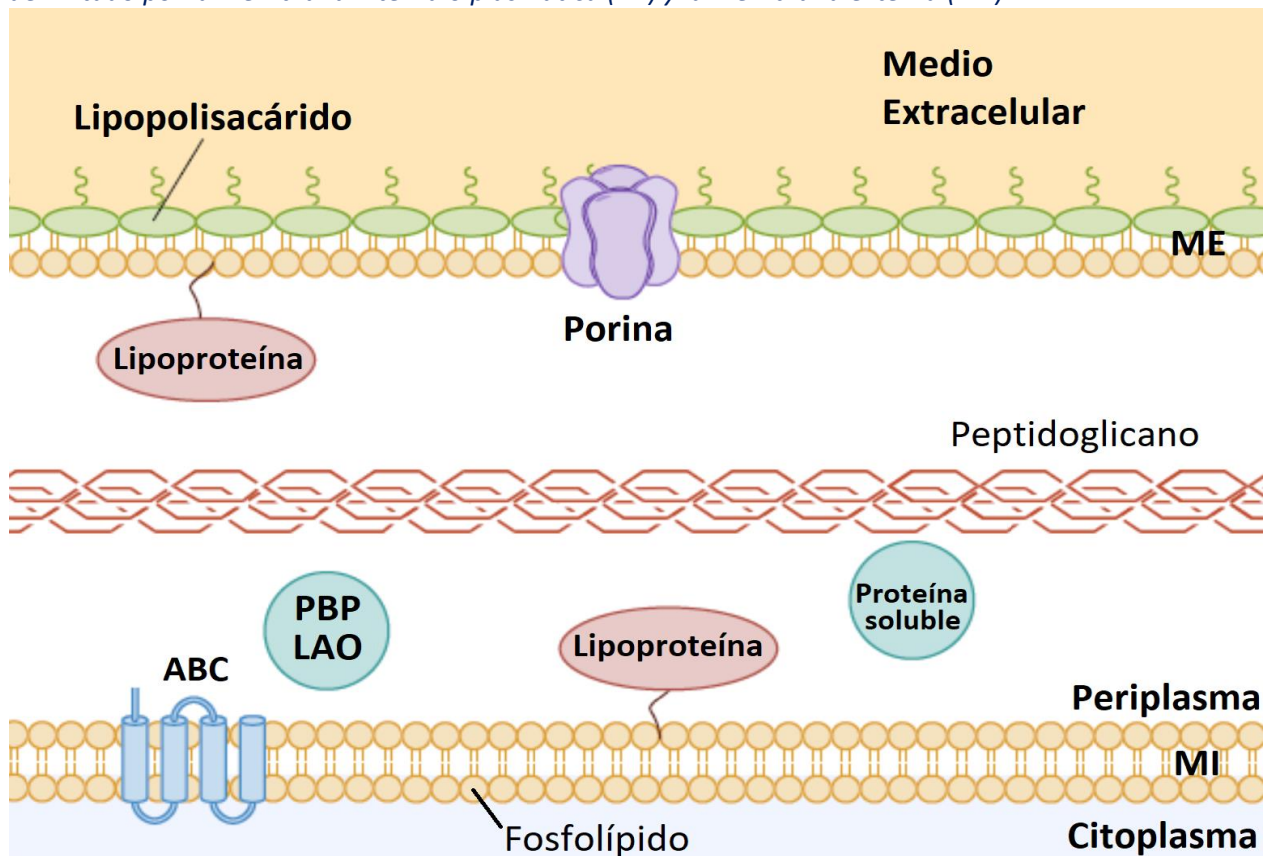
Los resultados muestran que la adición de moléculas de agua en los receptores silvestres incrementa su afinidad por ligandos pequeños, tales como histidina y ornitina. Además, las moléculas de agua agregadas modifican la especificidad de los receptores por nuevos

ligandos. Las mutaciones en Phe52 y Tyr14 muestran que los ligandos endógenos prefieren unirse a receptores silvestres en presencia de moléculas de agua. La mutación Ser69, en presencia de moléculas de agua, muestra la unión de ligandos no endógenos (isoleucina y ácido glutámico).

INTRODUCCIÓN

Las bacterias Gram negativas están característicamente rodeadas por una doble membrana: la membrana plasmática, que es una bicapa de fosfolípidos y la membrana externa, que contiene fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) (Fig. 1). El espacio periplásmico está delimitado entre ambas membranas y es una solución densa, con alta concentración de macromoléculas (peptidoglucano) (Bos y Tommassen, 2004).

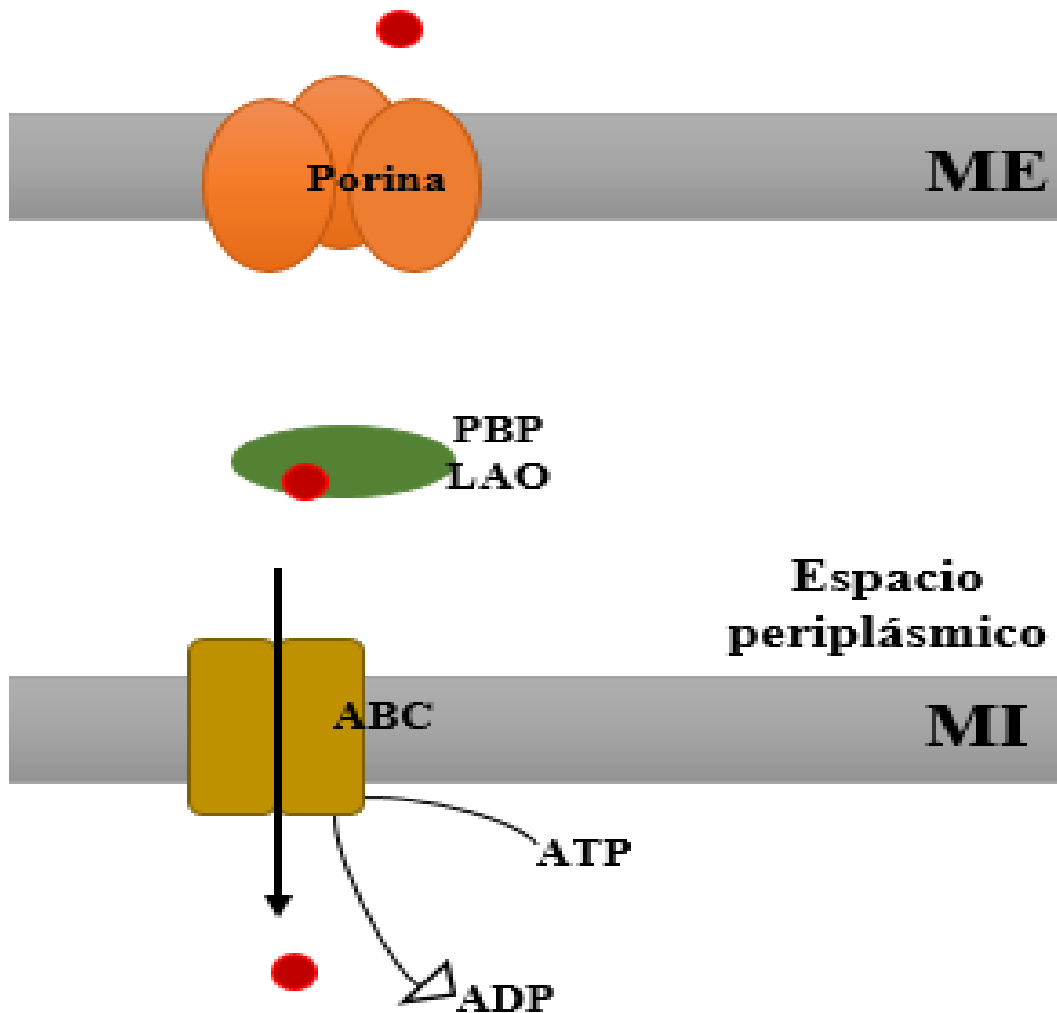
Fig. 1. Espacio periplásmico en bacterias Gram negativas. El espacio periplásmico o periplasma está delimitado por la membrana interna o plasmática (MI) y la membrana externa (ME).



Las proteínas de unión periplásmicas (PBP) ocupan el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas, forman sistemas de transporte periplásmicos que tienen un papel en la quimiotaxis y actúan como receptores iniciales del transporte activo de una variedad de sustratos: péptidos, monosacáridos, vitaminas, oligosacáridos, iones inorgánicos, metabolitos de bajo peso molecular y aminoácidos (Furlong, 1987; Ames, 1986). Una vez que los sustratos se han unido a las PBP interactúan con transportadores transmembranales provocando la translocación de los sustratos de las proteínas de unión

al citoplasma mediante la hidrólisis de ATP (Fig. 2) (Ames, *et. al.*, 1992). Los transportadores transmembranales están conformados por dos regiones transmembrana que construyen un canal de alta selectividad de sustrato, en el lado citosólico poseen dos dominios reguladores que conducen la unión y rotura del ATP y son miembros de la familia de ATPasas ABC (Müller-Esterl, 2008).

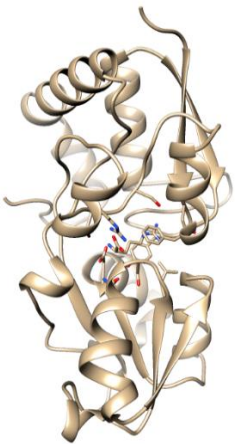
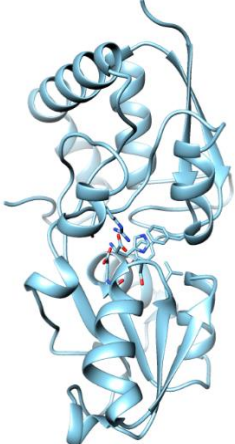
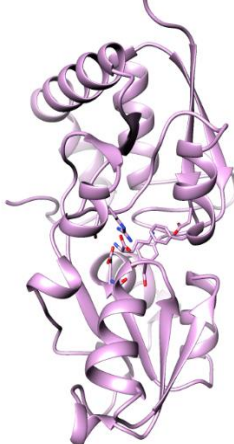
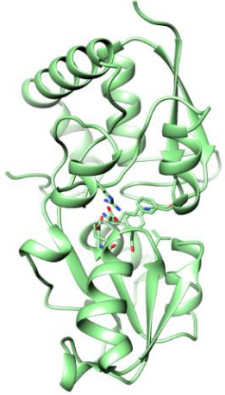

Fig. 2. Proteína de unión periplásmica. La PBP en unión con algún sustrato (ligando) interactúa con el transportador transmembrana. El transportador transmembrana hidroliza ATP y el sustrato traspasa la membrana plasmática llegando al citoplasma de la bacteria.



Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium es una bacteria Gram negativa que expresa al gen *argT* que codifica una proteína periplásmica: LAO o LAOBP (*Binding protein lysine, arginine, ornithine*, por sus siglas en inglés). LAO está conformada por una sola cadena compuesta de 238 aminoácidos, tiene un peso molecular de 26kDa, y de la

cual, se ha determinado cinco estructuras tridimensionales de la secuencia silvestre mediante la técnica de cristalografía de rayos X: 1LAF, 1LAG, 1LAH, 1LST y 2LAO (Tabla 1). A excepción de 2LAO, estas estructuras muestran afinidad nanomolar por los ligandos arginina, lisina, ornitina, así como afinidad micromolar por histidina (Pulido, *et. al.*, 2015), encontrándose en conformación cerrada. Por otra parte, 2LAO está vacía y en conformación abierta.

Tabla 1. Proteína LAO. Se muestra cada una de las cinco estructuras tridimensionales descritas para LAO con su respectivo ligando. Arg = Arginina, His = Histidina, Orn = Ornitina y Lys = Lisina. 1LAF, 1LAG, 1LAH y 1LST se encuentran en conformación cerrada (C). 2LAO se encuentra en conformación abierta (A).

1LAF – Arg	C	1LAG – His	C	1LAH – Orn	C
					
1LST – Lys	C	2LAO – -	A		
					

LAO es una proteína monomérica dividida en dos dominios. Generalmente el dominio I es más grande que el dominio II. Las terminaciones amino y carboxilo están localizadas en el dominio I. El dominio I está conformado del residuo 1 al 88 y del 195 al 238. El

dominio II, contiene dos cadenas laterales aromáticas y dos cadenas alifáticas que hacen interacciones hidrófobas con la porción alifática o aromática de los ligandos, y se conforma del residuo 93 al 185. Los segmentos que unen a ambos dominios parten del residuo 89 al 92 y del 186 al 194 (Oh, *et. al.*, 1993).

El primer dominio, proporciona seis residuos (ácido aspártico-11, serina-70, serina-72, arginina-77, fenilalanina-14 y fenilalanina-52), el dominio II, proporciona tres residuos (treonina-121, ácido aspártico-161 y leucina-117) para la unión de ligandos (Tabla 2). Estos nueve residuos son suficientes para que LAO una cuatro diferentes ligandos aminoácidos (arginina, histidina, ornitina y lisina) y han sido determinados mediante LigPlot y publicados en PDBsum.

Tabla 2. Residuos que conforman a LAO. Se mencionan número de residuos que conforman a cada dominio y a los residuos que participan en la unión de ligandos. Asp = Ácido aspártico, Ser = Serina, Arg = Arginina, Thr = Treonina, Tyr = Tirosina, Phe = Fenilalanina y Leu = Leucina. Los residuos que fueron mutados están resaltados en negritas.

	Núm. de residuos que lo conforman	Residuos para la unión de ligandos	
Dominio I	1 – 88 / 195 – 238	Asp-11 , Ser-70, Ser-72, Arg-77	Tyr-14, Phe-52
Segmentos cortos que unen al dominio I y II	89 – 92 / 186 – 194		
Dominio II	93 - 185	Thr-121, Asp-161	Leu-117

Las proteínas muestran: especificidad, afinidad y versatilidad cuando el acoplamiento de ligandos se lleva a cabo. El conocimiento y comprensión del acoplamiento e interacción entre receptor y ligando en una proteína es considerado con gran importancia ya que permite identificar elementos claves en dicha interacción.

El rediseño de las proteínas involucra intercambiar ciertos residuos que se ven involucrados en la unión de ligandos. Un segmento específico de la estructura proteínica (receptor) está dedicado a la interacción reversible con su ligando específico, este único suceso clave inicia una compleja vía de señalización. El rediseño de LAO consistió en

intercambiar residuos involucrados en la interacción receptora de ligandos por alanina. Las sustituciones individuales de muchos aminoácidos con alanina producen un mapa de cuáles interacciones son críticas y cuáles no, así como sus contribuciones energéticas relativas. Clackson y Wells, en 1995 analizaron interacciones importantes en las interfaces de proteínas, mediante el método “mutagénesis de escaneo de alanina”. La exploración con alanina mide el efecto de la eliminación de una cadena lateral de aminoácido más allá del átomo de carbono- β . De igual manera, Kortemme, *et. al.*, en 2014 desarrollaron un protocolo de “escaneo computacional de alanina” para calcular los efectos de las mutaciones por alanina en la energía libre de unión de un complejo receptor – ligando.

ANTECEDENTES

Banda-Vázquez, *et. al.*, en 2018, crearon una hexamutante *in vitro* de LAOBP que incluyó las sustituciones siguientes: Ser69Ala, Ser70Gly, Ser72Thr, Leu117Lys, Thr121Gly y Gln160His. Con esta hexamutante se buscaba que LAOBP modificará su especificidad de Arg por Gln. LAOBP no mostró afinidad por Gln (*No binding*) pero siguió mostrando afinidad por su ligando natural Arg: (0.0095 μ M). Por este motivo generaron una mutación puntual conservativa: Leu117Lys y realizaron pruebas de fusión térmica (Tm) para medir interacciones llevadas a cabo con los diferentes ligandos. En ausencia de ligando, LAOBP mostró Tm = 46°C, en presencia de Arg mostró Tm = 50°C y en presencia de Gln, Tm = 54°C, sugiriendo una interacción más fuerte de LAOBP con Gln que con Arg. La estructura LAOBP_Leu117Lys – Gln se co-cristalizó exitosamente (PDB: 5OWF).

Pulido, *et. al.*, en 2015, mediante mediciones a diferentes concentraciones de sacarosa estimaron el número de moléculas de agua estructurales que quedan secuestradas en la formación de complejos receptor-ligando. En el caso de LAOBP – His, la constante de unión (Kb, *Binding constant*, por sus siglas en inglés) disminuye con un aumento en la concentración de sacarosa, revelando que 3 ± 1 moléculas de agua quedan secuestradas tras la unión de dicho aminoácido. Para el caso de LAOBP – Arg, no lograron determinar el número de moléculas de agua debido a que altas concentraciones de osmolitos no dan una estimación confiable de la variación de Kb.

JUSTIFICACIÓN

Las proteínas de unión periplásmicas (PBP) de las bacterias Gram negativas son proteínas bacterianas que poseen una gran selectividad y afinidad por sus ligandos. Debido a ello, existe un interés creciente en la utilización de estas proteínas para desarrollar nuevos biosensores. El diseño de un biosensor se basa en dos principios fundamentales: reconocimiento bioquímico de señales externas al sistema biológico y transducción de esa señal. En el presente estudio empleamos la PBP LAO como modelo *in silico* para comprender como ocurre el acoplamiento receptor LAO con sus ligandos, la especificidad de sus interacciones y el efecto generado por la adición de moléculas de agua en estos parámetros. Dichos experimentos nos permitirán conocer de manera más detallada el sitio de reconocimiento de ligandos endógenos y nuevos ligandos y postular a LAO como posible elemento de reconocimiento de un biosensor.

HIPÓTESIS

Acorde con los resultados de Banda-Vázquez, *et. al.*, 2018 y Pulido, *et. al.*, 2015, quienes demostraron que LAO muestra mayor afinidad de unión por un ligando no endógeno y que moléculas de agua quedan secuestradas cuando se lleva a cabo la interacción receptor – ligando, esperamos que el rediseño de LAO mediante mutaciones en el sitio receptor muestre afinidad de unión por ligandos no endógenos y que la presencia de moléculas de agua implique mayor valor de interacción de los ligandos.

OBJETIVO GENERAL

- ✚ Evaluar el acoplamiento molecular dado entre el receptor y ligandos no endógenos de LAO en su forma silvestre y mutante.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar la interacción receptor – ligando de LAO con ligandos aminoácidos.
- ❖ Evaluar la interacción dada entre receptores mutados de LAO y ligandos para los que las formas silvestres no exhiben afinidad experimental.
- ❖ Analizar el efecto generado por la adición de moléculas de agua en la interacción receptor – ligando de LAO.

DISEÑO METODOLÓGICO

Este trabajo lo llevamos a cabo en el Laboratorio de Modelaje Químico-Biológico y visualización del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de las Américas de Puebla (UDLAP).

En el siguiente esquema resumimos los pasos que llevamos a cabo para realizar la evaluación de docking molecular y amber.

Preparación de ligandos y receptores

- Ligandos prueba y ligandos para ubicar sitio receptor
- Receptores silvestres, receptores mutados; ambos sin y con moléculas de agua

Predicción de la conformación del ligando

- Generación de esferas, caja y rejilla

Evaluación de la afinidad de unión

- Docking
- Amber

Con el objeto de que esta metodología se pueda desarrollar y reproducir, llevamos a cabo la preparación de receptores y ligandos en el programa UCSF Chimera v.1.12 y Avogadro, disponibles libre de cargo y en plataformas Linux, Mac y Windows.

Preparación de ligandos y receptores

Preparación de ligandos prueba

Desde la base de datos UCSF ZINC (Irwin, *et. al.*, 2012), descargamos (a excepción de histidina delta) los ligandos en formato mol2 (SYBYL v.7.0), pH7. El método determinó el número de átomos de hidrógeno (H) y el estado de protonación de los ligandos. En la tabla 3, enlistamos veinticuatro ligandos que utilizamos para realizar el análisis de acoplamiento molecular. Los ligandos subrayados corresponden a los ligandos endógenos mientras que aquellos que no lo están son ligandos no endógenos. Para referirnos a los ligandos se usó la nomenclatura bioquímica de tres letras.

El ligando histidina, lo trabajamos en tres distintas formas: histidina épsilon (HisE), histidina delta (HisD) e histidina cargada (His+). En total, HisE e HisD tienen 9 H. HisE tiene un átomo de H en el carbono (C) épsilon mientras que HisD tiene un átomo de H en el C delta (Fig. 3). Ambos ligandos tienen carga neutra. His+ tiene carga positiva y en total tiene 10 H. Ningún átomo de C está libre, todos cuentan con átomos de H. HisD no está en la base de datos UCSF ZINC por lo cual lo diseñamos en el programa Avogadro (Hanwell, *et. al.*, 2012).

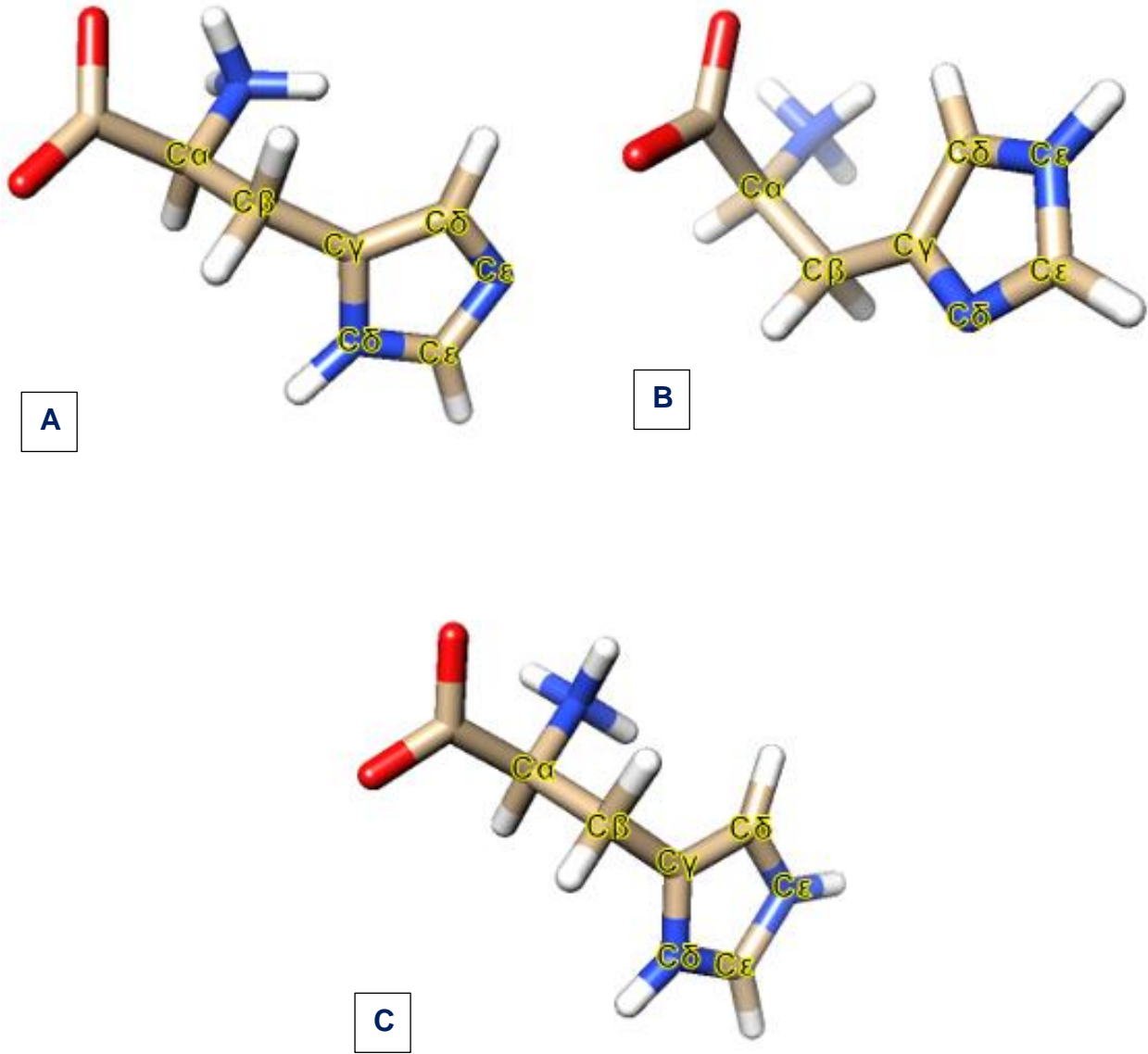
Preparación de ligandos (para ubicar sitio de unión al realizar docking)

Para realizar el método de docking molecular es necesario indicar a DOCK (programa para realizar docking) el sitio receptor de la proteína y así los ligandos prueba puedan unirse. La preparación de estos ligandos es diferente a los ligandos prueba. En Chimera, buscamos cada una de las estructuras tridimensionales de LAO con su respectivo ligando: 1LAF – Arg, 1LAG – His, 1LAH – Orn y 1LST – Lys. Para cada uno, eliminamos el receptor, quedando únicamente el ligando. Automáticamente, Chimera estimó los valores de carga (positiva) y un número determinado de H, procedimos a guardarlos en formato mol2.

Tabla 3. Ligandos prueba. Los ligandos están enlistados por peso molecular (de mínimo a máximo) y de acuerdo con la clasificación de sus propiedades fisicoquímicas. Referencia en el libro *Lehninger Principles of Biochemistry*, por Nelson y Cox, 2009. Los ligandos endógenos han sido subrayados.

Ligando	Nomenclatura de tres letras	Peso molecular
Apolares, alifáticos		
Glicina	Gly	75.07
Alanina	Ala	89.09
Prolina	Pro	115.13
Valina	Val	119.15
Isoleucina	Ile	131.17
Leucina	Leu	131.17
Metionina	Met	149.21
Aromáticos		
Fenilalanina	Phe	165.19
Tirosina	Tyr	181.19
Levodopa	Lev	197.18
Triptófano	Trp	204.23
Polares sin carga (neutros)		
Serina	Ser	105.09
Treonina	Thr	119.12
Cisteína	Cys	121.16
Glutamina	Gln	146.16
<u>Histidina delta</u>	<u>HisD</u>	<u>155.15</u>
<u>Histidina épsilon</u>	<u>HisE</u>	<u>155.15</u>
Asparagina	Asn	160.00
Cargados positivamente		
<u>Ornitina</u>	<u>Orn</u>	<u>132.16</u>
<u>Lisina</u>	<u>Lys</u>	<u>146.16</u>
<u>Histidina cargada</u>	<u>His+</u>	<u>156.16</u>
<u>Arginina</u>	<u>Arg</u>	<u>174.20</u>
Cargados negativamente		
Ácido aspártico	Asp	133.10
Ácido glutámico	Glu	147.13

Fig. 3. Histidinas. A) HisD, B) HisE y C) His+. Los carbonos fueron etiquetados para facilitar la comprensión de la diferencia de protonación en cada estructura. HisD presenta átomo de H en el C δ , HisE en el C ϵ . His+ presenta H en todos los C. HisD e HisE tienen carga neutra, His+ tiene carga positiva.



Preparación de receptores silvestres de LAO

Para este trabajo no incluimos a 2LAO, ya que no se tiene suficiente información específica de su interacción con algún ligando. En Chimera, buscamos las cuatro estructuras silvestres tridimensionales descritas para LAO (PDB: 1LAF, 1LAG, 1LAH y 1LST). En cada una, seleccionamos y eliminamos el ligando dejando únicamente el receptor, procedimos a prepararlo para el docking con la herramienta “*dock prep*”. Dicha herramienta, configuró el receptor permitiendo que el método determinara el estado de protonación, procedimos a guardarlo en formato mol2. Seguido a esto, al receptor le eliminamos la presencia de H y lo guardamos en formato pdb, seleccionamos la acción de mostrar superficie molecular y lo guardamos como archivo en formato dms. La superficie molecular es usada para calcular el tamaño de cada esfera que rodeé al receptor.

Preparación de receptores mutados de LAO

Las mutaciones en los receptores las realizamos en UCSF Chimera v.1.12.

Descargamos las estructuras silvestres de LAO: 1LAF y 1LAG. Eliminamos el ligando, dejando solamente el receptor, en el cual se seleccionó el residuo de la cadena proteica a mutar. Los residuos que mutamos son aquellos que están en interacción con la cadena lateral de su ligando. En la estructura 1LAF, los residuos a mutar fueron: Asp11, Gln122, Leu117, Phe52, Ser69 y Tyr14. En la estructura 1LAG: Asp161, Leu71, Leu117, Phe52, Ser69 y Tyr14. Con la herramienta “*rotamers*” cambiamos el residuo seleccionado por el aminoácido Ala, una vez hecha la mutación, guardamos la nueva estructura en formato pdb. Con la herramienta “*dock prep*” se configuró cada uno de los receptores (el método determinó el estado de protonación) y procedimos a guardarlos en formato mol2. Seguido a esto, al receptor le eliminamos la presencia de H y lo guardamos en formato pdb, seleccionamos la acción de mostrar superficie molecular y lo guardamos como archivo en formato dms. La superficie molecular es usada para calcular el tamaño de cada esfera que rodeé al receptor.

Preparación de receptores (silvestres y mutados) de LAO, añadiendo moléculas de agua

Descargamos las estructuras silvestres: 1LAF, 1LAG, 1LAH y 1LST en formato pdb desde Chimera y los guardamos. Ejecutamos el programa LigPlot v.4.5.3, (Wallace, 1996) en el que introducimos el nombre de cada pdb guardado y seleccionamos la opción de tomar en cuenta moléculas de agua; el programa generó esquemas (Fig4, Fig. 5, Fig. 6 y Fig. 7) en los que podemos observar las interacciones receptor – ligando que se llevan a cabo, tomando en consideración algunas moléculas de agua. En estos esquemas observamos cuáles son las moléculas de agua que participan directamente en la interacción y las escogimos. Para las estructuras 1LAF, 1LAH y 1LST seleccionamos una molécula de agua HOH403, HOH444 y HOH426, respectivamente. Para la estructura 1LAG seleccionamos dos moléculas de agua (HOH427 y HOH444).

Cuando descargamos las estructuras se generó un archivo de texto que contiene información acerca de la estructura tridimensional de la proteína; está información la modificamos, eliminando la información de las moléculas de agua que no están implicadas en la interacción del receptor – ligando, dejando sólo la información de las moléculas implicadas. En el caso de los receptores mutados, únicamente utilizamos las estructuras 1LAF y 1LAG que guardamos en formato pdb en el apartado de la preparación de receptores mutados. A dichas estructuras les eliminamos la información de las moléculas de agua que no están implicadas en la interacción del receptor – ligando y de esta manera dejamos información de las moléculas implicadas.

Hecho esto, procedimos a preparar cada uno de los receptores para realizar el docking con la herramienta “*dock prep*”. Como hemos descrito anteriormente, esta configuró el receptor permitiendo que el método determinara el estado de protonación, procedimos a guardarlos en formato mol2. Eliminamos la presencia de H y los guardamos en formato pdb, seleccionamos la acción de mostrar superficie molecular y los guardamos como archivos en formato dms. Recordemos que la superficie molecular es necesaria para calcular el tamaño de cada esfera que rodea al receptor.

Fig. 4. Molécula de agua en la interacción receptor – ligando de la estructura 1LAF. Observamos la interacción dada entre el receptor 1LAF y el ligando Arg, la molécula de agua 403 realiza puentes de H con el receptor y el ligando.

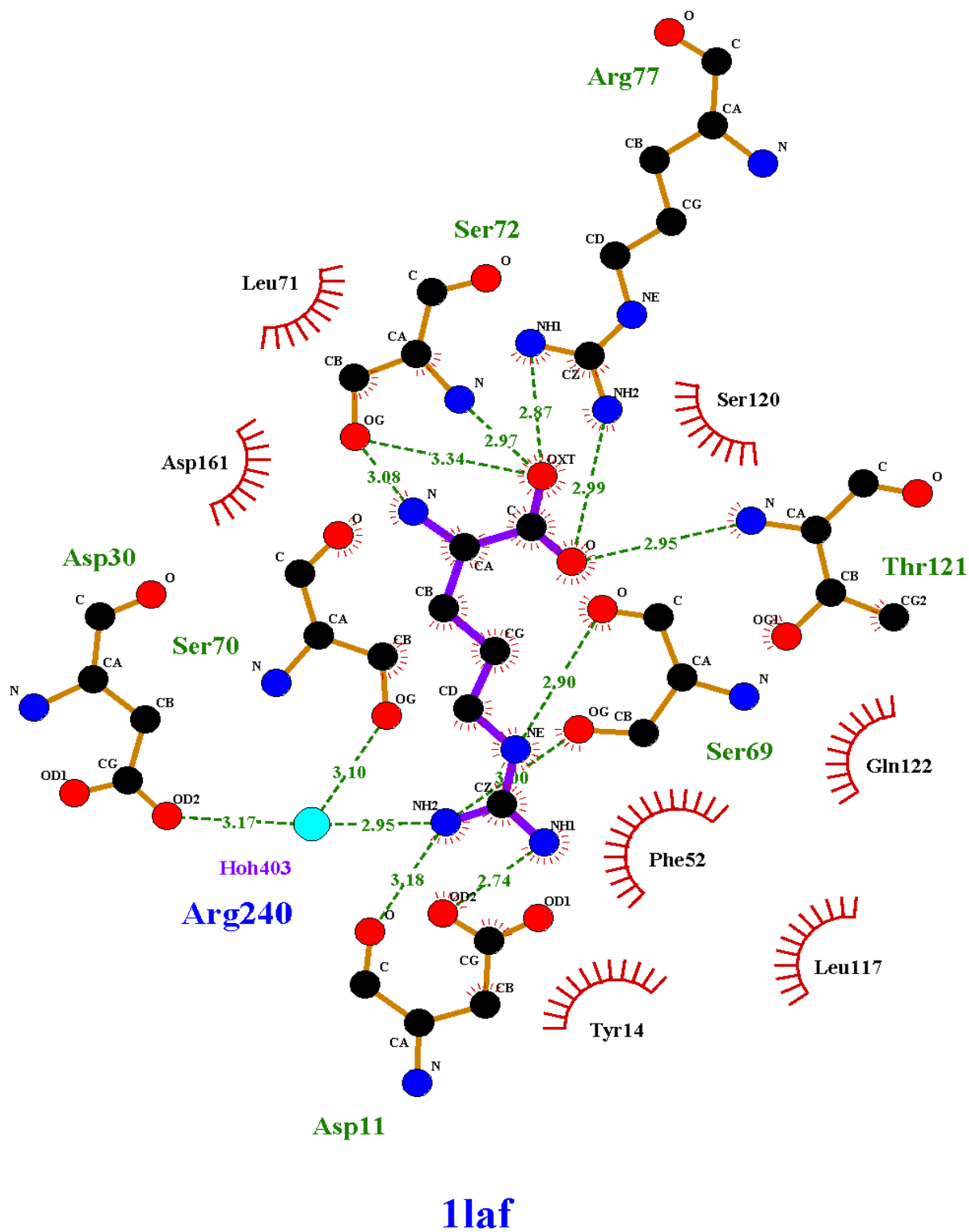


Fig. 5. Moléculas de agua en la interacción receptor – ligando de la estructura 1LAG. Observamos la interacción dada entre el receptor 1LAG y el ligando His, las moléculas de agua 427 y 444 realizan puentes de H con el receptor y el ligando.

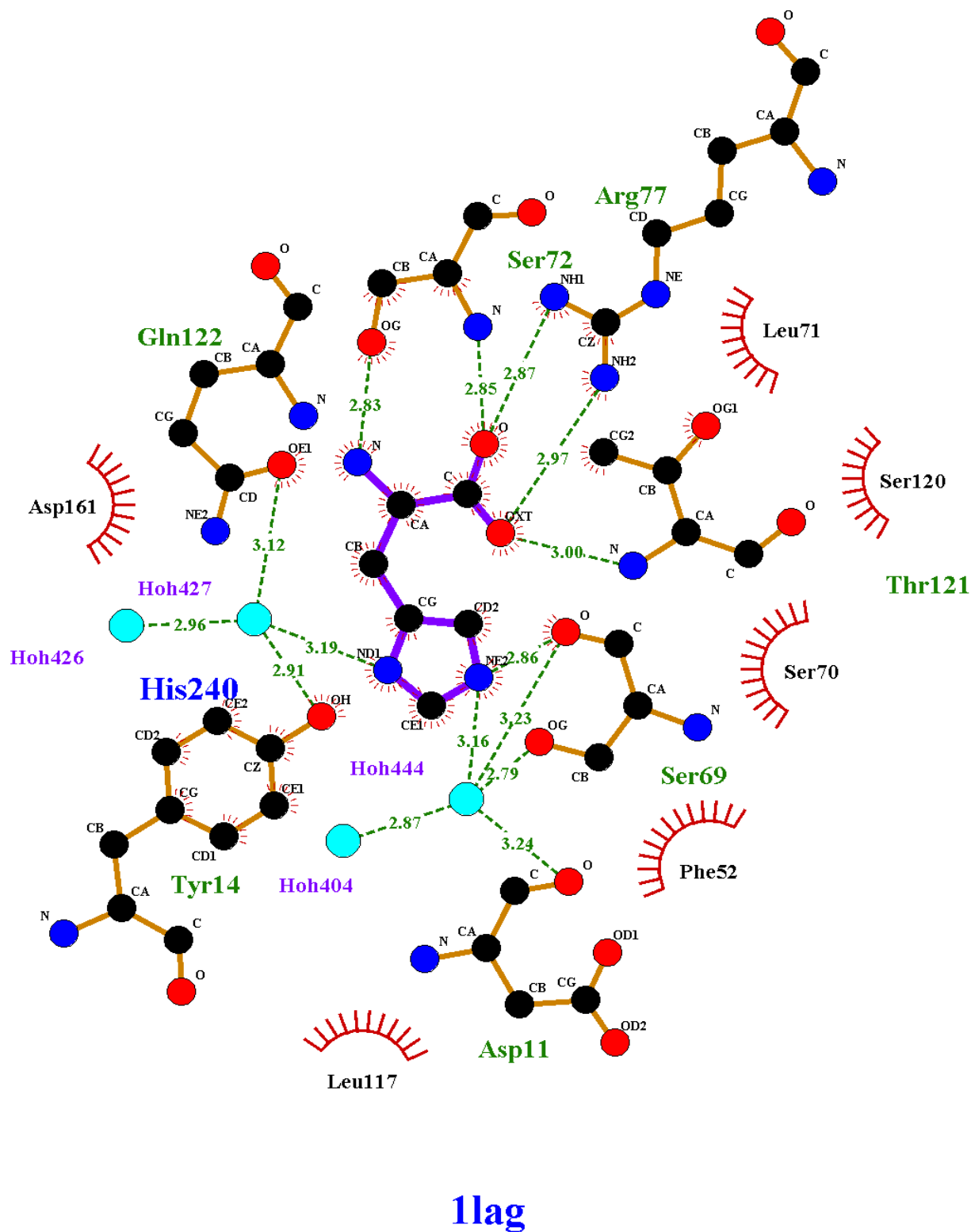
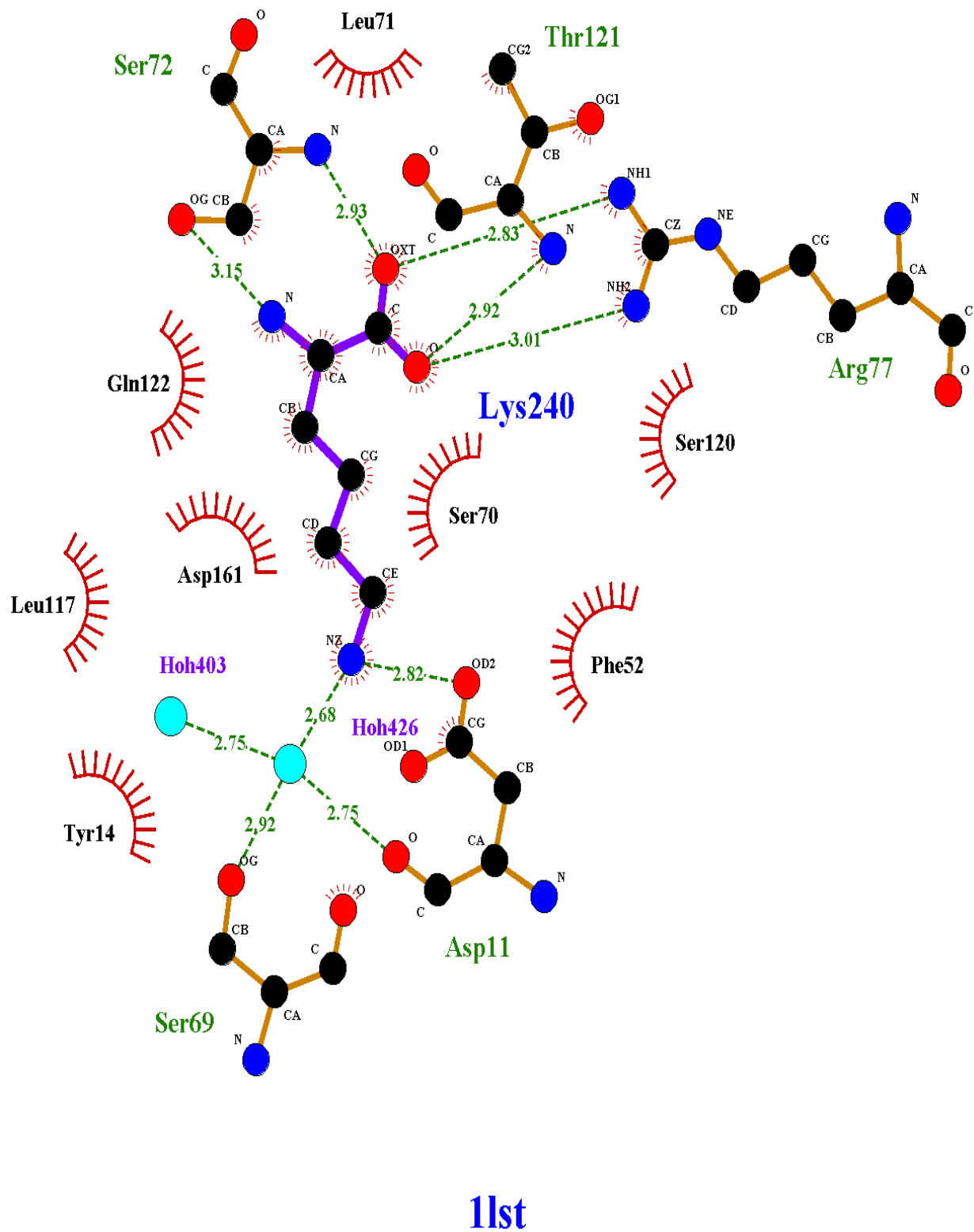


Fig. 7. Molécula de agua en la interacción receptor – ligando de la estructura 1LST. Observamos la interacción dada entre el receptor 1LST y el ligando Lys, la molécula de agua 426 realiza puentes de H con el receptor y el ligando.



Predicción de la conformación del ligando (posición y orientación dentro del sitio de unión).

DOCK generó una serie de parámetros que engloba y define la superficie receptora de la proteína LAO: esferas, caja y rejillas. Dichos parámetros permiten elucidar la posición y orientación del ligando. Los pasos descritos los hicimos para cada uno de los receptores con cada uno de los veinticuatro ligandos prueba. Es necesario tener computadora con sistema operativo Linux.

Los archivos de entrada (INPUTs) que ocupamos para realizar docking y evaluación de amber los obtuvimos desde Tutorials - UCSF DOCK: http://dock.compbio.ucsf.edu/DOCK_6/tutorials/index.htm.

Generación de esferas

El programa DOCK generó un conjunto de esferas localizadas dentro de un radio de 10 Angstrom (Å) que rodeó al receptor y relleno el centro activo de la proteína. El centro de las esferas corresponde a las posiciones de los átomos del ligando. Obtuvimos el primer input descrito en la Tabla 4 y lo modificamos de acuerdo con los datos que solicitó su formato. Abrimos una terminal en la pantalla de inicio de la computadora y escribimos el primer comando (Tabla 4), obtuvimos los dos primeros archivos de salida que mencionamos en la misma tabla. Seguido a esto, en la terminal procedimos a escribir el segundo comando, y obtuvimos el segundo archivo de salida descrito (Tabla 4).

Generación de caja y rejilla

La superficie de acoplamiento molecular fue definida por una caja que engloba al sitio receptor de la proteína LAO. Dentro de ésta se encontraban las esferas elegidas. Esta caja se amplió en 6 direcciones, con un margen de 5 Å. Para generar la caja modificamos el tercer input (box.in), adicionamos los datos específicos para diseñarla, e incorporamos a box.in modificado al programa DOCK agregando el tercer comando. Al final, obtuvimos el archivo de salida tres (rec_box.pdb) (ver Tabla 4).

La generación de rejilla se situó a una distancia de 0.3 Å del sitio receptor. Ésta se basa en la función de puntuación de energía compuesta por términos que tiene en cuenta las energías de interacción de Van der Waals y electrostática. Para que DOCK generara la rejilla utilizamos el cuarto input, el cual modificamos de la misma forma que los inputs anteriores. En la terminal escribimos el cuarto comando y obtuvimos los tres archivos de salida que indicamos en la Tabla 4.

Evaluación de la afinidad de unión

Los cálculos de acoplamiento molecular (Docking) y los cálculos de la energía libre de unión (Amber) los llevamos a cabo con la interacción entre las estructuras silvestres, mutadas y las estructuras con molécula(s) de agua y ligandos prueba. Esta evaluación la realizamos con el programa DOCK 6.9.

Docking

El docking molecular o acoplamiento molecular es usado para modelar la interacción entre moléculas pequeñas y una proteína a nivel atómico, lo que permite caracterizar el comportamiento de las moléculas pequeñas en el sitio receptor de la proteína diana. El proceso de acoplamiento implica dos pasos básicos: la predicción de la conformación del ligando, (posición y orientación) y la afinidad de unión (Meng, *et. al.*, 2011).

Realizamos el docking rígido, llamado así porque el ligando permanece rígido durante la evaluación de acoplamiento, por lo tanto, el ligando se une al receptor sin reorganización alguna. DOCK 6.9 hace coincidir los centros de los átomos del ligando con las esferas, después realiza una optimización energética usando un minimizador para optimizar la interacción entre el receptor y el ligando. La puntuación final es la mejor pose generada del proceso de orientación y de minimización. Obtuvimos el quinto input (Tabla 4), que al igual que los anteriores inputs modificamos. En la terminal, escribimos el quinto comando y obtuvimos el quinto archivo de salida.

Al contrario del docking rígido, en el docking flexible el ligando es flexible, permitiendo que éste se reorganice estructuralmente en respuesta al receptor. Primero se lleva a cabo la identificación de la parte rígida de la estructura y después de las partes flexibles

(considerando las posibles posiciones de torsión). Al igual que en el docking rígido, también se lleva a cabo una optimización energética para generar la mejor pose y puntuación final. Para realizar este docking se siguieron los mismos pasos que seguimos para realizar el docking rígido, únicamente cambiamos el input, (input seis de la Tabla 4) y en la terminal escribimos el comando seis. Obtuvimos el archivo de salida anchor_and_grow.scored.mol2.

Amber

La herramienta AMBER está implementada en el paquete DOCK 6.9 y calcula la energía libre de unión. A diferencia de la evaluación de docking (rígido y flexible), en el cálculo de puntuación de Amber, el ligando y el receptor son flexibles, esto permite el reordenamiento estructural de ambos y conlleva a que el receptor y el ligando adopten un modelo conformacional de tipo “ajuste inducido” (Pearlman, *et. al.*, 1995). AMBER calcula las energías libres de unión restando la sumatoria de la energía libre del receptor y el ligando a la energía libre del complejo unido, tal como dice la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{binding solvated}} = \Delta G_{\text{complex solvated}} - (\Delta G_{\text{receptor solvated}} + \Delta G_{\text{ligand solvated}})$$

Realizamos la evaluación de puntuación de Amber entre receptor – ligando dado por las estructuras silvestres, mutadas y las estructuras con molécula(s) de agua y ligandos prueba.

Para realizar este último paso, utilizamos los archivos de los receptores a los cuales eliminamos H, los mismos que guardamos en formato pdb. Cada uno de esos archivos se modificó, sustituyendo cisteínas (CYS) que forman puentes disulfuro en la cadena proteínica. La sustitución fue: CYS por CYX. En la terminal escribimos el séptimo comando (Tabla 4). El archivo de salida que obtuvimos al realizar el docking flexible: anchor_and_grow_score.mol2, lo tomamos como el ligand_file.mol2 (solicitado en el comando siete, de la Tabla 4). Finalmente, obtuvimos el ultimo input, lo modificamos, y en la terminal procedimos a escribir el octavo comando, del cual obtuvimos el archivo de salida que indicamos en la Tabla 4.

Tabla 4. Elementos de programación para llevar a cabo docking molecular.

	INPUT	COMANDO	ARCHIVO DE SALIDA
1	INSPH	sphgen	OUTSPH rec.sph
2		sphere_selector file.sph ligand_file.mol2 10.0	selected_spheres.sph
3	box.in	showbox < box.in	rec_box.pdb
4	grid.in	grid -i grid.in -o grid.out -v	grid.out grid.nrg grid.bmp
5	rigid.in	dock6 -i rigid.in -v	rigid_score.mol2
6	anchor_and_grow.in	dock6 -i anchor_and_grow.in -v	anchor_and_grow.score.mol2
7		prepare_amber.pl file_ligand.mol2 file_receptor_noh.pdb	
8	dock.in	dock6 -i dock.in -v	amber_score.mol2

Realizamos gráficas en el programa GraphPad Prism para evaluar la interacción de acoplamiento molecular y realizamos gráficas con modelos obtenidos a partir de la utilización del programa USCF Chimera para analizar el efecto estructural generado por la adición de moléculas de agua.

RESULTADOS

Evaluación del acoplamiento molecular entre receptores silvestres en unión con ligandos endógenos y efecto que genera la adición de moléculas de agua a nivel estructural

La evaluación entre los receptores silvestres de LAO (1LAF, 1LAG, 1LAH y 1LST) y ligandos endógenos (Arg, His, Orn y Lys) mostraron valores de interacción favorables para sus ligandos específicos, 1LAF – Arg (-59.1 kcal/mol), 1LAH – Orn (-77.5 kcal/mol), 1LST – Lys (-75.3 kcal/mol); y, para el caso de 1LAG, la His con mayor valor de unión fue HisD (-65.6 kcal/mol).

En la tabla 5, observamos los valores de afinidad (ΔG) entre receptores silvestres y ligandos endógenos. En los valores de interacción dada en ausencia de moléculas de agua (sH_2O), observamos que todos los ligandos se unen al receptor 1LAG, siendo Lys el ligando que muestra un alto valor de afinidad por el receptor (-85.2kcal/mol). Los receptores 1LAH y 1LST muestran la unión de cinco ligandos y el receptor 1LAF sólo mostró la unión de tres ligandos (HisD (-11.8kcal/mol), Orn (-57.7kcal/mol) y Arg (-59.1kcal/mol)). Los valores de interacción dados en presencia de moléculas de agua (cH_2O) revelan que cuando se tiene la presencia de una sola molécula de agua la afinidad aumenta con respecto al valor de afinidad dado en ausencia de la molécula de agua: 1LAF – Arg = -79.9kcal/mol, 1LAH – Arg = -89.2kcal/mol y 1LST – Orn = -93.6kcal/mol, de igual manera, cuando dos moléculas de agua están presentes, la afinidad aumenta con respecto al valor de afinidad dado en ausencia de las moléculas de agua: 1LAG – Orn = -93.2kcal/mol.

En algunos casos la presencia de una molécula de agua no muestra mayor valor de afinidad: 1LAH – Lys cH_2O = -31.1kcal/mol; 1LAH – Lys sH_2O = -63.5kcal/mol, otro caso es: 1LST – Lys cH_2O = -31.1kcal/mol; 1LST – Lys sH_2O = -75.3kcal/mol.

Tabla 5. Valores de interacción (ΔG) entre receptores silvestres y ligandos endógenos de LAO. Los datos corresponden a los valores de interacción receptor – ligando. *sH₂O* = sin moléculas de agua; *cH₂O* = con moléculas de agua. Receptor **1LAG** (resaltado en negritas) presenta dos moléculas de agua, los otros receptores presentan una sola molécula de agua.

ΔG LAO silvestre								
	<i>sH₂O</i>				<i>cH₂O</i>			
Receptor/Ligando (kcal/mol)	1LAF (Arg)	1LAG (His)	1LAH (Orn)	1LST (Lys)	1LAF (Arg)	1LAG (His)	1LAH (Orn)	1LST (Lys)
HisD	-11.8	-65.6	<i>nd</i>	<i>nd</i>	13.9	18.3	-34.1	<i>nd</i>
HisE	<i>nd</i>	-62.7	-41.1	-43.1	<i>nd</i>	-51.2	<i>nd</i>	-44.7
Orn	-57.7	-74.6	-77.5	-63.9	-77.5	-93.2	-72.4	-93.6
Lys	<i>nd</i>	-85.2	-63.5	-75.3	<i>nd</i>	-52.9	-48.4	-31.1
His+	<i>nd</i>	-37.1	-6.3	-16.3	<i>nd</i>	-87.8	-62.0	-84.0
Arg	-59.1	-78.6	-65.8	-60.0	-79.9	-35.7	-89.2	-69.7

"nd" indica ausencia de ligando

En la siguiente tabla, presentamos la diferencia de ΔG entre las estructuras en ausencia y presencia de agua. Los resultados positivos indican que la interacción es mayormente favorable en presencia de agua (valores resaltados en la tabla 6), mientras que valores negativos son favorables en ausencia de agua. El ligando His+ unido a los receptores 1LAH y 1LST muestra diferencias de 55.7 y 67.7, esto nos revela que la presencia de una molécula de agua atribuye mayor afinidad de unión al receptor. De igual manera, el receptor 1LAG que presenta dos moléculas de agua favorecen la interacción con His+ mostrando una diferencia de 50.7, las dos moléculas de agua ejercen mayor interacción entre el receptor y el ligando. Para Lys observamos valores de: -32.3, -15.1 y -44.2, dichos valores nos muestran que la afinidad de unión es favorable cuando no hay moléculas de agua presentes. En el caso de la unión 1LAH – HisD vemos que la molécula de agua favorece la unión de este ligando pues cuando la molécula de agua está ausente la unión de HisD no se lleva a cabo.

Tabla 6. Diferencia de ΔG entre estructuras silvestres de LAO en ausencia de agua y en presencia de agua. Resultados positivos indican que la interacción es más favorable en presencia de agua (valores resaltados). Valores negativos son favorables en ausencia de agua. Receptor 1LAG (resaltado en negritas) presenta dos moléculas de agua, los otros receptores presentan una sola molécula de agua.

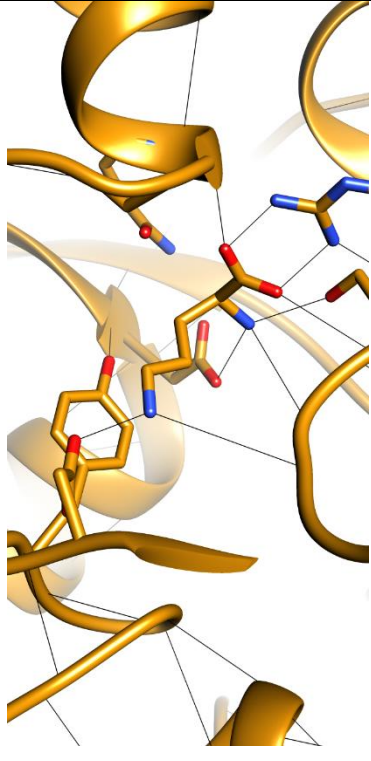
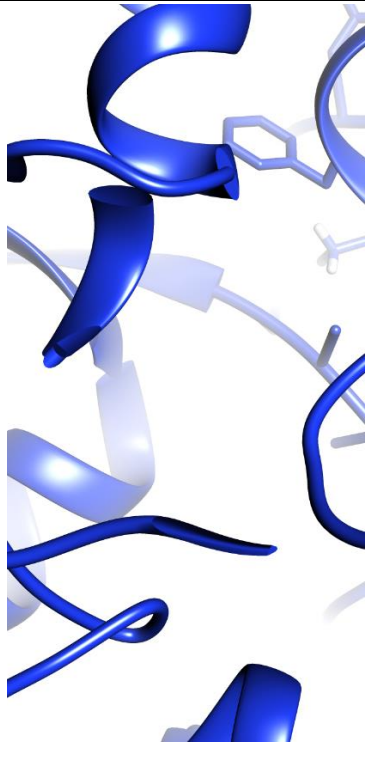
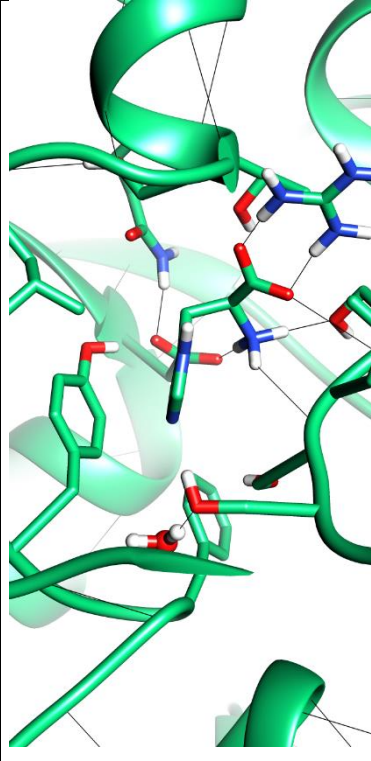
Dif. ΔG LAO silvestre (sH ₂ O - cH ₂ O)				
Receptor/Ligando	1LAF	1LAG	1LAH	1LST
HisD	-25.2	-83.9	34.1 *	<i>nd</i>
HisE	<i>nd</i>	-11.5	-41.1 *	1.6
Orn	19.8	18.6	-5.1	29.7
Lys	<i>nd</i>	-32.3	-15.1	-44.2
His+	<i>nd</i>	50.7	55.7	67.7
Arg	20.8	-42.9	23.4	9.7

"nd" indica la ausencia de ligando

** Valor de afinidad (ΔG) dado entre receptor – ligando*

En la tabla 7 podemos observar el efecto que generó dicha molécula de agua en la interacción entre el receptor 1LAH y el ligando HisD. En primer lugar, observamos que cuando se tiene la presencia de una molécula de agua, el ligando HisD se une al receptor 1LAH. El H₂ de la molécula de agua hace puente de H directamente con el residuo Ser69 del receptor. La interacción del receptor con el ligando genera 6 puentes de H, 3 puentes de H menos que el número de puentes de H que se generan en la interacción del receptor y el ligando cristalizado (9). Sin embargo, el número total de H es igual en ambos (161).

Tabla 7. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAH-HisD. En el primer recuadro vemos la estructura 1LAH en unión con su ligando específico Orn; esta imagen pertenece a la estructura cristalizada, en el segundo recuadro observamos el receptor en ausencia de ligando y en ausencia de moléculas de agua (sH_2O). El tercer recuadro muestra la unión del ligando HisD al receptor 1LAH, contando con la presencia de una molécula de agua (cH_2O).

Estructura				
	1LAH cristalizado	1LAH silvestre (sH_2O)	1LAH silvestre (cH_2O)	
	Ligando	Orn	HisD	HisD
	npH^1	9	<i>nd</i>	6 *
npH^2	161	150	161	

npH^1 : Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH^2 : Puentes de hidrógeno totales

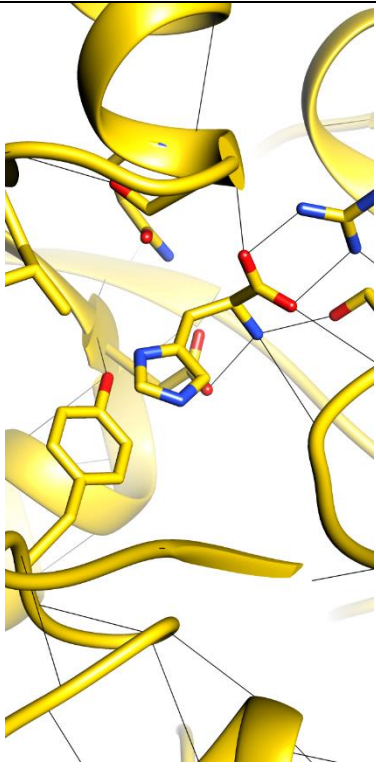
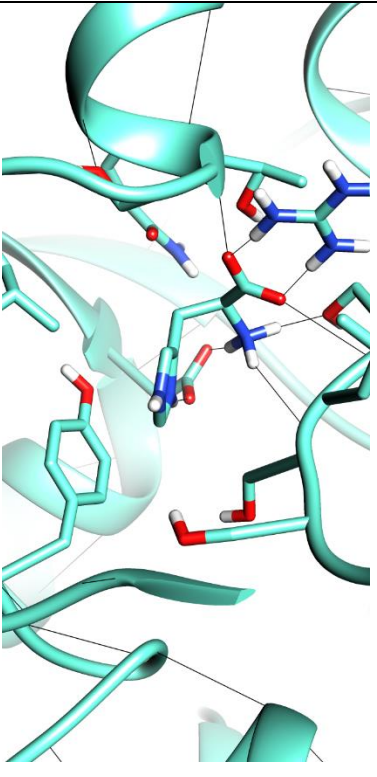
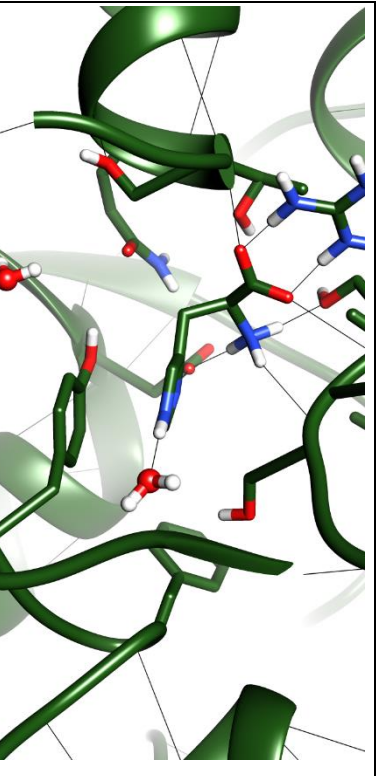
* Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua

En las siguientes tablas, observamos el efecto que generó la adición de moléculas de agua en la interacción entre las estructuras 1LAG, 1LAH y 1LST y el ligando His+.

Empezamos con la tabla 8, en esta observamos que una de las dos moléculas de agua hace puente de H con el ligando His+, específicamente el átomo de O_2 de la molécula de agua realiza el puente de H con el ligando. La otra molécula de agua no hace puente de H con el ligando. La interacción receptor – ligando conlleva a la formación de 9 puentes de H, cuando la molécula de agua se encuentra ausente solo se forman 8 y en la

estructura cristalizada se generan 7. El número total de H en la estructura cristalizada es de 160, cuando las moléculas de agua están presentes se forman 159, mientras que cuando no se tienen a las moléculas de agua el número de puentes de H es de 147. El número de puentes de H totales de la estructura con agua se acerca al número de puentes de H de la estructura cristalizada.

Tabla 8. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAG-His+. El primer recuadro muestra la estructura 1LAG con el ligando His, esta es la estructura cristalizada. En el segundo recuadro vemos el ligando His+ en unión al receptor 1LAG, en ausencia de agua (sH₂O), mientras que en el tercer recuadro vemos la misma interacción, pero contando con dos moléculas de agua (cH₂O).

Estructura				
	1LAG cristalizado	1LAG silvestre (sH ₂ O)	1LAG silvestre (cH ₂ O)	
	Ligando	His	His+	His+
	npH ¹	7	8	9 *
npH ²	160	147	159	

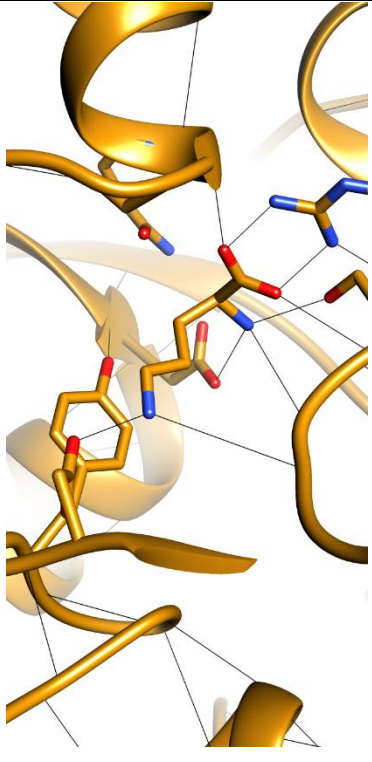
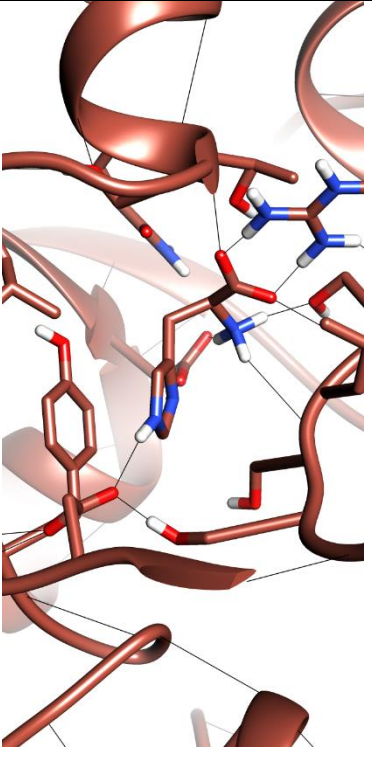
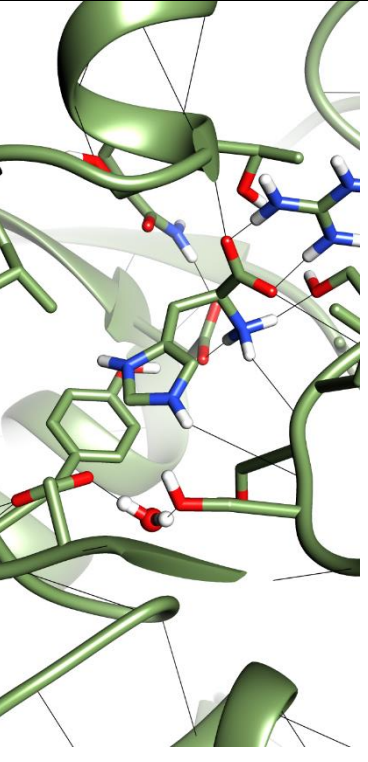
npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre molécula de agua – ligando*

En la tabla 9, vemos que el H1 de la molécula de agua realiza puentes de H exclusivamente con el residuo Asp11 mientras que el H2 de la molécula de agua realiza puente de H con el residuo Ser69 del receptor 1LAH. El número de puentes de H que se generó en el sitio de unión (8) es menor al número de puentes de H que son formados en la estructura cristalizada y en la estructura en ausencia de agua (9). El número de puentes de H totales es mayor cuando se tiene a la molécula de agua (165) que cuando no se tiene (estructura cristalizada = 161 y estructura sin agua = 160).

Tabla 9. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAH-His+. La estructura 1LAH y Orn son la estructura cristalizada (primer recuadro), en el segundo recuadro mostramos la interacción entre el receptor 1LAH y el ligando His+ en ausencia de moléculas de agua (sH_2O) mientras que en el siguiente recuadro se muestra la misma interacción, pero con la molécula de agua añadida (cH_2O).

Estructura				
	1LAH cristalizado	1LAH silvestre (sH_2O)	1LAH silvestre (cH_2O)	
	Ligando	Orn	His+	His+
	npH ¹	9	9	8 *
npH ²	161	160	165	

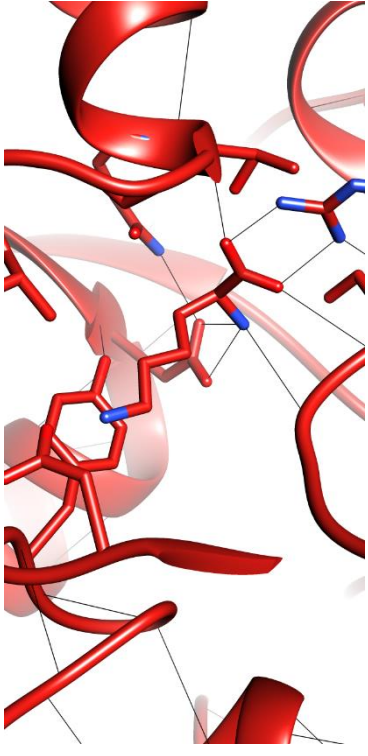
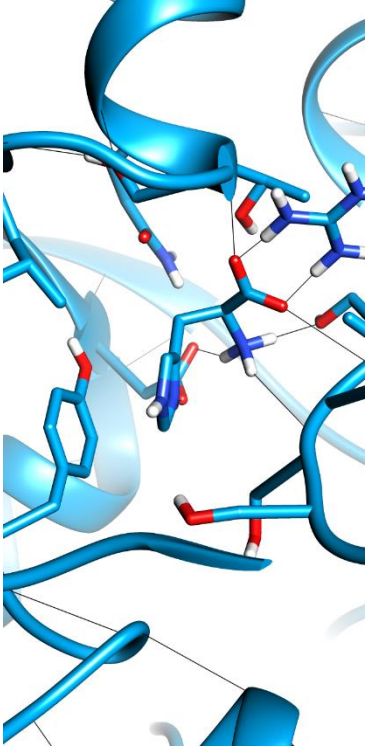
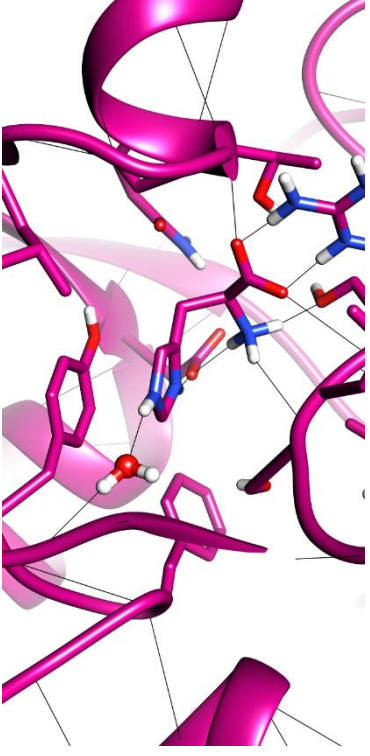
npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua – receptor*

Para el caso de la estructura 1LST en unión a His⁺ (Tabla 10) observamos que el H1 de la molécula de agua interactúa de manera directa con el residuo Asp11 del receptor, el O2 de la misma molécula de agua genera un puente de H con ese ligando. La interacción receptor – ligando genera 9 puentes de H, un puente de H más que el número de puentes de H que se forman cuando no está presente el agua (8) y dos puentes más de los que se tienen en la estructura cristalizada (7). El número total de puentes de H en la estructura cristalizada es de 165 y en la estructura con agua es de 167, mientras que en la estructura sin agua es de 146.

Tabla 10. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LST-His⁺. El primer recuadro muestra la estructura cristalizada (1LST – Lys). El segundo recuadro muestra la interacción del receptor 1LST y el ligando His⁺, en ausencia de agua (sH₂O). El último recuadro muestra la interacción entre 1LST e His⁺, en presencia de una molécula de agua (cH₂O).

Estructura				
	1LST cristalizada	1LST silvestre (sH ₂ O)	1LST silvestre (cH ₂ O)	
	Ligando	Lys	His ⁺	His ⁺
	npH ¹	7	8	9 *
npH ²	165	146	167	

npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua – ligando*

Evaluación del acoplamiento molecular entre receptores mutados en unión con ligandos endógenos de LAO y efecto generado a nivel estructural, dado por la adición de moléculas de agua

La evaluación de la interacción entre el receptor mutado 1LAF y ligandos endógenos, en ausencia de la molécula de agua muestra que Arg se une en todas las formas mutadas del receptor, mostrando mayor afinidad con el receptor mutado Asp11Ala (-101.7kcal/mol). Solamente en el receptor con la mutación Gln122Ala, se observa la unión de HisE, Orn, Lys, His+ y Arg, aunque no muestran la mayor afinidad de unión (Tabla 11). Cuando añadimos moléculas de agua, Arg continuó siendo el ligando que se unió en todas las formas mutadas del receptor. Los cinco ligandos muestran unión en más receptores mutados en presencia de la molécula de agua que en ausencia de esta, principalmente en los receptores con las mutaciones Gln122Ala, Phe52Ala y Ser69Ala. Los ligandos mostraron ser más afines al receptor 1LAF con la mutación Ser69Ala, en presencia de moléculas de agua (Tabla 11). Por otra parte, observamos que los ligandos HisE, Orn, Lys e His+ no se unen al receptor 1LAF con la mutación Tyr14Ala en presencia de la molécula de agua.

Tabla 11. Valores de interacción (ΔG) entre el receptor 1LAF mutado y ligandos endógenos de LAO. Los datos corresponden a los valores de interacción receptor 1LAF mutado – ligandos endógenos. sH₂O = sin moléculas de agua; cH₂O = con moléculas de agua.

ΔG 1LAF MUTADO										
	sH ₂ O					cH ₂ O				
Receptor/Ligando (kcal/mol)	HisE	Orn	Lys	His+	Arg	HisE	Orn	Lys	His+	Arg
Asp11Ala	<i>nd</i>	-46.8	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-101.7	<i>nd</i>	-59.4	<i>nd</i>	-56.3	-57.4
Gln122Ala	-21.2	-21.5	-19.3	-53.7	-38.5	-45.5	-54.0	-9.7	41.6	-66.3
Leu117Ala	<i>nd</i>	-62.8	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-48.6	-6.8	-15.2	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-59.5
Phe52Ala	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-61.5	-65.1	-81.1	-11.8	-23.3	0.7	-9.2	-33.6
Ser69Ala	-23.1	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-72.9	-57.8	-46.8	-95.0	-62.9	-80.2	-79.8
Tyr14Ala	-19.1	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-46.9	-52.7	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-42.5

"nd" indica ausencia de ligando

Al calcular las diferencias de ΔG entre la estructura 1LAF silvestre y la estructura 1LAF mutado, en ausencia de la molécula de agua, observamos que los ligandos muestran mayor número de valores de diferencia positivos lo cual nos dice que estos prefieren unirse al receptor mutado (valores positivos de la primera mitad de la tabla 12). His+ es el ligando que muestra mayor valor de diferencia de ΔG en unión al receptor 1LAF con las mutaciones Ser69Ala (Dif. $\Delta G = 72.9$), Phe52Ala (Dif. $\Delta G = 65.1$), Gln122Ala (Dif. $\Delta G = 53.7$) y Tyr14Ala (Dif. $\Delta G = 46.9$). Por otro lado, Orn es el único ligando que muestra preferencia por el receptor silvestre dado que los valores de diferencia de ΔG mostrados con el receptor 1LAF con las mutaciones Phe52Ala, Ser69Ala y Tyr14Ala indica un valor de diferencia de ΔG de -57.7.

La diferencia de ΔG entre la estructura silvestre y la estructura mutada, en presencia de una molécula de agua, revela la afinidad preferente que tiene Orn y Arg por el receptor silvestre con la molécula de agua, especialmente cuando el receptor presenta la mutación Phe52Ala (Dif. ΔG Orn = -54.2 y Dif. ΔG Arg = -46.3) y Tyr14Ala (Dif. ΔG Orn = -75.5 y Dif. ΔG Arg = -37.4) (Ver tabla 12, valores negativos remarcados en negritas).

Tabla 12. Diferencia de ΔG entre la estructura 1LAF silvestre y 1LAF mutado, en ausencia y presencia de agua. Resultados positivos indican que la interacción es mayormente favorable con el receptor mutado. Valores negativos indican que la interacción es favorable con el receptor silvestre.

Receptor/Ligando	Dif. ΔG					Dif. ΔG				
	1LAF silvestre (sH ₂ O)					1LAF silvestre (cH ₂ O)				
	-					-				
	1LAF mutado (sH ₂ O)					1LAF mutado (cH ₂ O)				
	HisE	Orn	Lys	His+	Arg	HisE	Orn	Lys	His+	Arg
Asp11Ala	nd	-10.9	nd	nd	42.6	nd	-18.1	nd	56.3 *	-22.5
Gln122Ala	21.2 *	-36.2	19.3 *	53.7 *	-20.6	45.5 *	-23.5	9.7 *	nd	-13.6
Leu117Ala	nd	5.1	nd	nd	-10.5	6.8 *	-62.3	nd	nd	-20.4
Phe52Ala	nd	-57.7 *	61.5 *	65.1 *	22	11.8 *	-54.2	nd	9.2 *	-46.3
Ser69Ala	23.1 *	-57.7 *	nd	72.9 *	-1.3	46.8 *	17.5	62.9 *	80.2 *	7.1
Tyr14Ala	19.1 *	-57.7 *	nd	46.9 *	-6.4	nd	-75.5 *	nd	nd	-37.4

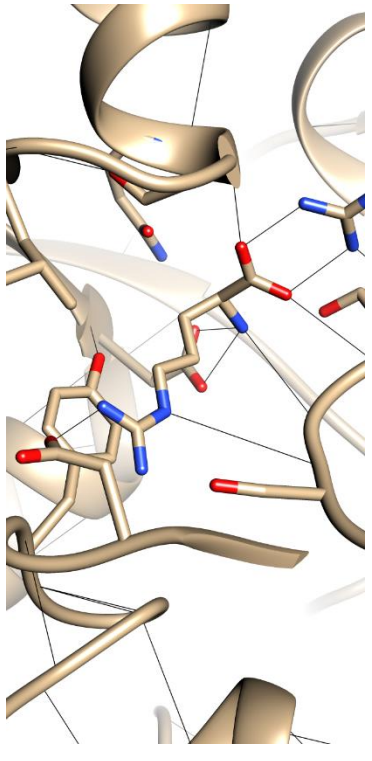
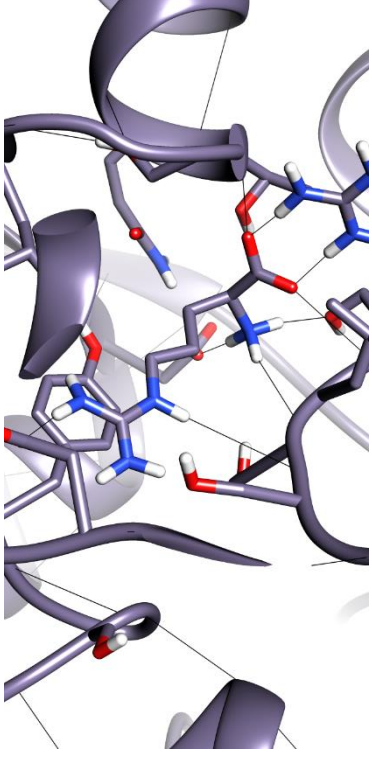
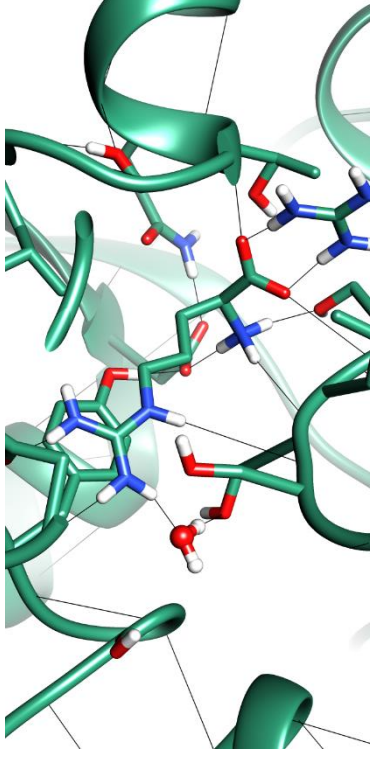
"nd" indica la ausencia de ligando

** Valor de afinidad (ΔG) dado entre receptor – ligando*

En la tabla 13 mostramos el efecto estructural que genera la molécula de agua en la interacción dada por el receptor 1LAF con la mutación Phe52Ala. Observamos que el H1 de la molécula de agua genera un puente de H con el residuo Ser70 del receptor; el O2 de la molécula de agua realiza un puente de H con el ligando. Además, la molécula de agua contribuye a la formación de 2 puentes de H más que los que se tienen en la estructura con la misma mutación pero que no presenta moléculas de agua y en la estructura cristalizada (en ambas se forman 9 puentes de H). El número de puentes de H totales que se tiene en el receptor 1LAF con dicha mutación es de 167, sobrepasando el número total de puentes de H de las otras estructuras.

Cuando se lleva a cabo la interacción entre el receptor 1LAF con la mutación Tyr14Ala y Arg, el H1 de la molécula de agua realiza un puente de H directo con el residuo Ser70 del receptor. En la tabla 14 observamos que el número de puentes de H que se forman entre la interacción del receptor y el ligando es de 10, mismo número de puentes de H que se tiene cuando se lleva a cabo la interacción en ausencia de agua, sin embargo, ambas interacciones que mencionamos sobrepasan por un puente de H al número de puentes de H de la interacción de la estructura cristalizada (9 puentes de H). Por otra parte, el número de puentes de H totales que se tiene en la interacción del receptor mutado con presencia de moléculas de agua es de 155, valor que sobrepasa por 10 puentes de H al número de puentes formados en la interacción sin agua. El número total de puentes de H formados en la interacción de la estructura cristalizada es de 160 mientras que los puentes de H totales del receptor mutado son de 155.

Tabla 13. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAF con la mutación Phe52Ala – Arg. El primer recuadro muestra la estructura cristalizada (1LAF – Arg). El segundo recuadro muestra la interacción del receptor 1LAF con la mutación Phe52Ala y el ligando Arg, en ausencia de agua (sH_2O). El último recuadro muestra la interacción entre 1LAF con la mutación Phe52Ala y Arg, en presencia de una molécula de agua (cH_2O).

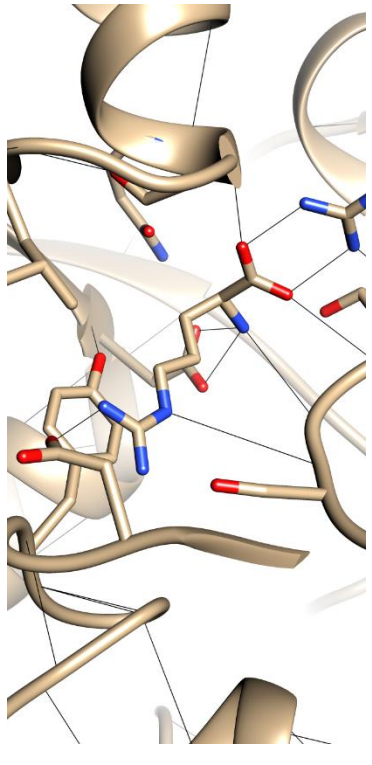
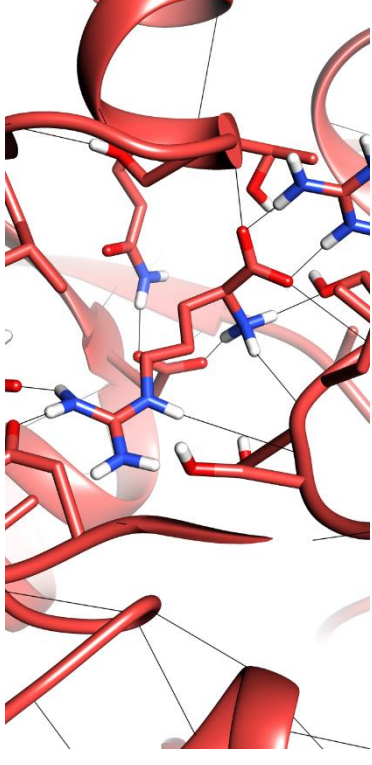
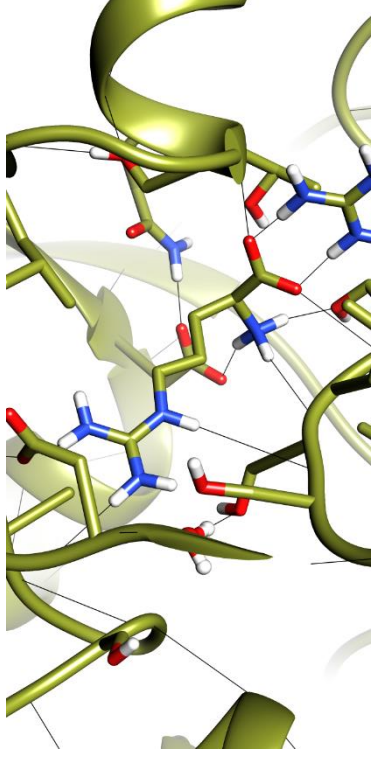
Estructura				
	1LAF cristalizado	1LAF mutación Phe52Ala (sH_2O)	1LAF mutación Phe52Ala (cH_2O)	
	Ligando	Arg	Arg	Arg
	npH ¹	9	9	11 *
npH ²	160	159	167	

npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua – ligando*

Tabla 14. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAF con la mutación Tyr14Ala – Arg. El primer recuadro muestra la estructura cristalizada (1LAF – Arg). El segundo recuadro muestra la interacción del receptor 1LAF con la mutación Tyr14Ala y Arg, en ausencia de agua (sH_2O). El tercer recuadro muestra la interacción del receptor 1LAF con la mutación Phe52Ala y el ligando Arg, en presencia de una molécula de agua (cH_2O).

Estructura				
	1LAF cristalizado	1LAF mutación Tyr14Ala (sH_2O)	1LAF mutación Tyr14Ala (cH_2O)	
	Ligando	Arg	Arg	Arg
	npH ¹	9	10	10 *
npH ²	160	145	155	

npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

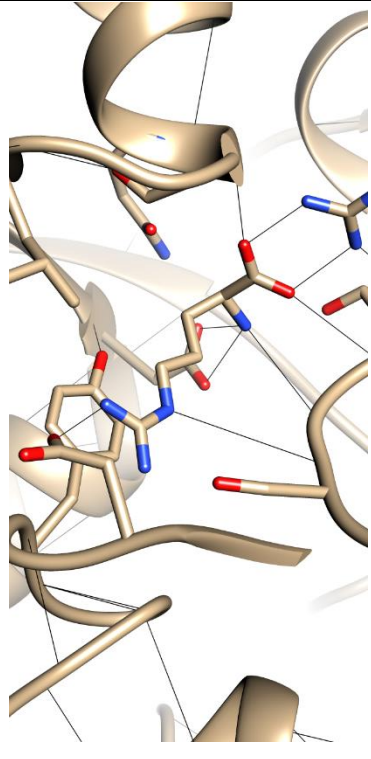
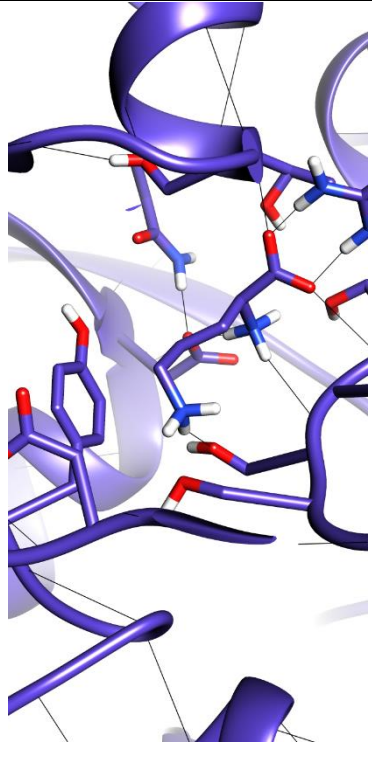
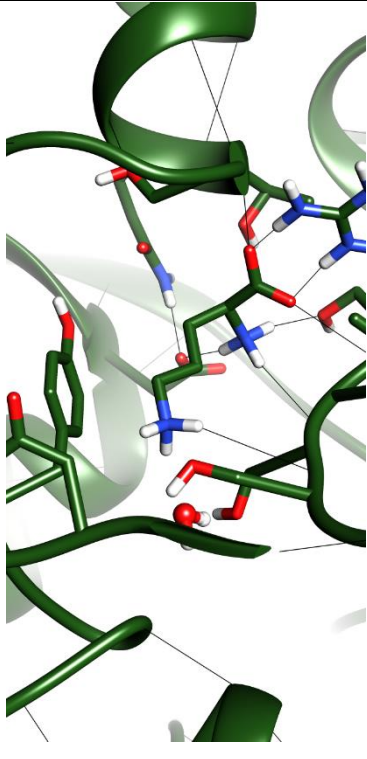
npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua*

En la tabla 15 mostramos el efecto generado por la molécula de agua en la interacción del receptor 1LAF con la mutación Leu117Ala – Orn. La molécula de agua no realiza puentes de H con el receptor o con el ligando. El número de puentes de H totales generados en la interacción entre el receptor mutado en presencia de la molécula de agua y el ligando es de 160, mismo número de puentes de H formados en la interacción de la estructura cristalizada; el número de puentes de H totales en la interacción 1LAF

mutado – Orn, en ausencia de agua es de 153. Los puentes de H formados entre el receptor mutado y el ligando en la estructura cristalizada son 9, el número de puentes de H formados en las otras interacciones no sobrepasan dicho número.

Tabla 15. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAF con la mutación Leu117Ala y el ligando Orn. El primer recuadro muestra la estructura cristalizada (1LAF – Arg). El segundo recuadro muestra la interacción del receptor 1LAF con la mutación Leu117Ala y el ligando Arg, en ausencia de agua (sH_2O). El último recuadro muestra la interacción de 1LAF con la mutación Phe52Ala y Arg, en presencia de una molécula de agua (cH_2O).

Estructura			
	1LAF cristalizado	1LAF mutación Leu117Ala (sH_2O)	1LAF mutación Leu117Ala (cH_2O)
Ligando	Arg	Orn	Orn
npH^1	9	7	8
npH^2	160	153	160

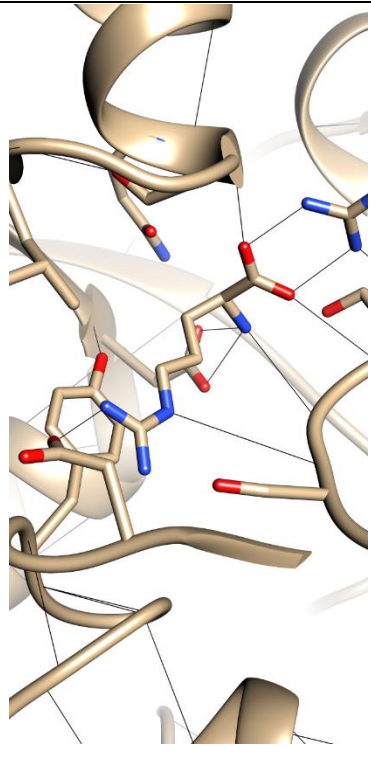
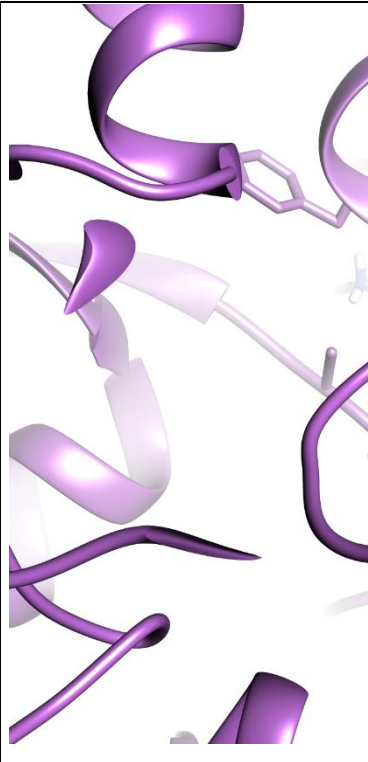
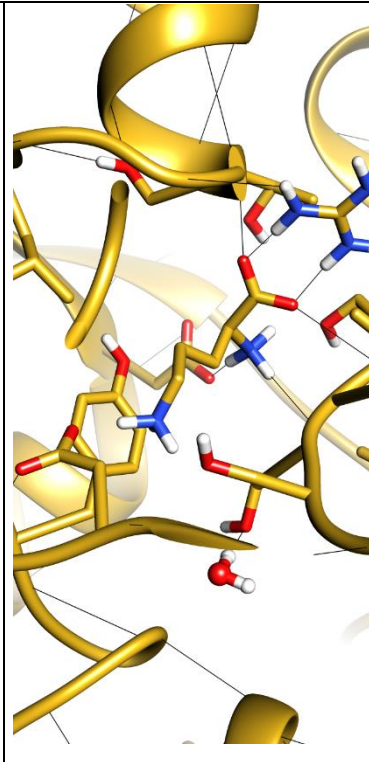
npH^1 : Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH^2 : Puentes de hidrógeno totales

Anteriormente observamos que al tener presente una sola molécula de agua en el receptor 1LAH, el ligando HisD se unía. Cuando el receptor 1LAF con la mutación Phe52Ala se encuentra en ausencia de moléculas de agua, el ligando Orn no se une, sin embargo, cuando añadimos una sola molécula de agua, Orn se une a dicho receptor

(Tabla 16). El H1 de la molécula de agua realiza un puente de H con el residuo Ser70 del receptor. El número de puentes de H formados entre 1LAF mutado y Orn es de 6, 3 puentes de H por debajo de los que se forman en la interacción de la estructura cristalizada. El número de puentes de H totales no varía mucho pues en la estructura cristalizada tenemos 160 puentes y en la estructura con moléculas de agua 161.

Tabla 16. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAF con la mutación Phe52Ala y el ligando Orn. El primer recuadro muestra la estructura cristalizada (1LAF – Arg). El segundo recuadro muestra el receptor 1LAF con la mutación Leu117Ala, ausente de agua (sH_2O) y sin ligando alguno. El último recuadro muestra la interacción de 1LAF con la mutación Phe52Ala y Orn, con molécula de agua (cH_2O).

Estructura				
	1LAF cristalizado	1LAF mutación Phe52Ala (sH_2O)	1LAF mutación Phe52Ala (cH_2O)	
	Ligando	Arg	Orn	Orn
	npH^1	9	<i>nd</i>	6 *
npH^2	160	167	161	

npH^1 : Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH^2 : Puentes de hidrógeno totales

* Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua

Podemos decir que los ligandos endógenos prefieren unirse al receptor silvestre 1LAF en presencia de agua. También podemos ver la desestabilización que implican las mutaciones. Por otra parte, el agua contribuye a la formación de puentes de H, ayudando a la estabilización de la proteína cuando se lleva a cabo la interacción receptor – ligando. Además, volvemos a demostrar que el agua es importante para la unión de ligandos que antes no se unían en ausencia de esta.

La evaluación del acoplamiento dado por el receptor mutado 1LAG y ligandos endógenos, en ausencia de agua, muestra que todos los ligandos se unieron a todas las formas mutadas del receptor. Tres ligandos (Lys, His+ y Arg) mostraron valores altos de unión (ΔG) al receptor 1LAG con la mutación Leu117Ala (-97.1, -90.3 y -99.0 kcal/mol respectivamente). HisE se unió al receptor 1LAG con la mutación Leu71Ala con un ΔG de -94.6 kcal/mol y Orn se une al receptor mutado 1LAG Phe52Ala con un ΔG de -88.2 kcal/mol. Los ligandos endógenos también se unen a los receptores mutados cuando se tiene la presencia de las dos moléculas de agua, a excepción de Arg que no se unió al receptor con la mutación Ser69Ala. HisE, Orn y Lys se unen al receptor 1LAG con la mutación Ser69Ala. La unión de Orn y Lys muestran las afinidades más altas (Orn: -103.7 kcal/mol y Lys: -101.6) (Tabla 17). His+ y Arg se unen al receptor 1LAG con la mutación Leu117Ala y dos moléculas de agua con ΔG de -58.5 y -82.9 kcal/mol aunque menor afinidad que sin agua (-90.3 y -99.0 kcal/mol, respectivamente).

Tabla 17. Valores de interacción (ΔG) entre receptores mutados y ligandos endógenos de LAO. Los datos corresponden a los valores de interacción receptor 1LAG mutado – ligandos endógenos. sH₂O = sin moléculas de agua; cH₂O = con moléculas de agua.

ΔG 1LAG MUTADO										
	sH ₂ O					cH ₂ O				
Receptor/Ligando (kcal/mol)	HisE	Orn	Lys	His+	Arg	HisE	Orn	Lys	His+	Arg
Asp161Ala	-11.3	-79.4	-72.4	-50.3	-89.3	7.1	-31.4	8.1	-45.8	-1.6
Leu71Ala	-94.6	-81.8	-88.3	-56.7	-79.6	-31.1	-67.9	-44.8	-74.1	-66.5
Leu117Ala	-88.9	-80.0	-97.1	-90.3	-99.0	-66.6	-68.7	-46.6	-58.5	-82.9
Phe52Ala	-43.1	-88.2	-63.8	-10.8	-60.0	-51.4	-47.5	-34.4	30.7	-47.6
Ser69Ala	-39.8	-12.8	-59.2	-56.0	-55.9	-87.3	-103.7	-101.6	-65.6	nd
Tyr14Ala	-7.0	-12.2	-27.9	-0.6	-40.8	-53.3	-25.2	-23.2	-10.8	-60.3

“nd” indica ausencia de ligando

Al realizar los cálculos de diferencia de ΔG entre la estructura 1LAG silvestre y la estructura 1LAG mutado en ausencia de agua, observamos que la afinidad es favorable para el receptor silvestre ya que HisE, Orn, Lys, His+ y Arg al unirse al receptor 1LAG con la mutación Tyr14Ala muestran valores negativos (-55.7, -62.4 y -57.3, -36.5 y -37.8)

mostrando la preferencia de unión por el receptor silvestre sin moléculas de agua (valores negativos, primera mitad de la tabla 18).

La diferencia de ΔG entre la estructura silvestre y las estructuras mutadas, en presencia de dos moléculas de agua, revela la afinidad preferente que tienen los ligandos por el receptor silvestre con moléculas de agua (ver segunda mitad de la tabla 18, valores negativos). Específicamente, His+ muestra valores mayores de diferencia de $\Delta G = -118.5$ al unirse al receptor 1LAG con la mutación Phe52Ala y -77 al unirse al receptor 1LAG con la mutación Tyr14Ala. Orn también muestra un valor alto de diferencia de $\Delta G = -68$ en unión al receptor 1LAG con la mutación Tyr14Ala.

Para ambos casos (interacciones sin moléculas de agua y con moléculas de agua) observamos que las mutaciones en los residuos Phe52 y Tyr14 del receptor 1LAG nos muestra la preferencia de unión de los ligandos a los receptores silvestres (sin y con moléculas de agua).

Tabla 18. Diferencia de ΔG entre la estructura 1LAG silvestre y 1LAG mutado, en ausencia y presencia de agua. Resultados positivos indican que la interacción es mayormente favorable con el receptor mutado. Valores negativos indican que la interacción es favorable con el receptor silvestre.

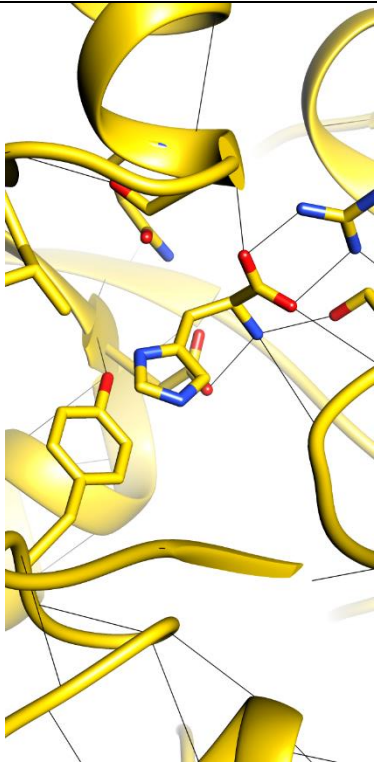
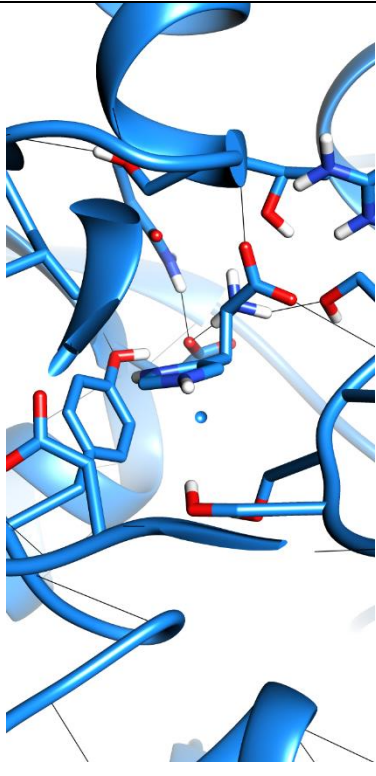
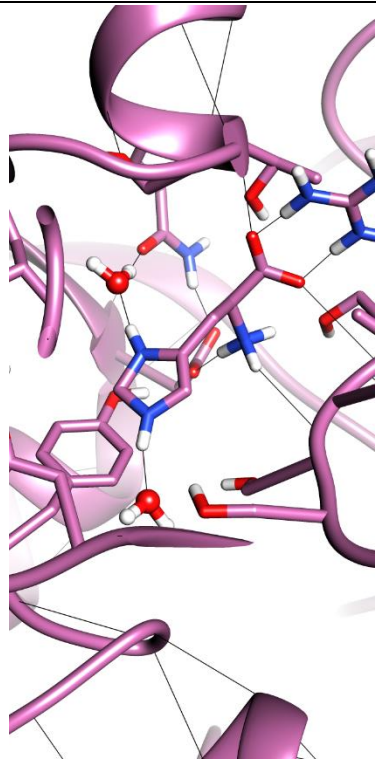
	Dif. ΔG 1LAG silvestre (sH ₂ O) -					Dif. ΔG 1LAG silvestre (cH ₂ O) -				
	1LAG mutado (sH ₂ O)					1LAG mutado (cH ₂ O)				
	HisE	Orn	Lys	His+	Arg	HisE	Orn	Lys	His+	Arg
Asp161Ala	-51.4	4.8	-12.8	13.2	10.7	-58.3	-61.8	-61	-42	-34.1
Leu71Ala	31.9	7.2	3.1	19.6	1	-20.1	-25.3	-8.1	-13.7	30.8
Leu117Ala	26.2	5.4	11.9	53.2	20.4	15.4	-24.5	-6.3	-29.3	47.2
Phe52Ala	-19.6	13.6	-21.4	-26.3	-18.6	0.2	-45.7	-18.5	-118.5	11.9
Ser69Ala	-22.9	-61.8	-26	18.9	-22.7	36.1	10.5	48.7	-22.2	-35.7 *
Tyr14Ala	-55.7	-62.4	-57.3	-36.5	-37.8	2.1	-68	-29.7	-77	24.6

"nd" indica la ausencia de ligando

** Valor de afinidad (ΔG) dado entre receptor – ligando*

En la tabla 19 podemos ver el efecto que generan las moléculas de agua presentes en la interacción del receptor 1LAG con la mutación Phe52Ala y el ligando His+. Observamos que el H2 de una de las dos moléculas de agua realiza puente de H con el residuo Gln122 de la cadena proteica, el O₂ de la misma molécula de agua realiza un puente de H con el ligando. El O₂ de la otra molécula de agua realiza un puente de H con el ligando. El número de puentes de H generados entre el receptor y el ligando de la estructura cristalizada es 7, en la interacción dada entre el receptor 1LAG con la mutación Phe52Ala, las moléculas de agua y el ligando His+ forman 8 puentes de H mientras que, en la misma interacción, pero en ausencia de moléculas de agua solamente se forman 4 puentes de H. Los puentes de H totales formados en la interacción de la estructura cristalizada son 160, los puentes de H totales de la estructura mutada con His+ y moléculas de agua son 157.

Tabla 19. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAG con la mutación Phe52Ala – His+. El primer recuadro muestra la estructura cristalizada (1LAG – His). El segundo recuadro muestra la interacción del receptor 1LAG con la mutación Phe52Ala y el ligando His+, en ausencia de agua (sH₂O). El último recuadro muestra la interacción entre 1LAG con la mutación Phe52Ala e His+, en presencia de dos moléculas de agua (cH₂O).

Estructura				
	1LAG cristalizado	1LAG mutación Phe52Ala (sH ₂ O)	1LAG mutación Phe52Ala (cH ₂ O)	
	Ligando	His	His+	His+
	npH ¹	7	4	8 *
npH ²	160	148	157	

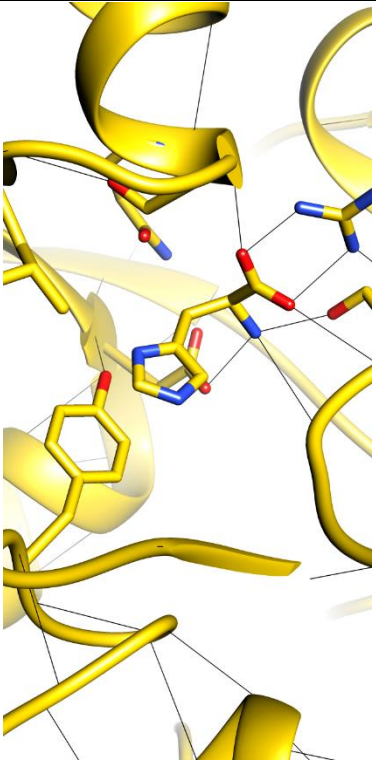
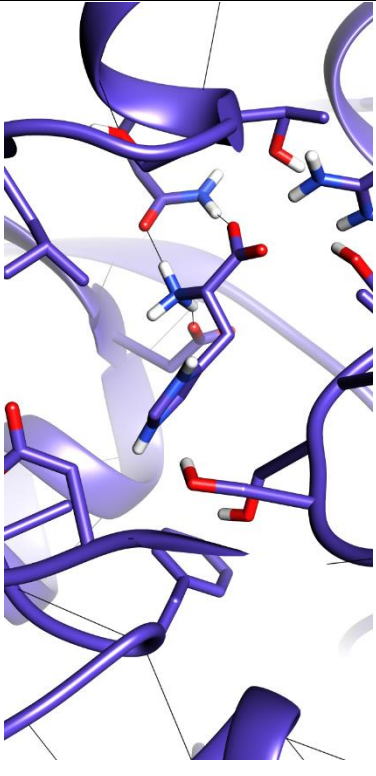
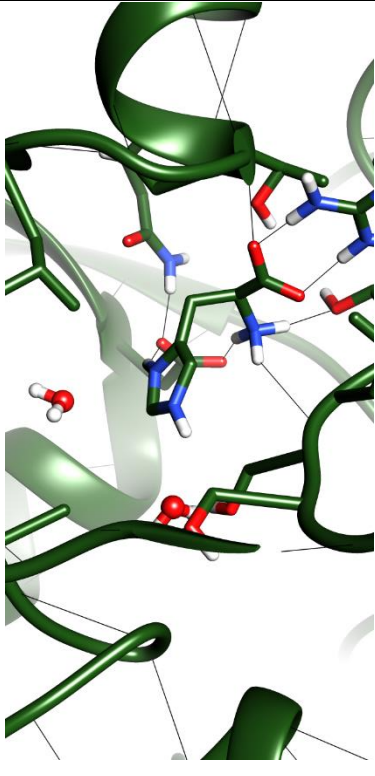
npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua – ligando*

Aunque las moléculas de agua no estén en contacto directo con el receptor o con el ligando conllevan a la formación de puentes de H, en la Tabla 20, podemos ver la interacción entre el receptor 1LAG con la mutación Tyr14Ala y el ligando His+ en presencia de agua, este nos muestra 7 puentes de H situados en la interacción receptor – ligando, mismo número de puentes de H que se tienen en la estructura cristalizada. El número total de puentes de H en la estructura cristalizada es de 160, el de la estructura mutada sin moléculas de agua es de 156 y el de la estructura con agua es de 155.

Tabla 20. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAG con la mutación Tyr14Ala-His+. El primer recuadro muestra la estructura 1LAG con el ligando His, esta es la estructura cristalizada. En el segundo recuadro vemos el ligando His+ en unión al receptor 1LAG con la mutación Tyr14Ala, en ausencia de agua (sH_2O), mientras que en el tercer recuadro vemos la misma interacción, pero contando con dos moléculas de agua (cH_2O).

Estructura				
	1LAG cristalizado	1LAG mutación Tyr14Ala (sH_2O)	1LAG mutación Tyr14Ala (cH_2O)	
	Ligando	His	His+	His+
	npH ¹	7	3	7
npH ²	160	156	155	

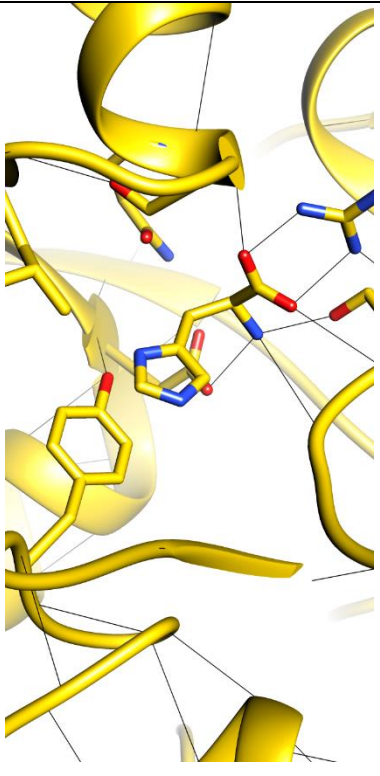
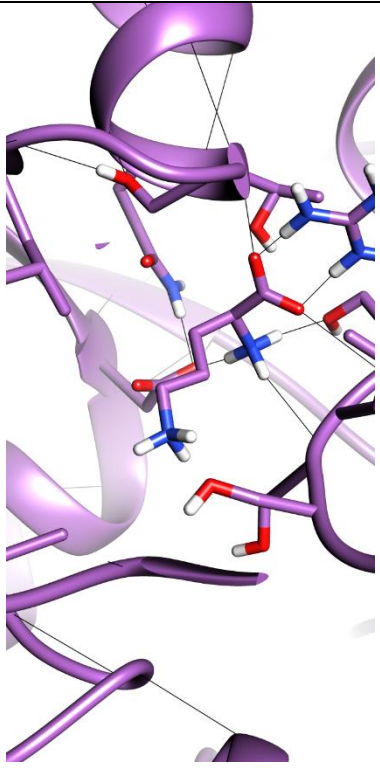
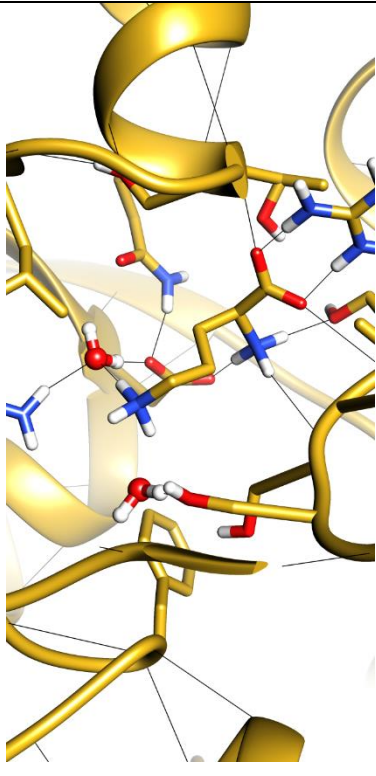
npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

En la tabla 21, tercer recuadro observamos la interacción del receptor 1LAG con la mutación Tyr14Ala y el ligando Orn, en presencia de moléculas de agua. Vemos que el H1 de una de las dos moléculas de agua genera un puente de H con el ligando y el O₂ de la misma molécula de agua genera dos puentes de H, uno con el ligando y otro con el residuo Gln143 de la cadena proteica. El H2 de la otra molécula de agua realiza un puente de H con el residuo Ser69 de la cadena proteica. El número de puentes de H generados entre el receptor y el ligando en la estructura cristalizada es de 7, mismo número de puentes de H realizados entre el receptor y el ligando de la estructura sin agua; mientras que en la interacción entre el receptor y el ligando en presencia de moléculas de agua se forma uno más (8). El número de puentes de H totales en la estructura con agua es menor por un puente que el número de puentes de H de la estructura cristalizada (159 y 160, respectivamente). La estructura sin agua tiene menor número de puentes de H (157).

En la tabla 22, recuadro 3, observamos la presencia de las dos moléculas de agua. El O₂ de una de ellas realiza un puente de H con el ligando, mientras que la otra molécula de agua, su H2 realiza puentes de H con el residuo Gln122 de la cadena proteica y el O₂ con el residuo Tyr14 del receptor. El número de puentes de H entre el receptor y el ligando no se modifica, en las tres distintas interacciones (cristalizado, sin agua y con agua) se forman 7 puentes de H. El número de puentes de H totales es mayor en la interacción con agua (164) mientras que el número total de puentes de H en la interacción sin agua es 159 y en la estructura cristalizada es 160.

Tabla 21. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAG con la mutación Tyr14Ala y el ligando Orn. El primer recuadro muestra la estructura cristalizada (1LAG – Arg). El segundo recuadro muestra la interacción del receptor 1LAG con la mutación Tyr14Ala y el ligando Orn, en ausencia de agua (sH₂O). El último recuadro muestra la interacción de 1LAG con la mutación Tyr14Ala y el ligando Orn, en presencia de moléculas de agua (cH₂O).

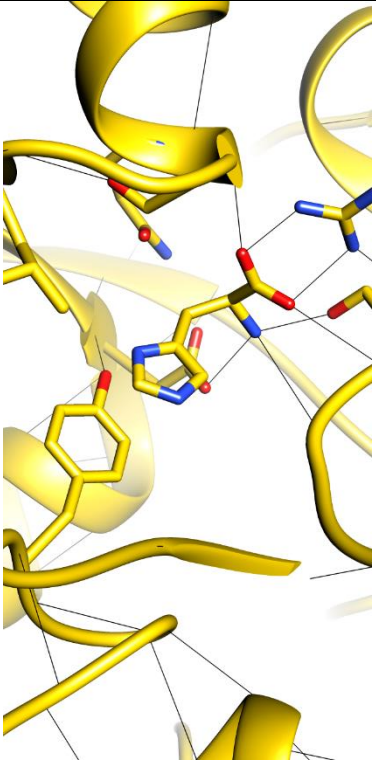
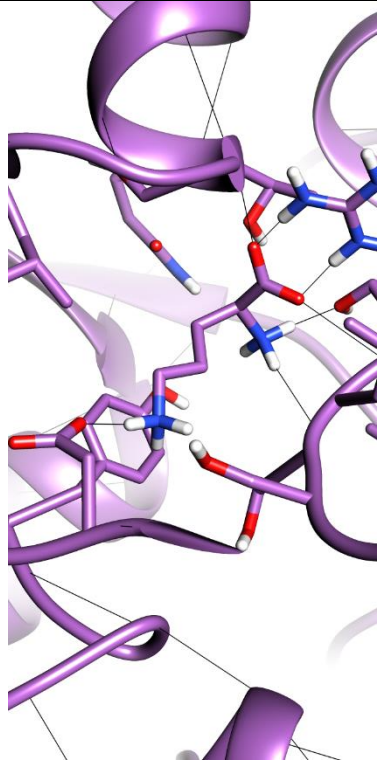
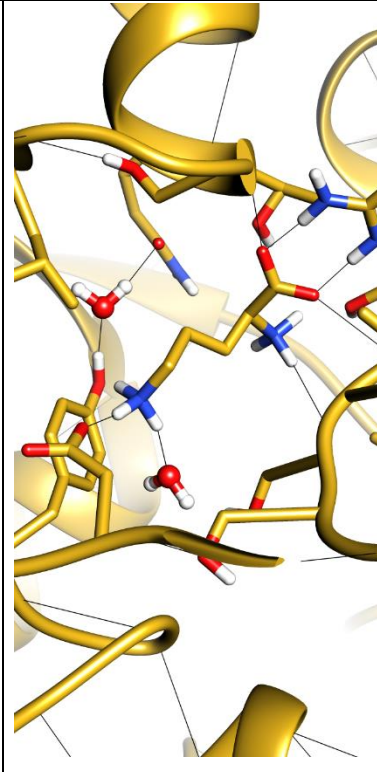
Estructura				
	1LAG cristalizado	1LAG mutación Tyr14Ala (sH ₂ O)	1LAG mutación Tyr14Ala (cH ₂ O)	
	Ligando	His	Orn	Orn
	npH ¹	7	7	8 *
npH ²	160	157	159	

npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua – ligando*

Tabla 22. Efecto de la adición de agua sobre las interacciones de puente de H en la estructura 1LAG con la mutación Asp161Ala-Orn. El primer recuadro muestra la estructura cristalizada (1LAG – Orn). El segundo recuadro muestra la interacción del receptor 1LAG con la mutación Asp161Ala y el ligando Orn, en ausencia de agua (sH₂O). El último recuadro muestra la interacción entre 1LAG mutación Asp161Ala y Orn, en presencia de una molécula de agua (cH₂O).

Estructura				
	1LAG cristalizado	1LAG mutación Asp161Ala (sH ₂ O)	1LAG mutación Asp161Ala (cH ₂ O)	
	Ligando	His	Orn	Orn
	npH ¹	7	7	7 *
npH ²	160	159	164	

npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

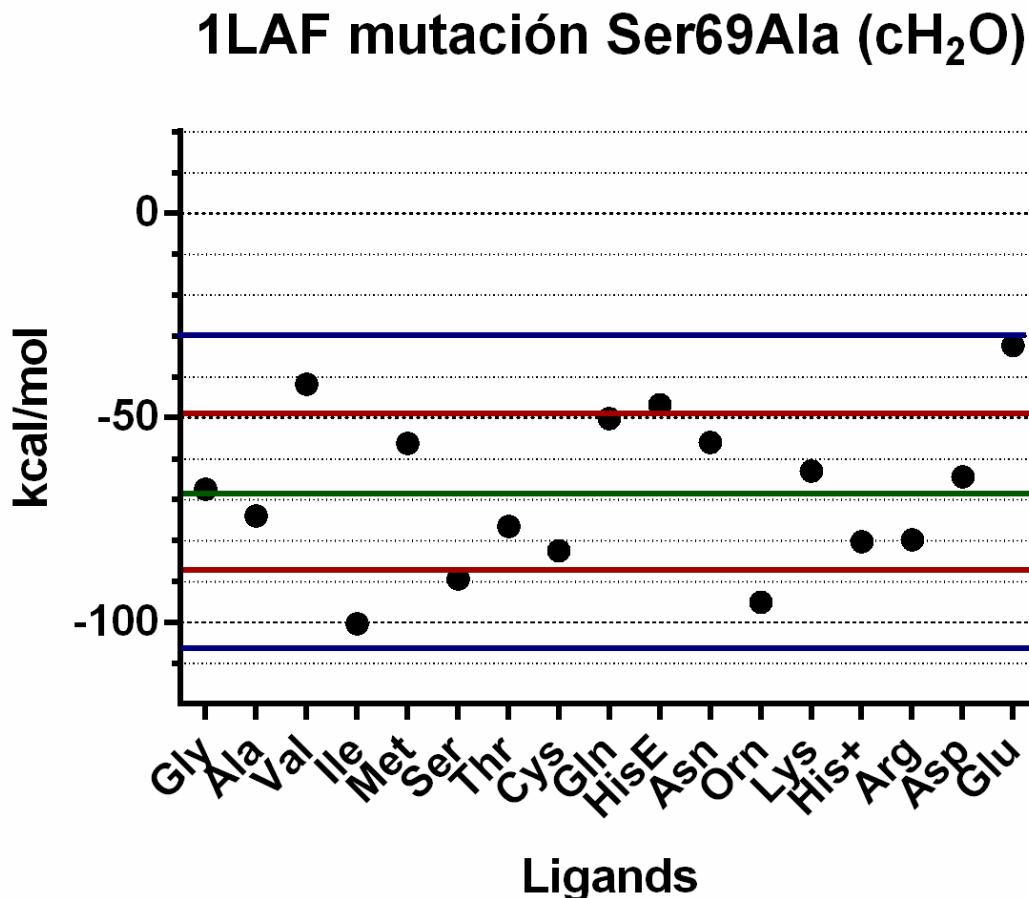
npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre molécula de agua – ligando*

Evaluación del acoplamiento molecular entre receptores mutados en unión con ligandos no endógenos de LAO y efecto generado a nivel estructural, dado por la adición de moléculas de agua

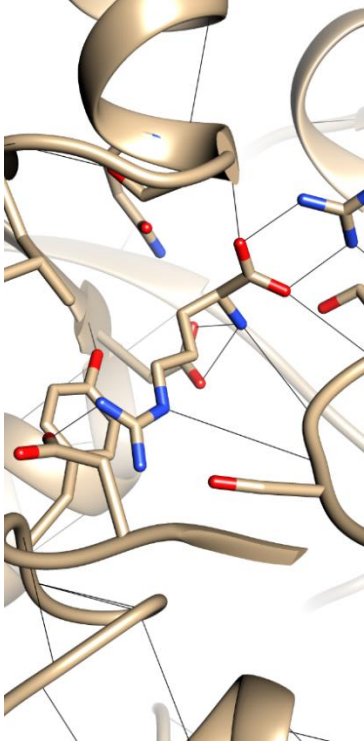
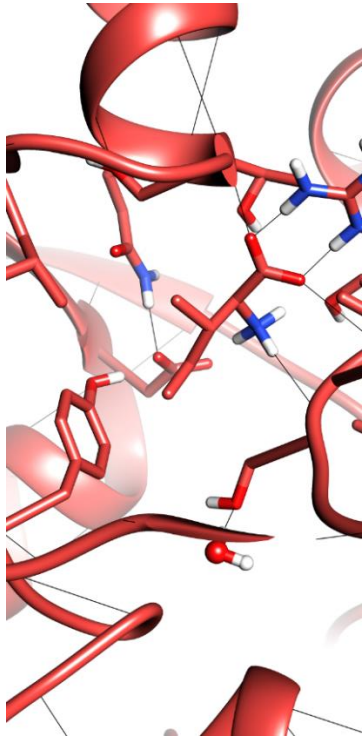
La evaluación entre el receptor 1LAF con sus seis distintas formas mutadas, en presencia de agua y los ligandos prueba enlistados en la parte de diseño metodológico, mostraron que Ile (ligando no endógeno de LAO) muestra afinidad por el receptor con la mutación Ser69Ala (Gráfica 1A, del anexo). Ile mostró un valor de interacción (ΔG) de -102kcal/mol (Gráfica 1).

Gráfica 1. Valores ΔG dados por la interacción entre el receptor 1LAF con la mutación Ser69Ala y ligandos no endógenos, en presencia de agua (cH_2O). Línea verde indica media aritmética, línea roja indica sigma y línea azul indica 2da sigma. Los ligandos mostrados solo son aquellos que se unieron al receptor.



En la tabla 23 vemos que la molécula de agua no hace puente de H con el ligando, sin embargo, el H1 de la molécula de agua presente realiza un puente de H con el residuo Ser70 del receptor. El número de puentes de H que se forman en la interacción receptor – ligando en la estructura mutada son 5 mientras que los números de puentes de H entre el receptor y el ligando de la estructura cristalizada son 9. Por otra parte, el número de puentes de H totales de la estructura cristalizada es de 160, el número de puentes de H totales de la estructura mutada sobrepasa dicho valor por 5 puentes de H más.

Tabla 23. Efecto de la molécula de agua en el receptor 1LAF con la mutación Ser69Ala en unión con el ligando Ile. En el primer recuadro observamos la estructura cristalizada (1LAF – Arg), de lado derecho, observamos la a la estructura mutada con Ile.

Estructura		
	1LAF cristalizado	1LAF mutación Ser69Ala (cH ₂ O)
Ligando	Arg	Ile
npH ¹	9	5 *
npH ²	160	165

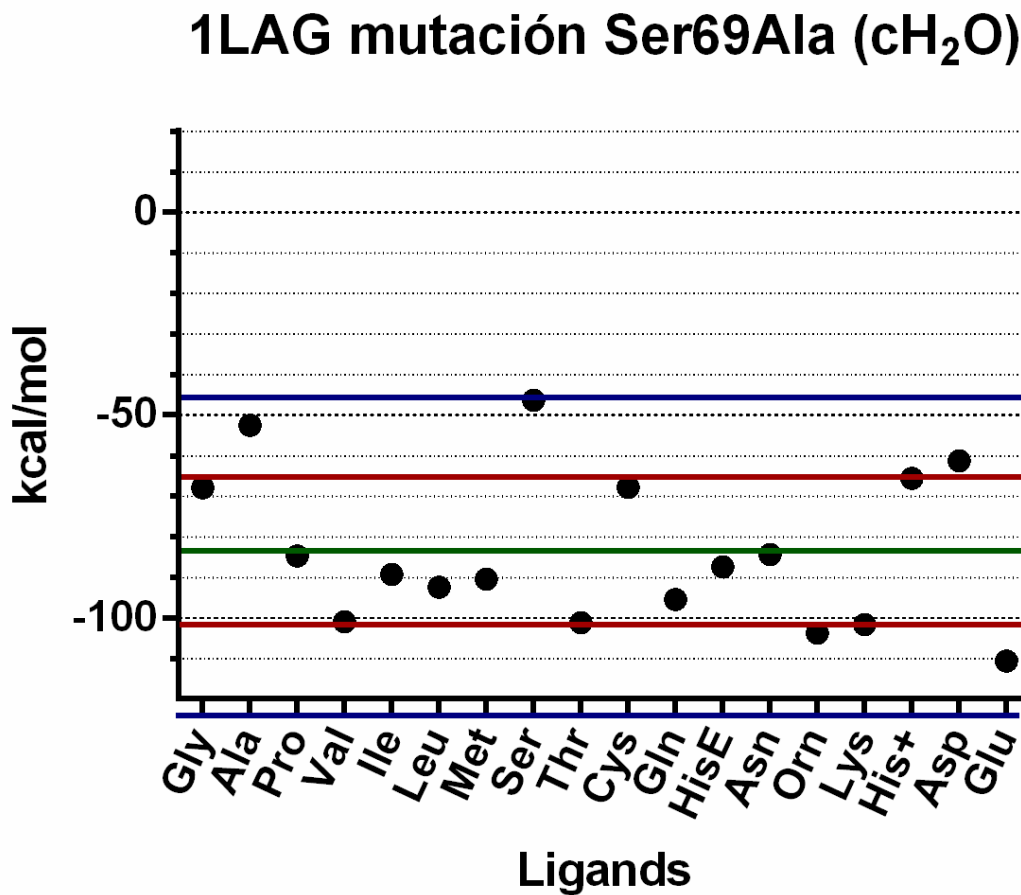
npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua*

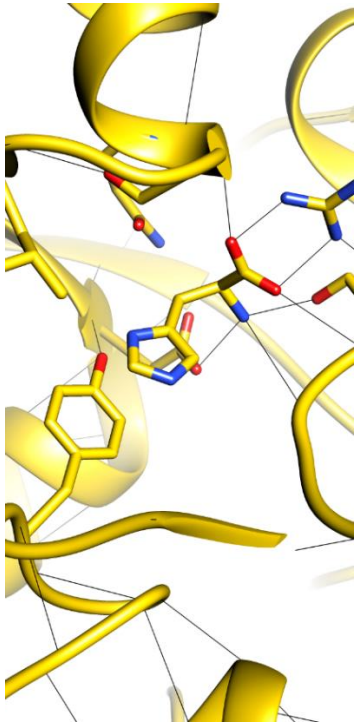
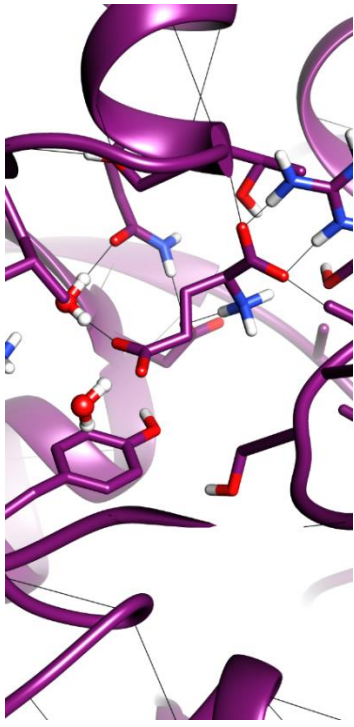
Para el caso de la evaluación entre el receptor 1LAG con sus seis distintas formas mutadas, en presencia de agua y los ligandos prueba enlistados en la parte de diseño metodológico, mostraron que Glu (ligando no endógeno de LAO) tiene afinidad hacia el receptor con la mutación Ser69Ala (Gráfica 2A, del anexo). Glu mostró un valor de interacción (ΔG) de -111kcal/mol (Gráfica 2).

Gráfica 2. Valores ΔG dados por la interacción entre el receptor 1LAG con la mutación Ser69Ala y ligandos no endógenos, en presencia de agua (cH_2O). Línea verde indica media aritmética, línea roja indica sigma y línea azul indica 2da sigma. Los ligandos mostrados solo son aquellos que se unieron al receptor.



En la tabla 24 vemos que solamente una molécula de agua realiza puentes de H con el receptor y el ligando. El H1 de una de la molécula de agua hace puente de H con el ligando y el H2 de la misma molécula realiza puente de H con el residuo Gln122 de la cadena proteica. El número de puentes de H que se forman en la interacción receptor – ligando en la estructura mutada son 6 mientras que los números de puentes de H entre el receptor y el ligando de la estructura cristalizada son 7. Por otra parte, el número de puentes de H totales de la estructura cristalizada es de 160, el número de puentes de H totales de la estructura mutada sobrepasa dicho valor por 4 puentes de H más.

Tabla 24. Efecto de la molécula de agua en el receptor 1LAG con la mutación Ser69Ala en unión con el ligando Glu. En el primer recuadro observamos la estructura cristalizada (1LAG – His), de lado derecho, observamos la a la estructura mutada con Glu.

Estructura		
	1LAG cristalizado	1LAG mutación Ser69Ala (cH ₂ O)
Ligando	His	Glu
npH ¹	7	6 *
npH ²	160	164

npH¹: Puentes de hidrógeno entre el receptor y el ligando

npH²: Puentes de hidrógeno totales

** Incluye un puente de hidrógeno directo entre receptor – molécula de agua – ligando*

DISCUSIÓN

Al inicio de este proyecto, se sospechaba la importancia de las moléculas de agua en la interacción proteína – ligando pues se ha observado experimentalmente por Pulido, *et. al.*, en 2015, quienes en sus experimentos revelan que 3 ± 1 molécula de agua es secuestrada cuando un aminoácido se une a la proteína LAO. Nuestros resultados *in silico* coinciden con esta noción y ofrecen una perspectiva distinta a nivel molecular; es importante recalcar que nosotros solamente escogimos moléculas de agua que participan directamente en la interacción, que para el caso de 1LAF fue únicamente una molécula de agua y para el receptor 1LAG fueron dos, no podemos descartar que otras moléculas de agua que no se involucren de manera directa en la interacción puedan dar paso a una mayor afinidad.

Nuestros resultados nos muestran que la mayoría de los ligandos se unen mejor a LAO por lo menos en presencia de una molécula de agua. His+, de manera sugestiva, se beneficia de dos moléculas de agua. La importancia de estas moléculas se manifiesta también al realizar mutaciones en los residuos que participan en la unión de ligandos. Mutamos los residuos directamente involucrados en la interacción con los ligandos: Phe52 y Tyr14, residuos aromáticos que unen los ligandos de LAO a través de las interacciones pi-cati3n. La presencia de una o dos moléculas de agua enfatiza la desestabilizaci3n de mutarlas por Ala. Este resultado fue inesperado, pero de grandes consecuencias. Es claro que cualquier intento efectivo de rediseño de LAO debe tomar en cuenta las moléculas de agua.

De acuerdo con la informaci3n que hemos consultado (Pulido, *et. al.*, 2015; Nikaido y Ames, 1992), sabemos que el ligando para el receptor 1LAG es histidina, sin embargo, se desconoce cuál de las tres formas de histidina (HisD, HisE o His+) que utilizamos en este proyecto es el ligando específico, nuestros resultados mostraron que HisD tiene alta afinidad cuando la interacci3n (con receptor silvestre) se lleva a cabo en ausencia de agua, pero cuando el agua est3 presente, esta afinidad se pierde. Después de que obtuvimos la diferencia de ΔG entre las interacciones en ausencia y presencia de agua notamos claramente que His+ es sobresaliente por encima de las otras dos formas de histidinas por ende podemos decir que el ligando específico para el receptor 1LAG en su

forma silvestre es His+. Aún desconocemos detalles que expliquen esta idea ya que se debería de realizar más pruebas para saber qué pasa con el intercambio de protones que pueda llevarse a cabo entre el receptor – molécula de agua – ligando.

El ligando HisD no lo utilizamos en la evaluación de interacciones receptores mutados y ligandos endógenos debido a la pérdida de afinidad que mostró cuando las moléculas de agua fueron añadidas en la interacción silvestre. Las moléculas de agua fueron consideradas como parte del receptor y no del ligando. LAO tiene cinco estructuras tridimensionales descritas, trabajamos con cuatro de ellas mientras que la estructura o receptor 2LAO no la consideramos para este proyecto de tesis debido a que la información acerca de ella no está definida, no sabemos a qué ligando es afín.

Aunque realizamos docking rígido y flexible, los datos resultantes del docking flexible fueron aquellos que consideramos para realizar el cálculo de *amber.score*; debido a que el docking flexible encuentra mejor posición y acomodamiento de moléculas.

Observamos la diversidad conformacional de LAO al unir sus diferentes ligandos dependiendo del receptor (1LAF, 1LAG, 1LAH o 1LST). Las energías de interacción difieren aún después de una pequeña dinámica molecular (*amber.score*).

Antes de realizar la mutación en el residuo Ser69 de alguno de los dos receptores mutados (1LAF o 1LAG) se tenía la unión de ligandos o aminoácidos cargados positivamente, en cambio cuando Ser69 lo cambiamos por un residuo apolar alifático (Ala), ligandos apolares alifáticos y ligandos cargados negativamente muestran mayor afinidad.

Todos estos casos, nos sugieren que, en efecto, el sitio de reconocimiento de ligandos y la proteína entera tienen cambios sutiles pero significativos en su estructura.

CONCLUSIONES

De los cuatro ligandos endógenos descritos para LAO, dos de ellos (Orn e His+) incrementan su afinidad en presencia de moléculas de agua en el sitio de unión.

Las moléculas de agua son importantes en la interacción receptor – ligando ya que permite la formación de nuevos puentes de H, también son importantes para permitir la unión de ligandos que antes no se unían, tal es el caso para la estructura 1LAH silvestre y la unión de HisD. Además, el docking en presencia de agua exacerba este comportamiento.

Las mutaciones en Phe52 y Tyr14 muestran repercusiones en la interacción de ligandos endógenos (mostrando que los ligandos prefieren unirse a los receptores silvestres tanto en ausencia como en presencia de agua), principalmente en presencia de agua ya que es donde observamos valores ΔG más negativos. Las interacciones de residuos aromáticos son de naturaleza distinta a las interacciones hidrofóbicas o los puentes de hidrógeno.

La mutación Ser69Ala en ambos receptores (1LAF y 1LAG) y en presencia de moléculas de agua, permite la unión de ligandos no endógenos (Ile y Glu) con diferente carga que los ligandos endógenos. Glu tiene carga negativa e Ile es apolar alifático mientras que Lys, Arg, y Orn tienen carga positiva. Esto sugiere que para rediseñar el sitio de unión de LAO se deben considerar la participación de moléculas de agua en el sitio de unión.

La molécula de agua presente en la interacción receptor 1LAF mutado con los ligandos realiza puente de H con el residuo Ser70 mientras que las moléculas de agua presentes en la interacción receptor 1LAG mutado con los ligandos generan puentes de H con el residuo Gln122.

Aún queda abierta la posibilidad de que otras moléculas de agua puedan contribuir a la afinidad de LAO y a su conformación ligando específica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ames, G. (1986). Bacterial Periplasmic Transport Systems: Structure, Mechanism and Evolution. *Annu Rev. Biochem.* Vol.55:397-425.

Banda-Vázquez, J., Shanmugaratnam, S., Rodríguez-Sotres, J., Torres-Larios, A. Höcker, B. y Sosa-Peinado, A. (2018). Redesign of LAOBP to bind novel L-amino acid ligands. *Protein science.* Vol. 27(5):957-968.

Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gillilan, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I. y Bourne, P. (2000). The protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* Vol.28(1):235-242.

Bos, M. y Tommassen, J. (2004). Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *El sevier.* Vol.7:610-616.

Clackson, T. y Wells, J. A. (1995). A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science.* Vol.267:383–386.

Furlong, C. (1987). Osmotic-shock-sensitive transport systems, In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. Vol.1. American Society of Microbiology, Wasington, D.C.

Irwin, J., Sterling, T., Mysinger, M., Bolstad, E. y Coleman, R. (2012). ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* Vol.52(7):1757-1768.

Kortemme, T., Kim, D. E. y Baker, D. (2004). Computational Alanine Scanning of Protein-Protein Interfaces. *Sci. STKE.* (219):1-8.

Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D., Vandermeersch, T., Zurek, E., y Hutchison, G. (2012). “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform” *Journal of Cheminformatics.* Vol.4:17.

Meng, X., Zhang, H., Mezei, M. y Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* Vol.7(2):146-157.

Müller-Esterl., W. (2008). Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Ed. Reverté, S. A.

Nelson, D. y Cox, M. (2009). Lehninger Principles of Biochemistry. 5ta ed. Ed. Omega S.A. Barcelona.

Nikaido, K. y Ames, G. (1992). Purification and Characterization of the Periplasmic Lysine-, Arginine-, Ornithine-binding Protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*". The Journal of Biological Chemistry. Vol.267(29):20706-20712.

Pearlman, D., Case, D., Caldwell, J., Ross, W., Cheatham, T., DeBolt, S., Ferguson, D., Seibel, G. y Kollman, P. (1995) AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. Comp. Phys. Commun. Vol.91:1-41.

Pulido, N., Silva, D-A., Téllez, L., Pérez-H., G. y Fernández-V., A. (2015). On the molecular basis of the high affinity binding protein from *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Recognit. Vol.28:108-116.

Ryan, K. y Ray. C. (2011). Sherris: Microbiología médica. 5ta ed. Ed. McGraw Hill México.

Ribeiro, L., Amarelle, V., Ribeiro, L. y Guazzaroni, M. (2019). Converting a Periplasmic Binding Protein into a Synthetic Biosensing Switch through Domain Insertion. BioMed Research International. Vol.2019:1-15.

SYBYL Molecular Modeling System, version 7.0, Tripos Inc., St. Louis, MO, 63144-2913.

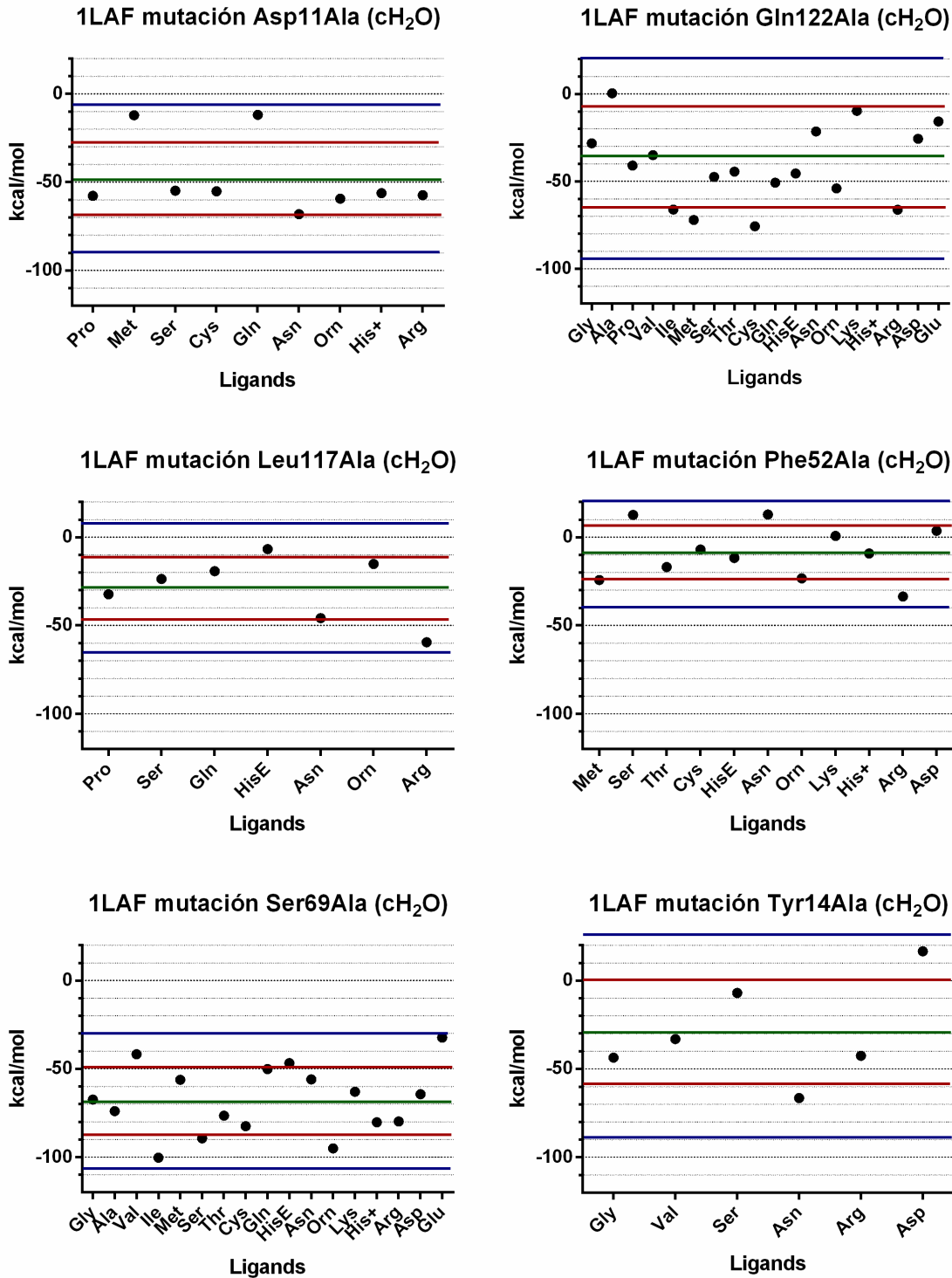
Oh, B. H., Pandit, J., Kang, C. H., Nikaido K., Gokcen, S., Ames, G. y Kim, S., H. (1993). Three-dimensional Structures of the Periplasmic Lysine/Arginine/Ornithine-binding protein with and without ligand. The Journal of Biol. Chem. Vol.268(15):11348–11355.

Oh, B. H., Ames, G. F. L. y Kim, S. H. (1994). Structural Basis for Multiple Ligand Specificity of the Periplasmic Lysine-, Arginine-, Ornithine-binding Protein*. The Journal of Biol. Chem. Vol.269(42):26323-26330.

Wallace, A., Laskowski, R., Thornton, J. (1996). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* Vol.8:127-134.

ANEXO

Gráfica 1A. Conjunto de gráficas que muestran valores de interacción entre el receptor 1LAF mutado y ligandos no endógenos, en presencia de agua. Línea verde indica media aritmética, línea roja indica sigma y línea azul indica 2da sigma.



Gráfica 2A. Conjunto de gráficas que muestran valores de interacción entre el receptor 1LAG mutado y ligandos no endógenos, en presencia de agua. Línea verde indica media aritmética, línea roja indica sigma y línea azul indica 2da sigma.

