



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Metionina sulfóxido reductasa A de *Mycobacterium tuberculosis*:  
Desentrañando los secretos de su ciclo catalítico**

**Lic. Santiago Sastre Barrios**

**Tesis de maestría**

Presentada como uno de los requisitos para el título de

**Magíster**

Universidad de la República  
Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química y  
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

**Lugar de realización:**

Facultad de Medicina  
Departamento de Bioquímica  
Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO)

**Septiembre 2022**

**Metionina sulfóxido reductasa A de *Mycobacterium tuberculosis*:  
Desentrañando los secretos de su ciclo catalítico**

**Tribunal:**

Dr. Marcelo Comini

Dr. Oscar Ventura

Dra. Luciana Capece

Dr. Ari Zeida, Director académico y Codirector de tesis

Dr. Rafael Radi, Codirector de tesis

## Resumen

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*) es el patógeno responsable de la enfermedad tuberculosis. Como parte de la respuesta antimicrobiana, los macrófagos que son uno de los blancos celulares más importantes de la micobacteria, generan especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno causando daño nitro-oxidativo en las biomoléculas de *Mt*. El parásito, por otro lado, como respuesta a este estrés oxidativo presenta una amplia batería de respuestas antioxidantes que regeneran este daño, entre las que se encuentra la metionina sulfóxido reductasa A, que cataliza la reducción del isómero *S* de metionina sulfóxido presente en proteínas.

El ciclo catalítico de ésta enzima consta de tres pasos, comenzando con la reducción de Met-S-SO, llevada a cabo por un cisteína reactiva que se oxida a ácido sulfénico, liberando la metionina reducida. El segundo y tercer paso constan de la formación de disulfuro intramolecular entre el ácido sulfénico y la cisteína reactiva, seguida de su reducción a través de la tiorredoxina sistema.

En esta Tesis de Maestría se emplearon varios enfoques computacionales y experimentales tales como ensayos de cinética rápida y en estado estacionario, dinámica molecular plana y acelerada, cálculos de estructura electrónica, determinación de perfiles de energía libre, *docking* proteína-proteína y análisis bioinformático de secuencias para caracterizar de forma pormenorizada el mecanismo enzimáticos.

En primer lugar, se obtuvo un protocolo experimental para obtener una fracción pura de *MtmsrA* recombinante, caracterizando completamente la cinética en estado estacionario y pre-estacionario. A su vez, se caracterizaron las propiedades dinámicas de la *MtmsrA* en diferentes estados de oxidación/ionización y de unión a diferentes ligandos, obteniendo resultados coherentes con la evidencia experimental. Por otra parte, a partir de los cálculos de estructura electrónica y los perfiles de energía libre determinados, los resultados presentes en esta Tesis de Maestría sugieren que la formación del ácido sulfénico pasa por un único intermediario sulfonio, a diferencia de lo reportado previamente en la literatura, y que depende de catálisis ácido-base por un residuo Histidina conservado en la subclase de *msrA* a la cual pertenece *MtmsrA*. En suma, este trabajo representa una caracterización detallada de una importante enzima antioxidante de *Mt*.

## Abstract

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*) is the pathogen responsible for tuberculosis disease. As part of the antimicrobial response, macrophages, which are one of the most important cellular targets of the mycobacteria, generate reactive oxygen and nitrogen species causing nitro-oxidative damage to the biomolecules of *Mt*. As a response to this oxidative stress, the bacteria presents a wide battery of antioxidant responses that regenerate this damage, among which is methionine sulfoxide reductase A, that catalyzes the reduction of the *S* isomer of methionine sulfoxide present in proteins.

The catalytic cycle of this enzyme consists in three steps beginning with the reduction of Met-S-SO carried out by a reactive cysteine that is oxidized to sulfenic acid, releasing the reduced methionine. The second and third steps consist of an intramolecular disulfide formation between the sulfenic acid and a resolving cysteine followed by its reduction through the thioredoxin system.

In this Thesis several computational and experimental approaches were used such as fast and steady-state kinetics assays, accelerated and conventional molecular dynamics, electronic structure calculations, free energy profile determinations, protein-protein docking, and bioinformatic sequence analysis to completely characterize the enzymatic mechanism.

First, in this work we produced and purified recombinant *MtmsrA* and fully characterized its kinetic properties both in steady and pre-steady state conditions. The dynamic properties of *MtmsrA* in different oxidation/ionization states and binding to different ligands were characterized, obtaining results consistent with experimental evidence. Based on electronic structure calculations and free energy profile determinations, our results suggest that sulfenic acid formation goes through a single sulfonium intermediate unlike what was previously reported in the literature. Additionally, this reaction depends on acid-base catalysis by a conserved Histidine residue in the *msrA* subclass to which *MtmsrA* belongs. In sum, this work represents a detailed characterization of an important antioxidant enzyme of *Mt*.



## **Agradecimientos**

Fueron muchos y muy diversos los aportes contribuyeron a que este manuscrito existiera. Fue un proceso que inició en febrero de 2019, y finaliza (al menos en parte) hoy, pandemia mediante.

El primer agradecimiento es para mi Codirector de Tesis y Director Académico Ari. Ari ha sido (y es) un modelo a seguir de lo que debe ser un académico, del que aún me queda mucho por aprender y espero poder seguir recorriendo mi camino junto a él. Gracias por creer en mí, y permitirme crecer como científico.

En el mismo punto se encuentra Rafael, mi también Codirector de Tesis. Gracias por abrirme las puertas para trabajar en el departamento y en el CEINBIO. Por el espacio generado cada vez que lo necesité, por todos los consejos dados (tanto personales como académicos) que me ayudaron a estar donde estoy hoy.

En segundo lugar, a Madia. A Dario. quienes, de alguna forma, también oficiaron (y offician) como orientadores en mi camino académico. Desde lo experimental o lo computacional, siempre estuvieron ahí para discutir los resultados que han ido surgiendo, y con sus ideas permitieron que esta Tesis llegara hasta donde llegó.

En tercer lugar a Jonathan, por la incalculable ayuda que me brindó a lo largo de todos estos años. En un plano científico, académico y personal.

A Alfonso, Santiago, Sebastián, a la Plataforma de Bioquímica Computacional y Estructural, por motivarme a querer ser todos los días un poco mejor. Por las discusiones de resultados, los bizcochos y el café matutino.

A Bruno, por la invaluable ayuda en el análisis de secuencia.

En cuarto lugar a la gente que forma parte del Departamento de Bioquímica y del CEINBIO, toda. Un lugar se compone, principalmente, por su gente. Poder formarse en un ambiente sano y divertido es algo que no abunda. A su vez, es un espacio donde convergen diversas ópticas que enriquecen cada trabajo, incluyendo por supuesto, este.

En quinto lugar a la educación pública, la Universidad de la República en general y las Facultades de Medicina y Química en particular, por permitir y promover el desarrollo

científico en Uruguay. Al PEDECIBA y a la ANII, por apostar por los jóvenes investigadores y aportar los fondos que hicieron posible esta Tesis de Maestría.

Al tribunal, Oscar, Luciana, Marcelo. Por la buena voluntad y la disposición a la hora de corregir esta Tesis de Maestría.

A mis padres, a mi hermana, por estar siempre, en todo momento, en todo lugar. Por todo el cariño y amor brindado a lo largo de mi vida. Sin ustedes nada de esto sería posible o tendría sentido siquiera.

A mi abuela, a mi tía abuela, a mis tíos, mis primos. A toda mi familia. Por los almuerzos de domingo en familia. Por construir entre todos el tejido familiar que nos une, y nos hace ser imprescindibles en nuestras vidas.

A mis amigos del liceo, facultad, ex-compañeros de trabajo. Por todos los días, tardes, noches de compartir risas, alegrías, llantos, tristezas, todo.

Finalmente, a lo largo de la Tesis en particular, y de mi vida en general, me he ido realizando muchas preguntas. Y descubrí que la respuesta a todas ellas es la misma, Dani. A ella, por ser mi sostén, mi guía, mi compañera, mi todo.

# Índice

<b>1. Introducción y objetivos</b>	1
1.1 Mycobacterium tuberculosis	1
1.2 Metionina sulfóxido reductasa A	2
1.3 Ciclo catalítico de la metionina sulfóxido reductasa A	6
1.3 Objetivos	13
<b>2. Metodología</b>	14
2.1 Introducción a los métodos empleados	14
2.1.1 Muestreo	14
2.1.2 Introducción a la mecánica clásica	17
2.1.3 Introducción a la mecánica cuántica	19
2.1.4 Introducción a los métodos mixtos	26
2.1.5 Introducción a los métodos de muestreo avanzado	29
2.2 Métodos de esta tesis	33
2.2.1 Simulaciones de dinámica molecular convencional	33
2.2.2 Titulación de aminoácidos mediante simulaciones a pH constante	34
2.2.3 Simulaciones moleculares sesgadas, <i>Steered molecular dynamics</i> y <i>Umbrella sampling</i>	35
2.2.4 Cálculos de estructura electrónica	36
2.2.5 Simulaciones de dinámica molecular acelerada	37
2.2.6 Ensayos de <i>docking</i> proteína-proteína	37
2.2.7 Métodos experimentales	38
<b>3. Estructura, dinámica y estabilidad de la MtmsrA en diferentes estados de oxidación</b>	42
3.1 Caracterización de MtmsrA en solución y complejos enzima:sustrato	42
3.2 Caracterización de los diferentes intermediarios enzimáticos	50
3.3 Estudio de MtmsrA en el estado disulfuro	53
3.4 Obtención de MtmsrA recombinante pura	57
<b>4. Caracterización cinética del mecanismo catalítico de la MtmsrA</b>	60
4.1 Caracterización cinética en estado estacionario	60
4.2 Caracterización cinética en condiciones no catalíticas	64
4.3 Caracterización del primer paso del mecanismo catalítico de la MtmsrA	67
4.4 Caracterización del segundo paso del mecanismo catalítico de la MtmsrA	78
4.5 Caracterización del cierre disulfuro	84
<b>5. Conclusiones y perspectivas</b>	87
<b>6. Bibliografía</b>	89
<b>7. Contribuciones científicas</b>	99

## 1. Introducción y objetivos

### 1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis (tb) es una enfermedad “antigua” en términos de su documentación a través de la historia, y aún hoy representa un problema de salud incluso en países desarrollados con programas efectivos anti-tuberculosis<sup>1</sup>. Esta enfermedad se encuentra entre las 10 principales causantes de muerte por un único agente infeccioso y ataca principalmente los pulmones, aunque puede infectar otras regiones extra-pulmonares. Presenta una incidencia anual de aproximadamente 140 casos cada 100000 personas, y se estima que cerca del 25% de la población mundial se encuentra contagiada. El agente causante de la tb es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*, *M. tuberculosis*), un *actynomicete*, un grupo diverso de bacterias filamentosas gram positivas, y su principal vía de infección es mediante el aire por individuos contagiados por *M. tuberculosis* a individuos sanos<sup>2</sup>.

Es un patógeno que logra sobrevivir en células del hospedero (mayormente macrófagos), a pesar de la efectividad que presentan estas células en lidiar con una infección bacteriana, evitando la generación de una respuesta humoral efectiva por parte del sistema inmune. Luego de que es fagocitado por macrófagos, se mantiene retenido en vacuolas fagocíticas hasta que la célula muere por apoptosis o necrosis. Sin embargo, estas vacuolas son inaccesibles para el aparato lisosomal de la célula, gracias a una detención del proceso natural de maduración del fagosoma luego de ser fagocitado por macrófagos<sup>3,4</sup>.

Bajo circunstancias normales, la infección es tratada por el sistema inmune en un 90% de los casos, y la infección no provoca la enfermedad. Esto se debe a la producción de diferentes especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y del nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*) por el macrófago, entre los que se destacan el óxido nítrico (NO•) generado por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, EC. 1.14.13.39)<sup>5,6</sup>, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) generados por la acción de la NADPH oxidasa (NOX, EC.1.6.3.1)<sup>7</sup>, o peroxinitrito (ONOOH) generado bajo la acción de ambas. Las RS (del inglés, *reactive species*) son muy tóxicas para la bacteria debido al daño directo que pueden generar sobre sus biomoléculas o indirectamente mediante la oxidación del *pool* de sus precursores<sup>8</sup>. La supervivencia del parásito va entonces a depender del nivel de

producción de RS por parte de las células del hospedero como respuesta antimicrobiana y de la robustez del sistema antioxidante del patógeno<sup>9</sup>.

*M. tuberculosis* ha desarrollado diversos mecanismos de supervivencia que le permiten eliminar de forma eficiente estas especies oxidantes, como también sistemas de reparación de biomoléculas oxidadas. Expresa varias enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas (SOD, EC 1.15.1.1), catalasa peroxidasa (EC 1.11.1.6) y peroxirredoxinas (EC 1.11.1.15) con la capacidad de neutralizar las RS generadas por el macrófago. También presenta proteasas con la capacidad de reciclar proteínas dañadas por las RS y proteínas con la capacidad de restaurar el daño generado por estas RS ya sea a nivel proteico o de ácidos nucleicos.

En proteínas, el átomo con mayor susceptibilidad a la oxidación es el azufre, presente en los aminoácidos cisteína, metionina y diversos grupos prostéticos. La exposición a RS lleva a la formación de enlaces disulfuros o estados de mayor oxidación de la cisteína y la generación de sulfóxidos de metionina. No todas las metioninas son susceptibles de oxidación, siendo las metioninas expuestas al solvente y presentes en estructuras flexibles los más propensos a oxidarse. Se ha planteado que la oxidación de metioninas, al igual que la oxidación de cisteínas, presenta un rol regulatorio, aunque hasta la fecha la única oxidasa reportada es la monooxigenasa MICAL<sup>10,11</sup>.

La oxidación de metionina en sulfóxido de metionina genera la formación de los epímeros metionina-(*R/S*)-sulfóxido en cantidades equimolares. Actualmente se conocen seis clases diferentes de metionina sulfóxido reductasas (msr), tres msr bacterianas dependientes de molibdeno<sup>12</sup>, MsrP (EC 1.8.5.B1), DmsA (EC 1.8.5.3) y BisC (EC 1.97.1.9) y tres msr dependientes de tioles msrA (EC 1.8.4.11), msrB (EC 1.8.4.12) y msrC (EC 1.8.4.14), encontrándose estas últimas conservadas en todos los órdenes de la vida y presentes en prácticamente todos los organismos. Esta Tesis de Maestría está centrada en la caracterización de la msrA de *Mycobacterium tuberculosis*.

## **1.2 Metionina sulfóxido reductasa A**

La péptido-metionina sulfóxido reductasa A o metionina sulfóxido reductasa A (msrA) es una proteína ubicua de aproximadamente 25 kDa presente en todos los órdenes de la vida. Esta enzima se describió por primera vez en 1981 por Brot y colaboradores a partir de un extracto

de *Escherichia coli* con capacidad de regenerar la actividad de una proteína ribosomal, L12, previo a perderla debido a la oxidación de residuos de metionina presentes en su estructura<sup>13</sup>. Luego, en 1992 Rahaman y colaboradores lograron clonar, secuenciar y expresar la msrA perteneciente a *Escherichia coli*<sup>14</sup>, y en los años venideros se expresó y estudió con éxito la msrA perteneciente a diversos organismos.

Si bien hasta la fecha no existen estudios exhaustivos sobre la clasificación filogenética de la msrA, desde un punto de vista estructural y funcional esta enzima puede dividirse en cuatro subclases o tipos según el número y localización de sus cisteínas reactivas<sup>15,16</sup>; **i**) en primer lugar se encuentran las proteínas con una única cisteína (o selenocisteína) reactiva en la posición 51, conocida como CysA (numeración basada en la secuencia de la msrA de *Escherichia coli*)<sup>17,18</sup>, **ii**) luego están las msrA que presentan dos cisteínas reactivas en posición 51 y 54<sup>19</sup> (CysD) o **iii**) o en las posiciones 51 y 198 (CysB) y finalmente **iv**) se encuentran las proteínas con tres cisteínas catalíticas ubicadas en posiciones 51, 198 y 206 (CysC)<sup>20,21</sup>. A su vez, es posible encontrar proteínas que presentan un dominio msrA fusionado a un dominio msrB, generalmente en bacterias<sup>22-24</sup>, así como con un dominio Trx o PilB. En algunos organismos, la cisteína que inicia el proceso de reducción se ve sustituida por una selenocisteína, aunque poco se ha profundizado sobre estas proteínas<sup>25</sup>. Finalmente, en organismos con varias isoformas de esta proteína (particularmente se observa en diversas plantas) existe un subgrupo que carece de cisteínas catalíticas, cuya función es desconocida, aunque parece actuar negativamente para la selección del individuo<sup>26</sup>.

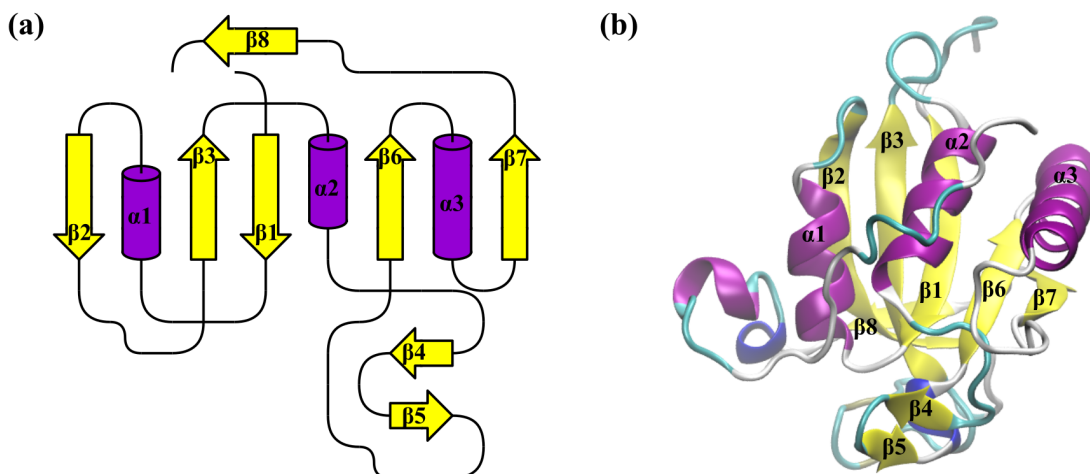
Se ha descrito que la ausencia de esta proteína en mamíferos induce una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y reduce la sobrevivencia tanto en condiciones normales como con elevados niveles de ROS<sup>27</sup>, otorgándole un rol regulador frente a la respuesta al estrés oxidativo. Estudios recientes determinaron que esta enzima se encuentra regulando la actividad de la piruvato quinasa 2 (EC 2.7.1.40), y que su supresión, por ejemplo, bajo condiciones de estrés oxidativo, es promotor de cáncer pancreático<sup>28</sup>.

En plantas el rol de las msr es bastante complejo debido al elevado nivel de isoformas presentes en cada organismo; por ejemplo, tanto *Arabidopsis thaliana* como *Salsnum lycopersium* presentan cinco isoformas de metionina sulfóxido reductasa A con diferente localización y función asociada<sup>29-31</sup>.

Esta enzima no sólo presenta un rol como antioxidante, sino que en diferentes patógenos extracelulares como *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* o *Neisseria gonorrhoeae* asiste en la adhesión al tejido del hospedero<sup>32</sup>. Esto también fue confirmado para patógenos intracelulares como *Mycoplasma genitalium*<sup>33</sup>, o *Mycobacterium tuberculosis*, donde la generación de cepas que carecen de estas enzimas presentan una mayor susceptibilidad a la muerte debido a NO<sub>2</sub> o HClO, evidenciando la relevancia en la protección de estas enzimas al patógeno frente al daño oxidativo<sup>34</sup>.

La *msrA* presenta un dominio estructural denominado PMSR o PF01625 (del inglés *peptide methionine sulfoxide reductase*), que corresponde a un plegamiento tipo  $\alpha\beta$  con una lámina beta central rodeada por alfa hélices<sup>17,20-24</sup>. Si bien el dominio PMSR presenta algunas similitudes estructurales y funcionales con la tiorredoxina y el plegamiento tipo tiorredoxina (particularmente las *msrA* pertenecientes a la subclase ii), no presentan ancestría evolutiva y representa un ejemplo de coevolución y convergencia evolutiva<sup>35</sup>.

Hasta el momento se ha determinado experimentalmente la estructura de la *msrA* perteneciente a 13 organismos diferentes repartidos en los diferentes grupos mencionados anteriormente. En todas ellas se observa que la lámina beta central está formada por cinco hojas beta ( $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 1$ - $\beta 6$ - $\beta 7$ ) orientadas en forma antiparalela a excepción de la interfaz formada entre  $\beta 6$ - $\beta 7$ . Entre  $\beta 2$ - $\beta 3$ ,  $\beta 1$ - $\beta 6$  y  $\beta 6$ - $\beta 7$  se insertan  $\alpha$ -hélices,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  respectivamente. Finalmente entre  $\beta 4$ - $\beta 5$  también se inserta una horquilla  $\beta$ . A partir de esta lámina central salen diferentes  $\alpha$ -hélices, tal como se muestra en la **Figura 1.2.1** A su vez puede presentar diferentes inserciones en este plegamiento.



**Figura 1.2.1** Estructura de *msrA*. (a) Diagrama topológico y (b) estructura 3D (PDB ID: 1NWA).

El sitio activo de la enzima corresponde a un bolsillo ubicado entre la hélice  $\alpha 1$ , las hojas beta  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 6$  y algunos *loops* especialmente próximos a estos, y está formado por las cadenas laterales de los aminoácidos pertenecientes a la secuencia consenso GCFWC/G del extremo N-terminal<sup>36</sup>, así como un ácido glutámico, un ácido aspártico y dos tirosinas próximas espacialmente a esta secuencia consenso. Finalmente también contiene la secuencia PNGYCH en el extremo C-terminal, que contiene una segunda cisteína requerida para la catálisis. Esto se determinó a partir de ensayos de mutagénesis dirigida, donde la alteración de diferentes aminoácidos mencionados anteriormente reduce drásticamente la actividad de la enzima, perdiendo incluso su capacidad catalítica<sup>22,36,37</sup>.

El ciclo catalítico que lleva a cabo esta enzima consta de una mitad oxidativa y una reductora, como se muestra en la **Figura 1.3.1**<sup>22,36,38,39</sup>. Éste puede resumirse en el ataque nucleofílico por parte de la cisteína del motivo GCFWG/C, formando un intermediario covalente que colapsa en un ácido sulfénico<sup>38</sup>, liberando en el proceso al producto. A continuación, prosigue una reacción de condensación por parte de una segunda cisteína y en las msrA del grupo iii) una serie de intercambios tiol-disulfuro<sup>39</sup>. Finalmente, el disulfuro es reducido por un reductor, generalmente tiorredoxina, para iniciar nuevamente un ciclo catalítico. Los parámetros cinéticos de la mitad oxidativa para esta enzima en diferentes especies se encuentran depositados en la **Tabla 1.2.1**.

Los valores de  $K_M$  depositados en la **Tabla 1.21** son muy diversos para los diferentes sulfóxidos estudiados, y globalmente se encuentran en el rango de 0.002-19 mM. La comparación de  $k_{cat}/K_M$  en los sistemas enzimáticos evaluados con más de un sustrato evidencia que el motivo NAc- genera una mayor selectividad por el sustrato frente al motivo H. En la bibliografía se propuso que algunos residuos conservados interaccionan específicamente con enlaces amida, explicando esta mayor selectividad. La generación de mutaciones dirigidas de residuos conservados de *NmmsrA*, como el Asp82 (numeración en base a la secuencia de *MtmsrA*), disminuyeron la  $K_M$  pero no así la  $k_2$  determinada para el proceso catalítico<sup>22</sup>. Esta evidencia sumada a las diferentes cristalográficas obtenidas de la proteína acomplejada con un péptido<sup>17</sup> apoyan la hipótesis del reconocimiento específico no ocurre únicamente mediante el motivo (S)-SO, sino también el reconocimiento de enlaces peptídicos.



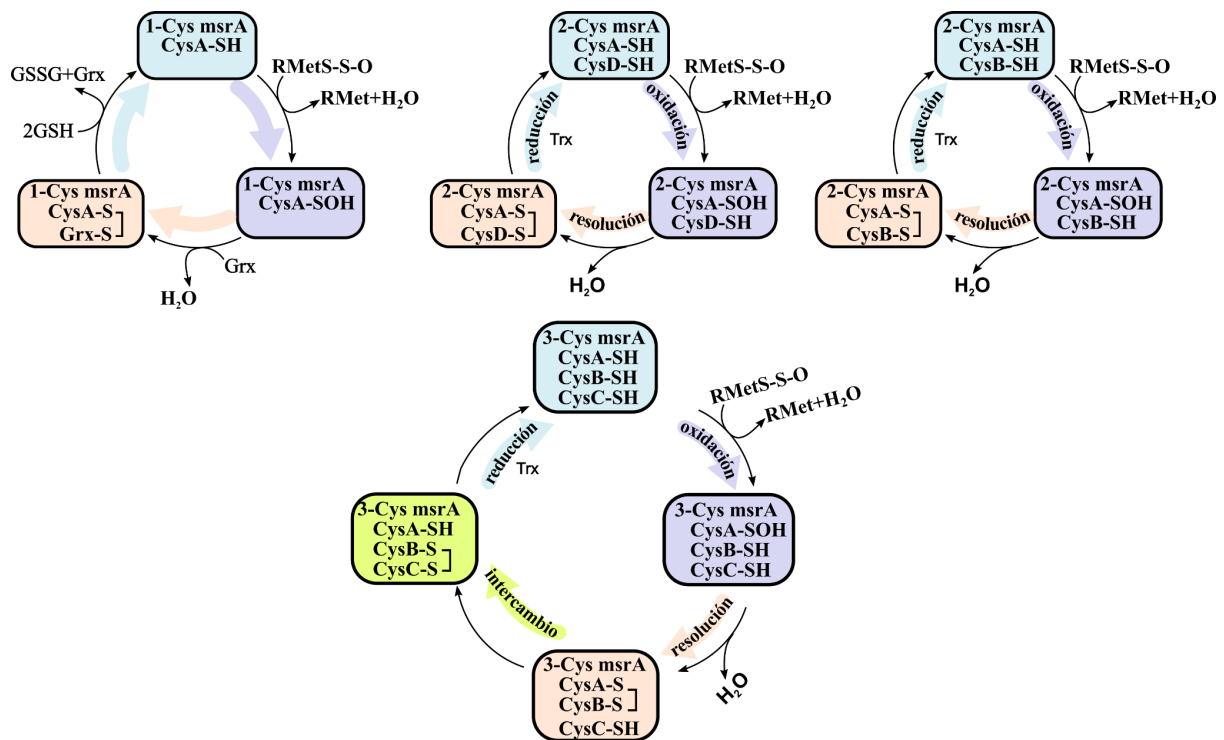
**Tabla 1.2.1** Parámetros enzimáticos de msrA de diferentes organismos para diferentes sustratos

Especie	Tipo	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Condiciones
<b>NAcMetSO</b>					
<i>N. meningitidis</i> <sup>40</sup>	2	3.4	0.6	5.6x10 <sup>3</sup>	pH 8, 25°, 100 μM CrTrx
<i>M. tuberculosis</i> <sup>34</sup>	2	2.6	1.6	1.6x10 <sup>3</sup>	pH 8, 25°, 40 μM EcTrx
<b>MetSO</b>					
<i>N. meningitidis</i> <sup>40</sup>	2	2.5	2.1	1.2x10 <sup>3</sup>	pH 8, 25°, 200 μM CrTrx
<i>M. tuberculosis</i> <sup>34</sup>	2	2.4	4.3	0.6x10 <sup>3</sup>	pH 8, 25°, 40 μM EcTrx
<i>P. trichocarpa</i> <sup>41</sup>	3	0.3	0.24	1.2x10 <sup>3</sup>	pH 8, 25°, 0-250 μM TdTrx
	3	1.2	0.38	3.2x10 <sup>3</sup>	pH 8, 25°, 0-250 μM TdTrx
<i>T. spp</i> <sup>42</sup>	2	0.52	0.723	0.7x10 <sup>3</sup>	pH 7.5, 30°, 0.5-20 μM TdTrx
<i>C. diphtheriae</i> <sup>43</sup>	3	0.10	0.085	1.2x10 <sup>3</sup>	pH 7.5, 37°, 3 y 6 μM CgTrx
	3	0.02	0.002	1.1x10 <sup>2</sup>	pH 7.5, 37°, 2 μM TdMrx
<i>E. coli</i> <sup>15</sup>	3	3.7	1.9	2.0x10 <sup>3</sup>	pH 8, 25°, 40 μM EcTrx
<i>S. pneumoniae</i> <sup>23</sup>	3	0.80	0.86	0.9x10 <sup>3</sup>	pH 8, 25°, 40 μM EcTrx
<i>T. kodakaraensis</i> <sup>44</sup>	4		19		pH 7.0, 100 mM DTT
<b>Dabsyl-MetSO</b>					
<i>T. denticola</i> <sup>45</sup>	2	0.12	0.18	0.7x10 <sup>3</sup>	pH 7.5, 37°, 10 μM TdTrx
<i>M. mucus</i> <sup>46</sup>	3	0.28	0.34	0.8x10 <sup>3</sup>	pH 7.5, 37°, 20 mM DTT
<i>C. elegans</i> <sup>47</sup>	3	0.06	1.18	0.5x10 <sup>2</sup>	pH 7.4, 37°, 20 mM DTT
<i>C. spp</i> <sup>18</sup>	4	84	10.2	8.2x10 <sup>3</sup>	pH 7.5, 37°, 20 mM DTT
<i>D. melanogaster</i> <sup>48</sup>	3	0.04	1.4	2.9x10 <sup>1</sup>	pH 7.5, 37°, 20 mM DTT

### 1.3 Ciclo catalítico de la metionina sulfóxido reductasa A

Una vez que se encuentra formado el complejo de Michaelis, el motivo (S)-SO del sulfóxido es estabilizado mediante enlaces de hidrógeno por la Tyr44, Glu52 y Tyr92 (numeración en base a la secuencia de *MtmsrA*). El mecanismo catalítico fue descrito en primera instancia por Boschi-Muller y colaboradores<sup>38</sup>, proponiendo un esquema de varias etapas basado en la

química del ácido sulfénico (-ROS(H)), producto de oxidación por dos electrones del tiol, que forma parte del mecanismo catalítico presente en varias enzimas<sup>49</sup>. El mecanismo, a grandes rasgos, es compartido por las cuatro subfamilias de msrA. En primer lugar la Cys reactiva realiza un ataque nucleofílico sobre el azufre del motivo (S)-SO en el sustrato oxidante llevando a la formación de un ácido sulfénico en dicha Cys y a la liberación del producto correspondiente. A continuación, la Cys resolutive resuelve el ácido sulfénico para formar un enlace disulfuro intramolecular entre ambas cisteínas. En el caso de las msrA con más de dos cisteínas reactivas, como el caso de la msrA de *E. coli* o *B. taurus*, existe un intercambio tiol-disulfuro entre la segunda cisteína resolutive sobre el disulfuro formado, generando un nuevo enlace disulfuro entre ambas cisteínas y liberando a la cisteína que inicia el proceso reactivo<sup>15,41</sup>. Este disulfuro debe ser reducido para comenzar un nuevo ciclo catalítico. Estas posibilidades mecánísticas se muestran en la **Figura 1.3.1**:

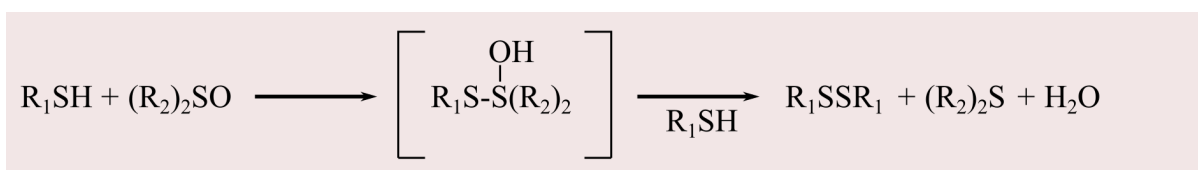


**Figura 1.3.1** Mecanismo catalítico de las diferentes subclases de msrA.

La cisteína reactiva debe encontrarse en su forma de tiolato para que realice el ataque nucleofílico sobre el sustrato. Estudios en la msrA de *Mus musculus* (*MmmsrA*) y *Neisseria meningitidis* (*NmmsrA*) demostraron mediante diferentes técnicas que el  $pK_a$  de esta cisteína puede verse enormemente afectado por el entorno<sup>22,37</sup>, particularmente por el Glu94, el cual se encuentra en su estado neutro a pH fisiológico. Si bien el  $pK_a$  de la cadena lateral de este

residuo aislado en solución se encuentra en 4.4, existen ejemplos de otros sistemas con un ácido glutámico en este estado<sup>50</sup> e incluso estabilizando una cisteína<sup>51</sup>.

La oxidación de tioles por sulfóxidos fue ampliamente abordada por la fisicoquímica orgánica sintética<sup>52-55</sup>, destacando el trabajo realizado por Snow y colaboradores<sup>52</sup> donde se estudió el mecanismo de reacción, encontrando una dependencia de la constante de reacción con el pH y con el entorno de los enlaces -SO y -S(H). A su vez, la presencia de ácidos, base o metales generan catálisis ácido-base específica<sup>55</sup>. Originalmente se planteó que siguen el siguiente esquema, pasando por un aducto entre el tiol y el sulfóxido:



**Figura 1.3.2.** Mecanismo de oxidación de tioles por sulfóxidos planteado por Wallace y colaboradores<sup>55</sup>.

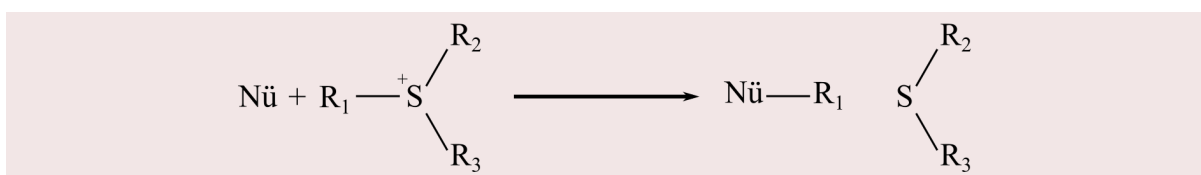
Si bien se conocía que la etapa limitante de la reacción presentada en la **Figura 1.3.2** es el ataque del tiol al sulfóxido para generar el aducto, el mecanismo a nivel atómico así como la naturaleza química de este aducto no fue descrito hasta 2006, donde Balta y colaboradores estudiaron el mecanismo de oxidación de tioles por DMSO utilizando métodos computacionales basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés *density functional theory*)<sup>56</sup>. En este trabajo, los autores describen un mecanismo mediante el cual el aducto descrito por en los trabajos de Waller y colaboradores corresponde a un sulfurano, una especie hipervalente del azufre, para luego decaer en forma competitiva o en ácido sulfénico o en disulfuro mediante la asistencia ácido-base de un segundo tiol.

Un sulfurano corresponde a una especie  $SR_4$  o  $SR_6$ , siendo los primeros conocidos como  $\sigma$ -sulfuranos cuya estructura molecular es la de una bipirámide trigonal donde los pares solitarios del azufre ocupan la posición ecuatorial. Las posiciones axiales son ocupadas por los ligandos de mayor electronegatividad, mientras que los dos restantes ocupan las posiciones ecuatoriales libres. El átomo de azufre central se encuentra en un enlace de tres centros y cuatro electrones<sup>57</sup>.

En 2011 Thiriot y colaboradores<sup>58</sup> describieron por primera vez el mecanismo a nivel atómico de la msrA utilizando una metodología similar a la empleada por Balta y colaboradores<sup>56</sup>. En

este caso se realizó una aproximación de *cluster* del sitio activo, describiendo que la oxidación del tiol proteico y correspondiente reducción del sulfóxido ocurre mediante una doble transferencia de protones de forma asincrónica al sulfóxido, obteniendo como producto final el ácido sulfénico. El valor de la barrera en términos de energía libre fue 4 veces menor al reportado en solución para este proceso. Al igual que en el trabajo de Balta y colaboradores, en este trabajo se describe la formación de un segundo intermediario, el catión sulfonio, previo al ataque sobre él por parte de una molécula de agua para formar el ácido sulfénico.

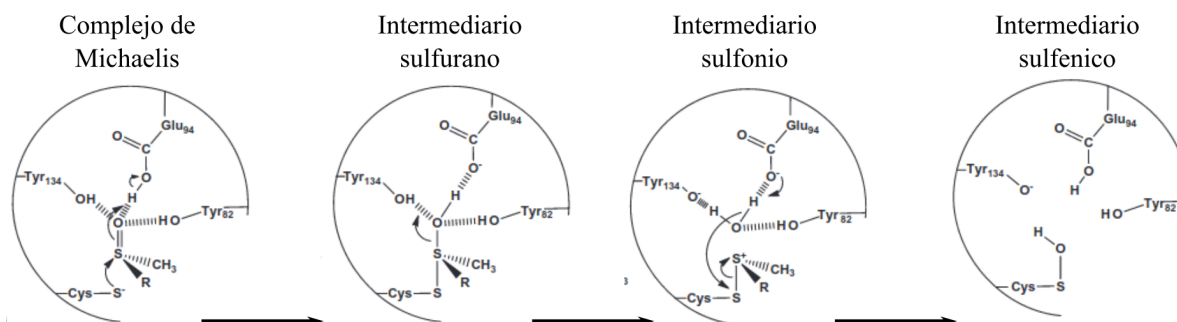
El catión sulfonio o sulfonio es una especie deficiente en electrones menos estable que su correspondiente análogo con oxígeno, el oxonio. En general, la química de estos compuestos es dominada por su tendencia a formar sulfuro<sup>59</sup>, pero al combinarse con nucleófilos simples, los sulfonios realizan fácilmente una sustitución nucleofílica, tal como se muestra en el siguiente esquema:



**Figura 1.3.3.** Sustitución nucleofílica del sulfonio.

Finalmente, en 2013, Dokainish y colaboradores<sup>60</sup> realizaron los primeros estudios mecanísticos empleando dinámica molecular y cálculos híbridos cuántico/clásicos QM/MM (del inglés, *quantum mechanics/molecular mechanics*) encontrando resultados consistentes con el modelo de *cluster* empleado por Thiriot y colaboradores años atrás.

En suma, estos trabajos llevaron a que el mecanismo catalítico empleado por las msrA sea el siguiente:



**Figura 1.3.4** Mecanismo catalítico de la msrA. Figura adaptada de Boschi-Muller y colaboradores<sup>61</sup>.

La formación de tres intermediarios enzimáticos previo a la formación del disulfuro fue propuesta tanto para *msrA* como *msrB*<sup>62</sup>, aunque existe controversia en la resolución del sulfonio. Mientras que Robinet y colaboradores proponen que la cisteína resolutive ataca directamente el catión sulfónio<sup>62</sup>, Niers y colaboradores subrayan que este trabajo plantea inconsistencias entre los resultados computacionales y la observación experimental.

A su vez, Lim y colaboradores demostraron mediante ensayos de espectrometría de masas con solvente y sustrato marcados con O<sup>18</sup> que la incorporación del átomo de oxígeno a nivel de la cisteína catalítica ocurre vía solvente, consistente con la formación de un sulfénico, cuyo origen proviene del solvente y no del sustrato<sup>63</sup>, apoyando que la resolución del sulfonio es mediante una molécula de agua, generando un intermediario sulfénico.

En este trabajo los autores caracterizaron la actividad oxidasa estereoespecífica por parte de las *msrA* de la subclase 4, donde los autores plantearon que una vez formado el enlace disulfuro entre las CysB y CysC, la CysA se encuentra libre para reducir una segunda molécula de metionina oxidada mediante el mecanismo descrito anteriormente, y que éste sulfénico presenta la capacidad de auto-oxidar residuos de metionina libres o presentes en su estructura. En trabajos posteriores Lim y colaboradores evidenciaron que esta enzima puede oxidar residuos de metionina en la calmodulina, proteína de gran relevancia en la contracción del músculo liso<sup>64</sup>, resaltando un nuevo nivel de regulación. Por otra parte, Kriznik y colaboradores<sup>65</sup> demostraron que la actividad oxidasa de *MmmsrA*, enzima perteneciente a este subgrupo, presenta dicha actividad en presencia de un sistema reductor dependiente de tiorredoxina (*trx*, EC 1.8.4.6) y tiorredoxina reductasa (*TR*, EC 1.8.1.9). Posteriormente, en ensayos con *DmmsrA* como miembro de la subclase 3, Tarafdar y colaboradores demostraron que este subgrupo carece de actividad oxidasa<sup>66</sup>. En este mismo trabajo se generaron quimeras entre la región N-terminal proveniente de *MmmsrA* y la C-terminal de *DmmsrA*, observando ahora sí actividad oxidasa, por lo que los autores concluyen que dicha actividad se encuentra en la región N-terminal.

Mediante ensayos de RMN en solución de *MmmsrA*, Coudevylle y colaboradores determinaron que la oxidación induce grandes cambios conformacionales cercanos al sitio activo, principalmente en el entorno de la horquilla beta formada por  $\beta 4$ - $\beta 5$ <sup>67</sup>. A su vez, Ranaivoson y colaboradores estudiaron los cambios estructurales de *NmmsrA* a lo largo del

ciclo catalítico, observando estos mismos cambios cuando la enzima se encuentra completamente oxidada y no cuando la CysA se oxida a ácido sulfénico<sup>68</sup>.

Una vez que la proteína se encuentra oxidada a disulfuro, es reducida por diferentes vías reductoras, que varía con la subclase de msrA. Inicialmente se describió que era reducida mediante por la vía de la tiorredoxina<sup>39</sup>, aunque diversos trabajos evidenciaron que también puede ser reducida por la vía de la micorredoxina, cuando ésta se encuentra presente en el organismo<sup>69</sup>, o por la vía de la glutarredoxina<sup>70</sup>. Esta última vía es de gran relevancia en el caso de las msrA de 1-Cys. A continuación, se describen los parámetros enzimáticos descritos hasta el momento para este proceso:

**Tabla 1.3.1** Parámetros enzimáticos de reducción de msrA de diferentes organismos para diferentes sustratos

Especie	Tipo	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Condiciones
<b>Tiorredoxina</b>					
<i>N. tabacum</i>		0.048	0.04	1.2x10 <sup>3</sup>	pH 8.0, 37°
<i>E. coli</i>	3	10	0.01	3.0x10 <sup>5</sup>	pH 8.0, 37°
<i>S. lycopersicum</i> <sup>71</sup>	3	0.003	0.15	4.6x10 <sup>4</sup>	pH 8.0, 28°
<i>P. trichocarpa</i>	3	18	0.3	1.7x10 <sup>4</sup>	pH 8.0, 30°
	3	15	1.2	8.9x10 <sup>4</sup>	
<b>Triparrredoxina</b>					
<i>T. cruzi</i>	2	0.52	0.013	2.4x10 <sup>4</sup>	pH 7.5, 30°
<b>Glutarredoxina</b>					
<i>C. ormelandii</i> <sup>70</sup>	1	4.5	0.25	1.8x10 <sup>4</sup>	pH 7.5, 37°
<b>DTT</b>					
<i>T. kodakaraensis</i> <sup>44</sup>	4	-	17	-	pH 7.5, 37°
<i>C. ormelandii</i>	1	10	0.84	1.2x10 <sup>4</sup>	pH 7.5, 37°

La eficiencia catalítica con la que la tiorredoxina reduce a la msrA es inferior a lo observado con otros sustratos de ésta enzima, como las peroxirredoxinas, cuyos valores de  $k_{cat}/K_M$  se encuentra en el rango de 1x10<sup>4</sup>-1x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> <sup>72</sup>. El rango determinado de  $k_{cat}/K_M$  para msrA es conservado a lo largo de la evolución, tal como se evaluó al emplear diferentes tiorredoxinas

ancestrales<sup>73</sup>. Ma y colaboradores describieron la estructura cristalográfica del complejo formado entre *ScmsrA* y *ScTrx2*, así como la estructura de *ScmsrA* en su estado reducido y oxidado<sup>74</sup>. En este trabajo, los autores confirmaron para otra *msrA* los cambios conformacionales sufridos a la altura de  $\beta 4$ - $\beta 5$  observados post-oxidación, y postulan que la desorganización de esa región facilita el reconocimiento por parte de *ScTrx2*<sup>74</sup>, aunque la interacción no ocurre mediante la formación de ese parche hidrofóbico, sino mediante un parche escondido en la región C-terminal que se vuelve accesible a *ScTrx2* mediante un *induced-fit*.

A lo largo del desarrollo de esta Tesis de Maestría en Química se abordó la caracterización completa del mecanismo catalítico de la enzima *MtmsrA* empleando diversas técnicas computacionales y experimentales.

Brevemente, en primer lugar se caracterizó el comportamiento dinámico de la enzima empleando simulaciones de dinámica molecular en diferentes estados redox relevantes para el ciclo catalítico, identificando cambios estructurales consistentes con lo reportado previamente en la bibliografía y con los resultados de dicroísmo circular. A su vez, se caracterizaron diferentes complejos moleculares, encontrando una base atomística que explique el amplio espectro de sustratos que presenta esta enzima. Finalmente, se describió en forma detallada el mecanismo catalítico mediante cálculos de estructura electrónica, simulaciones QM/MM y experimentos en estado pre-estacionario y estacionario.

### 1.3 Objetivos

El objetivo general de esta Tesis de Maestría es el estudio de las diferentes etapas del ciclo catalítico de la enzima *msrA* del patógeno *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de diversas metodologías computacionales y experimentales. Como objetivos específicos se plantean:

- #1.** Caracterizar la dinámica en solución del complejo de Michaelis y los cambios inducidos en *MtmsrA* debido a la unión de un sulfóxido de origen proteico.
- #2.** Determinar el mecanismo de reacción de la reducción de Met-SO a Met llevado a cabo por *MtmsrA*, racionalizando el rol de los diferentes residuos claves en esta etapa del ciclo catalítico y determinar experimentalmente la energía libre de activación de la etapa de oxidación de *MtmsrA*.
- #3.** Elucidar los factores estructurales asociados al cambio conformacional y la formación del enlace disulfuro en la enzima.
- #4.** Estudiar la formación del complejo *MtmsrA:MtrxC*, determinando los residuos claves en dicha interacción, así como el mecanismo de reducción de la enzima.

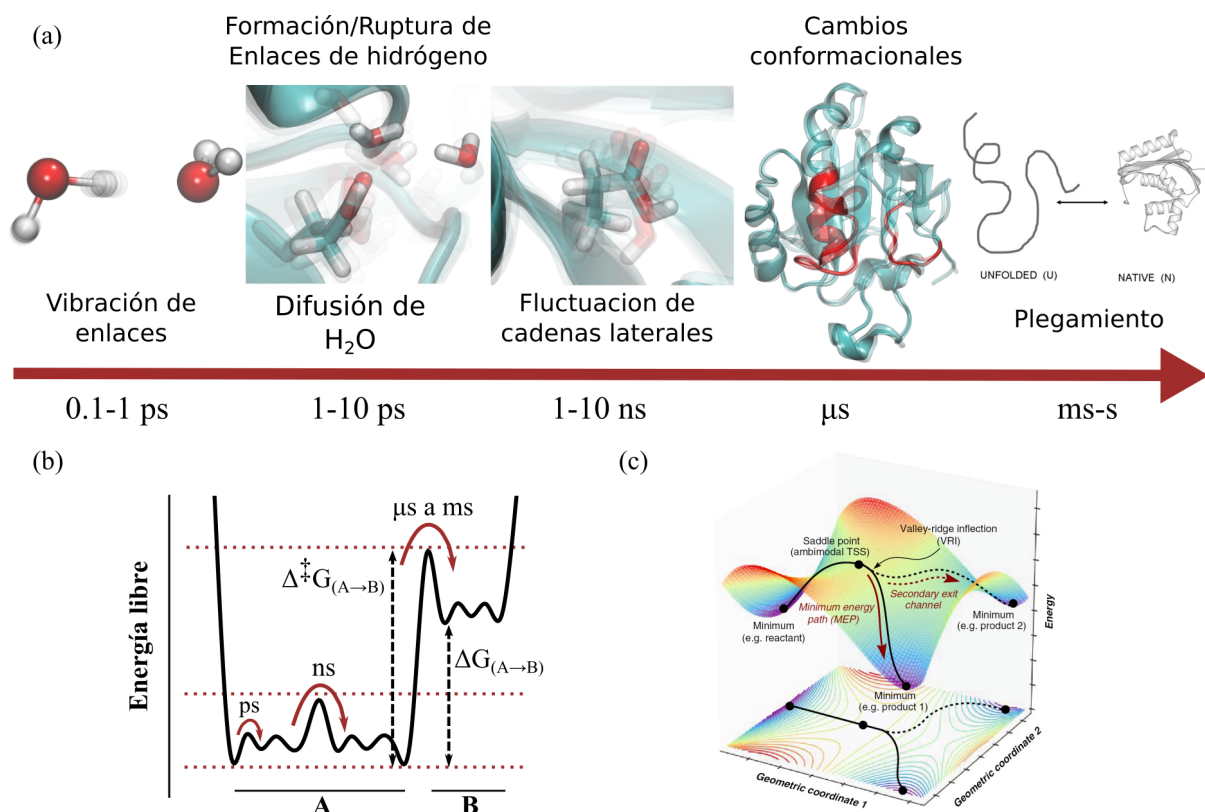


## 2. Metodología

### 2.1 Introducción a los métodos empleados

#### 2.1.1 Muestreo

A partir de la biología estructural se ha construido una visión relativamente estática de las proteínas, existiendo en un estado “bien” plegado (nativo) y uno desplegado (no nativo). Esta visión suele llevar a una mala interpretación de la dinámica existente en ellas, bien caracterizada mediante diferentes ensayos, entre los que se incluyen los intercambios de hidrógeno-deuterio<sup>75</sup>. En muchos casos estos procesos dinámicos se vinculan directamente con la función que lleva a cabo la macromolécula, como la liberación del O<sub>2</sub> por parte de la hemoglobina o los grandes cambios estructurales que tienen lugar en la calmodulina cuando libera el Ca<sup>2+</sup> para generar la contracción en el músculo liso<sup>76,77</sup>. La relación entre función y dinámica estructural existente en proteínas permite la modulación de diferentes vías biológicas.



Las proteínas presentan una larga lista de diferentes movimientos y eventos conformacionales que ocurren a diferentes escalas temporales, tal como se indica en la **Figura 2.1.1.1(a)**, que involucran desde movimientos locales hasta colectivos<sup>80</sup>. La vibración de enlaces suele tener un tiempo característico de femtosegundos ( $10^{-15}$  s), la rotación de cadenas laterales y movimientos de *loops* ocurre en el entorno de los pico- ( $10^{-12}$  s) y nanosegundos ( $10^{-9}$  s), mientras que movimientos colectivos que involucren un mayor número de átomos, como un cambio conformacional, interacción con un ligando o su propio plegamiento ocurre en escalas de tiempo superiores, característico de cada sistema biológico. Estos movimientos suelen ser inducidos o bien por un cambio en su entorno (cambios de pH, temperatura u otro agente molecular) o a un movimiento intrínseco de la proteína.

Todos estos fenómenos pueden entenderse bajo un modelo de *energy-landscape* o *landscape* (del inglés, paisaje energético)<sup>81,82</sup>, como se muestra en la **Figura 2.1.1.1(b)**, descrito inicialmente en mioglobinas, donde los diferentes estados conformacionales del *landscape* se encuentran en equilibrio térmico que puede verse afectado por diversos agentes, como la unión de diferentes sustratos. Cada proteína puede entenderse como un *landscape* multidimensional dependiente de temperatura, presión, y condiciones del solvente, que al verse afectado alguno de estos parámetros, consecuentemente se afecta el *landscape* de la proteína.

Una forma de describir este *landscape* es mediante una superficie de energía libre, la cual guarda relación con su superficie de energía potencial (SEP), una función escalar que define el valor de la energía potencial del sistema en función de las coordenadas nucleares. La dimensionalidad de esta superficie es de  $3N$ , siendo  $N$  el número total de átomos. Esta superficie presenta mínimos relativos, absolutos y puntos de silla de primer orden que corresponden a especies estables y estados de transición o TS (del inglés, *transition state*) respectivamente. Conociendo completamente la superficie de energía potencial se puede obtener toda la información cinética y termodinámica del sistema. Con la excepción de sistemas extremadamente simples, la SEP es una función multidimensional altamente compleja imposible de evaluar en las configuraciones de interés. Sin embargo, cabe destacar que aun en los casos más complejos, se encuentra bien definida.

Una forma de explorar la SEP es mediante la optimización de geometría, que consiste en considerar a la SEP como una función  $S\{\mathbf{q}\}$ , donde  $\{\mathbf{q}\}$  son las coordenadas espaciales, en lo cual se quiere encontrar un mínimo o un punto de silla de primer orden.

$$\frac{dS}{dq_i} = 0 \text{ con } i = 1, 2, 3... 3N \quad \text{ec. 2.1.1.1}$$

Existen varias familias de métodos que resuelven la **ecuación 2.1.1.1**, entre ellos los métodos que utilizan la energía y el gradiente (Steepest descent SD, Conjugated gradient CG), otros que además de estos parámetros involucran la matriz Hessiana (Newton—Raphson NR) y finalmente métodos que emplean la energía, el gradiente y la matriz Hessiana (cuasi—Newtoniano) donde la matriz Hessiana se aproxima mediante el gradiente de los puntos anteriores de la búsqueda.

Otra representación posibles de los estados de un sistema se obtiene mediante la construcción de un diagrama del espacio de fase de éste, donde cada posible estado se representa como un punto de un hiperespacio formado por la combinación del momento y la posición correspondiente a dicho estado. Todos los posibles microestados de un sistema están contenidos dentro del espacio de fase.

Uno de los postulados centrales de la termodinámica estadística establece que el promedio temporal de una variable de un sistema termodinámico es equivalente al promedio del *ensemble* en el espacio de fase, que representa el promedio sobre el valor instantáneo de dicha variable para cada miembro del ensemble cuando  $\eta \rightarrow \infty$ . Esto implica que para cualquier variable termodinámica el promedio determinado mediante el muestreo de todo el ensemble a cada momento en el tiempo es equivalente al promedio temporal de dicha variable obtenida de un miembro del *ensemble*. Este postulado es también conocido como hipótesis ergódica<sup>83</sup>. Esto es:

$$\bar{a} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \sum_0^{\tau} dt a(x_t) \quad \text{ec. 2.1.1.2}$$

De esta forma, el estudio de la evolución temporal de un sistema otorga información sobre el espacio conformacional del mismo, lo cual resulta mucho más eficiente que muestrear el espacio de fase completo del sistema.

Una forma de realizar esto es mediante la construcción de la evolución temporal de un sistema mediante la resolución de las leyes del movimiento de Newton. La trayectoria de dinámica molecular (MD, por su sigla en inglés *molecular dynamics*) se obtiene mediante:

$$\begin{aligned} d\mathbf{x} &= M^{-1}\mathbf{p}dt \\ d\mathbf{p} &= -\nabla_{\mathbf{x}}U(\mathbf{x})dt \end{aligned} \quad \text{ec. 2.1.1.3}$$

donde  $M^{-1}$  corresponde a la matriz diagonal de masa,  $\mathbf{x}=x_1,x_2\dots x_n$  y  $\mathbf{p}=p_1,p_2\dots p_n$  a las coordenadas cartesianas y los momentos de todos los átomos del sistema. Estas ecuaciones se resuelven numéricamente mediante la aplicación del algoritmo de Verlet<sup>84</sup>, basado en diferencias finitas. La integración se realiza en pequeños pasos separados por intervalos de tiempo constantes, denominados tiempo de integración o *time step*, donde se asume que la fuerza es constante en cada caso. Para que esto ocurra debe utilizarse un tiempo que se encuentre debajo del tiempo característico del movimiento más rápido del sistema, que corresponde a la vibración de enlaces covalentes.

### 2.1.2 Introducción a la mecánica clásica

La distribución de Boltzmann (característica de los conjuntos o *ensembles* canónico e isobárico-isotérmico) en el espacio de fase presenta la siguiente densidad de probabilidad:

$$\mu(\mathbf{x},\mathbf{p}) = \frac{1}{Q}e^{-\beta(U(\mathbf{x})+K(\mathbf{p}))} \quad \text{ec. 2.1.2.1}$$

donde  $Q$  representa el factor de normalización conocido como función de partición. El significado físico de  $\mu$  es la probabilidad por unidad de volumen del espacio de fase formado por  $\mathbf{x}$  y  $\mathbf{p}$ . La mayoría de los sistemas de interés fisicoquímico pueden describirse mediante un Hamiltoniano separable en un término de energía potencial que depende únicamente de  $\mathbf{x}$  y otro de energía cinética que depende de  $\mathbf{p}$ . Entonces, el momento es estadísticamente independiente de la configuración del sistema y su distribución es similar a la que presenta un gas ideal, no aportando información significativa en ningún sistema específico. En ese sentido, la **ecuación 2.1.2.1** puede modificarse a:

$$v(\mathbf{x}) = \frac{1}{Z}e^{-\beta U(\mathbf{x})} \quad \text{ec. 2.1.2.2}$$

donde  $Z$  es la función de partición configuracional. Una colección de diferentes microestados dados por la **ecuación 2.1.2.2** van a definir un macroestado termodinámico dado, descrito

bajo un número de variables termodinámicas intensivas [típicamente temperatura (T) o presión (P)] o extensivas [número de partículas (N), volumen (V) o energía (E)].

En los métodos de mecánica clásica o molecular (MM, por su sigla en inglés *molecular mechanics*) la energía potencial se encuentra definida por una función analítica que depende únicamente de las coordenadas nucleares y una serie de parámetros, denominado campo de fuerza. Teniendo una expresión para la energía potencial puede resolverse la **ecuación 2.1.1.3** bajo el *ensemble* definido en la **ecuación 2.1.2.2**. El campo de fuerza AMBER, empleado durante el desarrollo de esta Tesis de Maestría, divide la energía potencial en dos contribuciones, una de unión y otra de no unión o de interacción. Los términos de unión se computan para átomos conectados hasta por dos enlaces contiguos, incluyendo penalidades para las desviaciones respecto de su valor de equilibrio de distancias, ángulos y ángulos diedros. Las contribuciones de interacción se computan entre átomos que están en diferentes moléculas o a más de 3 enlaces de distancia, y se dividen en interacciones electrostáticas basadas en la ley de Coulomb y no electrostáticas, que emplean un potencial de Lennard-Jones para describir en forma aproximada las interacciones dispersivas y la repulsión a corta distancia. La expresión de  $U(\mathbf{x})$  resulta entonces:

$$U(\mathbf{x}) = \sum_{\text{enlaces}} \frac{1}{2}k_b(l - l_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{1}{2}k_a(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{1}{2}V_n(1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=N}^N \epsilon_i \left( \left( \frac{\sigma_{ij}}{x_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{\sigma_{ij}}{x_{ij}} \right)^6 \right) + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad \text{ec. 2.1.2.3}$$

donde los primeros dos términos corresponden a la contribución de los enlaces ( $l$ ) y flexiones angulares ( $\theta$ ) descrita mediante un potencial cuadrático centrado en  $l_0$  y  $\theta_0$  con constantes de fuerza  $k_b$  y  $k_a$  respectivamente. El tercer término corresponde a la contribución de las torsiones o ángulos diedros ( $\omega$ ) y está definido mediante tres parámetros,  $V_n$ , la barrera energética asociada a la rotación de los dos mínimos sucesivos de la función  $[1 + \cos(n\omega - \gamma)]$ , donde  $n$  representa la multiplicidad del potencial y el parámetro  $\gamma$  la fase de la función trigonométrica. El último término corresponde al componente de interacción dependiente de la distancia de pares de átomos  $x_{ij}$ , siendo la primera la el potencial de Lennard-Jones, donde  $\sigma_{ij}$  corresponde a la distancia entre átomos para la cual el potencial es mínimo y  $\epsilon_i$  a la profundidad del mismo. La segunda contribución es la interacción Coulómbica entre pares de átomos, donde  $q_i$  y  $q_j$  representa la carga de los átomos  $i$  y  $j$ . El campo de fuerza AMBER

contiene todos los parámetros mencionados anteriormente asociados a los aminoácidos naturales presentes en la mayoría de las proteínas.

Si bien la **ecuación 2.1.2.3** establece que debería calcularse para todos los pares de átomos a más de tres enlaces de distancia, en la práctica se calculan sólo para aquellos pares de átomos que se encuentren por debajo de un punto de corte dado. En el caso de las simulaciones periódicas, la interacción electrostática total es computada mediante un método conocido como sumas de Ewald, que permite tener en cuenta su contribución más allá del radio de corte de las contribuciones de interacción.

En el caso del solvente, los parámetros de los diferentes modelos de solventes son determinados de manera que puedan reproducir diferentes aspectos macroscópicos del solvente. Uno de los modelos más empleados de solvente es TIP3P<sup>85,86</sup>, donde cada molécula de agua presenta una geometría fija y la interacción entre ellas y con el soluto se describe mediante el término de interacción de la **ecuación 2.1.2.3**, ubicando tres cargas puntuales, una sobre cada átomo.

Las MD generadas con la **ecuación 2.1.1.3** pueden modificarse para generar trayectorias en diferentes *ensembles*. Por ejemplo, para trabajar con el *ensamble* canónico (NVT) se incluye una modificación que funciona como termostato, manteniendo la temperatura del baño en T. Estas ecuaciones deben modificarse a, por ejemplo:

$$\begin{aligned} d\mathbf{x} &= M^{-1}\mathbf{p}dt \\ d\mathbf{p} &= (-\nabla_{\mathbf{x}}U(\mathbf{x}) - \gamma\mathbf{p})dt + \sqrt{\frac{2\gamma M}{\beta}}\mathbf{W}_t \end{aligned} \quad \text{ec. 2.1.2.3}$$

donde  $\gamma$  es un coeficiente de fricción y  $\mathbf{W}_t$  es el movimiento Browniano en 3N dimensiones. El termostato empleado en la **ecuación 2.1.2.3** es uno de los más sencillos de todos y es el de *Langevin*. Las simulaciones en el *ensamble isotérmico-isobárico* (NPT) también incluyen un término que mantiene la presión constante  $\mathbf{P}$ , produciendo fluctuaciones en el volumen, funcionando en forma análoga a un barostato. Existen varios modelos de baróstatos empleados en simulaciones, destacando los de Berendsen, Nosé-Hoover y Monte-Carlo.

### 2.1.3 Introducción a la mecánica cuántica

Uno de los pilares fundamentales de la mecánica cuántica es que la información de un sistema físico se encuentra descrito mediante la función de onda,  $\psi(r, t)$  siendo  $r$  las

coordenadas espaciales de todas las partículas y  $t$  el tiempo, así como la existencia de un operador hermítico asociado a cualquier observable físico cuya medida da como resultado un único autovalor real<sup>87</sup>. Esta función se obtiene tras resolver la ecuación fundamental de esta teoría, la ecuación de Schrodinger (ES) dependiente del tiempo:

$$-\frac{\hbar}{i} \frac{\partial \Psi(r,t)}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(r,t) + V(r,t) \Psi(r,t) \quad \text{ec. 2.1.3.1}$$

donde  $h$  es la constante de Planck,  $m$  la masa de la partícula y  $V(r,t)$  el potencial al cual se encuentra sujeto el sistema. Si se considera que el potencial no depende del tiempo, la **ecuación 2.1.3.1** puede resolverse para estados estacionarios, definiendo al operador Hamiltoniano,  $\hat{H}$  como:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(r) \quad \text{ec. 2.1.3.2}$$

Al aplicar éste operador a la función de onda se obtiene finalmente la ecuación de Schrodinger independiente del tiempo en su forma compacta:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad \text{ec. 2.1.3.3}$$

Los diferentes sistemas van a presentar un operador Hamiltoniano diferente, según la forma del potencial. El operador Hamiltoniano para un sistema molecular tiene la siguiente forma:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{m_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \quad \text{ec. 2.1.3.4}$$

donde  $i$  y  $j$  corresponden a los subíndices de electrones,  $A$  y  $B$  a los subíndices de los núcleos, correspondiendo los primeros dos términos a la energía cinética de los electrones, núcleos y los otros tres términos al potencial atractivo entre núcleo-electrón y repulsivo electrón-electrón y núcleo-electrón respectivamente. Estos últimos términos acoplan las coordenadas entre electrones y núcleos, haciendo que no sea resoluble. El Hamiltoniano expresado como la **ecuación 2.1.3.4** se encuentra en unidades atómicas.

El problema nuclear puede solucionarse bajo las aproximaciones adiabática y Born-Oppenheimer<sup>88</sup>, que considera el sistema bajo una única superficie de energía potencial, y que los movimientos electrónicos y nucleares ocurren en escalas temporales diferentes, permitiendo tomar a los segundos en estado estacionario respecto de los primeros. Esto

permite factorizar la función de onda, una asociada a los electrones y otra a los núcleos. Al considerar los núcleos estacionarios, desaparece el término de energía cinética nuclear, y la energía depende paramétricamente de las posiciones nucleares, siendo la repulsión nuclear una constante. Es posible plantear una nueva ES, que va a depender de un nuevo Hamiltoniano, el Hamiltoniano electrónico:

$$\widehat{H}_{el}\psi_{el}(r) = E_{el}\psi_{el}(r) \quad \text{ec. 2.1.3.5}$$

Este sistema puede resolverse mediante una optimización de geometría, calculando el valor de la  $E_{el}$  con diferentes posiciones nucleares y luego recurrir a la **ecuación 2.1.3.3** para determinar la  $E_{tot}$ . Ahora resta conocer la  $\psi_{el}$  y obtener una forma de calcular  $E_{el}$ . La función de onda polielectrónica  $\psi_{el}$  puede aproximarse a un determinante de Slater,  $\Phi_{SD}$ , definido en la **ecuación 2.1.3.6**<sup>89</sup>.

$$\Phi_{SD} = A[\chi_1(1) \dots \chi_N(N)] = A\Pi$$

$$A = \frac{1}{\sqrt{N!}} \sum_{p=0}^{N-1} (-1)^p P = \frac{1}{\sqrt{N!}} \left[ 1 - \sum_{ij} P_{ij} \dots \right] \quad \text{ec. 2.1.3.6}$$

donde  $A$  representa el operador de antisimetría, que contiene todas las  $N$  permutaciones posibles y  $\chi_1$  los diferentes spin-orbitales involucrados, definidos ortogonales entre sí. Al introducir el  $\Phi_{SD}$  en la **ecuación 2.1.3.5**, la  $E_{el}$  queda definida según la **ecuación 2.1.3.7**:

$$E_{el} = \sum_i^N h_i + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N (J_{ij} - K_{ij}) + V_{NN} \quad \text{ec. 2.1.3.7}$$

siendo  $J_{ij}$  y  $K_{ij}$  las integrales de dos electrones de Coulomb e intercambio (que surge a partir de la única permutación posible) respectivamente y  $h_i$  la integral monoeléctrica. Dado que el elemento  $J_{ii}$  es idéntico al elemento  $K_{ii}$  se elimina la repulsión de un electrón consigo mismo. A partir de esta ecuación se tiene una forma para determinar la energía del  $\Phi_{SD}$ . Esta expresión puede minimizarse mediante multiplicadores de Lagrange<sup>89</sup>, empleando la condición de ortonormalidad de los spin-orbitales, derivando en las ecuaciones de Fock:

$$\widehat{f}\chi_i(1) = \sum_j \lambda_{ij}\chi_j(1) \quad \text{ec. 2.1.3.8}$$



donde los valores  $\lambda_{ij}$  corresponden a los multiplicadores de Lagrange asociados a los  $N$   $\chi_i$  spin-orbitales y  $\hat{f}$  al operador de Fock, definido como:

$$\hat{f} = \hat{h} + \sum_b (\hat{J}_b - \hat{K}_b) \quad \text{ec. 2.1.3.9}$$

La matriz resultante de multiplicadores de Lagrange puede diagonalizarse, y los  $\chi_i$  spin-orbitales representados en esta base diagonal corresponden a los orbitales canónicos, donde el multiplicador asociado  $\lambda_i$  corresponde a la energía orbital,  $\epsilon_i$ .

Estas ecuaciones deben resolverse mediante un método iterativo SCF (del inglés, *self-consistent field*). Cada spin-orbital  $\chi_i$  puede expandirse en una base finita de funciones de base  $\varphi$  con un coeficiente  $c_{i\mu}$  asociado:

$$\chi_i = \sum_{\mu}^M c_{i\mu} \varphi_{\mu} \quad \text{ec. 2.1.3.10}$$

$$\hat{F}_i \sum_{\mu}^M c_{i\mu} \varphi_{\mu} = \epsilon_i \sum_{\mu}^M c_{i\mu} \varphi_{\mu}$$

donde  $M$  es el número de funciones elegidas. Esto permite escribir las ecuaciones de HF de forma matricial, como se observa en la ecuación **ec. 2.1.3.11**.

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\epsilon$$

$$F_{\mu\nu} = \int dr_1 \varphi_{\mu}^*(1) \hat{f} \varphi_{\nu}(1)$$

$$S_{\mu\nu} = \int dr_1 \varphi_{\mu}^*(1) \varphi_{\nu}(1) \quad \text{ec. 2.1.3.11}$$

$$\mathbf{D}_{\gamma\delta} = \sum_j^M c_{\gamma j} c_{\delta j}$$

donde  $\mathbf{F}$  representa la matriz de Fock y  $\mathbf{S}$  la matriz de solapamiento, y  $F_{\mu\nu}$  o  $S_{\mu\nu}$  el elemento  $\mu\nu$  de dichas matrices respectivamente. Dentro de la matriz de Fock se encuentra la matriz densidad  $\mathbf{D}_{\gamma\delta}$ . El procedimiento SCF comienza definiendo  $\mathbf{D}_{\gamma\delta}$  según diferentes criterios, *i.e.* geométricos, luego generando  $\mathbf{F}$  y calculando las integrales di-electrónicas (paso limitante de HF). A continuación, se diagonaliza esta matriz, y con ese nuevo conjunto el proceso se repite sin volver a calcular las integrales, iterando únicamente los coeficientes de la matriz densidad. De esta forma, si se parte de  $M$  funciones de base habrá  $N$  MO ocupados y  $M-N$  virtuales.

La calidad del cálculo dependerá del tamaño de la base elegida para expandir los orbitales. Sin embargo, por más que se expanda infinitamente el método HF presenta un error intrínseco al tener en cuenta la repulsión electrón-electrón en forma promediada a partir de un potencial de campo medio, sin tener en cuenta la repulsión instantánea. Este error se lo conoce como error de correlación. Existe una gran cantidad de métodos que permiten obtener resultados que incorporen dicha energía, siendo uno de los más empleados los métodos basados en la teoría de perturbaciones de Møller–Plesset y la Teoría del funcional de la densidad (DFT).

Existe una segunda aproximación en química cuántica que no implica trabajar con la función de onda del sistema, y es trabajar directamente con la densidad electrónica del sistema  $\rho(r)$ , un observable físico que depende únicamente de tres coordenadas espaciales.

Al generalizar  $\hat{H}$  como  $\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} + \hat{U}$ , donde  $\hat{T}$  es el término cinético,  $\hat{U}$  la interacción entre electrones y  $\hat{V}$  la interacción con un campo externo. La información que necesita entonces  $\hat{H}$  es la posición y el número de núcleos, que corresponden a cargas puntuales cuya localización se encuentra en un máximo de  $\rho(r)$ , así como el número total de electrones, que podemos determinarlo según:

$$N = \int \rho(r) dr \quad \text{ec. 2.1.3.12}$$

De esta forma, dado una cierta  $\rho(r)$  podemos construir el  $\hat{H}$  del sistema y determinar la energía del mismo.

En las primeras aproximaciones de DFT (del inglés *density functional theory*), la energía se separa en un componente cinético y uno potencial clásico:

$$V_{ne}[\rho(r)] = \sum_{k=1}^{nuc} \int \frac{Z_k \rho(r)}{r-r_k} dr$$

$$V_{ee}[\rho(r)] = \int \int \frac{\rho(r)\rho(r)}{|r_1-r_2|} dr_1 dr_2 \quad \text{ec. 2.1.3.13}$$

$$T_{ueg}[\rho(r)] = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{\frac{2}{3}} \int \rho(r)^{\frac{5}{3}} dr$$

Tanto  $T$  como  $V$  dependen de  $\rho(r)$ , una función que depende a su vez de tres coordenadas espaciales. Con esta primera aproximación todas las moléculas resultan inestables, ya que no

introduce ni correlación ni intercambio, y el electrón produce repulsión consigo mismo. Para solucionar esto se adiciona una función  $h$  desconocida para el caso de muchos electrones que introduce la correlación, el intercambio y elimina el error SIE (del inglés *self-interaction error*).

Luego de estas primeras aproximaciones, aparecen en escena los dos teoremas de Hohenberg-Konh (HK) y el teorema de Konh-Sham (KS) que hacen que DFT sea hoy en día uno de los métodos de estructura electrónica más extendidos. El primer teorema de HK, aplicado originalmente al estado basal no degenerado, establece que  $\rho(r)$  determina el potencial externo  $\hat{v}$  del Hamiltoniano, mientras que el segundo teorema de HK plantea que si tomamos un funcional de prueba  $\rho_a(r)$ , la energía del sistema seguirá el principio variacional,  $E_a > E_0$ . KS plantea un sistema ficticio de electrones no interactuantes con la misma densidad que un sistema que sí interacciona. La energía de una molécula está determinada por la **ecuación 2.1.3.13**:

$$E = T + V_{ne} + V_{ee} + V_{xc} \quad \text{ec. 2.1.3.14}$$

Donde  $T$  es la energía cinética clásica de los electrones no interactuantes,  $V_{ne}$  y  $V_{ee}$  son la interacción clásica entre los el núcleo con los electrones y consigo mismos respectivamente y finalmente el término  $V_{xc}$  contiene los efectos cuánticos de correlación, intercambio. La forma funcional de la ecuación se muestra a continuación:

$$E[\rho(r)] = T_{ni}[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] + \Delta T[\rho(r)] + \Delta V_{ee}[\rho(r)] \quad \text{ec. 2.1.3.15}$$

Donde  $\Delta T$  refiere a las correcciones a la energía cinética y  $\Delta V_{ee}$  a todas las correcciones no clásicas. KS plantean expresar  $\rho(r)$  en términos de orbitales moleculares, tal como hacemos en HF, y la **expresión 2.1.3.15** queda de la siguiente forma:

$$E[\rho(r)] = \sum_i^N \{ \langle \chi_i | - \langle \chi_i | \} + \sum_i^N \langle \chi_i | + E_{XC}[\rho(r)] \quad \text{ec. 2.1.3.16}$$

Y a su vez la densidad  $\rho(r)$  estará formada por los orbitales que la forman. Ahora bien, para ello tenemos que tener una definición para el término  $E_{XC}$ . La aproximación más sencilla es la LSDA (del inglés *local spin density approximation*), donde  $E_{XC}$  queda definido por la ecuación 2.1.3.17:

$$E_{XC}[\rho(r)] = \int d^3r \rho(r) \{E_X[\rho(r)] + E_C[\rho(r)]\} \quad \text{ec. 2.1.3.17}$$

Donde el término  $E_X$  es extraído del intercambio determinado en un gas de electrones uniforme neutralizado por cargas positivas y el término  $E_C$  fue ajustado por un Monte-Carlo.

Al juntar la **ecuación 2.1.3.17** en la **ecuación 2.1.3.16** queda completamente definida la expresión de la energía y se puede determinar los  $\chi_i$  que cumplan la siguiente igualdad:

$$\begin{aligned} \chi_i h_i^{KS} &= \varepsilon_i \chi_i \\ h_i^{KS} &= \frac{-1}{2} \nabla_i^2 + \sum_k^{nuc} \frac{Z_k}{r_k - r_i} + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r')}{|r_i - r'|} + V_{XC} \\ V_{XC} &= \frac{\partial E_{XC}}{\partial \rho} \end{aligned} \quad \text{ec. 2.1.3.18}$$

Tal como en HF, se puede expandir los spin-orbitales y construir una matriz de KS diferenciada de la matriz de Fock únicamente en los dos últimos términos.

El método LSDA utiliza un gas de electrones ya que permite calcular exactamente la energía, haciendo que la parte de  $E_X$  en una molécula localmente es idéntica a la de un gas de electrones de la misma densidad. La parte de correlación ( $E_C$ ) no se puede calcular de forma analítica incluso para el sistema de un gas de electrones uniforme. Esto hace que la solución de las integrales  $E_{XC}$  no sea analítica y deba realizarse numéricamente con una grilla.

Existen otras aproximaciones al término  $E_{XC}$ , como la que presentan los funcionales GGA (del inglés *generalized gradient approximation*) donde no depende únicamente de la densidad electrónica sino también del gradiente de la misma. Un ejemplo es el siguiente:

$$E_{XC}^{GGA}[\rho(r)] = E_{XC}^{LSDA}[\rho(r)] + \Delta E_{XC} \left[ \left| \nabla \rho(r) / \rho^{\frac{4}{3}} \right| \right] \quad \text{ec. 2.1.3.19}$$

Un funcional de la densidad popular de esta familia es el de Becke<sup>90</sup>, quien parametrizó 6 gases cuya energía se conoce exactamente a la **ecuación 2.1.3.19**. Una segunda extensión conocidos como funcionales Meta GGA consisten en hacer que el término  $E_{XC}$  dependiera también o de la curvatura de la densidad o de la derivada segunda de  $\chi_{KS}$ . Finalmente surgieron los funcionales híbridos, que agregan como fracción el intercambio de HF.

$$E_{XC} = E_X^{HF} + z(E_{XC}^{DFT} - E_X^{HF}) \quad \text{ec. 2.1.3.202}$$

La utilización de la teoría funcional de la densidad con funcionales GGA o híbridos permite obtener generalmente buenos resultados para geometrías y otras propiedades moleculares, energías de enlace, frecuencias de vibración, etc. Sin embargo, existen imitaciones en DFT que deben considerarse. En primer lugar, debido a la inclusión de un funcional de intercambio y correlación aproximado, la teoría deja de ser variacional. En segundo lugar, a diferencia de lo que ocurre en HF, en DFT no se elimina completamente el término de auto-interacción entre los diferentes electrones del sistema.

DFT es actualmente la teoría de elección por los químicos computacionales cuando se desean realizar cálculos de estructura electrónica, dado que es la teoría que ofrece la mejor relación entre la calidad de sus resultados y el costo computacional requerido.

#### 2.1.4 Introducción a los métodos mixtos

En las secciones anteriores se desarrollaron las bases de los métodos basados en la mecánica cuántica y clásica. Los primeros aportan información sobre la distribución electrónica del sistema y resultan imprescindibles cuando se desea estudiar un proceso reactivo. Debido a que presentan un costo computacional elevado, son inaccesibles en sistemas con muchos electrones. Por otro lado, los métodos que describen al sistema con mecánica clásica tienen un costo computacional extremadamente menor y permiten estudiar fenómenos estructurales y/o dinámicos asociados a moléculas con una gran cantidad de átomos. Ambas metodologías pueden combinarse para estudiar un sistema donde la descripción de la densidad electrónica sea imprescindible en una determinada región, y el resto del sistema pueda describirse clásicamente. Un ejemplo clásico de aplicación de este tipo de metodologías es el estudio de reacciones enzimáticas<sup>91</sup>. Este tipo de esquema recibe el nombre de QM/MM (del inglés *quantum mechanics/molecular mechanics*).

Para utilizar un esquema QM/MM previamente al cálculo se necesita definir el sector del sistema que se describe cuánticamente (subsistema o región QM), mientras que el resto (subsistema o región MM) será tratado con mecánica clásica. El subsistema QM debe incluir como mínimo todos los átomos que incluyan enlaces que puedan romperse o formarse durante el proceso de interés, y para obtener una buena representación del problema de

estudio, normalmente se requiere incluir una mayor cantidad de átomos. Debe tenerse en cuenta que cuanto mayor sea el tamaño del subsistema QM, la calidad del cálculo será mayor, pero con un costo muy superior.

Dentro de los métodos QM/MM pueden distinguirse dos clases de esquemas: el aditivos y el sustractivos, ambas empleadas en esta Tesis de Maestría<sup>92,93</sup>. En el esquema aditivo, el Hamiltoniano consiste en la suma de la contribución del subsistema QM ( $\hat{H}_{QM}$ ), el subsistema MM ( $\hat{H}_{MM}$ ) y un término de acoplamiento QM/MM ( $\hat{H}_{QM-MM}$ ):

$$\hat{H} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM-MM} \quad \text{ec. 2.1.4.1}$$

Para el cálculo de la energía  $E_{QM}$  (asociada al  $\hat{H}_{QM}$ ), debe seleccionarse un método cuántico. En el Hamiltoniano cuántico no sólo se tienen en cuenta las cargas cuánticas de los núcleos, sino que además el cálculo se realiza teniendo en cuenta el potencial electrostático generado por los átomos clásicos, y la energía  $E_{MM}$  (asociada al  $\hat{H}_{MM}$ ) se calcula aplicando un campo de fuerza al subsistema MM. El término clave es el de interacción  $\hat{H}_{QM-MM}$ . La forma en que se define éste da cuenta del método QM/MM particular. En forma general, incluye las interacciones electrostáticas, de van der Waals y de unión de los átomos en la frontera entre los átomos QM y los MM. El método empleado en esta Tesis describe el término de acoplamiento QM/MM se representa en la **ecuación 2.1.4.2** para un sistema de A átomos MM y B átomos QM:

$$E_{QM-MM} = \sum_{i=1}^{i=A} q_i \int \frac{\rho(r)}{|r-\tau_i|} dr + \sum_{j,i=1}^{A,B} \frac{q_i Z_j}{|R_i-\tau_j|} + \sum_{j,i=1}^{A,B} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{R_i-\tau_j} \right)^6 - \left( \frac{\sigma_{ij}}{R_i-\tau_j} \right)^{12} \right] \quad \text{ec. 2.1.4.2}$$

donde  $\tau_i$  corresponde a las posiciones de los núcleos MM,  $R_j$  a las coordenadas de los núcleos QM. Los primeros dos términos corresponden a la interacción electrostática entre la densidad electrónica del subsistema cuántico y las cargas sobre los átomos MM ( $q_i$ ) y a la interacción electrostática entre los núcleos QM, de carga  $Z_j$  y los átomos MM respectivamente, y el tercero describe las interacciones de van der Waals y repulsivas a corto alcance, en la misma forma que lo realiza en campo de fuerza clásico. Para calcular la energía de acoplamiento se requiere obtener entonces los parámetros asociados al potencial de Lennard-Jones ( $\epsilon_{ij}$  y  $\sigma_{ij}$ ) para los átomos del subsistema QM.

Adicionalmente, en la mayoría de los casos de interés bioquímico en que se desea aplicar una metodología QM/MM la frontera entre el subsistema QM y el MM involucra enlaces covalentes. Es decir, dos átomos están unidos covalentemente, localizando uno en el subsistema QM ( $A_{QM}$ ) y el otro en el MM ( $A_{MM}$ ). Para solventar este problema en los cálculos QM/MM realizados en este trabajo se utilizó el método SPLAM (del inglés *Scaled Position Link Atom Method*)<sup>94</sup>. En este método, un átomo llamado átomo *Link*, usualmente un átomo de Hidrógeno ( $H_{Link}$ ), se ubica en el enlace por el que atraviesa la frontera. De esta manera, el  $H_{Link}$  completa la valencia del átomo cuántico ubicado en la frontera. La posición del  $H_{Link}$  está forzada a mantenerse en el enlace  $A_{QM}-A_{MM}$ . Para ello, la fuerza sobre el  $H_{Link}$  se descompone en una componente perpendicular y otra paralela al enlace  $A_{QM}-A_{MM}$ . La componente perpendicular se redistribuye entre los átomos  $A_{QM}$  y  $A_{MM}$ . Por otra parte, para mantener el enlace  $A_{QM}-A_{MM}$ , los términos de unión, ángulos y diedros involucrados en el enlace son contabilizados a través del campo de fuerza clásico. Las interacciones de Lennard-Jones que involucran a los átomos  $A_{QM}$ ,  $H_{Link}$ ,  $A_{MM}$  son anuladas para pares de átomos separados por menos de tres enlaces. Por último, para evitar una sobrepolarización de la unión  $A_{QM}-H_{Link}$  debido a la corta distancia entre el  $H_{Link}$  y el átomo  $A_{MM}$ , se anula la carga sobre el átomo  $A_{MM}$ .

Por otro lado, el esquema sustractivo, también conocido como IMOMM (del inglés *Integrated Molecular Orbital Molecular Mechanics*)<sup>95</sup> u ONIOM (del inglés *Own N-layer Integrated molecular Orbital molecular Mechanic*)<sup>96</sup>, describe la energía del sistema según la ecuación 2.1.4.3:

$$E_{sist}^{QM/MM} = E_{mod}^{QM} + E_{sis}^{MM} - E_{mod}^{MM} \quad \text{ec. 2.1.4.3}$$

donde  $E_{sist}^{QM/MM}$  es la energía del sistema calculado al nivel integrado QM/MM,  $E_{mod}^{QM}$  es la energía del subsistema QM calculada a nivel QM,  $E_{sis}^{MM}$  es la energía del sistema calculada a nivel MM y  $E_{mod}^{MM}$  es la energía del subsistema QM calculada a nivel MM.

Al considerar la energía según la **ecuación 2.1.4.3**, el acoplamiento QM-MM se calcula a nivel clásico (MM). Durante un proceso reactivo, las cargas atómicas de los átomos que se encuentran involucrados se modifican a lo largo de la coordenada de reacción, a su vez

siendo polarizadas por el entorno en el que se encuentran. Esta descripción no tiene en cuenta este fenómeno, al tratar el acoplamiento de forma clásica.

### **2.1.5 Introducción a los métodos de muestreo avanzado**

La realización de cálculos de energía libre y su variación a lo largo de un proceso, otorga información esencial de un sistema químico. La energía libre de Gibbs es la energía libre calculada en condiciones de número de partículas, temperatura y presión constantes (NPT), las cuales son las normalmente utilizadas en las simulaciones de MD, además de ser las condiciones experimentales más frecuentes.

Como se mencionó en la **Sección 2.1.1**, la mayoría de los procesos biológicos de relevancia ocurren en escalas de tiempo inaccesibles con el poder de cómputo actual<sup>97</sup>. Por ejemplo, la apertura de un canal iónico se debe a un cambio conformacional ocurrido en el canal como respuesta a la unión de un ligando o un cambio en el potencial de membrana<sup>98</sup>. Este proceso tiene un tiempo característico en el entorno de los pocos milisegundos, es decir, 1000 veces más que la duración máxima permitida de una MD realizada con el poder de cómputo actual. Por el contrario, una reacción química en solución acuosa tiene un tiempo característico de pocos femtosegundos, sin embargo, para que ocurra debe superarse una barrera de energía libre asociada a estados de alta energía que no se muestran en forma sencilla, lo que lo vuelve un evento raro<sup>99</sup>.

Para superar estos inconvenientes a lo largo de los años se fueron desarrollando diversos métodos que permiten muestrear correctamente estos procesos, superando los obstáculos mencionados en el párrafo anterior<sup>100</sup>. Estos métodos de muestreo avanzado pueden dividirse según si se añade un sesgo al Hamiltoniano del sistema o si se altera la distribución canónica<sup>101</sup>.

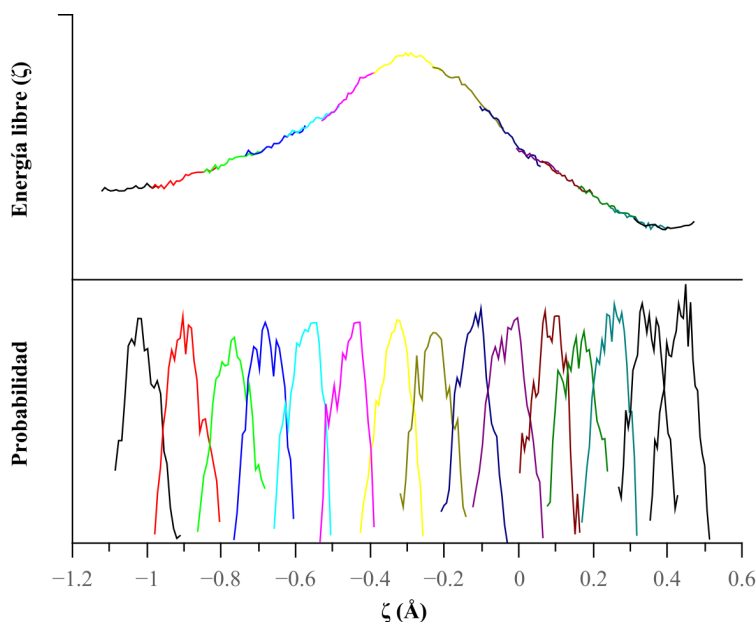
La primera familia de métodos disminuye la barrera energética, incrementando el muestreo de las regiones de alta energía. Estos métodos requieren de la pre-elección de una coordenada de sesgo o distinguida sobre la cual se realiza el muestreo. Teniendo en cuenta el sesgo aplicado al Hamiltoniano, es posible obtener directamente la energía libre a lo largo del proceso estudiado. Los métodos que pertenecen a la segunda familia generan una distribución que permite mejor muestreo de toda la superficie de energía libre, sin añadir de una coordenada distinguida.



Dentro de la primera familia se encuentra el método de Umbrella sampling, empleado para el estudio de reacciones químicas/bioquímicas donde la coordenada distinguida corresponde a la coordenada de reacción seleccionada en base a la intuición química<sup>102-104</sup>. Brevemente, el método de Umbrella sampling modifica la energía potencial añadiendo de un término adicional:

$$V^*(\mathbf{r}) = V(\mathbf{r}) + k(\xi - \xi_0)^2 \quad \text{ec. 2.1.5.1}$$

donde  $V(\mathbf{r})$  corresponde a la función energía potencial sin modificar (dada por el hamiltoniano),  $k$  es una constante ajustable por el usuario,  $\xi$  corresponde a la coordenada elegida y  $\xi_0$  al valor deseado de esa coordenada. Al agregar este término, configuraciones que se encuentren cercanas al valor de  $\xi_0$  se verán favorecidas, y de esta forma se logra muestrear correctamente estructuras de elevada energía. En la práctica, se realizan varias simulaciones de MD variando los valores de  $\xi_0$  para recorrer la coordenada de reacción elegida, donde cada simulaciones otorgará una porción o ventana del perfil de energía libre buscado, y el verdadero perfil se obtiene de restar al perfil obtenido el sesgo añadido. El perfil final será el resultado de la superposición de todos los perfiles obtenidos.

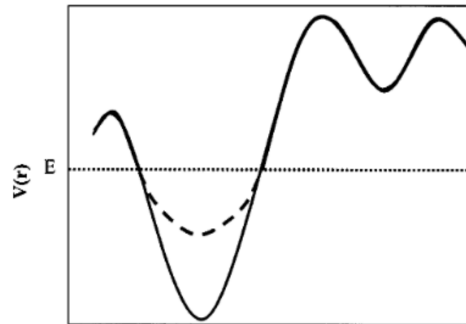


**Figura 2.1.5.1** Perfil de energía libre a lo largo de la coordenada distinguida. El Panel superior corresponde al perfil sesgado y en el panel inferior se representan los histogramas de probabilidad para cada ventana simulada.

Para obtener buenos resultados, debe tenerse en cuenta en primer lugar que las secciones del perfil de energía libre obtenidas en cada una de las ventanas deben superponerse. Por otra

parte, debe seleccionarse la  $k$  asociada a la perturbación armónica con cuidado, para asegurar una correcta exploración de todos los modos transversales a la coordenada distinguida.

Dentro de la segunda familia de métodos de muestreo avanzado se encuentra la dinámica molecular acelerada (aMD)<sup>105,106</sup>, donde se busca representar la siguiente situación:



**Figura 2.1.5.2.** Superficie de energía potencial real (trazo continuo) y sesgado (trazo discontinuo).  
Figura adaptada de Hamelberg y colaboradores<sup>105</sup>.

Bajo este esquema, se añade un potencial no negativo  $\Delta V(\mathbf{r})$ , también denominado *boost*, cuando el verdadero potencial  $V(\mathbf{r})$  se encuentre por encima de un determinado valor umbral,  $E$ . La simulación entonces se corre bajo el potencial:

$$V^*(\mathbf{r}) = \begin{cases} V(\mathbf{r}), & V(\mathbf{r}) \geq E \\ V(\mathbf{r}) + \Delta V(\mathbf{r}), & V(\mathbf{r}) < E \end{cases} \quad \text{ec. 2.1.5.2}$$

El potencial sesgado generado a partir de la **ecuación 2.1.5.2** permite que el sistema pueda “escapar” del mínimo energético en el que se encuentra, y en forma consecuente la evolución temporal se produce a un ritmo acelerado, con una escala temporal no lineal,  $\Delta t^*$ , definido como:

$$\Delta t_i^* = \Delta t e^{\beta \Delta V[r(t_i)]} \quad \text{ec. 2.1.5.3}$$

donde  $\Delta t$  el tiempo de integración real, y depende de si el sistema tiene o no el *boost* de potencial añadido. Si el umbral elegido  $E$  es muy elevado, se origina una distribución muy ruidosa debido al mal muestreo de los mínimos de la superficie. La forma según la que se define el *boost*  $\Delta V(\mathbf{r})$  y el valor de umbral  $E$  es lo que va a definir a los diferentes métodos aMD.

Una vez finalizada la simulación, la distribución original puede recuperarse mediante un *reweighting* del espacio de fase del potencial modificado multiplicando cada configuración por la fuerza del sesgo en cada posición<sup>107</sup>.

## 2.2 Métodos de esta tesis

### 2.2.1 Simulaciones de dinámica molecular convencional

Como estructura de partida se tomó la estructura cristalográfica de *MtmsrA* unida a una metionina de origen proteico (PDB ID: 1NWA)<sup>17</sup>, adicionando los átomos de hidrógeno según el estado esperado a pH 7.4. Todas las simulaciones de dinámica molecular (MD, del inglés *molecular dynamics*) se realizaron con el software Amber18<sup>108</sup>, embebiendo la proteína en una caja octaédrica truncada con 12 Å de distancia entre cualquier átomo de la proteína y el borde de la caja. La MD se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

1. 1000 ciclos de minimización del sistema completo utilizando el algoritmo steepest descent, utilizando el campo de fuerza *ff14SB*<sup>109</sup> para la proteína, y los residuos no estándar fueron parametrizados siguiendo el protocolo RESP.
2. 100ps de calentamiento de 0 a 200 K utilizando el termostato de Berendsen, en un *ensamble* NVT, utilizando un tiempo de integración de 1 fs.
3. 100ps de calentamiento de 200 a 300 K utilizando el termostato de Berendsen, en un *ensamble* NVT, utilizando un tiempo de integración de 2 fs.
4. 50ps de equilibración a 300 K, utilizando el termostato de Berendsen y el barostato de Monte-Carlo, en un *ensamble* NPT, utilizando un tiempo de integración de 2 fs.
5. 1000ns de MD a 300 K, utilizando el termostato de Berendsen y el barostato de Monte-Carlo, en un *ensamble* NPT, utilizando un tiempo de integración de 2 fs.

En todos los casos se utilizó el algoritmo SHAKE para restringir los enlaces entre los átomos pesados e hidrógenos, manteniéndolos en su distancia de equilibrio, y Particle Mesh Ewald<sup>110</sup> para computar las interacciones electrostáticas de largo alcance.

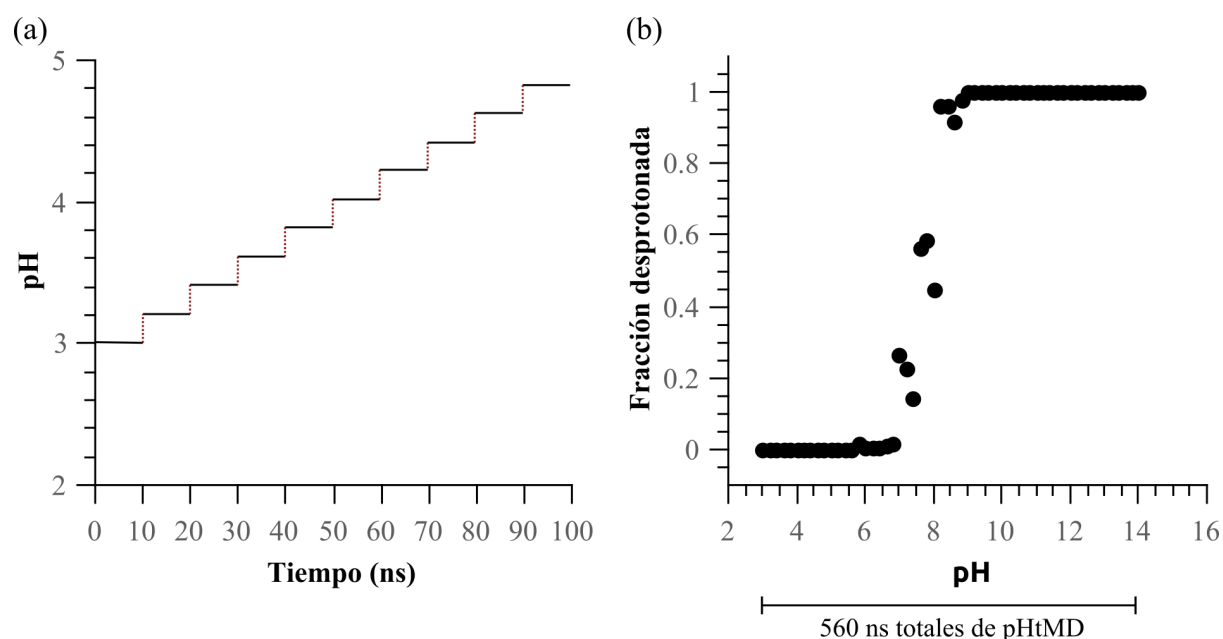
Una vez que la simulación finalizó, fue posible evaluar diversas propiedades del sistema. La flexibilidad que presenta el sistema se determinó mediante el RMSF (del inglés *root mean square fluctuation*) de los *C $\alpha$*  de la proteína. La exposición al solvente por parte de un residuo se cuantificó mediante el SASA (del inglés *solvent accessible surface area*) utilizando el algoritmo LCPO<sup>111</sup>, y la estructura secundaria secundaria con el DSSP (del inglés *Dictionary of Secondary Structures of Proteins*)<sup>112</sup>.

Para evaluar cómo se distribuyen las aguas alrededor de cierto átomo en particular se calculó la distribución radial,  $g(r)$ , de moléculas de agua sobre ese átomo, y se normaliza a uno el valor para una distancia superior a 8 Å.

A su vez, utilizando la aproximación de trayectoria simple se estimó la energía de unión de diferentes complejos mediante MMGBSA<sup>113</sup>, tomando 1000 estructuras con un espaciamiento homogéneo de 1ns entre ellas.

### 2.2.2 Titulación de aminoácidos mediante simulaciones a pH constante

Para obtener una buena predicción del  $pK_a$  de diferentes aminoácidos relevantes de *MtmrA* se realizaron titulaciones a pH constante, pHtMD (Del inglés *pH-titration molecular dynamics*)<sup>99</sup>. Brevemente, esta técnica busca evaluar el estado de protonación de los residuos que se quiere titular mientras se muestrea el espacio conformacional de la proteína, y del residuo, obteniendo un valor más representativo de  $pK_a$ . Para ello se realiza una única simulación a pH constante de varios cientos nanosegundos de duración<sup>114</sup>, realizando un cambio en el valor del pH como se muestra en la siguiente figura:



**Figura 2.2.2.1.** *Workflow* de pHtMD. (a) Variación escalonada del pH en función del tiempo de simulación. (b) Fracción desprotonada del residuo titulado en función del pH, indicando el tiempo total de simulación.

Siguiendo el workflow de la **Figura 2.2.2.1**, cada unidad de pH corresponde con 50 ns totales de simulación. El protocolo entonces aplicado utilizando esta metodología fue el siguiente:

Se asignó el campo de fuerza *constph* a la proteína, equivalente al ff99SB para proteínas con algunas modificaciones incluidas en los residuos titulables, y se siguieron los pasos 1-4 de la **Sección 2.2.1** para preparar la estructura. Los pasos de pHtMD se aplicaron de la siguiente manera:

1. Se corre a pH constante durante 10 ns, relajando el solvente y evaluando cada 0.2 ns el estado de protonación del residuo que está siendo titulado.
2. Se toma la estructura final de la simulación, se incrementa en 0.2 unidades de pH y se repite el paso 1.

Estos dos pasos se aplican de forma iterativa hasta que se quiere terminar la corrida. Una vez obtenida la fracción en la cual el residuo de interés estuvo desprotonado, se ajusta la **ecuación 2.2.2.1** a los datos obtenidos, y de como parámetro de ajuste se obtiene el  $pK_a$  de dicho residuo.

$$f^- = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad \text{ec. 2.2.2.1}$$

Para las titulaciones realizadas para *MtmsrA* o *MtmsrA* unida a sustrato o producto se tomó como estructura de partida se tomó la estructura cristalográfica de *MtmsrA* unida a una metionina de origen proteico (PDB ID: 1NWA)<sup>17</sup>, tratando la estructura mediante el mismo protocolo que en la **Sección 2.2.1**. Las titulaciones realizadas para los intermediarios enzimáticos se realizaron tomando como estructura de partida la última estructura obtenida con métodos QM/MM, aplicando el mismo protocolo que el descrito en la **Sección 2.2.1**.

### **r2.2.3 Simulaciones moleculares sesgadas, *Steered molecular dynamics* y *Umbrella sampling***

Se extrajo una estructura de la MD realizada siguiendo el protocolo de la **Sección 2.2.1**, y se procedió a realizar el siguiente protocolo para obtener la curva de energía libre obtenida mediante el método *umbrella sampling*<sup>102</sup> en función de una coordenada de reacción:

1. 10 ps de MD a nivel QM/MM.
2. A partir del punto final de la MD QM/MM, se realizó una *Steered molecular dynamics* (SMD)<sup>115</sup> a una velocidad de 0.1 Å ns<sup>-1</sup> a lo largo de la coordenada de reacción elegida.
3. Se tomaron estructuras de la SMD extraídas cada 0.1 Å de la coordenada de reacción.

4. Cada ventana se minimizó a nivel QM/MM, agregando el valor correspondiente a la ventana como restricción armónica, con la región MM fija.
5. Se realizó una MD de 1ns dejando la región QM fija, habiendo cambiado la carga atómica de los átomos QM por la obtenida al final de la minimización.
6. Se repitió 10 veces los pasos 4 y 5 durante.
7. Se realizó una MD a nivel QM/MM durante 15 ps con la estructura de cada ventana obtenida en el punto 6, agregando una restricción armónica, tomando como posición de equilibrio la correspondiente a la ventana, y como  $k$  100 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>. Se descartaron los primeros 5 ps para calcular el valor de energía libre correspondiente a esa ventana.

Los cálculos QM/MM se realizaron mediante el código LIO/AMBER<sup>97,116</sup>, al nivel PBEPBE/dzvp|ff14SB. Una vez que se corrió toda la curva y se aseguró que los histogramas provenientes de las diferentes ventanas muestreadas se solaparon correctamente, se utilizó la aproximación *umbrella integration*<sup>117</sup> para obtener la curva de energía libre.

#### 2.2.4 Cálculos de estructura electrónica

Todos los cálculos de estructura electrónica se realizaron con el paquete Gaussian09<sup>118</sup>, al nivel DFT/6-31+G\*\*. El efecto del solvente se tuvo en cuenta de forma implícita mediante la aproximación IEF-PCM<sup>119</sup>, utilizando el dieléctrico del agua (78.35). Los puntos estacionarios se optimizaron utilizando el algoritmo de Schegel, dejando fijo los puntos de anclaje del sistema a la proteína, y las aproximaciones termoquímicas se calcularon a 298.15 K, tal como viene implementado en el paquete.

Las especies estables de cada reacción estudiada se obtuvieron a partir del último punto hallado por el camino de reacción intrínseco (IRC, del inglés *intrinsic reaction coordinate*)<sup>120</sup>, calculado con el algoritmo HPC utilizando un paso de 0.2 Bohr.

El grado de avance de la reacción en el estado de transición se definió según las **ecuaciones 2.2.4.1** o **2.2.4.2** para enlaces que se forman o que se rompen respectivamente:

$$\text{Grado de avance} = \frac{WBI \text{ en el TS}}{WBI \text{ en CF}} \times 100\% \quad \text{ec. 2.2.4.1}$$

$$\text{Grado de avance} = \left(1 - \frac{WBI \text{ en el TS}}{WBI \text{ en CF}}\right) \times 100\% \quad \text{ec. 2.2.4.2}$$

Siendo *WBI* el índice de enlace de Wiberg (WBI), obtenido mediante un *single point* de la estructura optimizada tras realizar un análisis de poblaciones NBO.

### 2.2.5 Simulaciones de dinámica molecular acelerada

Como punto de partida para la dinámica molecular acelerada (aMD) se tomó la última estructura obtenida durante la MD del estado a caracterizar. El *boost* de aceleración se generó siguiendo lo descrito en bibliografía<sup>106,107,121-123</sup>. Brevemente, se añadió un  $\Delta V(r)$  tanto en la energía potencial total como la correspondiente a los diedros con el fin de incrementar el muestreo conformacional. El  $\Delta V(r)$  se calculó según:

$$\Delta V(r) = \frac{(E_{pot} - V_{pot}(r))^2}{\alpha_{pot} + E_{pot} - V(r)} + \frac{(E_{died} - V_{died}(r))^2}{\alpha_{died} + E_{died} - V_{died}(r)} \quad \text{ec. 2.2.5.1}$$

donde los términos de  $E_{pot}$  y  $E_{died}$  se describen según la ecuación 4.2.5.2:

$$\begin{aligned} E_{pot} &= \langle E_{pot} \rangle + \alpha_{pot} \\ E_{died} &= \langle E_{died} \rangle + \alpha_{died} + N_{res} * b_1 \end{aligned} \quad \text{ec. 2.2.5.2}$$

Los valores de  $\langle E_{pot} \rangle$  y  $\langle E_{died} \rangle$  corresponden al valor medio de la energía potencial total y al componente de los diedros de la energía potencial previo a la aceleración, y los valores de  $\alpha_{pot}$  y  $\alpha_{died}$  se calcularon según:

$$\begin{aligned} \alpha_{pot} &= a_1 * N_{atoms} \\ \alpha_{died} &= \frac{\lambda * b_1 * N_{res}}{5} \end{aligned} \quad \text{ec. 2.2.5.3}$$

Los valores de  $N_{atoms}$ ,  $N_{res}$  y  $\langle E_{pot} \rangle$  y  $\langle E_{died} \rangle$  variaron para cada sistema, mientras que los parámetros  $a_1$ ,  $b_1$  y  $\lambda$  se definieron en 0.2 kcal mol<sup>-1</sup>, 3.5 kcal mol<sup>-1</sup> y 0.3 respectivamente.

En cada sistema se corrieron cinco réplicas de cada sistema durante 300 ns de aceleración en un *ensemble* NVT a 300 K cada sistema, partiendo de la misma estructura. En cada caso la distribución original se estimó utilizando el método de *reweighting*, lo que permitió construir superficies de energía libre.

### 2.2.6 Ensayos de *docking* proteína-proteína

Los ensayos de *Docking* proteína-proteína de *MtmsrA:MttrxC* se realizaron empleando el servidor online HADDOCK<sup>124,125</sup>, utilizando como punto de partida estructuras representativas de los diferentes *clusters* localizados en la dinámica según el RMSD de los



Cα. Como superficie de interacción se seleccionó la región linder a la *MtmsrA* Cys154 y *MttrxC* Cys31.

La estructura de *MttrxC* corresponde a una estructura representativa extraída del cluster más poblado de una dinámica molecular de dicho sistema, partiendo de la estructura PDB id 3NOF<sup>126</sup>, siguiendo el protocolo presentado en la **Sección 2.2.1**.

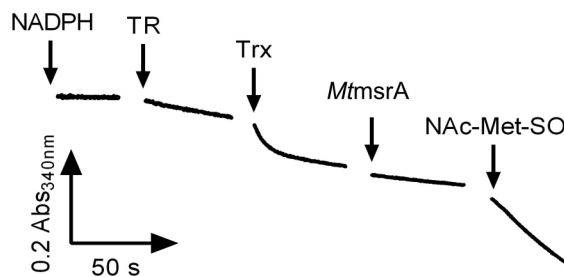
### **2.2.7 Métodos experimentales**

*Producción y purificación de MtmsrA*: El gen que codifica la *MtmsrA* (TB Database: Rv0137c, 21 kDa) fusionado con la proteína de unión a maltosa (MBP, 43 kDa) y una cola de residuos de histidina N-terminal en el vector pDEST17 fue cedido gentilmente por el Dr. Bruno Manta del Instituto Pasteur de Montevideo. La proteína fue expresada en *Escherichia coli* BL21(DE3). Las bacterias conteniendo el plásmido fueron crecidas en medio LB en presencia de ampicilina (100 mg/L) a 37 °C a partir de crioinóculos almacenados en 30 % de glicerol a -80 °C. Una vez alcanzada una turbidez cercana a 0.8, la expresión de la enzima fue inducida por la adición de 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) durante *overnight* a 20°C. Las bacterias fueron centrifugadas a 4000 rpm, el sobrenadante descartado, y resuspendidas en amortiguador Tris 20 mM, 0.5 M NaCl pH 7.6 (solución A) en una cantidad de 40 mL por cada litro de cultivo. Las bacterias fueron sonicadas y centrifugadas a 10000 rpm. El sobrenadante fue filtrado (0,8 m) y pasado por una columna de níquel (HisTrap, 5 mL) previamente equilibrada en solución A + imidazol 5 mM. La columna fue limpiada de las proteínas no unidas o unidas inespecíficamente con solución A + 25 mM de imidazol. La proteína de fusión fue eluida con solución A + imidazol 100 mM. A continuación, se eliminó el imidazol pasando la muestra por un concentrador y se procedió a medir la concentración de proteína mediante absorbancia a 280 nm ( $\epsilon_{280}$  estimado en 100395 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). A continuación, la cola de histidina y la MBP fueron cortadas mediante incubación con la enzima TEV proteasa (28 kDa) recombinante en una relación 1/10 durante toda la noche a 4°C. Luego de su corte, las colas junto con la MBP fueron removidas mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Níquel Hitrap (GE Healthcare). La concentración de proteína fue medida mediante absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar 34045 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, calculado al utilizar su secuencia aminoacídica en su forma reducida mediante la herramienta bioinformática Expsy Protparam tool (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

El plásmido de la TEV proteasa fue cedido gentilmente por el Dr. Marcelo Comini del Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. La expresión y purificación de la proteína se realizó mediante un protocolo previamente reportado<sup>127</sup>.

*Medida de tioles libres:* La concentración de tioles libres en las proteínas fueron medidas por el ensayo de Ellman ( $\epsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 15  $\mu\text{L}$  de muestra de proteína a diferentes diluciones, o amortiguador (blanco) se mezclaron con 135  $\mu\text{L}$  de ácido 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 1 mM preparado en amortiguador Tris 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.4 (amortiguador B) y la absorbancia se midió a 412 nm utilizando una cubeta de 100  $\mu\text{L}$ .

*Ensayos de actividad enzimática:* La actividad enzimática se midió empleando un ensayo acoplado NADPH:TR:trx: *MtmsrA*, siguiendo la disminución de la absorbancia del NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). En la **Figura 2.2.7.1** se muestra un ejemplo de evolución temporal.



**Figura 2.2.7.1** Ensayo acoplado de medición de actividad enzimática *MtmsrA*.

La [NADPH] fue de 200  $\mu\text{M}$ , [TR] de 2 o 4  $\mu\text{M}$  (según el ensayo), [*Ectrx1*] de 80  $\mu\text{M}$ , [*MttrxC*] en un rango variable de 5-80  $\mu\text{M}$ , [NAcMetSO] en un rango variable de 0-1500  $\mu\text{M}$ . Todos los ensayos se realizaron a 25°, pH 7.4.

La velocidad de la reacción para una enzima bi-sustrática que no forma complejo ternario se encuentra definida por<sup>128</sup>:

$$v = \frac{V a b}{K_M^b a + K_M^a b + a b} \quad \text{ec. (2.2.7.1)}$$

donde  $a$  y  $b$  representan los sustratos,  $V$  la velocidad máxima y  $K_M^a$ ,  $K_M^b$  las constantes de Michaelis para  $a$  y  $b$  respectivamente. Si se considera uno de los sustratos constante a

concentraciones crecientes del otro, por ejemplo,  $a$  constante, la **ecuación (2.2.7.1)** se reordena en:

$$v = \frac{b \frac{Va}{a+K_M^a}}{\frac{K_M^b a}{a+K_M^a} + K_M^a b} = \frac{b V_{max}^b}{b + K_{0.5}^b} \quad \text{ec. (2.2.7.2)}$$

Los parámetros aparentes obtenidos a partir de las hipérbolas de la **ecuación (2.2.7.2)** se ajustan a los siguientes curvas para obtener los valores reales:

$$V_{max}^a = \frac{V b}{K_M^b + b} \quad \text{ec. (2.2.7.3)}$$

$$K_{0.5}^a = \frac{K_M^a b}{K_M^b + b}$$

A su vez, en el gráfico secundario de  $v/a$  vs  $a$ , gráficamente puede confirmarse el mecanismo *ping pong* según si las rectas se cortan en la ordenada en el origen o en otro punto. El valor de la ordenada en el origen se corresponde con  $K_M^a/V$ .

*Ensayos de cinética rápida:* Las constantes de velocidad de oxidación de *MtmsrA* por MetSO y NAcMetSO se determinaron siguiendo la disminución de intensidad de fluorescencia intrínseca proteica ( $\lambda_{exc} = 295$  nm), que se produce durante la oxidación. La *MtmsrA* reducida típicamente 1  $\mu$ M se mezcló rápidamente con sulfóxido en exceso usando un equipo de flujo detenido (Applied Photophysics SX20)<sup>129</sup>. Las constantes de velocidad observadas de disminución de fluorescencia ( $k_{obs}$ ) se determinaron mediante el ajuste de una función monoexponencial a los datos experimentales, y las constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones fueron obtenidas a partir de la pendiente de la recta del gráfico  $k_{obs}$  versus concentración de sulfóxido. Para obtener los parámetros termodinámicos de activación de oxidación de *MtmsrA* por NAcMetSO, se realizó el experimento a cuatro temperaturas diferentes (14.9°C, 20°C, 25°C y 30°C).

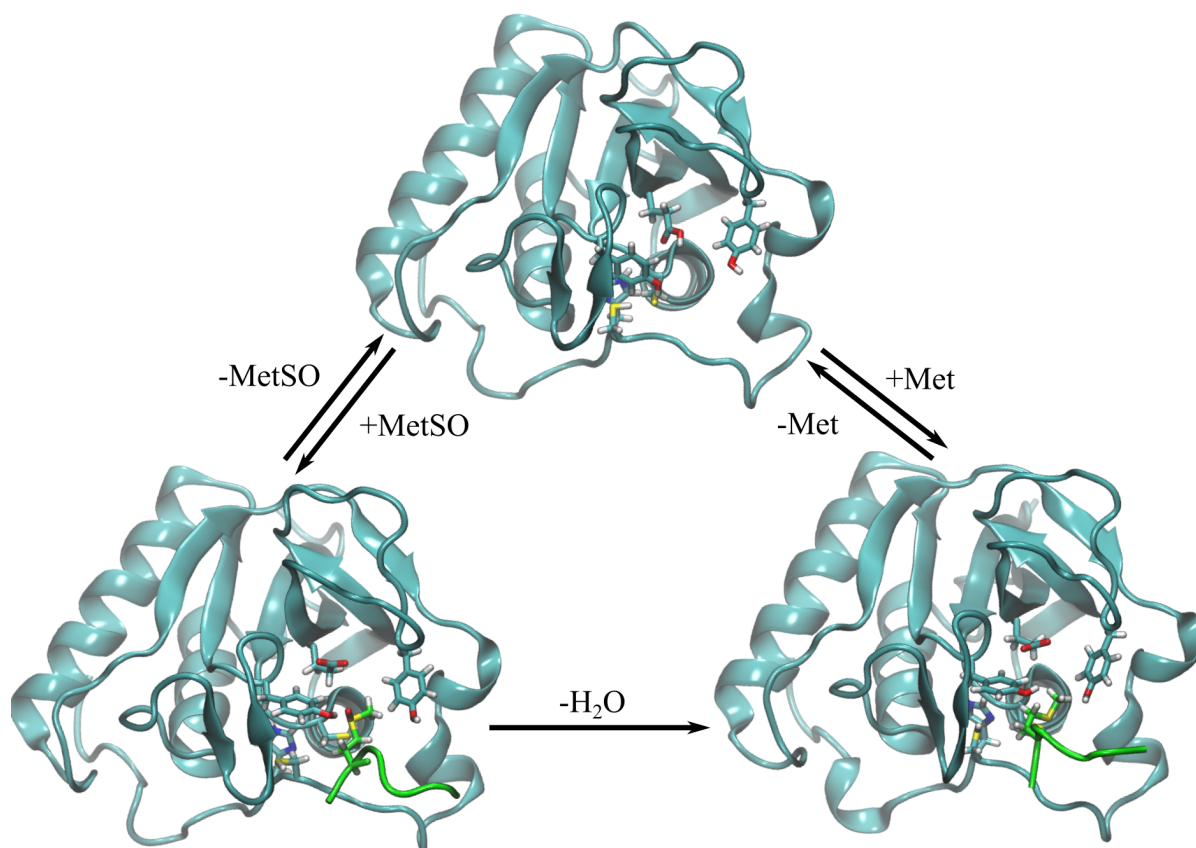
*Ensayos de dicroísmo circular:* Los espectros de dicroísmo circular en UV-lejano fueron obtenidos utilizando el equipo Applied Photophysics Chirascan V100, para la *MtmsrA* (10  $\mu$ M) incubada con 2 mM DTT (reducida) o 1 mM NAcMetSO (oxidada). Adicionalmente, se realizaron rampas de temperatura para cada muestra, tomando espectros cada 5°C entre 20-70°C. Se construyeron curvas de desnaturalización siguiendo la señal de dicroísmo

circular a 222 nm, determinando la temperatura de desnaturalización aparente ( $T_m^{app}$ ) a partir del ajuste de un modelo simple de dos estados.

### 3. Estructura, dinámica y estabilidad de la *MtmsrA* en diferentes estados de oxidación

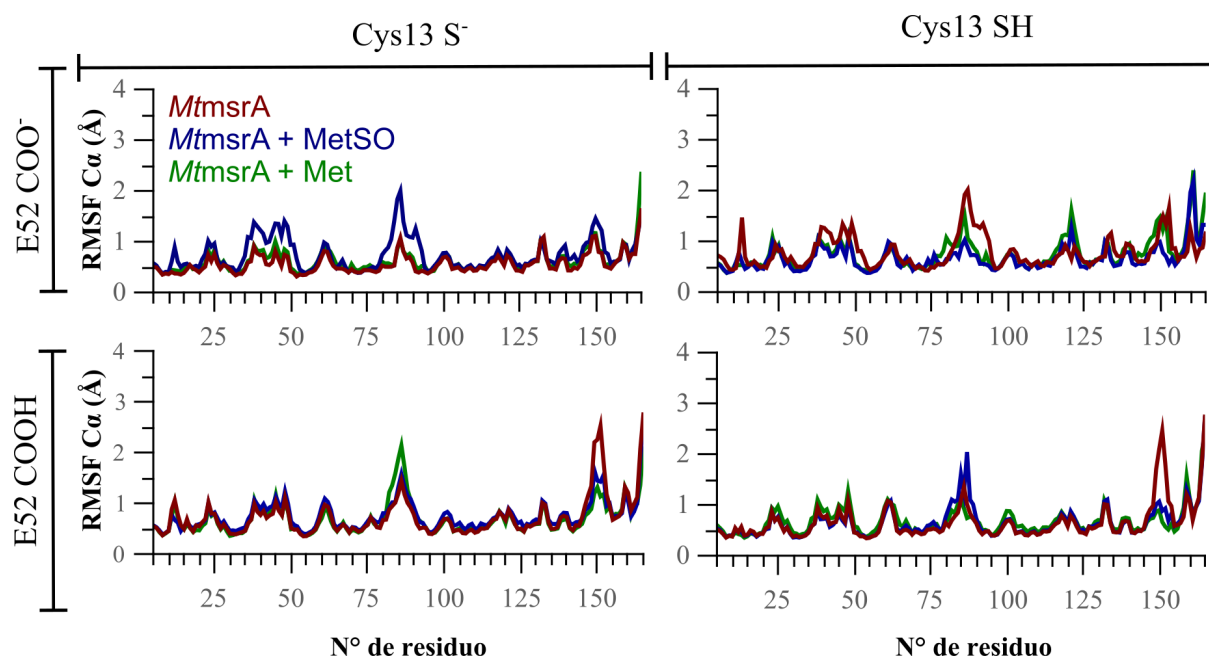
#### 3.1 Caracterización de *MtmsrA* en solución y complejos enzima:sustrato

Con el fin de comprender los cambios inducidos por el sustrato en el sitio activo y en las propiedades dinámicas de la proteína, se realizaron simulaciones MD de la proteína (*MtmsrA*), con el sitio activo ocupado con un hexapéptido (His-Met-Thr-Ser-Asn-Gln) que contiene una metionina *S*-sulfóxido (*MtmsrA*+MetSO) o metionina en la misma posición (*MtmsrA*+Met). A su vez se consideraron diferentes estados de ionización para la Cys13 y el Glu52. El protocolo de MD seguido en todos estos sistemas, así como la descripción metodológica de los análisis realizados se describe en la **Sección 2.2.1**. En la **Figura 3.1.1** se muestra una estructura representativa de los diferentes sistemas abordados, considerando únicamente un estado de ionización para la Cys13 y el Glu52.



**Figura 3.1.1.** Esquema representativo de los sistemas abordados, *MtmsrA* C13<sup>S<sub>γ</sub>S(H)</sup>/G52<sup>COO(H)</sup>, *MtmsrA*+MetSO C13<sup>S<sub>γ</sub>S(H)</sup>/G52<sup>COO(H)</sup> o *MtmsrA*+Met C13<sup>S<sub>γ</sub>S(H)</sup>/G52<sup>COO(H)</sup>

La primera característica dinámica analizada corresponde a la flexibilidad de la proteína en las diferentes situaciones estudiadas, medida según el RMSF de los Ca.



**Figura 3.1.2.** Flexibilidad proteica cambiando el estado de ionización de los residuos Cys13 y Glu52, medida según el RMSF de los C $\alpha$  de la proteína eliminando los extremos N y C terminal. En azul *MtmsrA*, en rojo *MtmsrA+MetSO* y en verde *MtmsrA+Met*.

Como se observa en la **Figura 3.1.2**, todos los paneles presentan un perfil similar, siendo las zonas que presentan mayores variaciones las comprendidas entre las regiones 35-50 (correspondiente a un *loop* entre  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3), 85-95 (comprende parte de la horquilla  $\beta$ ) y 145-155 (*loop* del extremo C-terminal), todas regiones circundantes al sitio activo.

Dentro de las regiones cuya flexibilidad se ve más afectada por la unión del sustrato/producto en las diferentes situaciones estudiadas se encuentran los residuos Asp86 e His151, residuos conservados cuyo rol propuesto es establecer interacciones tipo enlace de hidrógeno con el *backbone* del péptido, ayudando a situar el motivo SO correctamente dentro del sitio activo, cuya mutación incrementa en un orden el  $K_M$  del sustrato a la enzima<sup>37</sup>. Estudios de RMN en solución acuosa de *EcmsrA* y NAcMetSO determinaron que la región que se altera asociada a la presencia del sustrato corresponde a esta horquilla<sup>67</sup>. En este sentido, los resultados de las simulaciones son consistentes con la observación experimental.

A continuación, se detallan todas las frecuencias de las interacciones que diferentes residuos establecen con algún enlace amida con los aminoácidos del péptido.

**Tabla 3.1.1.** Porcentaje de ocupación para los diferentes enlaces de hidrógeno formados entre el péptido y la *MtmsrA*.

#Res	MetSO				Met			
	C13S <sup>-</sup>		C13SH		C13S <sup>-</sup>		C13SH	
	E52 <sup>COO-</sup>	E52 <sup>COOH</sup>	E52 <sup>COO-</sup>	E52 <sup>COOH</sup>	E52 <sup>COO-</sup>	E52 <sup>COOH</sup>	E52 <sup>COO-</sup>	E52 <sup>COOH</sup>
<b>W15</b>	>61.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Y34</b>	>4.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Y44</b>	>4.06	>3.99	>0.06	>0.97	>6.45	>2.78	>0.32	0.00
<b>R45</b>	>2.07	>9.02	>0.73	>5.22	>9.98	>12.17	>3.55	0.00
<b>N86</b>	>0.01	>0.65	>13.34	>5.14	>0.30	>2.33	>2.22	>24.49
<b>D87</b>	>0.05	>5.36	>10.40	>19.97	>11.90	>2.65	>6.71	>13.79
<b>R88</b>	0.00	>14.07	0.00	>2.88	>0.84	>0.02	>0.81	>44.08
<b>H141</b>	>37.47	>0.08	0.00	0.00	>3.79	>5.52	0.00	0.00
<b>Y144</b>	>0.16	>4.62	>2.22	>1.11	>0.23	>3.99	>0.76	0.00
<b>Y148</b>	>1.62	0.00	>0.35	0.00	>1.31	0.00	>0.12	0.00
<b>Y152</b>	>0.01	>0.03	>0.14	>0.14	>5.78	>25.65	>6.2	0.00

De la **Tabla 3.1.1** se extrae que efectivamente las regiones cuya flexibilidad se ven perturbadas, son las que interaccionan con el *backbone* del péptido. No se observa ningún residuo en particular que interaccione durante un tiempo prolongado en todos los sistemas estudiados. Esta plasticidad en la interacción con un péptido puede ser el origen del amplio espectro de proteínas reducidas por las metionina sulfóxido reductasas.

A continuación, se buscó caracterizar la unión del motivo (S)-S-O al sitio activo. Para ello se realizaron dos aproximaciones. En primer lugar, se estudió en todos los sistemas mencionados anteriormente el porcentaje de la dinámica donde al menos dos aminoácidos reactivos (Tyr44, Glu52 y Tyr92) se encontraban puenteados mediante una molécula de agua, depositados en la **Tabla 3.1.2**.

De ésta se desprende que cuando el Glu52 se encuentra desprotonado, el sitio de unión al motivo (S)-S-O tiene una gran afinidad por unir una molécula de agua junto con la Tyr44, a

diferencia de lo que ocurre cuando se encuentra neutro. Cuando esto ocurre, también se observa la aparición de puentes Glu52-Tyr92. No parece haber una diferencia significativa asociado al estado de protonación de la Cys13.

**Tabla 3.1.2** Porcentaje de interacción entre aminoácidos puenteados por un agua (en %).

			Y44-E52	Y44-Y92	E52-Y92
<b>MtmsrA</b>	<b>C13<sup>S-</sup></b>	<b>E52<sup>COO-</sup></b>	28	4	8
		<b>E52<sup>COOH</sup></b>	07	6	2
	<b>C13<sup>SH</sup></b>	<b>E52<sup>COO-</sup></b>	27	2	4
		<b>E52<sup>COOH</sup></b>	5	2	2
<b>MtmsrA+MetSO</b>	<b>C13<sup>S-</sup></b>	<b>E52<sup>COO-</sup></b>	0	0.0	4
		<b>E52<sup>COOH</sup></b>	2	3	2
	<b>C13<sup>SH</sup></b>	<b>E52<sup>COO-</sup></b>	25	6	16
		<b>E52<sup>COOH</sup></b>	4	0.0	1
<b>MtmsrA+Met</b>	<b>C13<sup>S-</sup></b>	<b>E52<sup>COO-</sup></b>	30	6	12
		<b>E52<sup>COOH</sup></b>	4	2	3
	<b>C13<sup>SH</sup></b>	<b>E52<sup>COO-</sup></b>	24	5	5
		<b>E52<sup>COOH</sup></b>	0.00	5	2

Por otro lado, en los sistemas que tienen unido el sustrato se cuantificó la frecuencia de la interacción entre los diferentes residuos reactivos y el oxígeno del motivo (S)-S-O.

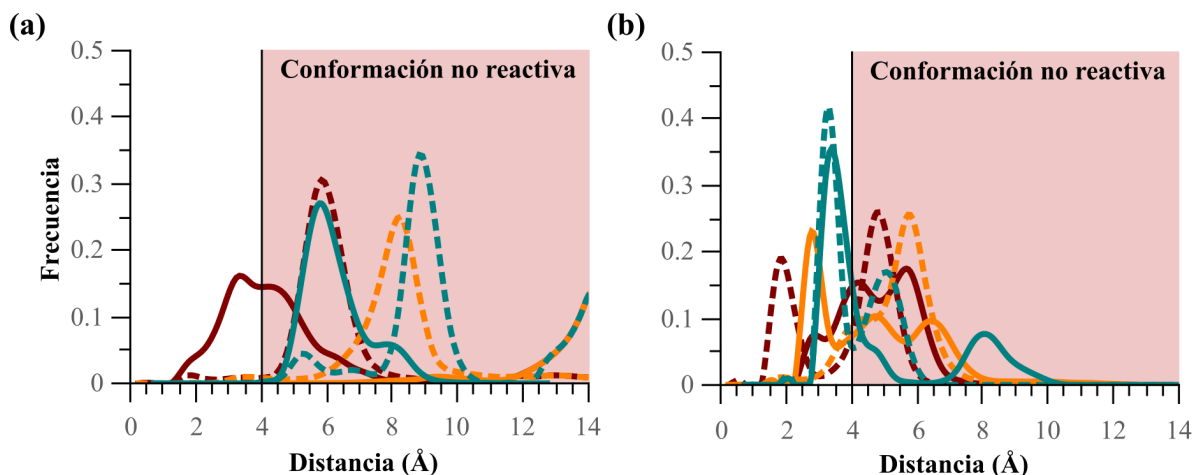
**Tabla 3.1.3.** Porcentaje de interacción entre aminoácidos y el motivo (S)-S-O (%).

#Res	<b>C13<sup>S-</sup></b>		<b>C13<sup>SH</sup></b>	
	<b>E52COO<sup>-</sup></b>	<b>E52COOH</b>	<b>E52COO<sup>-</sup></b>	<b>E52COOH</b>
<b>Y44</b>	0.00	23	0.0	3
<b>E52</b>	0.00	58	0.0	56
<b>Y92</b>	8	7	2	32

Cuando el Glu52 se encuentra desprotonado, no interacciona directamente con el motivo (S)-S-O, concordante con la interacción puenteada por agua entre estos tres residuos descrita en la **Tabla 3.1.3**. Por el contrario, cuando se encuentra neutro presenta interacción durante



gran parte de la dinámica, con una interacción prolongada por una de las dos tirosinas dependiendo del estado de protonación de la cisteína. En la **Figura 3.1.3** se muestra el histograma de estas interacciones descritas en la **Tabla 3.1.3**, considerando una distancia reactiva de  $<4 \text{ \AA}$  para el Glu52 y  $<2.5 \text{ \AA}$  para ambas tirosinas.

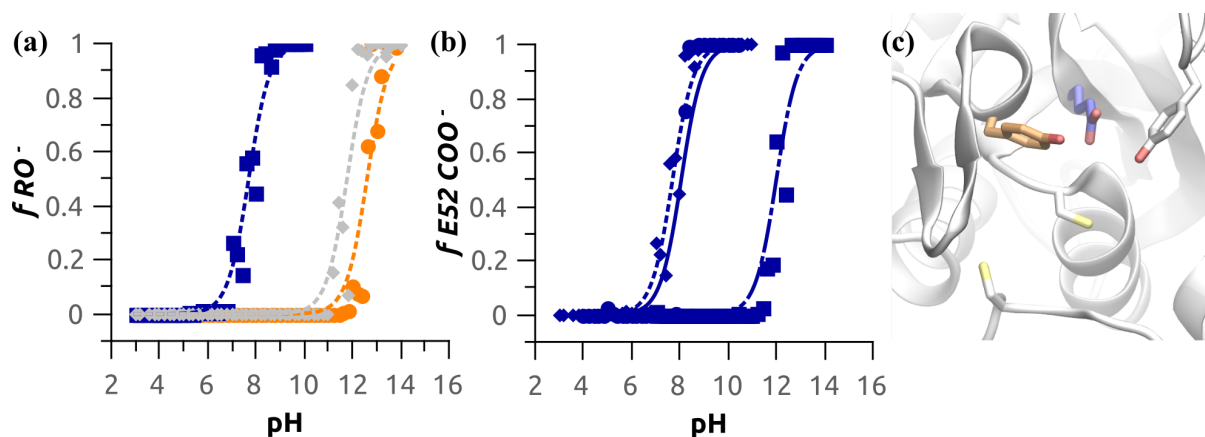


**Figura 3.1.3** Histogramas de las distancias entre Tyr44<sup>O<sup>e</sup></sup> (magenta), Glu52<sup>O<sup>e</sup></sup> (cian) y Tyr92<sup>O<sup>e</sup></sup> (naranja) y Met\*2<sup>O<sup>e</sup></sup> para el estado tiolato (trazo continuo) y tiol (trazo punteado) para MtmsrA+MetSO Glu52<sup>COO<sup>-</sup></sup> (a) y Glu52<sup>COOH</sup> (b).

En la **Figura 3.1.3** se observa la exploración conformacional de las variables depositadas en la **Tabla 3.1.3** para los diferentes estados de interés. En esta figura se observa que la conformación reactiva ve muy disminuída cuando el Glu52 se encuentra desprotonado frente al estado neutro, donde se encuentran lejos ambas tirosinas del motivo (S)-S-O. Este resultado es consistente con la formación de puentes de agua entre los residuos radiactivos aún en presencia de sustrato descritos en la **Tabla 3.1.2**.

Una vez que determinado los cambios inducidos en las propiedades del sitio activo y de la dinámica global de la proteína asociado a los estados de protonación de residuos claves, particularmente el Glu52, se determinó el  $pK_a$  de varios residuos con la técnica pHtMD descrita en la **Sección 2.2.2** de la metodología.

Si bien hubiera sido de interés titular el  $pK_a$  de los residuos Cys13 y Cys154, esta técnica tal como viene implementada en el paquete Amber18 utilizado en esta tesis de Maestría presenta varios inconvenientes a la hora de cuantificar  $pK_a$  anómalos de cisteína, aminoácido cuya acidez es muy susceptible al entorno. Es por ello que las diferentes situaciones se consideró el estado de ionización del tiol de la Cys13 más representativo para estos estados (neutro en ausencia de sustrato o presencia de producto y aniónico en presencia de sustrato)<sup>63</sup>.



**Figura 3.1.4** Medida de  $pK_a$  de residuos del sitio activo de *MtmsrA* mediante pHtMD. (a) Titulación de los residuos Tyr44 (línea punteada gris), Glu52 (línea punteada azul) y Tyr92 (línea punteada naranja) en ausencia de sustrato. (b) Titulación de Glu52 en ausencia de ligando (—,  $\diamond$ ), presencia de sustrato (---,  $\square$ ) o producto (----,  $\circ$ ). (c) Estructura del sitio activo resaltado la posición de los residuos titulados.

En la **Figura 3.1.4(a)** se observan las curvas de titulación de los residuos Tyr44, Gly52 y Tyr92 de *MtmsrA* en ausencia de sustrato señalados en la **Figura 3.1.4(c)**, con el tiol de la Cys13 en forma neutra. Los  $pK_a$  obtenidos se detallan en la siguiente **Tabla 3.1.4**.

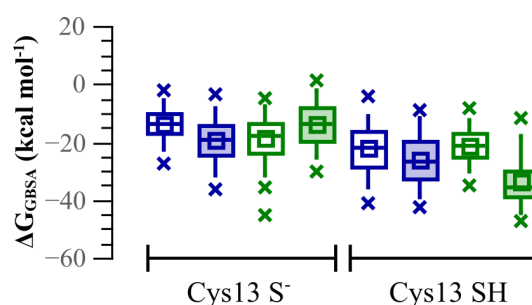
**Tabla 3.1.4.** Valores de  $pK_a$  obtenidos con pHtMD.

	Tyr44	Glu52	Tyr92
<i>MtmsrA</i>	11.78	7.70	12.61
<i>MtmsrA</i> +MetSO	ND	12.00	ND
<i>MtmsrA</i> +Met	ND	8.06	ND

Como se puede observar, estos valores corresponden a 11.78, 7.70 y 12.61 respectivamente. El  $pK_a$  de las tirosinas está próximo al esperado para este residuo en contexto proteico, siendo la Tyr44 ligeramente más ácida a la Tyr92. Por otra parte, el  $pK_a$  del Glu52 es varias unidades de pH más elevado al del ácido glutámico en solución. En otros sistemas biológicos también se vió que el  $pK_a$  de ácidos glutámicos se encuentra por encima para el respectivo del aminoácido en solución<sup>50</sup>, sobre todo cuando el ácido glutámico se encuentra “escondido” en el *core* del sitio activo o de la proteína. Por otro lado, en la **Figura 3.1.4(b)** se compara el  $pK_a$  del Glu52 en diferentes estados, con el sitio activo vacío, unida a sustrato o unida a producto. En este caso, los  $pK_a$  obtenidos son de 7.70, 12.00 y 8.06 respectivamente. Esta diferencia es de 4.3 unidades de pH ocurrida dentro del rango fisiológico de pH implica que a pH 7.4 la

fracción neutra de Glu52, la forma en la que puede transferir un protón al sustrato, incrementa de 66.6% a 99.9%.

Finalmente, la última propiedad dinámica evaluada fue la energía de unión del sustrato o producto de todos los sistemas descritos anteriormente mediante el método MMGBSA bajo la aproximación de trayectoria simple. En la **Figura 3.1.5** se observa el *boxplot* obtenido de la simulación, donde cada observación corresponde al valor de MMGBSA para dicha configuración molecular.



**Figura 3.1.5** Energía de unión calculada mediante MMGBSA. En azul se muestra el sistema *MtmrsA+MetSO*, mientras que en verde se muestra *MtmrsA+Met*. Los boxplot sin pintar corresponden a los sistemas con Glu52 COO<sup>-</sup> y pintado a Glu52 COOH.

En la figura presentada anteriormente se describe la energía de unión de los diferentes sistemas mediante un *boxplot*, mientras que en la **Tabla 3.1.5** se reporta la media de cada sistema así como el error sobre la media. Los diferentes sistemas estudiados presentan diferentes rangos, que no parece correlacionar con el estado de protonación de los diferentes aminoácidos estudiados.

**Tabla 3.1.5** Energía de unión del sustrato/producto medido mediante  $\Delta MM(GB)SA$  para los diferentes sistemas evaluados (kcal mol<sup>-1</sup>)

	C13 S <sup>-</sup>		C13 SH	
	Glu52 COO <sup>-</sup>	Glu52 COOH	Glu52 COO <sup>-</sup>	Glu52 COOH
<i>MtmrsA+MetSO</i>	-13.0 ± 0.2	-18.7 ± 0.2	-21.9 ± 8	-25.9 ± 9
<i>MtmrsA+Met</i>	-18.5 ± 0.7	-12.9 ± 0.2	-20.3 ± 6	-33.1 ± 8

De la **Tabla 3.1.4** se extrae que, en todos los casos estudiados, la energía de unión de los diferentes complejos estudiados es menor cuando la Cys13 se encuentra como tiolato. Por el contrario, a excepción del sistema *MtmrsA+Met* Cys13<sup>S<sup>-</sup></sup>, la forma neutra del Glu52 incrementa esta energía de unión. Este resultado es consistente con lo observado

anteriormente, donde el Glu52 en estado neutro interacciona durante una fracción importante de la dinámica con el O $\epsilon$  del motivo (S)-S-O. Ambos cambios en el  $\Delta$ MMGBSA son coherentes con una desestabilización del complejo inicial como mecanismo de catálisis.

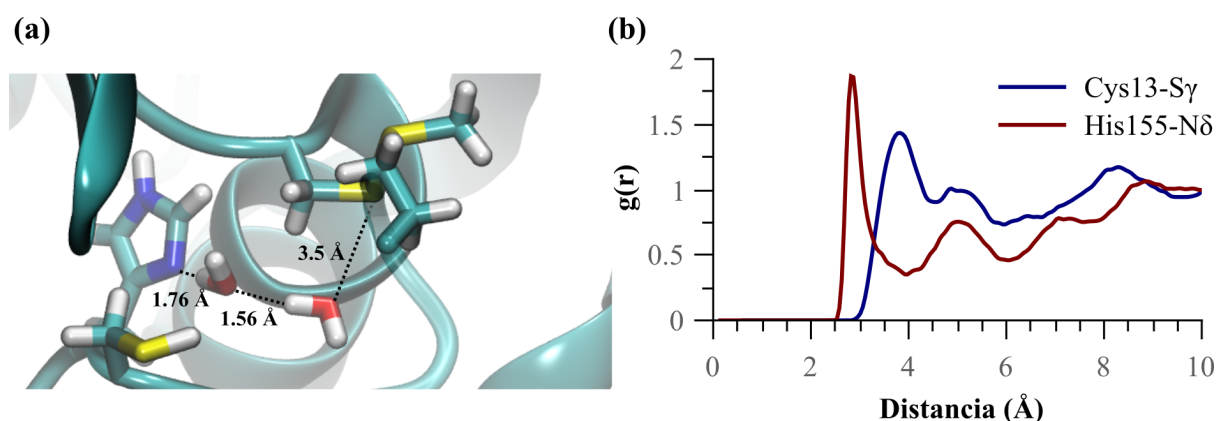
En suma, se logró caracterizar el comportamiento dinámico de la enzima en ausencia y presencia de sustrato/producto en su estado reducido. A su vez, el residuo Glu52 en presencia de sustrato se encontrará preferencialmente en forma favorable a la reacción. Esto se ve reforzado con los estudios de los complejos de Michaelis abordados en la sección anterior, donde se determinó que es el residuo que interacciona durante más tiempo con el motivo sulfóxido del sustrato.

### 3.2 Caracterización de los diferentes intermediarios enzimáticos

Como se verá en la **Sección 4.3.1**, a diferencia de los reportes de Thiriot y colaboradores o Dokainish y colaboradores, el primer intermediario enzimático del ciclo catalítico corresponde al catión sulfonio o sulfonio en lugar del sulfurano, previo a la formación del ácido sulfénico. En esta sección se abordará la caracterización dinámica y los cambios a nivel del sitio activo que acontecen a la formación del disulfuro.

Para ello se realizó una MD utilizando el protocolo de la **Sección 2.2.1**. Las estructuras de partida elegidas para realizar las simulaciones de los diferentes intermediarios corresponden a la obtenida tras optimizar clásicamente el mínimo hallado a nivel QM/MM.

En primer lugar, se muestra como se encuentra hidratada la Cys13 y la His155 en el sitio activo, medido según la función de distribución radial,  $g(r)$ , de los átomos Cys13<sup>S $\gamma$</sup>  o His155<sup>N $\delta$</sup>  respectivamente respecto a las moléculas de agua.



**Figura 3.2.1** Comportamiento dinámico del intermediario sulfonio. **(a)** Representación de un fotograma de la MD, indicando cómo se estructuran las aguas alrededor del sulfonio. **(b)** Distribución radial de las moléculas de agua alrededor de los átomos Cys13<sup>S $\gamma$</sup>  o His155<sup>N $\delta$</sup> .

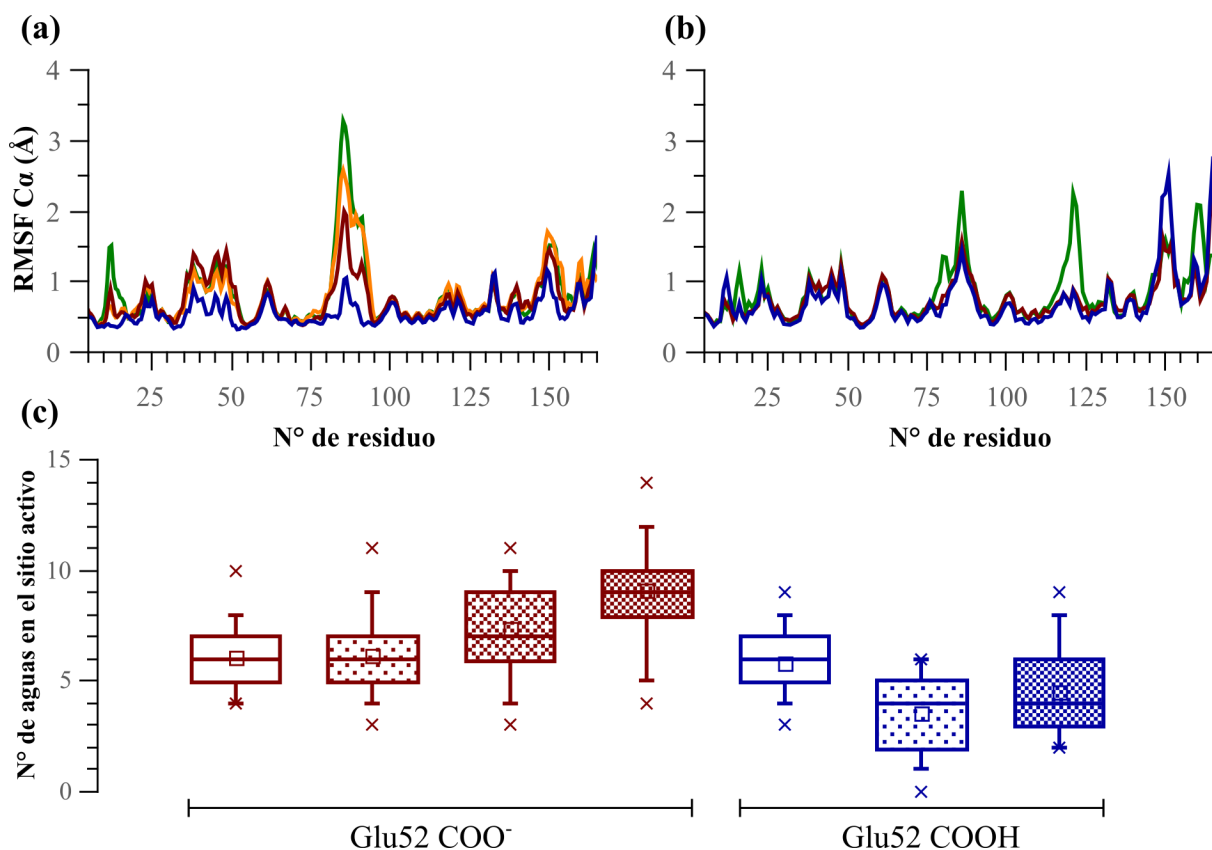
Como se observa en una **Figura 3.2.1(a)**, la Cys13 se encuentra interaccionando con la His155 a través de dos moléculas de H<sub>2</sub>O. Esto se verifica con la distribución radial que presentan las aguas sobre los átomos Cys13<sup>S $\gamma$</sup>  y His155<sup>N $\delta$</sup>  (línea roja y negra respectivamente de la **Figura 3.2.1(c)**). Esta disposición se encontró durante un 39% de la MD. Esta disposición es favorable para que la His155 actúe como una base, acoplado la catálisis ácido-base por al ataque nucleofílico de una molécula de H<sub>2</sub>O sobre el sulfénico, evaluado en la **Sección 4.2.2**.

Como se describió previamente, la formación del sulfénico requiere de la presencia de un catalizador básico, mientras que su resolución de un catalizador ácido, debido a la alta

basicidad del grupo OH. Para determinar si el residuo His155 puede actuar nuevamente como catalizador ácido/base, se determinó su  $pK_a$  aplicando el protocolo descrito en la **Sección 2.2.2**, considerando a la Cys13 como ácido sulfénico y la Cys154 como tiol y tiolato, obteniendo como resultado 8.6 y 8.4 respectivamente. A pH fisiológico, este residuo se encontrará protonado, por lo que será tenido en cuenta para las sucesivas simulaciones.

El residuo Glu52 es otro candidato para actuar como catalizador ácido/base en esta etapa. Sin embargo, no fue posible determinar su  $pK_a$  ya que el mismo se encuentra influenciado por la Cys13 en forma de sulfénico cuyo  $pK_a$  es desconocido. Para solventar esto se realizó el estudio dinámico de este estado de oxidación para ambos estados iónicos del Glu52.

En primer lugar, se estudió los cambios de flexibilidad medidos según el RMSF de los  $C\alpha$ , tal como se muestra en la **Figura 3.2.2**.

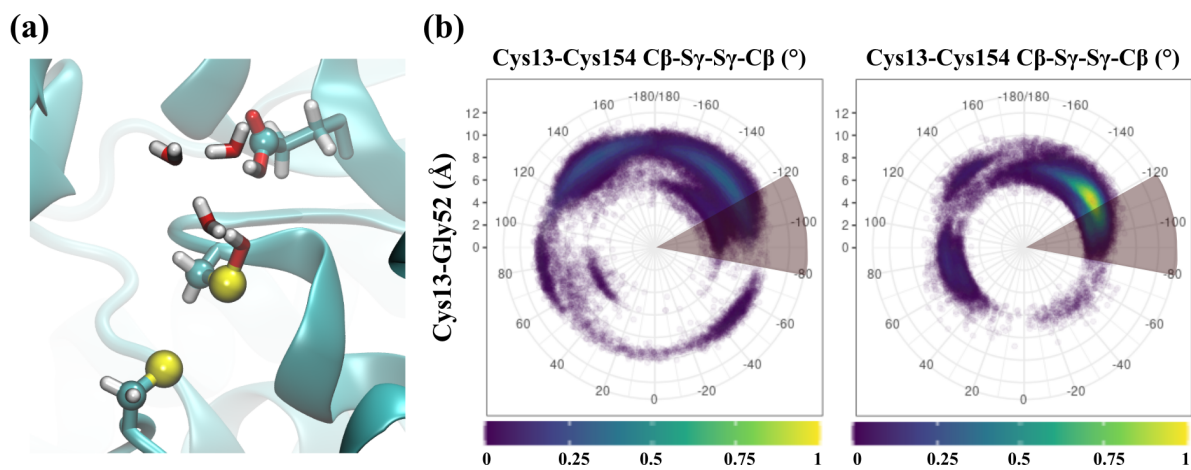


**Figura 3.2.2.** Propiedades dinámicas de la proteína y el sitio activo en diferentes estados de oxidación de la Cys13 y de protonación del Glu52. **(a)** Flexibilidad proteica medida según el RMSF de los  $C\alpha$  de la proteína eliminando extremos N y C terminal con Glu52  $COO^-$  y **(b)**  $COOH$ . En azul *MtmrA*, en rojo *MtmrA*+MetSO, en naranja *MtmrA* Cys13-Sulfonio y en verde *MtmrA* Cys13-Sulfénico. **(c)** Número de aguas presentes en el sitio activo calculado según las aguas a menos de 6 Å del  $C\alpha$  de la Cys13. De izquierda a derecha, *MtmrA*, *MtmrA*+MetSO, *MtmrA* Cys13-Sulfonio y *MtmrA* Cys13-Sulfénico.

Tal como se observa en la **Figura 3.2.2(a)**, la región que se ve más afectada debido al estado de oxidación de la Cys13 cuando el Glu52 se encuentra desprotonado, es la correspondiente a la horquilla  $\beta$  próxima al sitio activo. Por otro lado, en la **Figura 3.2.2(b)** se observa que la zona de mayor movilidad se encuentra entre los residuos 110-125, correspondiente a la  $\alpha 3$ , región distal del sitio activo. Este resultado es consistente con los estudios en RMN de *EcmsrA*<sup>67</sup>, donde se observa una pérdida de estructura en dicha región cuando la proteína se encuentra como disulfuro.

A su vez se comparó el nivel de hidratación del sitio activo medido según la cantidad de aguas que se encuentran radialmente a 6 Å del Cys13<sup>C $\alpha$</sup> . Cuando la proteína se encuentra en su estado reducido, no hay diferencias asociadas al estado de ionización del Glu52, pero a medida que ésta se oxida las diferencias se pronuncian, lo cual implicaría una desorganización mayor a nivel del sitio activo.

Finalmente, en virtud de cuantificar mejor estos cambios a nivel del sitio activo y de identificar una conformación adecuada para el proceso de resolución, en la **Figura 3.2.3** se cuantificó el muestreo conformacional midiendo la distancia de la Cys13 al Glu52 y el diedro formado por los átomos Cys154<sup>C $\beta$</sup> -Cys154<sup>S $\gamma$</sup> -Cys13<sup>S $\gamma$</sup> -Cys13<sup>C $\beta$</sup> .



**Figura 3.2.3.** Exploración conformacional del estado Cys13-SOH y Cys154-S<sup>-</sup> según el estado de ionización de Glu52. (a) Estructura representativa del estado Cys13-SOH con Glu52 COOH. (b) Mapas bidimensionales de frecuencia de distancia Cys13<sup>S $\gamma$</sup> -Glu52<sup>C $\delta$</sup>  y el diedro Cys154<sup>C $\beta$</sup> -Cys154<sup>S $\gamma$</sup> -Cys13<sup>S $\gamma$</sup> -Cys13<sup>C $\beta$</sup> .

En la **Figura 3.2.3** se observa que el muestreo conformacional adoptado cambia significativamente según el estado de protonación del Glu52. Cuando éste se encuentra neutro, la Cys13 se encuentra más próxima a él, consistente con el menor número de H<sub>2</sub>O detectadas en el sitio activo en este estado, a diferencia de lo que ocurre cuando se encuentra

desprotonado. El valor del ángulo diedro formado Cys154<sup>CB</sup>-Cys154<sup>Sγ</sup>-Cys13<sup>Sγ</sup>-Cys13<sup>CB</sup> propicio para un disulfuro proteico debe encontrarse en el entorno de -80 y -120<sup>130,131</sup>. Cuando el Glu52 se encuentra desprotonado, visita esta conformación durante un 13% de la dinámica, mientras que cuando está neutro incrementa a 26.4%. Si restringimos a las estructuras donde el Glu52 se encuentra a menos de 8 Å de Cys13<sup>Sγ</sup> este número se ve reducido a 7.7% y 25.5% respectivamente.

### 3.3 Estudio de *MtmsrA* en el estado disulfuro

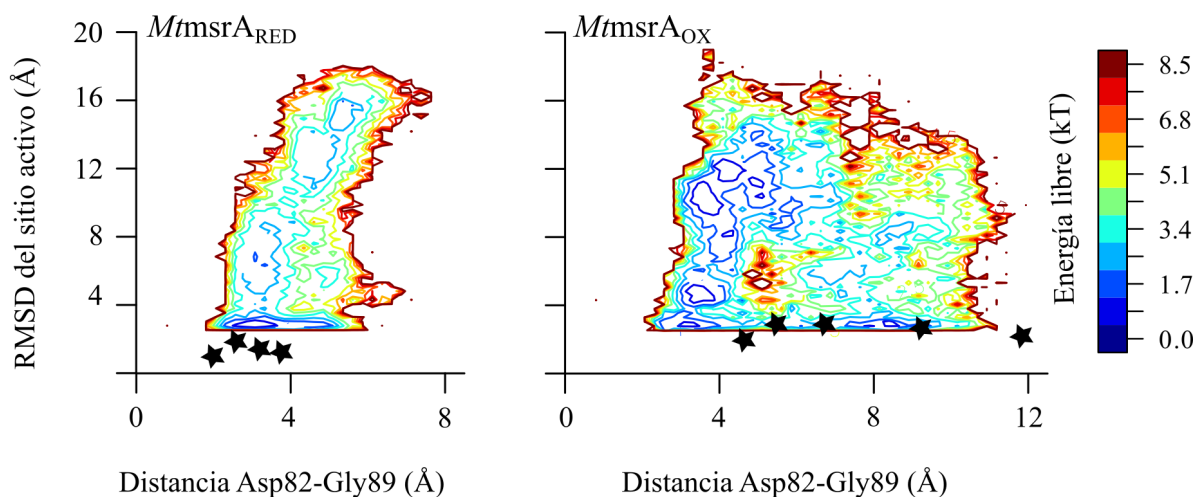
Previo a realizar el *docking* proteína-proteína entre *MtmsrA* y *MtTrxC* para comprender las bases moleculares de dicha interacción, se caracterizó el estado completamente oxidado de la primera enzima. Para ello se siguió el protocolo descrito en la **Sección 2.2.5**, tanto de la enzima oxidada a disulfuro como reducida como control de aceleración. Los parámetros de aceleración empleados se encuentran depositados en la **Tabla 3.3.1**.

**Tabla 3.3.1.** Parámetros de aceleración empleados para los diferentes sistemas durante las aMD.

	N° de átomos	N° de residuos	$E_{pot}$	$E_{died}$	$\alpha_{pot}$	$\alpha_{died}$	Muestreo total
<i>MtmsrA</i> <sub>red</sub>	28420	166	-81943	2721	5684	116	5x300ns
<i>MtmsrA</i> <sub>ox</sub>	28373		-81773	2725	5674		

Como se comentó anteriormente, en la **Figura 3.2.3** se observa que la región próxima a la Cys13 presenta un incremento en su flexibilidad a medida que ésta se oxida progresivamente. Esto también se describió mediante el incremento del número de aguas a nivel del sitio activo. Como se mencionó anteriormente en la introducción, en trabajos previos determinó que cuando la *msrA* se encuentra como disulfuro, las regiones próximas al sitio activo, y este mismo, pierden su estructuración. Como variables para caracterizar el estado oxidado se tomó el RMSD de los fragmentos que contienen a los residuos del sitio activo, así como una distancia clave entre residuos que forman dicha horquilla. Sobre estas variables se realizó un *reweighting* siguiendo lo reportado en la bibliografía<sup>107,123</sup> para recuperar la superficie de energía libre, como se muestra en la **Figura 3.3.1**.



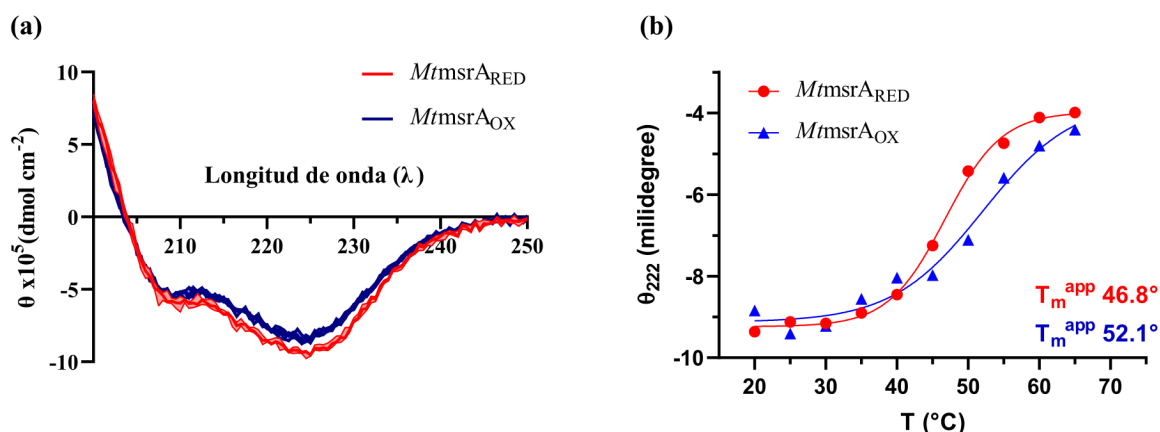


**Figura 3.3.1.** Superficie de energía libre de las variables elegidas. **(a)** Superficie correspondiente a *MtmsrA*<sub>RED</sub> y **(b)** Superficie correspondiente a *MtmsrA*<sub>OX</sub>. Las estrellas marcadas en las superficies de energía libre corresponden a los valores de estas mismas variables de *EcmsrA* en su respectivo estado de oxidación.

El mínimo localizado a 2 Å de RMSD con el enlace de hidrógeno formado en la horquilla próxima al sitio activo se corresponde al estado nativo, observado en ambos estados redox. Cuando la proteína se encuentra reducida, este mínimo es el más estable, existiendo otros estados conformacionales con la horquilla formada pero con el sitio activo desestructurado. En la superficie de energía libre se representa el promedio de las estructuras determinadas por RMN de *EcmsrA* en ambos estados de oxidación.

Cuando la *MtmsrA* se encuentra oxidada el estado nativo deja de ser el más estable y los diferentes mínimos localizados en la superficie de la proteína reducida se estabilizan. Uno de los estados hallados coincide con el estado oxidado de *EcmsrA*.

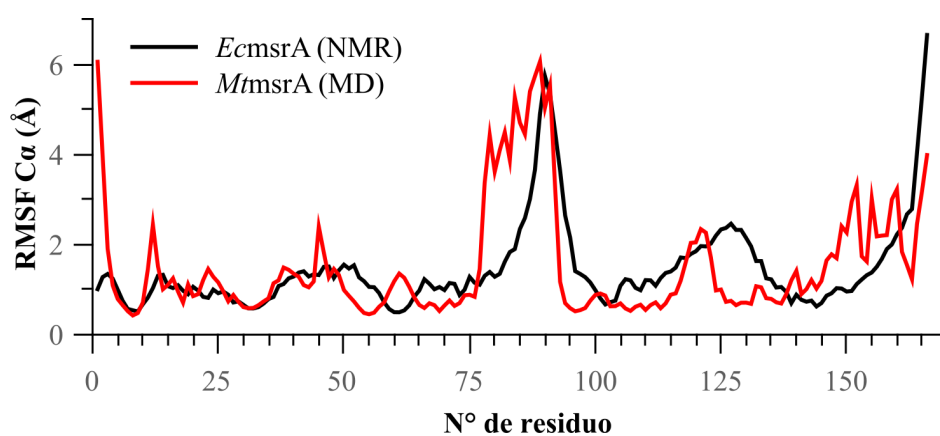
Los cambios estructurales asociados a la oxidación de la *MtmsrA* también se siguieron mediante el espectro de dicroísmo circular, según se detalló en la **Sección 2.2.7**, tal como se muestran en la siguiente figura:



**Figura 3.3.2.** (a) Espectro de dicroísmo circular de *MtmsrA* en su estado reducido (línea roja) y oxidado (línea azul). (b) Estudio de la temperatura de desnaturalización de *MtmsrA* en ambos estados de oxidación.

En el espectro de dicroísmo circular se evidencia una pérdida de estructura secundaria asociada a la formación del enlace disulfuro. Sin embargo, una vez que la proteína se encuentra oxidada, esta presenta una  $T_m^{app}$  5.3°C superior, cambio similar al observado en otras proteínas globulares<sup>132,133</sup>.

A partir de la superficie de energía libre determinada para el estado oxidado, se extrajeron cuatro estructuras (próximas a la referencia del estado oxidado descrito para *EcmsrA*) y se corrieron 500ns de cMD. Cuando se compara el comportamiento dinámico de la proteína, medido según el RMSF de los  $C\alpha$ , tal como se realizó en las **Secciones 3.2.1** y **3.2.2**, se observa que el comportamiento es similar al que presenta *EcmsrA*, tal como se muestra a continuación:



**Figura 3.3.3.** Análisis de flexibilidad proteica medida según el RMSF de los  $C\alpha$  de la *MtmsrA* y *EcmsrA*.

En la **Tabla 3.3.2** se depositan otras propiedades del comportamiento dinámico relevantes para la interacción con *Mttrx* de la proteína en su estado oxidado, comparándolas con la dinámica RMN de *EcmsrA*.

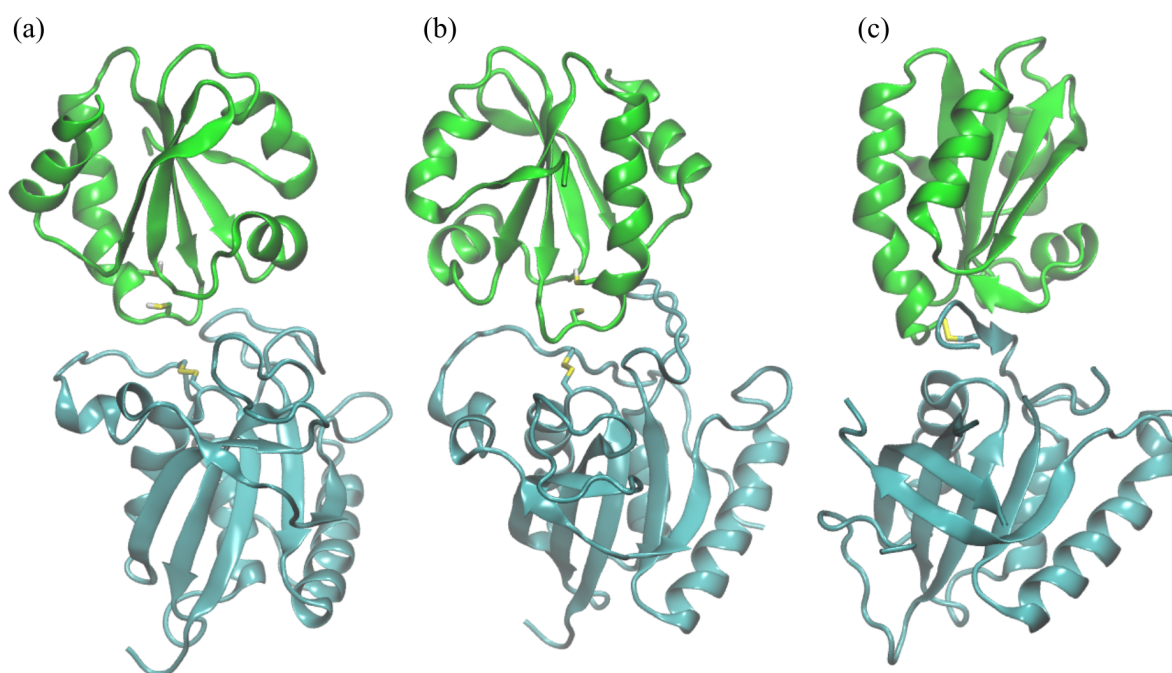
**Tabla 3.3.2.** Cambio en las propiedades dinámicas de *msrA<sub>OX</sub>* vs *msrA<sub>RED</sub>* para *MtmsrA* y *EcmsrA*.

		<i>EcmsrA</i>	<i>MtmsrA</i>			
			#1	#2	#3	#4
DSSP (%)	hélice $\alpha$	-2.2	-0.85	0.05	0.78	1.17
	hoja $\beta$	-1.94	-2.27	-1.98	-2.31	-2.19
$\Delta$ SASA* ( $\text{\AA}^2$ )		304	-120	84	34	32
$\Delta$ Radio de giro ( $\text{\AA}$ )		$0.6 \pm 0.3$	$0 \pm 0.17$	$0.2 \pm 0.17$	$0 \pm 0.17$	$0.1 \pm 0.17$

\*- El valor de SASA se calculó sobre los residuos que se encuentren a 7  $\text{\AA}$  del residuo Cys13. Las diferencias se consideraron calculando el valor de la propiedad para *MtmsrA<sub>RED</sub>*-*MtmsrA<sub>OX</sub>*.

El contenido de estructura secundaria de las diferentes réplicas es similar al cambio que presenta *EcmsrA*, mientras que el cambio en el parche hidrofóbico de ésta es significativamente mayor. Esta pérdida de estructura secundaria asociado presente en la enzima oxidada se condice con el trabajo de Palde y colaboradores<sup>134</sup>, quienes determinaron que el principal factor que permiten la formación de complejos transientes entre tiorredoxina y sus diferentes blancos fisiológicos es la exposición de un parche hidrofóbico, que lleva a la disminución en la entropía de solvatación una vez se forma el complejo. Por otra parte, ni la superficie expuesta de los aminoácidos hidrofóbicos en un entorno de 7  $\text{\AA}$  del disulfuro como el radio de giro se vieron incrementados como sucede en *EcmsrA*.

Finalmente, a partir de estas simulaciones se realizó un análisis de *cluster* según RMSD de  $C\alpha$ , agrupando todas las estructuras de *MtmsrA*, en orden de obtener diferentes estructuras representativas de dichos *clusters* y realizar el docking proteína-proteína con las estructuras representativas extraídas de la simulación de *MttrxC* (para más información sobre las simulaciones de *MttrxC*, ver **Sección A2** del **Anexo**). El docking se llevó a cabo con la herramienta HADDOK, tal como se describe en la **Sección 2.2.6** de la metodología. De todas las estructuras de partidas evaluadas inicialmente, se encontraron las siguientes estructuras que sirven como punto inicial para el estudio del complejo *MtmsrA:MttrxC*.



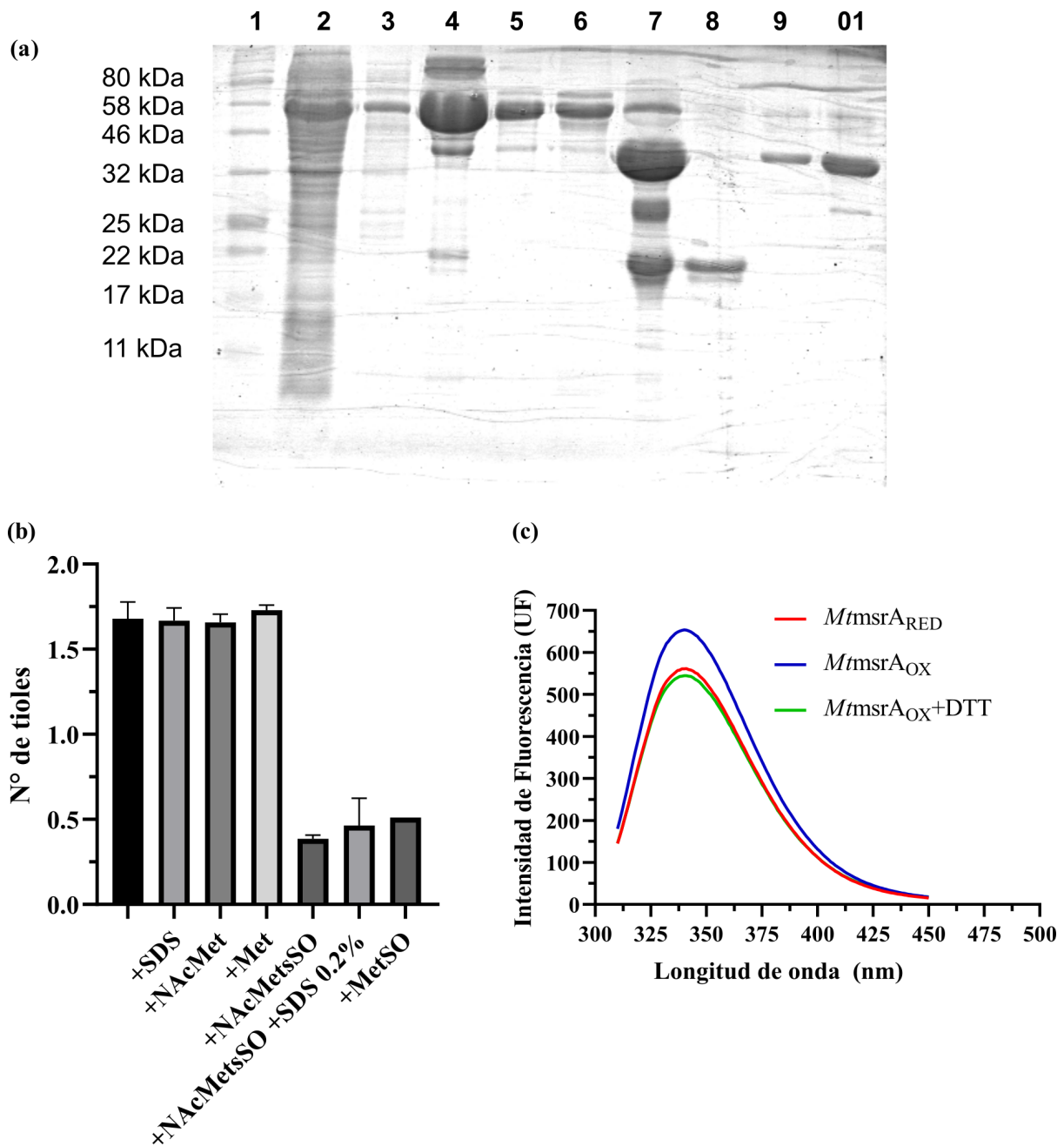
**Figura 3.3.4** Estructura tridimensional de los complejos msrA:trx. **(a)** y **(b)** las mejores predicciones realizadas por HADDOCK de *MtrxC-MtmsrA* y **(c)** Complejo de *Sctrx2-ScmsrA* (PDBid 3PIN)<sup>74</sup>.

Si bien la estructura inicial del complejo obtenida en ambos casos es consistente con lo esperado, la orientación relativa de *MtrxC* a *MtmsrA* no coincide con la reportada por Ma y colaboradores<sup>74</sup>, pese a la correcta orientación del tiol de *MtrxC* respecto al disulfuro de *MtmsrA*. Sin embargo, no existe suficiente evidencia experimental para determinar que esa orientación es la más estable. Si se partiera a partir de una de estas estructuras, el tiempo característico de la rotación de una proteína respecto a otra supera por amplio margen los tiempos de muestreo accesibles hoy en día.

### 3.4 Obtención de *MtmsrA* recombinante pura

Siguiendo el protocolo descrito en la **sección 2.2.7** se procedió en primer lugar a purificar la *MtmsrA* de forma recombinante. El proceso de purificación se detalla en los geles mostrados en la **Figura 3.4.1**. Tal como se observa, el sistema produce la proteína de fusión en gran cantidad respecto a las otras proteínas presentes en el lisado bacteriano, y es el elemento que queda retenido en mayor concentración en la columna de HisTrap. En el segundo gel se observa que la TEV proteasa realiza el corte de manera satisfactoria, ya que se pueden distinguir únicamente dos bandas en los pesos moleculares esperados para *MtmsrA* (21 kDa)

y MBP (43 kDa). De esta forma fue posible obtener una fracción pura con un rendimiento de 6 mg proteína/litro de cultivo.



**Figura 3.4.1** Purificación y caracterización de la *MtmsrA* recombinante. **(a)** Gel reductor SDS 15% del proceso de purificación. Carril 1) marcador de peso molecular, 2) fracción no unida, 3) eluido con 25 mM de imidazol, 4) y 5) eluido con 100 mM imidazol, 6) eluido con 250 mM imidazol, 7) mezcla post tratamiento con TEV proteasa, 8) fracción no unida 2, 9) eluido con 100 mM imidazol, 10) eluido con 250 mM imidazol. **(b)** Determinación del número de tioles mediante ensayo con DTNB en diferentes condiciones. **(c)** Espectros de emisión de fluorescencia de *MtmsrA* reducida (línea roja), *MtmsrA* oxidada (línea azul) y *MtmsrA* oxidada con agregado de 1 mM DTT (línea verde)

Una vez que se obtuvo la fracción pura de *MtmsrA*, se procedió a evaluar si presenta cambios fluorimétricos asociados a su oxidación. Para ello, se midió el número de tioles libres presentes en la muestra siguiendo el protocolo descrito en la **Sección 2.2.7**. Como se observa en la **Figura 3.4.1(b)**, cuando a la proteína reducida se le agrega un exceso de NAcMetSO se detectan únicamente 0.4 tioles por mol de proteína, tanto en presencia como ausencia de SDS, lo que indica que los tioles presentes se encuentran en una forma no reactiva con DTNB, presumiblemente como disulfuro. Por otra parte, cuando no se agrega nada a la muestra o se adiciona NAcMet o Met se detectan alrededor de 1.8 tioles libres por mol de proteína, ligeramente inferior al valor de 2 tioles esperado si la enzima estuviera completamente reducida. Estos resultados en suma indican que el protocolo de reducción de la enzima funciona correctamente y que la enzima recombinante retiene la capacidad de oxidarse en presencia de NAcMetSO.

De la **Figura 3.4.1(c)**, observando los espectros emisión a 295 nm vemos que existen cambios espectrales asociados al estado redox de la proteína, tal como se había reportado para proteínas homólogas<sup>129</sup>, y que estos cambios son reversibles con el agregado de un reductor<sup>129</sup>.

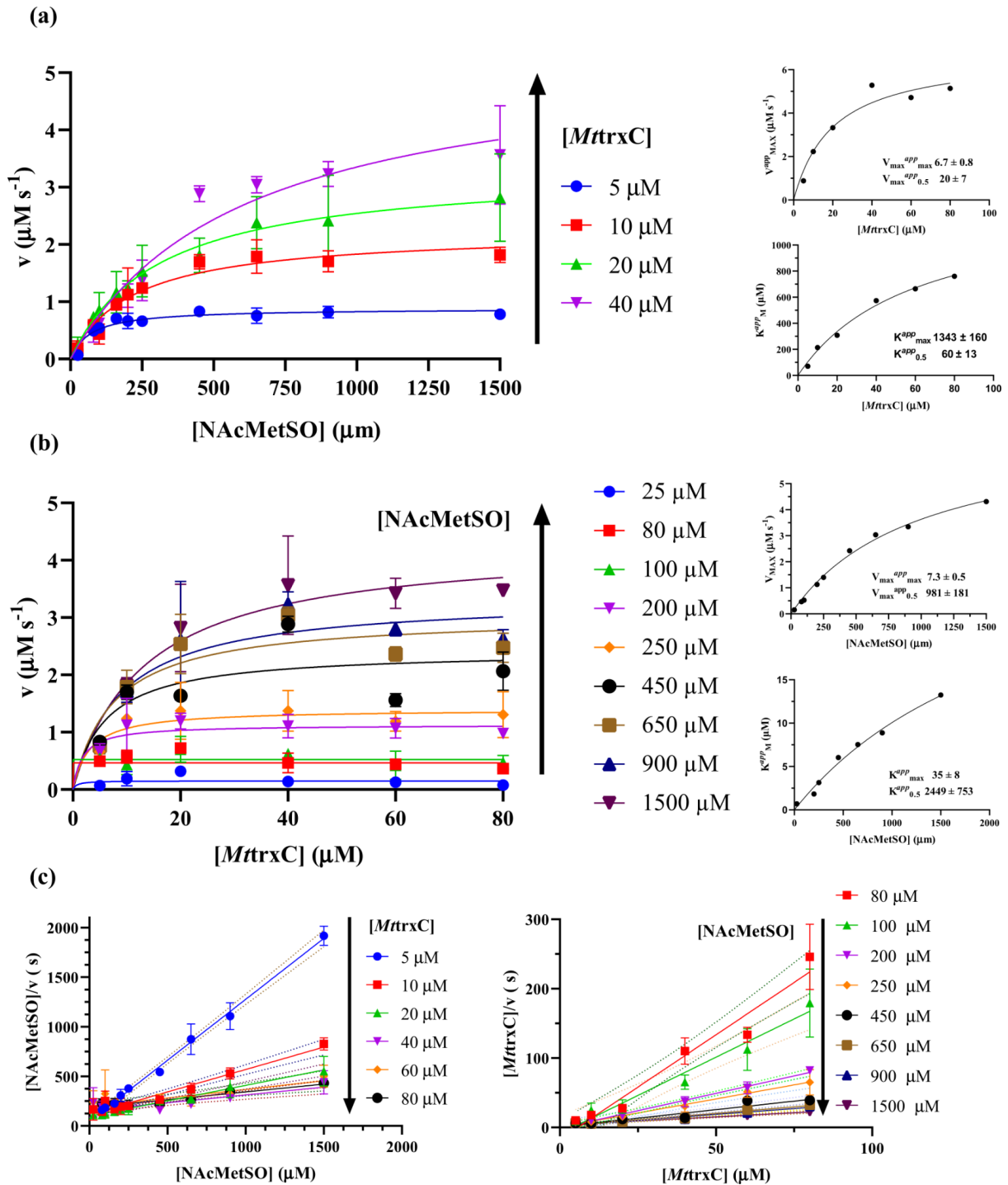
## 4. Caracterización cinética del mecanismo catalítico de la *MtmsrA*

### 4.1 Caracterización cinética en estado estacionario

En virtud de caracterizar la cinética en estado estacionario de la *MtmsrA* producida en forma recombinante según se describió en el paso anterior, se realizó un ensayo de actividad acoplado al sistema TR reductasa, tal como se describió en la **Sección 2.2.7**. Brevemente, en una misma solución se añaden NADPH, *PaTR*, *MtrxC/Ectrx1*, *MtmsrA*, y tras el agregado de diferentes concentraciones de sustrato se sigue la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH.

El mecanismo bisustrático propuesto para *MtmsrA*, tal como para todas las enzimas dependientes de la vía de la TR, es tipo ping-pong. Este mecanismo puede comprobarse realizando registros primarios de velocidad inicial en función de uno de los sustratos, para diferentes concentraciones del segundo sustrato constante durante el experimento. De esta forma, pueden ajustarse las curvas obtenidas a la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten y obtener los parámetros  $V_{\max}^{\text{app}}$  y  $K_{0.5}^{\text{app}}$ . A continuación, se construyen los registros secundarios graficando la dependencia de estos parámetros con el otro sustrato, y de estas curvas puede obtenerse el  $K_M$  y  $k_{\text{cat}}$  de la enzima para ambos sustratos. Si el comportamiento de estos parámetros es hiperbólico, nos encontramos frente a una enzima bisustrática *ping-pong*<sup>128</sup>. Tal como se observa en la **Figura 4.1.1**, la dependencia de los parámetros aparentes con el otro sustrato se ajustan correctamente a una hipérbola, confirmando que es un mecanismo tipo ping-pong.

Los ajustes de las hipérbolas de la **Figura 4.1.1** se realizaron en forma independiente, y los valores de los parámetros enzimáticos coinciden con los correspondientes al otro sustrato, teniendo en cuenta la desviación sobre la medida. A continuación, en la **Tabla 4.1.1**, se reporta el valor de los diferentes parámetros ajustados, así como los obtenidos por Lee y colaboradores en su trabajo en *MtmsrA*.



**Figura 4.1.1.** Ensayos de actividad enzimática en estado estacionario. Cada experimento de velocidad en función de sustrato corresponde a tres curvas realizadas en forma independiente. Los ensayos en estado estacionario se realizaron con  $[\text{SaTR}]$  2  $\mu\text{M}$ ,  $[\text{MtrxC}]$  5-80  $\mu\text{M}$ ,  $[\text{NacMetSO}]$  0-3000 mM, pH 7.4, 25°C. **(a)** Velocidad en función de  $[\text{NacMetSO}]$  a diferentes concentraciones de  $\text{MtrxC}$  y gráficos secundarios correspondientes. **(b)** Velocidad en función de  $[\text{MtrxC}]$  a diferentes concentraciones de  $\text{NacMetSO}$  y gráficos secundarios correspondientes. **(c)** Gráficos de  $[\text{sustrato}]/v$  en función de la  $[\text{sustrato}]$  (ver **Sección 2.2.7**)

En la **Figura 4.1.1** se observa que la dependencia de la velocidad inicial en función de ambos sustratos sigue un perfil hiperbólico. Esto se verifica en la linealización de cada hipérbola del



gráfico de  $[\text{NAcMetSO}]/v$  vs  $[\text{NAcMetSO}]$  o  $[\text{MttrxC}]/v$  vs  $[\text{MttrxC}]$ . En estos gráficos se observa que las rectas se cortan en la ordenada en el origen, tal como se espera para un mecanismo tipo *ping pong*<sup>128</sup>. A continuación, los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de los gráficos secundarios de las constantes aparentes en función del otro sustrato, evidenciados también en la **Figura 4.1.1**.

**Tabla 4.1.1.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir de las gráficas de la Figura 16.

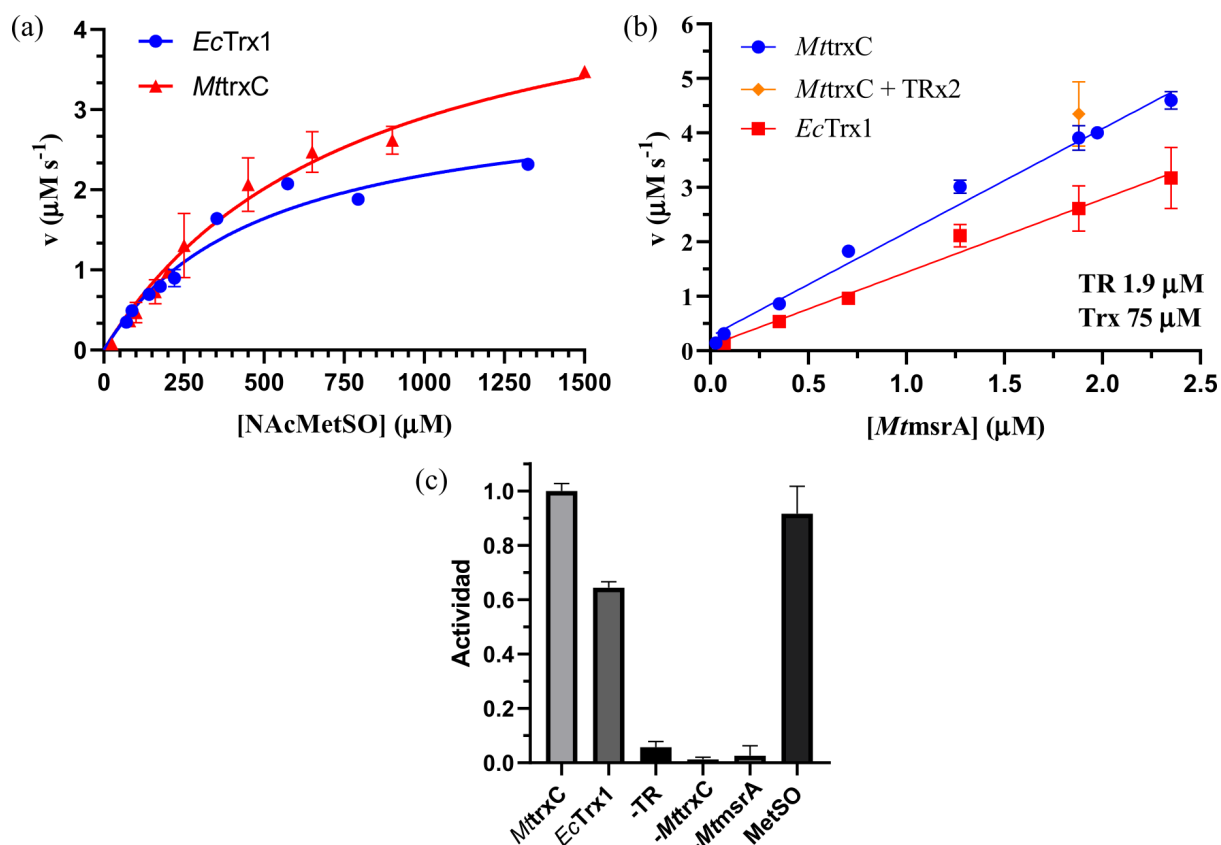
	$K_M$ (mM)	$V_{\max}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
NAcMetSO	$1.34 \pm 0.16$	$7.3 \pm 0.5$	$3.65 \pm 0.3$	$2656 \pm 535$
	$1.60 \pm 0.40^1$	ND	$2.60 \pm 0.2^1$	$1625 \pm 425^1$
<i>MttrxC</i>	$0.020 \pm 0.007$	$6.7 \pm 0.5$	$3.35 \pm 0.4$	$(1.7 \pm 0.8) \times 10^6$
<i>Ectrx1</i> <sup>2</sup>	0.49	3.2	1.6	3300

1- Valores extraídos del trabajo de Lee y colaboradores<sup>34</sup>.

2- Valores del ajuste de la curva de velocidad con  $80 \mu\text{M}$  *Ectrx1*.

En primer lugar, los valores reportados en este trabajo de tesis se encuentran próximos a los reportados por Lee y colaboradores<sup>34</sup>. La diferencia en  $k_{\text{cat}}$  y  $k_{\text{cat}}/K_M$ , puede deberse a que en este trabajo se empleó como reductor a *MttrxC*, uno de los reductores fisiológicos posibles, en lugar de *Ectrx1*. Para testear la posibilidad de un cambio en los parámetros cinéticos cambiando el reductor se realizó un ensayo acoplado a una única concentración de *Ectrx1*, comparando con los resultados de *MttrxC* a la misma concentración.

Como se puede ver en la **Tabla 4.1.1** y en la **Figura 4.1.2(a)**, el valor de  $k_{\text{cat}}$  con *Ectrx1* frente a *MttrxC* es menor, y ambos se encuentran en el orden de lo reportado para esta enzima. Los valores de  $K_M$  tanto para NAcMetSO como para *MttrxC* se encuentran en el orden con los reportados en las **Tablas 1.2.1** y **1.4.1** de la introducción. El valor de  $k_{\text{cat}}/K_M$  no se encuentra afectado por el cambio del cosustrato reductor, tal como se esperaba.



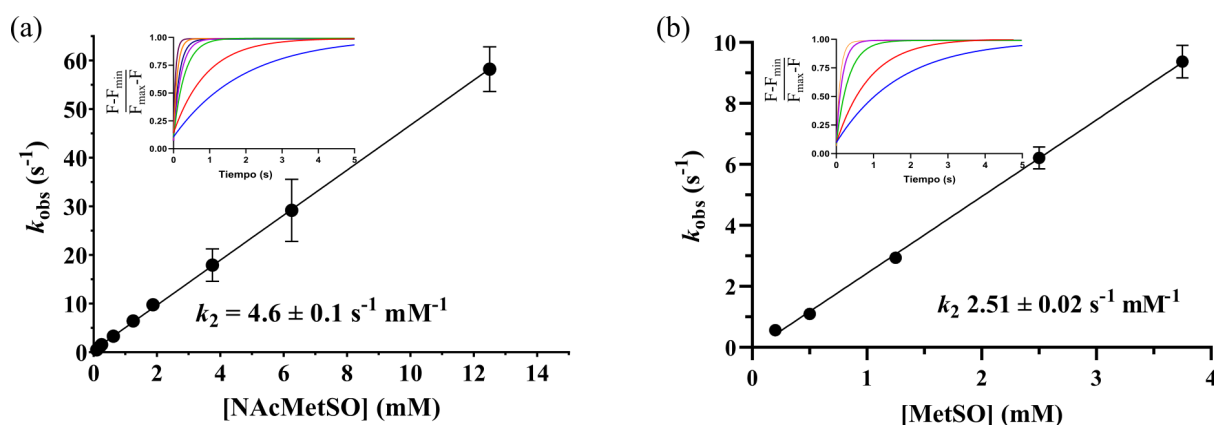
**Figura 4.1.2.** Controles realizados del experimento de actividad acoplada. **(a)** Curva de velocidad en función de sustrato con  $80 \mu\text{M}$  de *MtrxC* o *EcTrx1*. **(b)** Dependencia de la velocidad con la concentración de enzima y **(c)** Ensayos de actividad eliminando diferentes componentes del ensayo acoplado, en condiciones de  $[\text{SaTR}] 2 \mu\text{M}$ ,  $[\text{MtrxC}] 80 \mu\text{M}$ ,  $[\text{NAcMetSO}] 3000 \text{ mM}$ , pH 7.40 y  $25^\circ$ .

Para evaluar si la concentración de enzima elegida para realizar los ensayos de actividad no se encuentra limitada por alguno de las otras enzimas, se siguió la velocidad de reducción de NAcMetSO a una concentración saturante, modificando la concentración de enzima, tal como se observa en la **Figura 4.1.2(b)**, donde se ve que en las condiciones del ensayo la velocidad incrementa linealmente con la concentración de enzima.

Finalmente, para evaluar que el sistema acoplado funcionó correctamente y el cambio de absorbancia a 340 nm corresponde a la oxidación de NADPH debido al correcto funcionamiento del sistema acoplado, así como que no se encontrara limitando la reducción de sustrato, se realizó el ensayo extrayendo los diferentes actores que intervienen en el ensayo a una concentración saturante de sustrato. Tal como se observa en la **Figura 4.1.2(c)**, cuando se eliminan tanto la *MtmsrA*, *PaTR* o la *MtrxC*, no se observan cambios en la absorbancia a 340 nm.

## 4.2 Caracterización cinética en condiciones no catalíticas

Una vez que se caracterizó la cinética en estado estacionario, se prosiguió a caracterizar la reducción de diferentes sustratos por *MtmsrA* en condiciones no catalíticas o pre-estacionarias, tal como se describió en la **Sección 2.2.7**. Brevemente, se siguió el cambio de emisión de fluorescencia total excitando a 295 nm con un equipo de flujo detenido cuando se hace reaccionar al sustrato y la enzima en exceso de sustrato oxidante.



**Figura 4.2.1.** Cinética de oxidación de *MtmsrA* por (a) NAc-MetSO y (b) MetSO. Las mediciones en flujo detenido de los cursos temporales de oxidación se realizaron en presencia de buffer 100 mM Tris pH 7.4 más 0.1 mM DTPA y 25°C. Las  $k_{obs}$  se determinaron a partir del ajuste de funciones mono-exponenciales a los datos experimentales.

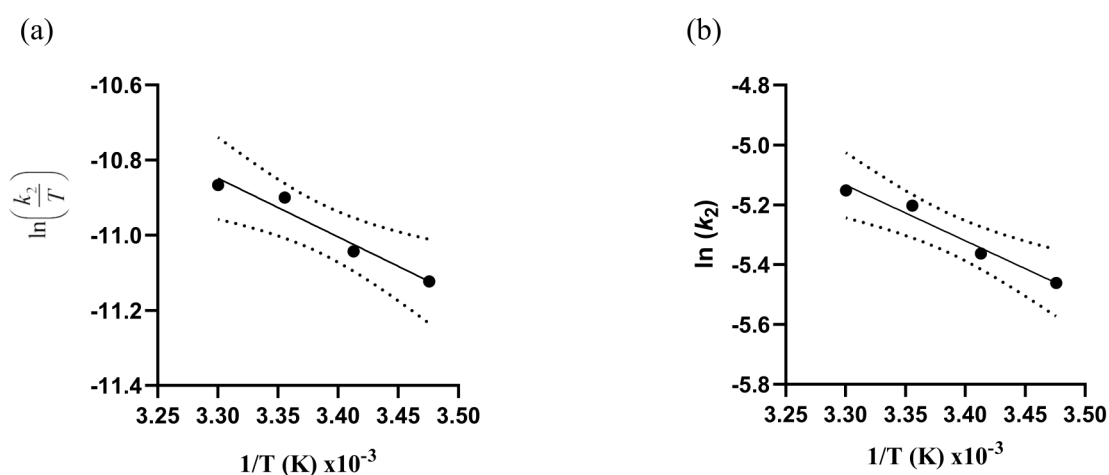
Se repitió el ensayo incrementando la concentración de sustrato, observando una única fase en los registros primarios, representados como *inset* en la **Figura 4.2.1**. Se ajustaron funciones monoexponenciales a estos registros. Finalmente, se graficó la variación de la  $k_{obs}$  del cambio de fluorescencia en función de la concentración de sustrato, como se muestra en la **Figura 4.2.1**. En el rango de concentración trabajado (0-12 mM de NAcMetSO y 0-4 mM MetSO) la  $k_{obs}$  varía linealmente con la concentración de sustrato, como se esperaba en condiciones de pseudo-primer orden. Los valores se ajustaron como una recta con una pendiente de  $4.6 \pm 0.1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  y  $2.51 \pm 0.02 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y un *offset* próximo a cero en ambos casos, consistente con un proceso irreversible.

En la **Figura 3.4.1(c)** ya se había demostrado que la emisión de fluorescencia variaba con el estado de oxidación de la proteína, y dado este cambio sigue una cinética de pseudo-primer orden con la concentración de dos sustratos diferentes, es posible postular que este cambio se debe a la reacción química entre la enzima y el sustrato. Si se compara la  $k_{cat}/K_M$  determinada

para NAcMetSO determinada en estado estacionario,  $2.7 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , con la obtenida en estado pre-estacionario,  $4.6 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , vemos que el proceso de reducción del sustrato se encuentra en el mismo orden. En este escenario, el paso limitante parece ser la reducción del sulfóxido y no la reducción del disulfuro por el sustrato reductor como plantean Antoine y colaboradores<sup>22</sup> para *NmmsrA*.

A su vez, cuando se compararon diferentes sulfoxidos, el grupo N-Acetil incrementó en 1.8 veces la velocidad de reacción. Lee y colaboradores<sup>34</sup> encontraron diferencias en sus estudios en estado estacionario entre estos sustratos. Si comparamos la constante de segundo orden reportada por ellos,  $0.56 \pm 0.08 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , vemos que es nuevamente la constante en estado pre-estacionario es al menos 1.7 veces superior. En suma, tal como se hipotetiza en la literatura, el grupo N-Acetil acelera la velocidad de la reacción.

Finalmente, en orden de obtener la energía libre de activación asociada al proceso de oxidación que pueda compararse con los valores obtenidos mediante las simulaciones computacionales, se evaluó la dependencia de la temperatura de la constante de oxidación en estado pre-estacionario, tal como se describió en la **Sección 2.2.6**. El rango de concentraciones de sustrato abordado para este ensayo fue de 0.0625-5 mM. En la **Figura 4.2.2(a)** se muestra la dependencia de la  $k_{\text{obs}}/T$  vs  $1/T$  tal como implica el análisis cinético de Eyring<sup>135</sup>, mientras que en la **Figura 4.2.2(b)** se muestra la dependencia de la  $k_{\text{obs}}$  vs  $1/T$  según el análisis de Arrhenius.



**Figura 4.2.2.** Dependencia de la temperatura de la cinética pre-estacionaria. Los ensayos se realizaron a pH 7.4 a T 14.9°C, 20°C, 25°C y 30°C en un buffer Tris 70mM, pH 7.4. En **(a)** se muestra el análisis cinético de Eyring y en **(b)** el de Arrhenius.

Los valores energéticos obtenidos para cada análisis se detallan en la **Tabla 4.2.1**.

**Tabla 4.2.1.** Parámetros cinéticos y termodinámicos de activación para la reacción de NAcMetSO con *MtmsrA*.

$k_2$ 25°C (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	E <sub>act</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	Δ <sup>‡</sup> H (kcal mol <sup>-1</sup> )	Δ <sup>‡</sup> S (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	Δ <sup>‡</sup> G <sub>298K</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )
4.6x10 <sup>3</sup>	3.7	3.1	-58.5	20.5

La energía de activación determinada por el análisis de Arrhenius y la entalpía de activación determinada mediante Eyring se encuentran próximas, tal como se esperaba. La contribución entálpica del proceso es menor a la entrópica a temperaturas relevantes. Por ejemplo, a 298 K la contribución entálpica es 6.6 veces menor a la entrópica.

Tal como se abordará en la **Sección 4.3**, este resultado destaca la importancia de utilizar métodos computacionales que estimen la superficie de energía libre del proceso estudiado, caracterizando en forma pormenorizada los diferentes intermediarios involucrados en el proceso, teniendo explícitamente en cuenta la dinámica del fenómeno químico.

### 4.3 Caracterización del primer paso del mecanismo catalítico de la *MtmsrA*

El mecanismo catalítico de la *MtmsrA* implica, al menos, tres etapas desde la formación del complejo de Michaelis hasta la oxidación a disulfuro de la enzima con concomitante liberación de sustrato. Para estudiar esto se llevaron a cabo dos aproximaciones computacionales:

- I.** Determinación con modelo de cluster a nivel QM
- II.** Determinación a nivel QM/MM con el esquema ONIOM
- III.** Determinación de camino de reacción a nivel QM/MM con Umbrella Sampling

Este esquema se aplicó para los diferentes procesos químicos estudiados en esta tesis. El primer abordaje al problema químico corresponde al estudio mediante el uso de modelos de cluster, y una vez que se comprenden los elementos centrales de la reacción se procede a estudiarla en la proteína sobre la superficie de energía libre de la misma.

Como se mencionó previamente en la **Sección 1.2**, utilizando modelos de *cluster* Thiriot y colaboradores<sup>58</sup> determinaron que la formación de sulfénico ocurre mediante dos intermediarios, sulfurano y sulfonio. En su trabajo, eligieron como región cuántica la cadena lateral de los residuos Cys13 y Tyr44, el grupo carboxílico del Glu52, una molécula de dimetilsulfóxido como sustrato y dos moléculas de aguas. El nivel de teoría empleado fue B3LYP/6-311++G(2df,2p)||B3LYP/6-31G(d). En dicho trabajo no se realizó una exploración mecanicista de la región cuántica y/o del nivel de teoría empleado.

En este capítulo se estudió el efecto del cambio del funcional de la densidad en el mecanismo de reacción con un funcional puro (PBE) y otro *long-range* ( $\omega$ B97x-D), así como el efecto del cambio de la región cuántica en el mecanismo, utilizando únicamente el funcional  $\omega$ B97x-D. La elección de estos funcionales para realizar el estudio comparativo con los resultados de Thiriot y colaboradores<sup>58</sup> se basó en la incorporación explícita de los efectos de dispersión por parte de  $\omega$ B97x-D, y estudios previos realizados por el grupo de trabajo en PBE<sup>103,104,136</sup>.

Los diferentes sistemas estudiados corresponden a: **i)** la cadena lateral de la Cys13, el ácido carboxílico de la Glu52, dimetilsulfóxido como sustrato y dos moléculas de aguas, **ii)** la

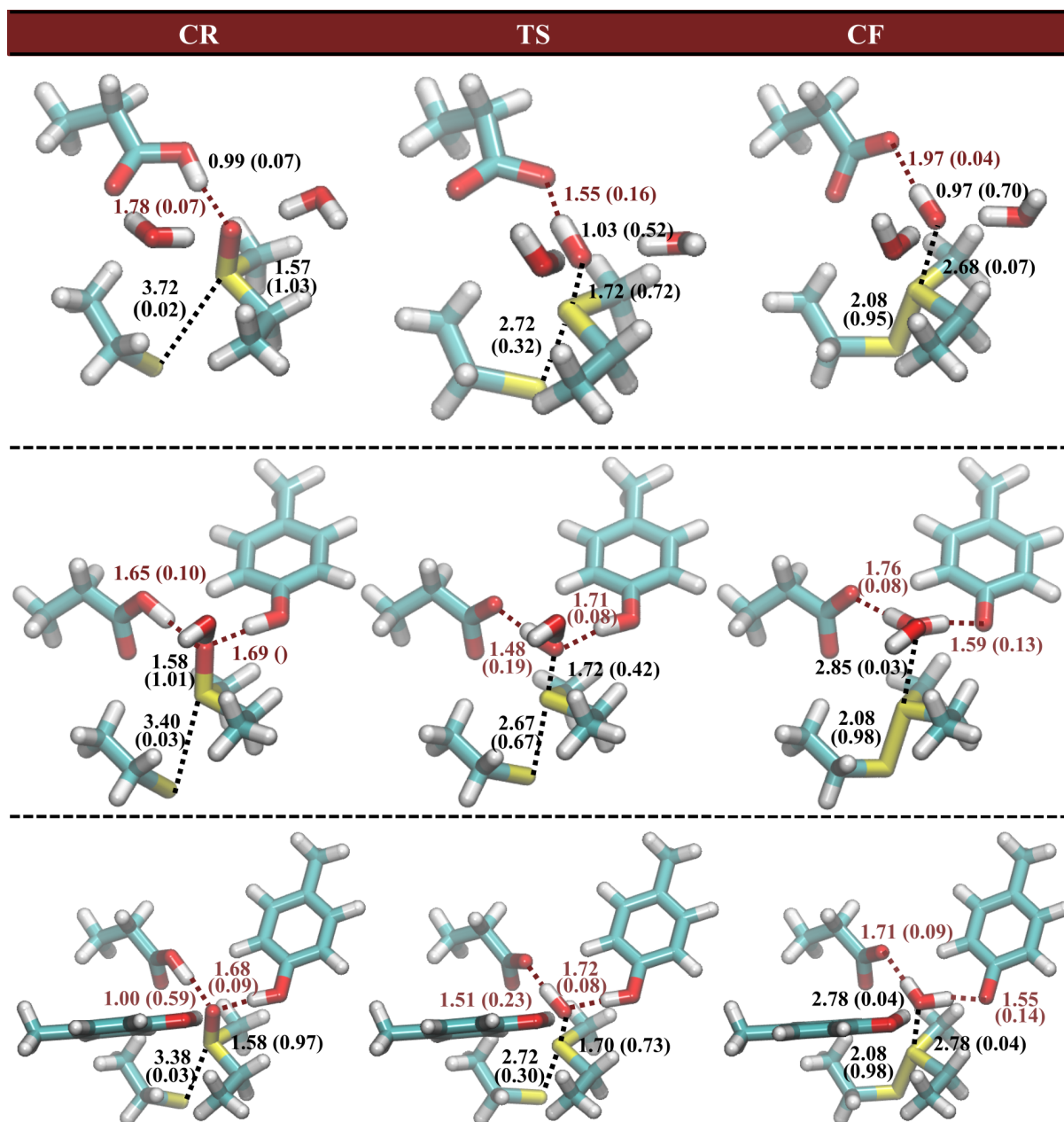
región **i**) sustituyendo una molécula de agua por un *p*-cresol y **iii**) la región i) sustituyendo ambas moléculas de aguas por grupos *p*-cresoles.

Para llevar a cabo esto se realizaron optimizaciones de geometría parciales, como se mencionó en la **Sección 3.4**, utilizando los funcionales anteriormente mencionados, dejando fijos los grupos -CH<sub>3</sub> donde se realizó el recorte de la proteína. A diferencia del trabajo de Thiriot y colaboradores, el solvente se tuvo en cuenta en forma implícita durante las optimizaciones de geometría, cálculos de Hessiano y localización de caminos de reacción.

En la **Figura 4.3.1** se muestran las especies estacionarias determinadas a nivel  $\omega$ B97-xD/6-31+G\*\* con las diferentes regiones cuánticas estudiadas. A su vez, en la **Tabla 4.3.1** se depositan los valores de  $\Delta^\ddagger G$  y  $\Delta_R G$  obtenidos. En todos los sistemas estudiados se observa un TS temprano, donde la principal diferencia energética observada con el incremento de la región cuántica corresponde a un incremento de al menos 4.72 kcal mol<sup>-1</sup> de barrera y al menos 8.72 kcal mol<sup>-1</sup> en la energía de reacción entre el sistema I y el resto de sistemas, modificando el signo de la reacción, pasando de ser una reacción endergónica a exergónica.

**Tabla 4.3.1** Energía libre de reacción y activación calculados a nivel  $\omega$ B97x-D/6-31+G\*\* en kcal mol<sup>-1</sup> y porcentaje de avance de la reacción (a.u.).

	$\Delta^\ddagger G$	$\Delta_R G$	Porcentaje de avance a la altura del TS (a.u.)			
			S $\gamma$ -S $\delta$	S $\delta$ -O $\epsilon$	O $\epsilon$ -H <sub>COO</sub>	O $\epsilon$ -H <sub><i>p</i>-cresol</sub>
<b>I</b>	13.75	7.17	0.32	0.32	0.71	0.00
<b>II</b>	9.03	-1.55	0.33	0.32	0.74	0.00
<b>III</b>	8.38	-3.42	0.28	0.26	0.70	0.00

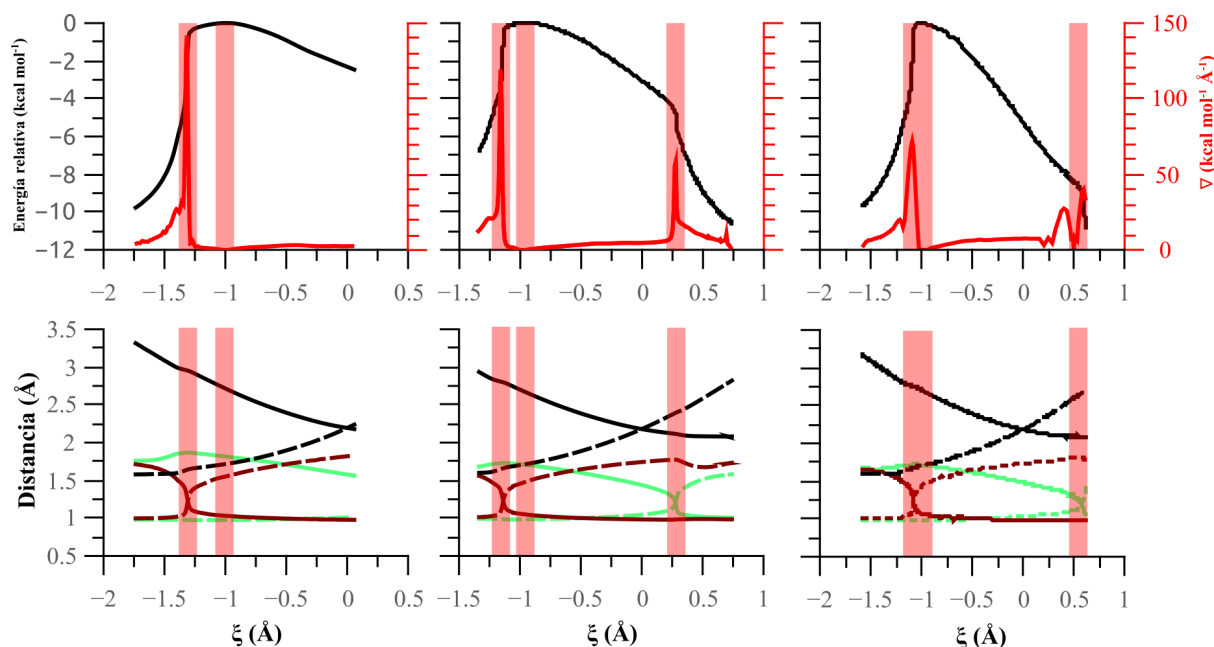


**Figura 4.3.1.** Puntos estacionarios caracterizados a nivel IEFPCM $\epsilon=78.5$   $\omega$ B97x-D/6-31+G\*\*. (a) Complejo inicial, (b) estado de transición y (c) complejo final.

La diferencia energética tanto en la barrera como la estabilidad de los productos puede racionalizarse debido a que el grupo *p*-cresol es un mejor ácido respecto al grupo alcohol, generando como productos secundarios una molécula de agua y un *p*-cresolato en lugar de un hidroxilo y un *p*-cresol. En todos los casos el mecanismo es concertado tipo S<sub>N</sub>2 con formación temprana del estado de transición en todos los sistemas evaluados. El proceso de formación y ruptura de los enlaces S<sub>γ</sub>-S<sub>δ</sub>, S<sub>δ</sub>-O<sub>ε</sub> respectivamente ocurre en forma sincrónica, obteniendo un TS temprano en todas las regiones. El sistema I no cumple el postulado de



Hammond<sup>137</sup>, ya que presenta un TS temprano pero una energía más próxima a la de productos que a los reactivos. En la **Figura 4.3.2** se muestra el IRC, donde la energía y los diferentes parámetros geométricos evaluados se presentan en función de la resta de las distancias  $S\delta-O\epsilon$  y  $S\gamma-S\delta$  correspondientes a ese punto del IRC.



**Figura 4.3.2** Evolución de la energía y diferentes parámetros geométricos durante el IRC de los diferentes sistemas estudiados, graficado en función de la coordenada distinguida  $\xi(S\delta-O\epsilon - S\gamma-S\delta)$ . La evolución de la energía y los diferentes parámetros geométricos evaluados se presentan en función de la resta de las distancias  $S\delta-O\epsilon$  y  $S\gamma-S\delta$  correspondientes a ese punto del IRC.

En primer lugar, en todos los sistemas se observa una transferencia de protón por parte del ácido glutámico previo al estado de transición. A medida que se incrementa la región cuántica, este proceso se acopla cada vez más al estado de transición. Adicionalmente, en los sistemas II y III se observa una caída abruptamente de la energía en el entorno de 0.3-0.5 Å de la coordenada distinguida asociado a la transferencia del segundo protón por parte del grupo *p*-cresol.

Según el análisis del IRC realizado por Labet y colaboradores<sup>138</sup>, las curvas de energía de los sistemas II y III puede interpretarse como la suma de tres procesos elementales, mientras que la curva del sistema I como la suma de dos procesos elementales. En este caso, los procesos corresponden a la transferencia de un protón del ácido carboxílico al oxígeno del sulfóxido, al ataque nucleofílico del tiolato sobre el sulfóxido y una segunda transferencia de protón del grupo *p*-cresol al sulfóxido protonado.

A continuación, se seleccionó el sistema II, similar al empleado por Thiriot y colaboradores<sup>58</sup>, cambiando el funcional de la densidad por los mencionados anteriormente. Como se observa en la siguiente figura, no existen diferencias significativas en la estructura tanto geométrica como electrónica en las diferentes especies presentadas en la **Figura 4.3.3**.

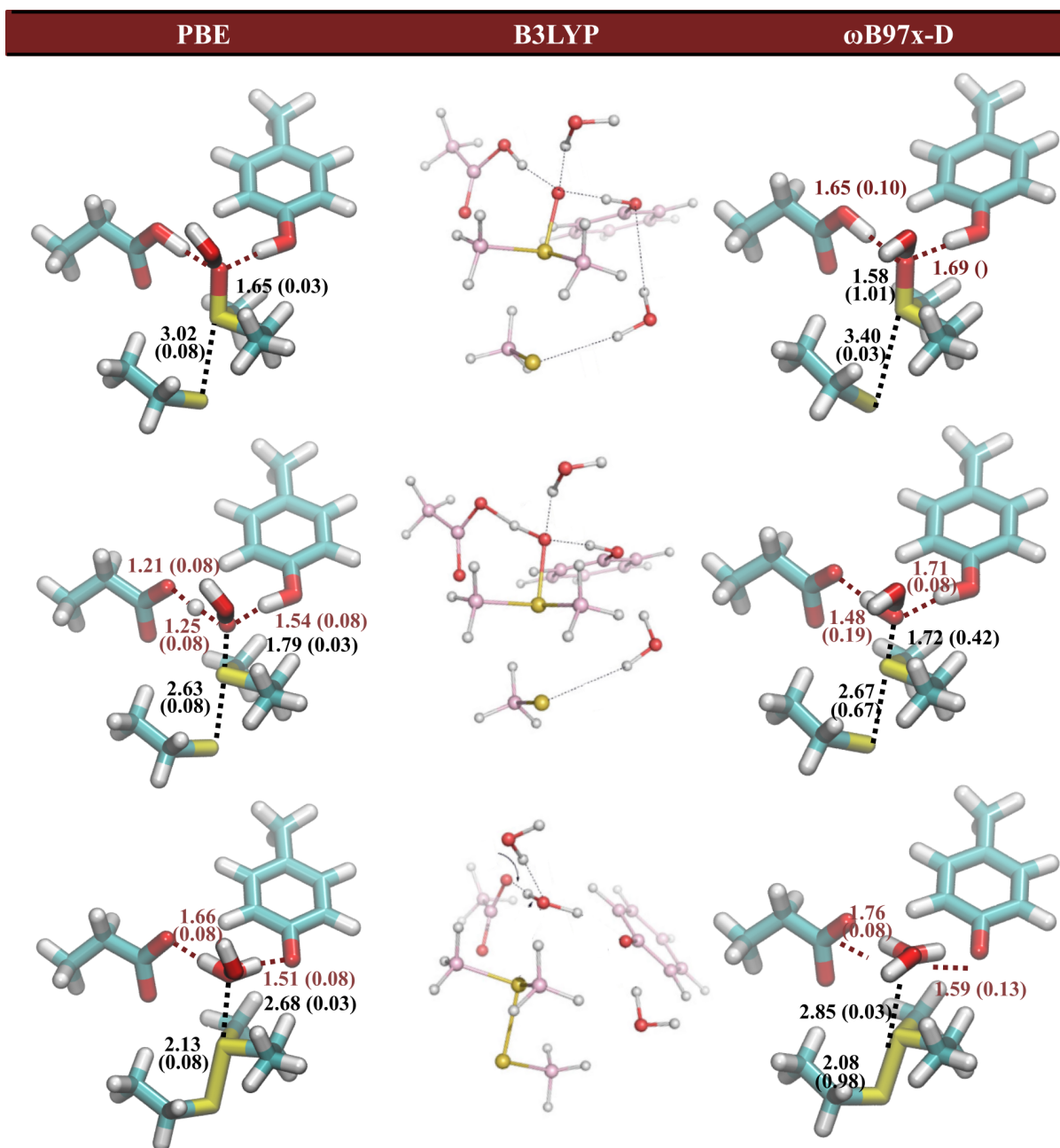
Los parámetros energéticos, obtenidos con los diferentes niveles de cálculo estudiados, se muestran en la **Tabla 4.3.2**, similares a la **Tabla 4.3.1** donde se comparó el cambio en el sistema.

**Table 4.3.2.** Valores obtenidos de energía libre de activación y de reacción a nivel DFT/6-31+G\*\* en kcal mol<sup>-1</sup>.

	PBE	B3LYP*		$\omega$ B97x-D
		Paso I	Paso II	
$\Delta^\ddagger G$	0.64	9.1	6.90	9.0
$\Delta_R G$	-5.73	9.0	-0.20	-1.6

\* Valores extraídos de la referencia Thiriot y colaboradores<sup>58</sup>.

Si bien en todos los casos se observa que la reacción es exergónica, los valores energéticos depositados en la **Tabla 4.3.2** presentan severos cambios con los diferentes funcionales empleados. Mientras que con el funcional PBE el proceso no presenta barrera, tanto con B3LYP como  $\omega$ B97x-D presenta una barrera en el entorno de 9.0 kcal mol<sup>-1</sup>. Si bien Thiriot y colaboradores<sup>58</sup> reportan que el proceso ocurre en dos etapas, al incluir los efectos del solvente, tenidos en cuenta implícitamente en esta etapa durante las optimizaciones parciales, la barrera del segundo paso desaparece, y da una energía final de reacción similar a la obtenida con  $\omega$ B97x-D. Esta dependencia del funcional en procesos con átomos de azufre ya fue reportada para otras reacciones, aunque no para este tipo de proceso de varias etapas<sup>139</sup>.

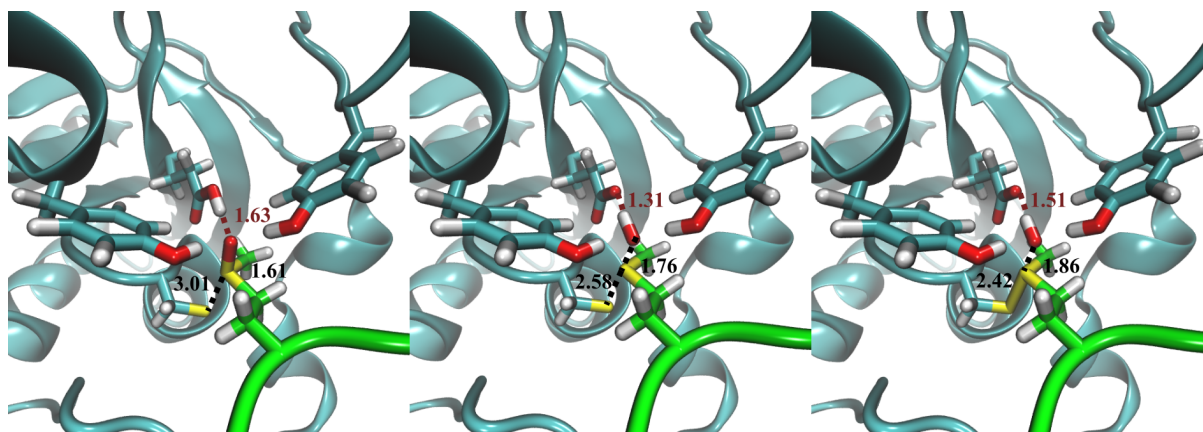


**Figura 4.3.3.** Puntos estacionarios caracterizados a nivel IEFPCM $\epsilon=78.5$  DFT/6-31+G\*\*. Las estructuras del funcional B3LYP corresponden a una adaptación de Thiriot y colaboradores<sup>58</sup>.

En un segundo nivel de complejidad, se estudió el mecanismo de reacción hasta la formación del ácido sulfénico, empleando el esquema QM/MM ONIOM[DFT(6-31+G\*)|amberff96]:me con los mismos funcionales utilizados hasta el momento, incluyendo el funcional híbrido B3LYP. Estos datos fueron a su vez contrastados con los resultados reportados por Dokainish y colaboradores<sup>60</sup>, quienes en consonancia con Thiriot y colaboradores<sup>58</sup> observaron formación de sulfurano y sulfonio. Como se describió en la **Sección 2.1.4**, el esquema ONIOM con *embedding* mecánico permite incorporar el efecto del acoplamiento mecánico

entre la región clásica y la región cuántica, pero sin permitir que ésta polarice la densidad electrónica.

Los estados estacionarios obtenidos al nivel QM/MM ONIOM[ $\omega$ B97x-D(6-31+G\*)|amberff96]:me se muestran en la **Figura 4.3.4**. Las estructuras obtenidas para los diferentes funcionales y las obtenidas por Dokainish y colaboradores<sup>60</sup> para la primera etapa de la reacción no difieren significativamente.



**Figura 4.3.4.** Puntos estacionarios caracterizados a nivel QM/MM ONIOM[ $\omega$ B97x-D(6-31+G\*)|amberff96]:me.

Los valores energéticos obtenidos para estos sistemas así como parámetros geométricos relevantes, así como los reportados por Dokainish y colaboradores<sup>60</sup>, se depositan en la **Tabla 4.3.3**.

**Tabla 4.3.3.** Energía libre de reacción y activación calculados a nivel  $\omega$ B97x-D/6-31+G\*\* en kcal mol<sup>-1</sup> y porcentaje de avance de la reacción.

	$\Delta^\ddagger G$	$\Delta_R G$	Porcentaje de avance a la altura del TS (%)			
			Cys13 <sup>S<sub>Y</sub></sup> -Met*2 <sup>S<sub>δ</sub></sup>	Met*2 <sup>S<sub>δ</sub></sup> -Met*2 <sup>O<sub>ε</sub></sup>	Glu52 <sup>O<sub>ε</sub></sup> -Glu52 <sup>H</sup>	Met*2 <sup>O<sub>ε</sub></sup> -Tyr44 <sup>H</sup>
<b>PBE</b>	0.59	-0.29	54.24	49.19	62.17	0.00
<b>B3LYP</b>	0.90	1.73	80.93	55.74	77.98	0.00
	2.80	-11.2	49.51	19.72	76.40	0.00
<b><math>\omega</math>B97x-D</b>	5.37	3.59	74.02	59.09	84.06	0.00

\* Valores extraídos de la referencia Dokainish y colaboradores<sup>60</sup>.

Las tendencias tanto en energía de activación siguen la observada en el modelo de *cluster*, aunque se observan diferencias en la energía de reacción. Puntualmente, al emplear el

funcional B3LYP, la energía de reacción determinada difiere en más de 10 kcal mol<sup>-1</sup> de la determinada en la literatura. Otra diferencia central respecto de lo descrito anteriormente es que el sulfurano corresponde a un intermediario estable. Dentro de los diferentes funcionales empleados existen diferencias respecto al grado de sincronidad y el grado de avance que presentan a nivel del TS, aunque en todos los casos se encuentra un TS tardío. Por ejemplo, la formación del enlace Cys13<sup>S<sub>γ</sub></sup>-Met\*2<sup>S<sub>δ</sub></sup> ocurre en forma temprana y acoplado a la transferencia pre-TS. El nivel de avance de la reacción de los diferentes enlaces reportados en la tabla anterior se construyó en base a parámetros geométricos y no electrónicos. No fue posible determinar para ninguno de los funcionales un estado de transición adecuado para la segunda etapa del proceso, sin embargo, tomando los valores de referencia de Dokainish y colaboradores, los valores de  $\Delta^\ddagger G$  y  $\Delta_R G$  se encuentran en el entorno de 2.44 y -2.3/-9.67 kcal mol<sup>-1</sup> respectivamente, según si el donante del segundo protón es la Tyr44 o Tyr92 respectivamente.

La caracterización mecanística de esta primera etapa realizada por Dokainish y colaboradores se encuentra en consonancia con la reportada en esta tesis. Las diferencias geométricas observadas entre los diferentes puntos estacionarios pueden deberse a, en primer lugar, diferencias en el punto de partida, ya que en ambos estudios se realizó una MD previo al cálculo QM/MM o una elección de una región cuántica de menor tamaño, mientras que las diferencias energéticas también pueden explicarse a que el nivel de cálculo empleado por Dokainish y colaboradores fue ONIOM[ $\omega$ B97x-D(6-311+G(2df,p)| amberff96):ee ||ONIOM[ $\omega$ B97x-D(6-31+G\*)| amberff96]:me en lugar de ONIOM[ $\omega$ B97x-D(6-31+G\*)| amberff96]:me.

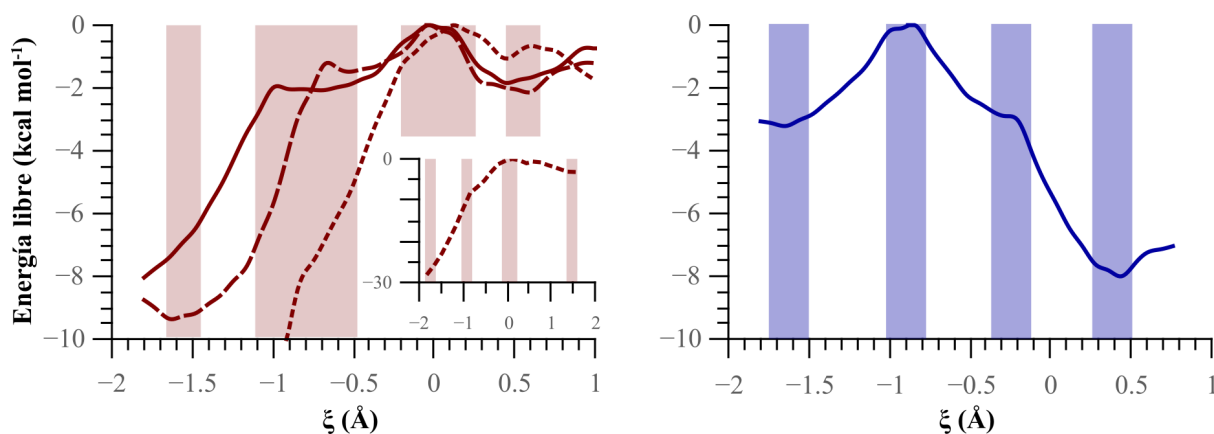
En suma, a diferencia de lo que ocurría cuando se realizó un modelo de *cluster*, con todos los funcionales hay formación de sulfonio mediante un mecanismo tipo S<sub>N</sub>1, con previa formación de sulfurano. En este caso, el valor de  $\Delta^\ddagger G$  no presenta una elevada dependencia con el funcional y/o región cuántica seleccionada, como sí ocurre con el valor y signo de  $\Delta_R G$ .

Estos valores presentan una inconsistencia con los ensayos cinéticos de Antoine y colaboradores<sup>129</sup> en NmmsrA, donde el paso limitante de la catálisis corresponde a la formación del sulfénico y no al cierre disulfuro. La constante asignada por Antoine y

colaboradores<sup>129</sup> para el paso de reducción es de  $790 \text{ s}^{-1}$ , que se corresponde a una barrera de  $13.49 \text{ kcal mol}^{-1}$  bajo el supuesto de que se cumple la teoría del estado de transición de Eyring<sup>135</sup>, valor muy superior a los depositados en la **Tabla 4.3.3**. Si bien con el esquema de ONIOM se tiene en cuenta el entorno de la proteína, no está reproduciendo correctamente lo reportado experimentalmente.

A la luz de estos resultados, la inclusión de los efectos térmicos se volvió imprescindible para caracterizar correctamente el mecanismo de reacción dentro de su superficie de energía libre, y poder determinar los intermediarios enzimáticos.

Para llevar a cabo la aproximación 3, se siguió el protocolo descrito en la **Sección 2.2.3** de la metodología, definiendo como coordenada distinguida la resta de las distancias  $\text{Met2}^{*\text{S}\delta}-\text{Met2}^{*\text{O}\epsilon}$  y  $\text{Cys13}^{\text{S}\gamma}-\text{Met2}^{*\text{S}\delta}$ . Esto se repitió con cuatro estructuras diferentes del complejo de Michaelis en conformación reactiva obtenidas en la dinámica molecular. En tres de ellas el sustrato interactúa con la Tyr44 (Conformación I, panel izquierdo de la **Figura 4.3.5**) y en la última con la Tyr92 (Conformación II, panel derecho de la **Figura 4.3.5**). A su vez, las estructuras seleccionadas de la conformación I presentan un diferente grado de hidratación de la Cys13. La región cuántica seleccionada corresponde a la cadena lateral de los residuos Cys13, Glu52, Met2\* y Tyr44/Tyr92 según la conformación. A continuación, se muestran las curvas de energía libre obtenidas para esta coordenada distinguida:

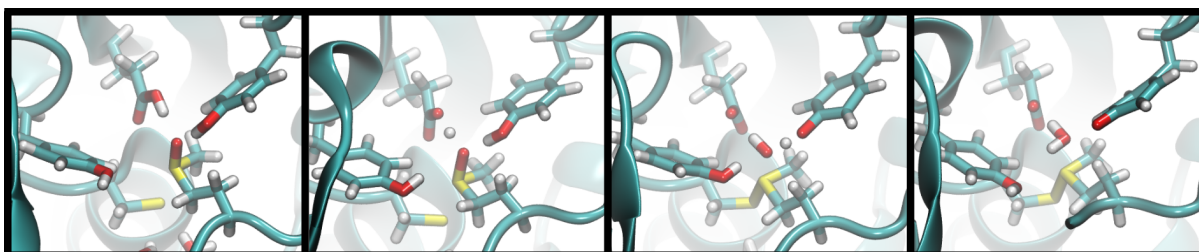


**Figura 4.3.5.** Curva de energía libre a lo largo de la coordenada de reacción, definida como la diferencia en las distancias  $\text{S}\delta-\text{O}\epsilon$  y  $\text{S}\gamma-\text{S}\delta$ . El panel izquierdo corresponde a la conformación I, con ninguna molécula de agua (—), tres (---) o seis (---) hidratando la Cys13, mientras que el panel derecho corresponde a la conformación II con tres moléculas de agua hidratando la Cys13.

La primera observación que puede extraerse de la **Figura 4.3.5** es que según la tirosina que done el segundo protón, el perfil energético cambia significativamente. Como se mencionó

anteriormente, esto también fue reportado por Dokainish y colaboradores, aunque sin diferencias en la barrera, y en ambos casos se trató de una reacción exergónica, a diferencia de lo observado en la **Figura 4.3.5**. Otra conclusión que puede extraerse de esta figura es que el cambio en la hidratación de la Cys13 afecta la barrera del proceso, disminuyendo de  $27.8\text{kcal mol}^{-1}$  en una situación donde se encuentra altamente solvatada a  $9.4\text{ kcal mol}^{-1}$  o  $8.0\text{ kcal mol}^{-1}$  cuando se encuentra sin solvatar o con pocas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente. Esta diferencia puede deberse al muestreo empleado, ya que si bien en 20 ps de dinámica QM/MM ocurren fenómenos de intercambio de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , se encuentra por debajo del tiempo necesario para hidratar al tiolato de la Cys13.

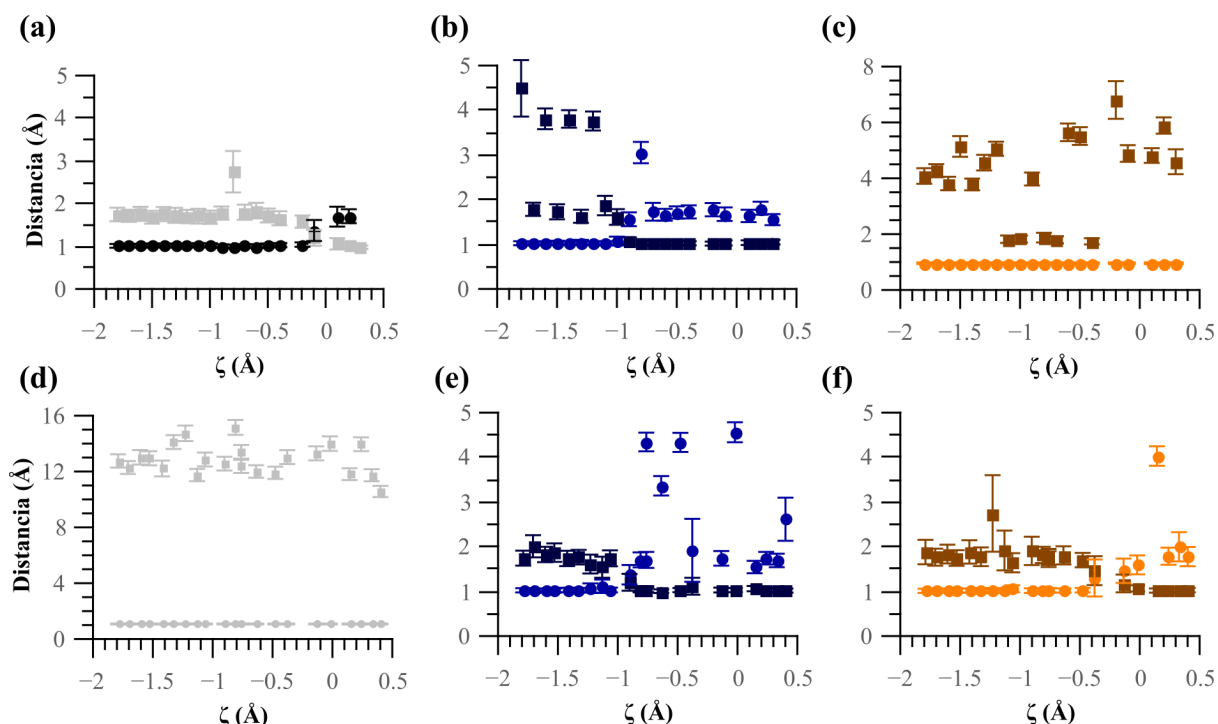
En todas las situaciones estudiadas en la **Figura 4.3.5** el proceso muestra cuatro puntos de interés cuya localización y características varían sobre la coordenada distinguida según el donante del segundo protón. En la **Figura 4.3.6** se muestra una estructura correspondiente a los puntos señalados, denominados  $\text{PE}_1$ ,  $\text{PE}_2$ ,  $\text{PE}_3$  y  $\text{PE}_4$  de punto estacionario, ya que todos comparten tener una derivada primera nula. Para afirmar la naturaleza de dicho punto estacionario debería realizarse un análisis de frecuencia a partir de la matriz Hessiana del sistema.



**Figura 4.3.6.** Estructura representativa de las regiones señaladas en la curva de energía libre. De izquierda a derecha,  $\text{PE}_1$ ,  $\text{PE}_2$ ,  $\text{PE}_3$  y  $\text{PE}_4$ .

Los puntos estacionarios obtenidos son similares a los descritos con los modelos reducidos, aunque con diferencias según que tirosina dona el segundo protón.





**Figura 4.3.7.** Análisis de distancias geométricas relevantes a lo largo de la coordenada distinguida, para la conformación I (panel superior) y la conformación II (panel inferior). (a) y (d) Distancias entre Tyr44<sup>OH</sup>-Tyr44<sup>HO</sup> (●) y Met\*<sup>2Oδ</sup>-Tyr44<sup>HO</sup> (■), (c) y (e) Distancias entre Glu52<sup>Oε</sup>-Glu52<sup>H</sup> (●) y Met\*<sup>2Oδ</sup>-Glu52<sup>H</sup> (■) y (c) y (f) Distancias entre Tyr92<sup>OH</sup>-Tyr92<sup>HO</sup> (●) y Met\*<sup>2Oδ</sup>-Tyr92<sup>HO</sup> (■).

Con el modelo reducido los puntos estacionarios se ubicaron a -1.6, -0.84, 0.54, mientras que con la aproximación ONIOM con el mismo funcional se ubicaron a -1.66, -1.01, 0.08, 0.42 y 0.64 de la coordenada distinguida. El estado PE<sub>1</sub> presenta un correlato estructural con los el CR y CR<sub>1</sub> mientras que PE<sub>4</sub> se asemeja al CF y CF<sub>2</sub> del modelo reducido y la aproximación ONIOM respectivamente. La diferencia energética entre estos dos estados varía según que tirosina done el segundo protón; el proceso en la conformación I es endergónico, 8.02, 6.28 y 24.9 kcal mol<sup>-1</sup> según incrementa el nivel de solvatación, mientras que cuando el proceso es exergónico para la conformación II, -5.64 kcal mol<sup>-1</sup>.

La identidad de PE<sub>2</sub> y PE<sub>3</sub> varía según la conformación; mientras que en la conformación I PE<sub>2</sub> representa un hombro y PE<sub>3</sub> el máximo sobre la coordenada distinguida, con la conformación II el máximo es PE<sub>2</sub> y el hombro PE<sub>3</sub>. Estos puntos también presentan un correlato estructural; PE<sub>2</sub> se asemeja al estado de transición del modelo reducido, con un fuerte acoplamiento entre la primera transferencia protónica y el ataque del Cys13<sup>Sγ</sup> sobre el Met\*<sup>2Sδ</sup>, mientras que PE<sub>3</sub> se asemeja al TS<sub>2</sub> determinado con la aproximación ONIOM, donde este ataque nucleofílico se encuentra acoplado a la transferencia del protón de la Tyr44/Tyr92 al grupo OH<sup>-</sup> saliente.

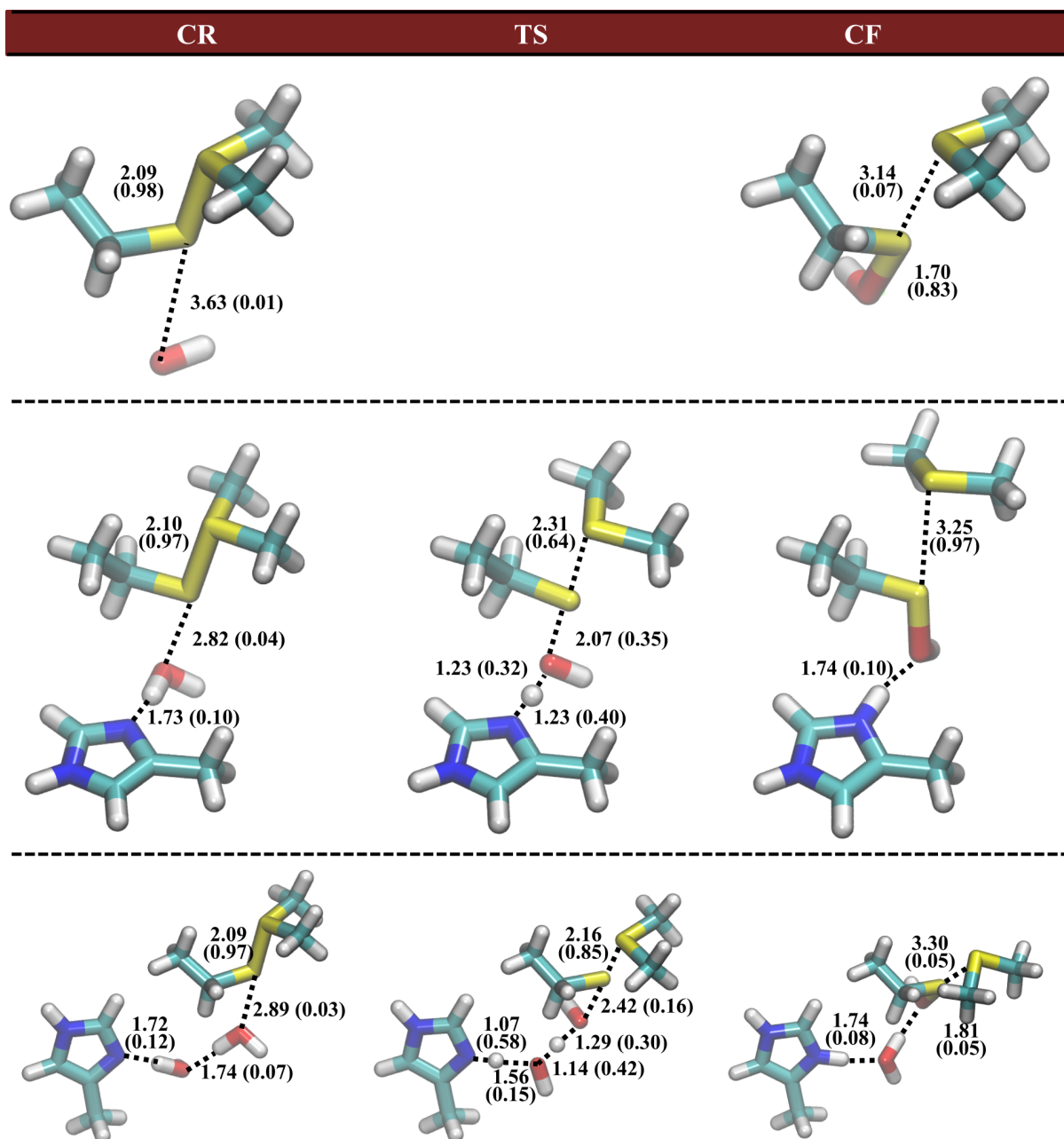


El estado sulfurano determinado con la aproximación ONIOM, postulado como intermediario en la literatura del mecanismo de msrA, corresponde a un estado intermedio entre PE<sub>2</sub> y PE<sub>3</sub>, aunque no es estable. Finalmente, cuando se realizaron MD QM/MM sin restricciones partiendo en este punto el sistema volvía a PE<sub>1</sub>, a diferencia de lo que ocurría cuando la MD QM/MM comenzaba pasando PE<sub>3</sub>, que caía a PE<sub>4</sub> y se mantenía como sulfonio.

En suma, se emplearon diferentes metodologías y aproximaciones para caracterizar esta primera etapa del mecanismo catalítico, encontrando similitudes y discrepancias con lo reportado previamente en la bibliografía. Los valores de  $\Delta^\ddagger G$  y  $\Delta_R G$  determinados a lo largo de este capítulo se ven afectados con el cambio de región cuántica, funcional o aproximación empleada. A su vez, según la aproximación empleada el número de intermediarios hallados se alteró. Cuando se incorporan efectos dinámicos tanto de la proteína como del solvente, además de permitir la polarización de la densidad electrónica por parte de la región cuántica se observó que el sulfurano reportado como intermediario enzimático no corresponde a una especie estable.

#### 4.4 Caracterización del segundo paso del mecanismo catalítico de la *MtmsrA*

Al igual que en la **Sección 4.3**, se realizaron dos aproximaciones para estudiar este paso. En primer lugar, se realizó una caracterización de un modelo de cluster con tres sistemas diferentes, **i)** la cadena lateral de la Cys13 en forma de sulfurano con un dimetilsulfóxido y una molécula de OH<sup>-</sup>, **ii)** la región **i)** incluyendo la cadena lateral de la His155 y una molécula de H<sub>2</sub>O en lugar de OH<sup>-</sup> y **iii)** la región **ii)** con una molécula de H<sub>2</sub>O adicional. La resolución del sulfurano solo se estudio a nivel  $\omega B97-xD/6-31+G^{**}$ . Los estados estacionarios hallados para cada sistema se muestran en la **Figura 4.4.1**. En primer lugar, para el Sistema **i)** no fue posible determinar el estado de transición. Tanto en el sistema **ii)** como **iii)** se observa que la catálisis ácido-base se encuentra acoplada al ataque nucleofílico sobre el sulfonio. Este resultado es consistente con la catálisis generada mediada por bases observada para la reducción de sulfóxido por tioles<sup>55</sup>, tal como se describió en la **Sección 1.3** de la introducción. Debido a que no fue posible determinar un estado de transición para el Sistema I, a continuación éste quedará fuera de la comparación. En la **Tabla 4.4.1**, presentada a continuación, se describe la energética y algunas propiedades derivadas de la estructura electrónica de la reacción de los diferentes sistemas estudiados.



**Figura 4.4.1.** Puntos estacionarios caracterizados a nivel IEFPCM $\epsilon=78.5$   $\omega$ B97-xD/6-31+G\*\*. (a) Complejo inicial, (b) Estado de transición y (c) complejo final.

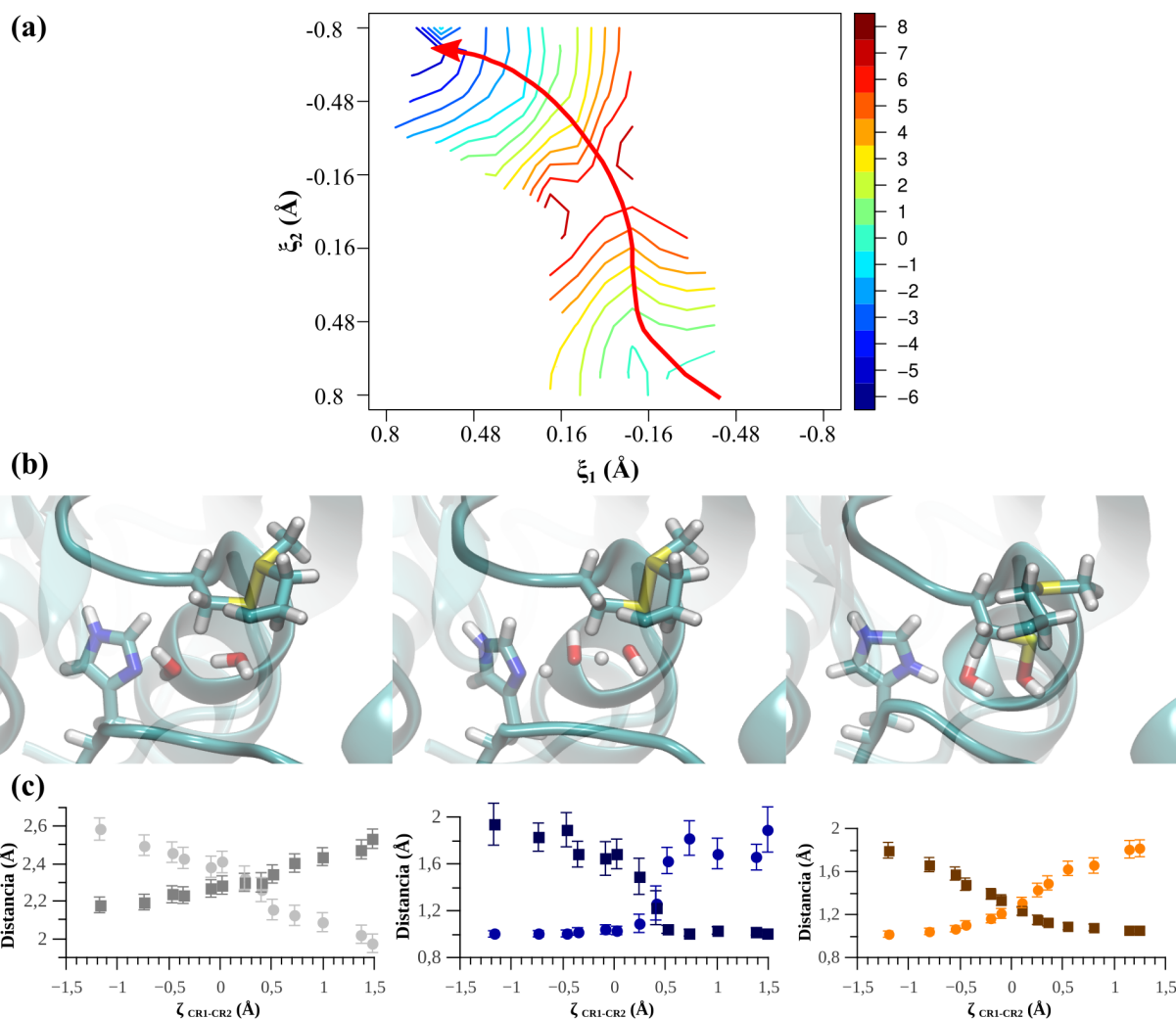
**Tabla 4.4.1.** Energía libre de reacción y activación calculados a nivel  $\omega$ B97x-D/6-31+G\*\* en kcal mol<sup>-1</sup> y porcentaje de avance de la reacción (a.u.).

	$\Delta^\ddagger G$	$\Delta_R G$	Porcentaje de avance a la altura del TS					
			$S_\gamma$ -S $\delta$	$S_\gamma$ -O	O-H <sub>1</sub>	O <sub>2</sub> -H <sub>1</sub>	O <sub>2</sub> -H <sub>2</sub>	N $\epsilon$ -H <sub>2</sub>
<b>I</b>	-	-25.06				-		
<b>II</b>	8.20	-1.63	0.35	0.41		-	0.54	0.54
<b>III</b>	9.98	-0.41	0.13	0.16	0.58	0.59	0.87	0.87

A partir de la **Tabla 4.4.1** se observa que en ambos sistemas el proceso es exergónico, aunque a medida que incrementa el número de moléculas, disminuye. Cuando se desglosan los valores energéticos en términos de sus componentes, H y TS, el valor de  $T\Delta S$  vale 42.82 y  $-0.27 \text{ kcal mol}^{-1}$  sobre  $\Delta_R G$  y 0.45 y  $2.01 \text{ kcal mol}^{-1}$  sobre  $\Delta^\ddagger G$  para los Sistemas II y III respectivamente. A medida que se incrementa el número de moléculas se observa que el factor entrópico se vuelve más importante sobre las energía de activación y de reacción.

La barrera obtenida para esta etapa es similar a la obtenida para la etapa anterior, siendo  $0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  menor y  $0.98 \text{ kcal mol}^{-1}$  mayor respectivamente. El proceso de formación y ruptura de los enlaces  $S\gamma-S\delta$  y  $S\gamma-O$  es ligeramente asincrónico a diferencia de la catálisis ácido-base generada por el grupo imidazol y la  $H_2O$ . Si bien en ambos casos la catálisis ácido-base se encuentra fuertemente acoplada al ataque nucleofílico sobre el sulfonio, el sistema III presenta un TS aún más temprano, con apenas una fracción de avance de 0.13 y 0.16 para la formación y ruptura de los enlaces  $S\gamma-S\delta$  y  $S\gamma-O$  a la altura del TS respectivamente.

En suma, esto implica que para describir completamente el proceso, incorporando los efectos térmicos y los inducidos por la proteína, se debe realizar un *umbrella sampling* considerando dos coordenadas de reacción (2D), tomando como primera coordenada distinguida ( $\xi_1$ ) la resta de las distancias  $Cys13^{S\gamma}-H_2O^O$  con  $Cys13^{S\gamma}-Met2^{*S\delta}$ , que representan la formación y ruptura de los enlaces mencionados anteriormente, y la segunda coordenada distinguida ( $\xi_2$ ) la resta de las distancias  $His155^{N\delta}-H_2O^H$  y  $H_2O^H-H_2O^O$ . Según las coordenadas distinguidas seleccionadas, en el Sistema III del modelo reducido los puntos estacionarios se encontraron en las coordenadas  $\xi_1, \xi_2$   $(-0.76, 0.75)$ ,  $(-0.26, -0.51)$  y  $(-1.60, 0.69)$  para RC, TS y PC respectivamente. A continuación, en la **Figura 4.4.2** se muestra el *umbrella sampling* 2D obtenido, junto con un análisis del camino de mínima energía hallado:



**Figura 4.4.2.** (a) Paisaje de energía libre de la resolución del sulfónio. (b) Estructura representativa de los puntos estacionarios determinados sobre el paisaje. (c) Análisis de distancias a lo largo del camino de mínima energía determinado.

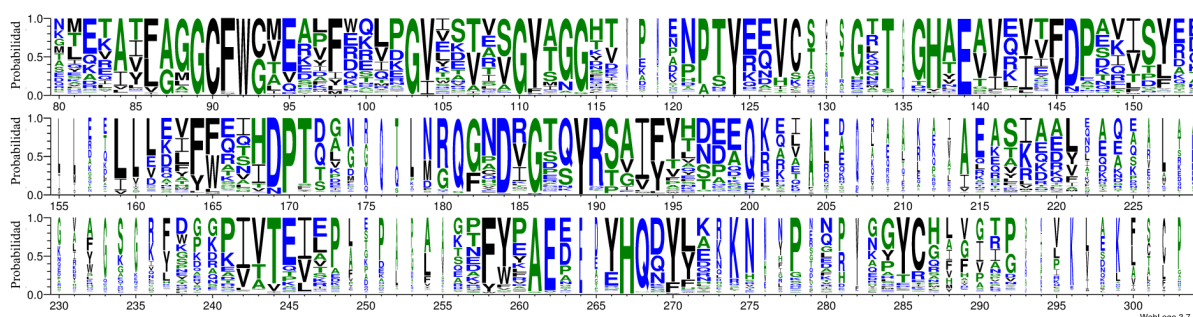
De la superficie de energía libre obtenida en la **Figura 4.4.2**, se puede determinar que el camino de mínima energía es el que atraviesa las coordenadas depositadas en la **Tabla 4.4.2**, que conecta el complejo inicial con el complejo final, con una barrera de  $5.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  para y una energía de reacción unas  $-6 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

**Tabla 4.4.2.** Camino de mínima energía determinado en el paisaje energético.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
$\xi_1$	-0.45	-0.3	-0.2	-0.2	-0.1	-0.1	0	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
$\xi_2$	0.75	0.5	0.35	0.25	0.1	0	-0.1	-0.25	-0.25	-0.35	-0.5	-0.75	-0.75
$\xi_1 - \xi_2$	-1.2	-0.8	-0.55	-0.45	-0.2	-0.1	0.1	0.25	0.35	0.55	0.8	1.15	1.25

Los puntos estacionarios que se visualizan en la **Figura 4.4.2(b)** se hallan en las coordenadas (-0.45, 0.75), (0, -0,1) y (0.5, -0.75) para el CR, TS y CP respectivamente. Al realizar el seguimiento de la distancia entre los átomos partícipes de los enlaces que se rompen y forman en la **Figura 4.4.2(c)** se puede determinar que en el TS localizado, tal como ocurría con el modelo de *cluster*, el ataque nucleofílico se encuentra acoplado a la catálisis ácido base, y que luego de transferidos los protones entre la His155 y las moléculas de H<sub>2</sub>O, la energía comienza a descender abruptamente. De esta forma, la His155 generaría catálisis ácido base específica y general, permitiendo la resolución del intermediario sulfonio.

La conservación de la His155 y su posible relevancia catalítica se estudió mediante análisis bioinformático a partir de la base de secuencias disponible para la familia PF01625 en el servidor PFAM<sup>140</sup>, eliminando las filas que contenían más de un 90% de gaps. En la siguiente figura se muestra la frecuencia de los diferentes aminoácidos conservados en las diferentes posiciones generadas con el servidor *weblogo*<sup>141</sup>:



**Figura 4.4.3** Probabilidad de ocurrencia aminoacídica en la secuencia de *msrA* determinada a partir del alineamiento obtenido de PFAM.

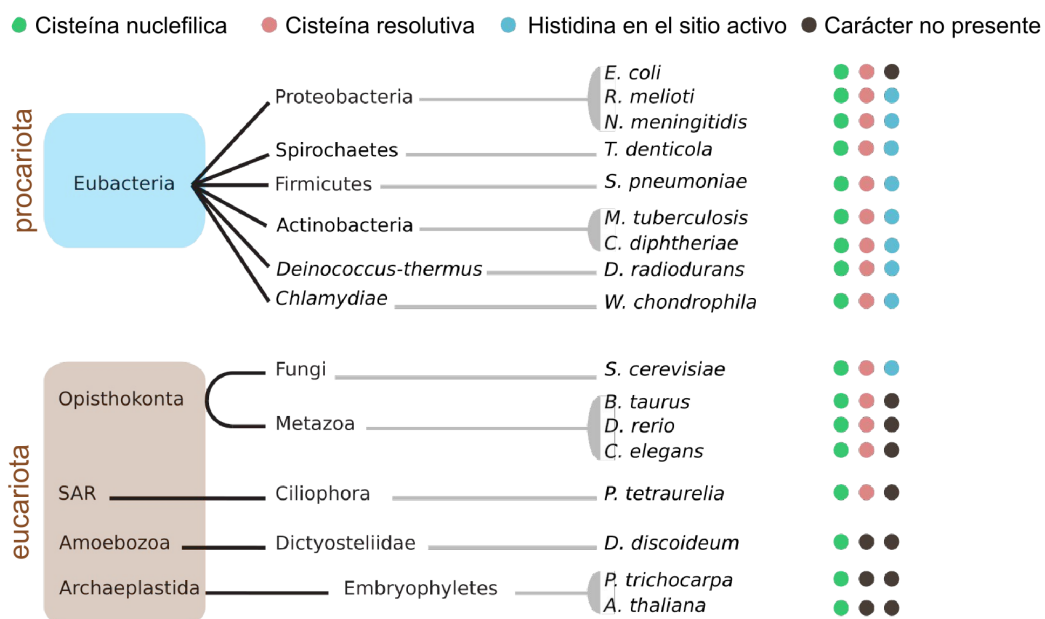
Como se observa en la **Figura 4.4.3**, y ya se había mencionado en la Introducción, el motivo GCFWC/G se encuentra altamente conservado. Los residuos catalíticos Tyr44, Glu52 y Tyr92 también se encuentran altamente conservados. Por otra parte, la conservación de las diferentes cisteínas no es tan clara, y es por eso que para estudiar la conservación de la His155 se realizó una subdivisión de las *msrA* en base a los criterios bioquímicos presentados en la introducción y no a criterios filogenéticos. Brevemente, los subtipos de *msrA* presentan **i)** una única cisteína (o selenocisteína) reactiva en la posición 51 (numeración basada en la secuencia de la *msrA* de *Escherichia coli*)<sup>17,18</sup>, **ii)** dos cisteínas reactivas en las posiciones 51 y 54<sup>19</sup> o **iii)** 51 y 198 y finalmente **iv)** con al menos tres cisteínas catalíticas ubicadas en las posiciones 51, 198 y 206 (*CysC*)<sup>20,21</sup>. De un total de 4890 secuencias seleccionadas, 94 corresponden al subtipo **i**, 2523 al subtipo **ii**, 2049 al subtipo **iii** y 176 al subtipo **iv**.

La His155 se encuentra presente únicamente en la secuencia consenso de las *msrA* del **subtipo iii**. Para profundizar esto, en la **Tabla 4.4.3** se estudió la frecuencia de aparición de este aminoácido en dicha posición.

**Tabla 4.4.3.** Frecuencia de aparición de His/Gly/Ala en la posición 155 para los diferentes subtipos estudiados.

		Subtipo I	Subtipo II	Subtipo III	Subtipo IV	Total
p155	<b>H</b>	0.000	0.008	0.607	0.000	0.258
	<b>G</b>	0.000	0.002	0.265	0.938	0.146
	<b>A</b>	0.000	0.060	0.015	0.017	0.01
	<b>Q</b>	0.000	0.133	0.002	0.000	0.07
	<b>Otro</b>	1.00	0.707	0.111	0.045	0.516

A partir de la **Tabla 4.4.3** se observa que el nivel de conservación de la His155 en todas las secuencias de *msrA* es de 25.8%, mostrando diferencias significativas según el tipo de *msrA*. Como se desprende de la tabla, en el subtipo III (el perteneciente a *MtmsrA*) la histidina en dicha posición presenta un elevado nivel de conservación. Complementariamente, se estudió el nivel de distribución de los diferentes subtipos de *msrA* a lo largo del árbol evolutivo, tal como se muestra en la siguiente figura:

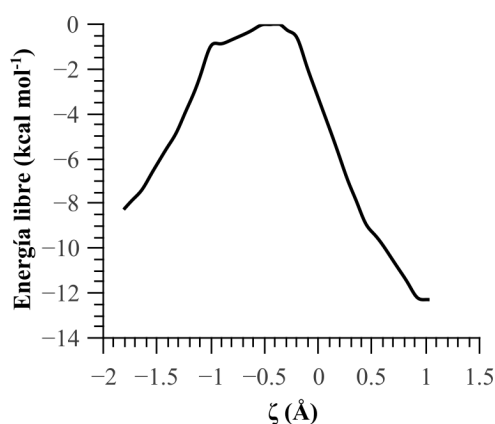


**Figura 4.4.4** Estudio de la conservación de la His155 a lo largo del árbol evolutivo.

A raíz de la **Figura 4.4.4** se puede extraer que el subtipo iii de msrA tiene una mayor preponderancia en eubacteria, mientras que en *eukaryotes* se ve una mayor abundancia de los otros subtipos, siendo este último el preponderante en mamíferos.

#### 4.5 Caracterización del cierre disulfuro

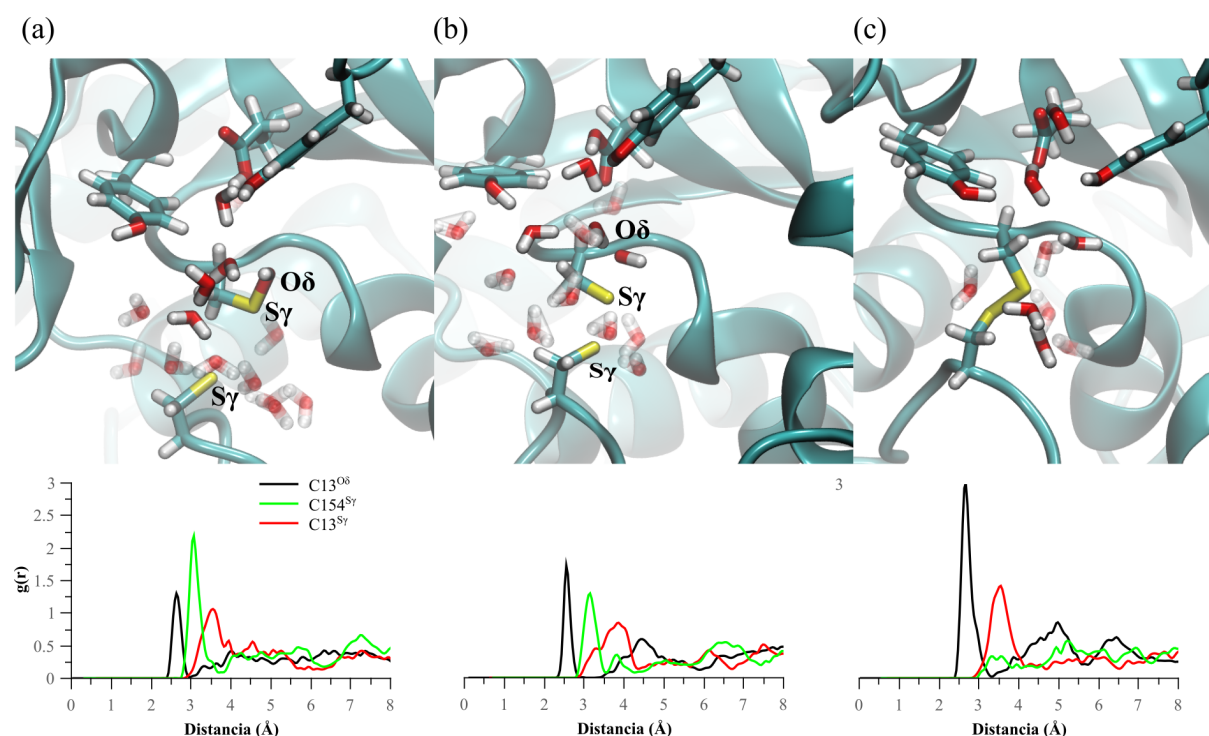
En orden con terminar la caracterización de la etapa oxidativa del mecanismo catalítico, a partir de una estructura inicial apropiada para la reacción del cierre disulfuro seleccionada según los criterios establecidos en el apartado anterior. En su trabajo, Dokainish y colaboradores<sup>60</sup> postularon que el Asp87 está directamente involucrado en esta etapa del mecanismo catalítico mediante catálisis ácida. Sin embargo, en su trabajo, el tiempo de simulación que emplearon para caracterizar el estado sulfénico fue de 1 ns, tiempo que se encuentra por debajo del tiempo característico de la acomodación de las cadenas laterales en una proteína, como se muestra en la **Figura 2.1.1.1**. Cuando se caracterizó el estado sulfénico en esta tesis, el carboxilato del Asp87 se encuentra a una distancia promedio del Cys13<sup>Oδ</sup> de  $11.8 \pm 2 \text{ \AA}$  y  $12 \pm 2 \text{ \AA}$  en los sistemas Glu52 desprotonado y neutro respectivamente. Es por eso que se descartó dicha posibilidad mecanística, y se consideró la posibilidad de que sea nuevamente el residuo Glu52 quien actúa como ácido. Se realizó un SMD según lo indicado en la **Sección 3.2.3**, seleccionando como región cuántica la cadena lateral de los residuos Cys\*13, Cys52, Glu154 y cuatro molécula de agua que conectan la Cys\*13 con el Glu52. La coordenada sesgada elegida corresponde a la resta de las distancias  $\text{Cys13}^{\text{S}\gamma}\text{-Cys13}^{\text{O}\delta}$  y  $\text{Cys13}^{\text{S}\gamma}\text{-Cys154}^{\text{S}\gamma}$ . En la siguiente figura se muestra el perfil de energía libre del cierre disulfuro:



**Figura 4.5.1** Perfil de energía libre del cierre disulfuro. La coordenada sesgada elegida corresponde a la resta de las distancias  $\text{Cys13}^{\text{S}\gamma}\text{-Cys13}^{\text{O}\delta}$  y  $\text{Cys13}^{\text{S}\gamma}\text{-Cys154}^{\text{S}\gamma}$ .



A su vez, en la siguiente figura se muestra una estructura representativa extraída de las ventanas que corresponden a los mínimos [**Figura 4.5.2(a)** y **Figura 4.5.2(c)**] y al máximo [**Figura 4.5.2(b)**] a lo largo del perfil de energía libre obtenido.



**Figura 4.5.2.** Estructura representativa de los puntos estacionarios obtenidos del perfil de energía libre (panel superior), y función de distribución radial de los átomos  $C13^{O\delta}$ ,  $C13^{S\gamma}$  y  $C154^{S\gamma}$  para **(a)** reactivos, **(b)** máximo de la coordenada y **(c)** productos.

Como se observa en la **Figura 4.5.2(a)**, el perfil de energía libre presenta una barrera energética de  $8.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  y una energía libre de reacción de  $-4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ , siendo un proceso exergónico. Si bien en este caso no fue posible muestrear correctamente la catálisis general y específica, dado que esta ocurre luego del máximo del perfil de energía libre es probable que no afecte el perfil de reacción.

Como se aprecia en la **Figura 4.5.2**, a medida que avanza la reacción el perfil de hidratación, medido según la distribución radial de átomos de oxígeno perteneciente a las aguas respecto de los diferentes átomos que intervienen en la reacción se modifica considerablemente. En principio, el átomo  $Cys154^{S\gamma}$  es el que se encuentra con una esfera de solvatación de mayor tamaño y mejor definida respecto a  $Cys13^{S\gamma}$  y  $Cys13^{O\delta}$ . Una vez que se alcanza el TS, la altura del pico asociado al número de aguas presentes en la primera esfera de solvatación de  $Cys154^{S\gamma}$  disminuyó a la mitad, mientras el del átomo  $Cys13^{O\delta}$  se ve incrementado.



Finalmente, una vez que la reacción finaliza, la solvatación de Cys13<sup>Oδ</sup> es similar al de cualquier molécula de agua, con tres esferas de solvatación bien estructuradas. En principio la solvatación de los átomos Cys13<sup>Sγ</sup> y Cys154<sup>Sγ</sup> debería ser similar, pero una vez finalizada la reacción el residuo que queda expuesto es la Cys13.

## 5. Conclusiones y perspectivas

A lo largo de esta tesis se buscó caracterizar completamente el mecanismo catalítico de la enzima metionina sulfóxido reductasa A del patógeno *Mycobacterium tuberculosis* empleando diversas metodologías empíricas y computacionales, contrastando la información generada con la reportada previamente en la literatura.

En primer lugar, se estudió en forma minuciosa las propiedades dinámicas de la *MtmsrA* en diferentes estados de oxidación, así como formando diferentes complejos enzima-sustrato/producto. Los cambios descritos en los diferentes sistemas estudiados son consistentes con las observaciones experimentales descritas previamente así como en esta tesis; la labilidad en la red de enlaces de hidrógenos descrita para los diferentes complejos de Michaelis estudiados es consistente con la enorme variedad de sustratos que presenta esta enzima, los cambios observados a nivel del  $pK_a$  de los diferentes residuos del sitio activo asociados a la unión del sustrato son consistentes con los estados de protonación favorables a la catálisis, y el estado disulfuro caracterizado es consistente con los reportes bibliográficos, así como los estudios de dicroísmo circular aquí abordados.

Por otro lado, la reducción de sulfóxidos mediada por tioles, tanto en solución acuosa como enzimática, ha sido estudiada experimental y computacionalmente durante décadas. Sin embargo, hasta el momento de realizada esta tesis de Maestría no se había realizado un estudio pormenorizado del mecanismo catalítico, ni se había estudiado este proceso directamente sobre la superficie de energía libre. Los resultados aquí presentes evidenciaron la importancia en este proceso catalítico de incorporar efectos dinámicos y térmicos, ya que permitieron descartar al sulfurano como un intermediario catalítico. A su vez, fue posible determinar que para este subtipo de *msrA* la His155 presenta un rol de catalizador ácido/base, residuo que se encuentra conservado dentro de éste subtipo.

En suma, en esta Tesis de Maestría se caracterizaron las diferentes etapas del ciclo catalítico de la metionina sulfóxido reductasa A del patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Por un lado, la descripción atomística del mecanismo catalítico representa un aporte relevante en el campo de reducción de sulfóxidos por tioles mediado por sulfóxido reductasas, descartando la existencia de un intermediario planteado en estudios previos sobre superficies de energía potencial. Por otro lado, la descripción experimental permitió verificar varios de los

resultados computacionales, así como la determinación de diferentes parámetros termodinámicos claves con posible aplicación biotecnológica. La reducción enzimática de sulfóxidos es de gran relevancia biotecnológica en el campo de la química verde, debido a que los métodos tradicionales requieren del uso en exceso de diversas sustancias tóxicas, y no logran la enantioselectividad enzimática.

Comprender en detalle los mecanismos de reparación proteica de diferentes patógenos asociado al daño oxidativo generado por el sistema inmune abre la puerta a la producción de fármacos que exploten las diferencias presentes en éstos y el funcionamiento de las proteínas homólogas del hospedero.

## 6. Bibliografía

- (1) Russell, D. G. Mycobacterium Tuberculosis: Here Today, and Here Tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2 (8), 569–578. <https://doi.org/10.1038/35085034>.
- (2) World Health Organization. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2020. 2020.
- (3) Brown, C. A.; Draper, P.; Hart, P. D. Mycobacteria and Lysosomes: A Paradox. *Nature* **1969**, 221 (5181), 658–660. <https://doi.org/10.1038/221658a0>.
- (4) Hart, P. D.; Armstrong, J. A.; Brown, C. A.; Draper, P. Ultrastructural Study of the Behavior of Macrophages Toward Parasitic Mycobacteria. *Infect. Immun.* **1972**, 5 (5), 803–807. <https://doi.org/10.1128/iai.5.5.803-807.1972>.
- (5) Nicholson, S.; Bonecini-Almeida, M. da G.; Lapa e Silva, J. R.; Nathan, C.; Xie, Q. W.; Mumford, R.; Weidner, J. R.; Calaycay, J.; Geng, J.; Boechat, N.; Linhares, C.; Rom, W.; Ho, J. L. Inducible Nitric Oxide Synthase in Pulmonary Alveolar Macrophages from Patients with Tuberculosis. *J. Exp. Med.* **1996**, 183 (5), 2293–2302. <https://doi.org/10.1084/jem.183.5.2293>.
- (6) Nathan, C. Role of INOS in Human Host Defense. *Science* **2006**, 312 (5782), 1874–1875. <https://doi.org/10.1126/science.312.5782.1874b>.
- (7) Panday, A.; Sahoo, M. K.; Osorio, D.; Batra, S. NADPH Oxidases: An Overview from Structure to Innate Immunity-Associated Pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* **2015**, 12 (1), 5–23. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.89>.
- (8) Van Acker, H.; Coenye, T. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol.* **2017**, 25 (6), 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.008>.
- (9) Jamaati, H.; Mortaz, E.; Pajouhi, Z.; Folkerts, G.; Movassaghi, M.; Moloudizargari, M.; Adcock, I. M.; Garssen, J. Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 2008. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02008>.
- (10) Manta, B.; Gladyshev, V. N. Regulated Methionine Oxidation by Monooxygenases. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, 109, 141–155. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.010>.
- (11) Lee, B. C.; Péterfi, Z.; Hoffmann, F. W.; Moore, R. E.; Kaya, A.; Avanesov, A.; Tarrago, L.; Zhou, Y.; Weerapana, E.; Fomenko, D. E.; Hoffmann, P. R.; Gladyshev, V. N. MsrB1 and MICALs Regulate Actin Assembly and Macrophage Function via Reversible Stereoselective Methionine Oxidation. *Mol. Cell* **2013**, 51 (3), 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.06.019>.
- (12) Peskin, A. V.; Turner, R.; Maghzal, G. J.; Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. Oxidation of Methionine to Dehydromethionine by Reactive Halogen Species Generated by Neutrophils. *Biochemistry* **2009**, 48 (42), 10175–10182. <https://doi.org/10.1021/bi901266w>.
- (13) Brot, N.; Weissbach, L.; Werth, J.; Weissbach, H. Enzymatic Reduction of Protein-Bound Methionine Sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78 (4), 2155–2158. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2155>.
- (14) Rahman, M. A.; Nelson, H.; Weissbach, H.; Brot, N. Cloning, Sequencing, and Expression of the Escherichia Coli Peptide Methionine Sulfoxide Reductase Gene. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267 (22), 15549–15551. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49570-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49570-7).
- (15) Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Branlant, G. E. Coli Methionine Sulfoxide Reductase with a Truncated N Terminus or C Terminus, or Both, Retains the Ability to Reduce Methionine Sulfoxide. *Protein Sci.* **2008**, 10 (11), 2272–2279. <https://doi.org/10.1110/ps.10701>.
- (16) Sasoni, N.; Hartman, M. D.; Guerrero, S. A.; Iglesias, A. A.; Arias, D. G. Functional Characterization of Methionine Sulfoxide Reductases from Leptospira Interrogans.

- Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2021**, 1869 (2), 140575. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140575>.
- (17) Taylor, A. B.; Benglis, D. M.; Dhandayuthapani, S.; Hart, P. J. Structure of *Mycobacterium Tuberculosis* Methionine Sulfoxide Reductase A in Complex with Protein-Bound Methionine. *J. Bacteriol.* **2003**, 185 (14), 4119–4126. <https://doi.org/10.1128/JB.185.14.4119-4126.2003>.
- (18) Kim, H.-Y.; Zhang, Y.; Lee, B. C.; Kim, J.-R.; Gladyshev, V. N. The Selenoproteome of *Clostridium* Sp. OhILAs: Characterization of Anaerobic Bacterial Selenoprotein Methionine Sulfoxide Reductase A. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, 74 (4), 1008–1017. <https://doi.org/10.1002/prot.22212>.
- (19) Madeira, J.-P.; Alpha-Bazin, B. M.; Armengaud, J.; Duport, C. Methionine Residues in Exoproteins and Their Recycling by Methionine Sulfoxide Reductase AB Serve as an Antioxidant Strategy in *Bacillus Cereus*. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 1342. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01342>.
- (20) Tête-Favier, F.; Cobessi, D.; Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Branlant, G.; Aubry, A. Crystal Structure of the *Escherichia Coli* Peptide Methionine Sulphoxide Reductase at 1.9 Å Resolution. *Structure* **2000**, 8 (11), 1167–1178. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00526-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00526-8).
- (21) Rouhier, N.; Santos, C. V. D.; Tarrago, L.; Rey, P. Plant Methionine Sulfoxide Reductase A and B Multigenic Families. *Photosynth. Res.* **2006**, 89 (2–3), 247–262. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9097-1>.
- (22) Antoine, M.; Gand, A.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. Characterization of the Amino Acids from *Neisseria Meningitidis* MsrA Involved in the Chemical Catalysis of the Methionine Sulfoxide Reduction Step. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (51), 39062–39070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608844200>.
- (23) Kim, Y. K.; Shin, Y. J.; Lee, W.-H.; Kim, H.-Y.; Hwang, K. Y. Structural and Kinetic Analysis of an MsrA-MsrB Fusion Protein from *Streptococcus Pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **2009**, 72 (3), 699–709. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06680.x>.
- (24) Kim, S.; Lee, K.; Park, S.-H.; Kwak, G.-H.; Kim, M. S.; Kim, H.-Y.; Hwang, K. Y. Structural Insights into a Bifunctional Peptide Methionine Sulfoxide Reductase MsrA/B Fusion Protein from *Helicobacter Pylori*. *Antioxidants* **2021**, 10 (3), 389. <https://doi.org/10.3390/antiox10030389>.
- (25) Kim, H.-Y.; Fomenko, D. E.; Yoon, Y.-E.; Gladyshev, V. N. Catalytic Advantages Provided by Selenocysteine in Methionine- S -Sulfoxide Reductases. *Biochemistry* **2006**, 45 (46), 13697–13704. <https://doi.org/10.1021/bi0611614>.
- (26) Le, D. T.; Nguyen, K.-L.; Chu, H. D.; Vu, N. T.; Pham, T. T. L.; Tran, L.-S. P. Function of the Evolutionarily Conserved Plant Methionine-S-Sulfoxide Reductase without the Catalytic Residue. *Protoplasma* **2018**, 255 (6), 1741–1750. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1266-5>.
- (27) Moskovitz, J.; Bar-Noy, S.; Williams, W. M.; Requena, J.; Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. Methionine Sulfoxide Reductase (MsrA) Is a Regulator of Antioxidant Defense and Lifespan in Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98 (23), 12920–12925. <https://doi.org/10.1073/pnas.231472998>.
- (28) He, D.; Feng, H.; Sundberg, B.; Yang, J.; Powers, J.; Christian, A. H.; Wilkinson, J. E.; Monnin, C.; Avizonis, D.; Thomas, C. J.; Friedman, R. A.; Kluger, M. D.; Hollingsworth, M. A.; Grandgenett, P. M.; Klute, K. A.; Toste, F. D.; Chang, C. J.; Chio, I. I. C. Methionine Oxidation Activates Pyruvate Kinase M2 to Promote Pancreatic Cancer Metastasis. *Mol. Cell* **2022**, S109727652200541X. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.06.005>.
- (29) Romero, H. M.; Berlett, B. S.; Jensen, P. J.; Pell, E. J.; Tien, M. Investigations into the Role of the Plastidial Peptide Methionine Sulfoxide Reductase in Response to

- Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2004**, *136* (3), 3784–3794. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046656>.
- (30) Lavine, T. F. The Formation, Resolution, and Optical Properties of the Diastereoisomeric Sulfoxides Derived from L-Methionine. *J. Biol. Chem.* **1947**, *169* (3), 477–491.
- (31) Liu, L.; Wang, M. H. Expression and Biological Properties of a Novel Methionine Sulfoxide Reductase A in Tobacco (*Nicotiana Tabacum*). *Protein J.* **2013**, *32* (4), 266–274. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9479-0>.
- (32) Wizemann, T. M.; Moskovitz, J.; Pearce, B. J.; Cundell, D.; Arvidson, C. G.; So, M.; Weissbach, H.; Brot, N.; Masure, H. R. Peptide Methionine Sulfoxide Reductase Contributes to the Maintenance of Adhesins in Three Major Pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (15), 7985–7990. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7985>.
- (33) Das, K.; De la Garza, G.; Maffi, S.; Saikolappan, S.; Dhandayuthapani, S. Methionine Sulfoxide Reductase A (MsrA) Deficient *Mycoplasma Genitalium* Shows Decreased Interactions with Host Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7* (4), e36247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036247>.
- (34) Lee, W. L.; Gold, B.; Darby, C.; Brot, N.; Jiang, X.; de Carvalho, L. P. S.; Wellner, D.; St. John, G.; Jacobs Jr, W. R.; Nathan, C. *Mycobacterium Tuberculosis* Expresses Methionine Sulphoxide Reductases A and B That Protect from Killing by Nitrite and Hypochlorite. *Mol. Microbiol.* **2009**, *71* (3), 583–593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06548.x>.
- (35) Gladyshev, V. N. Thioredoxin and Peptide Methionine Sulfoxide Reductase: Convergence of Similar Structure and Function in Distinct Structural Folds. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *46* (2), 149–152. <https://doi.org/10.1002/prot.10003>.
- (36) Moskovitz, J.; Poston, J. M.; Berlett, B. S.; Nosworthy, N. J.; Szczepanowski, R.; Stadtman, E. R. Identification and Characterization of a Putative Active Site for Peptide Methionine Sulfoxide Reductase (MsrA) and Its Substrate Stereospecificity. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (19), 14167–14172. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14167>.
- (37) Gand, A.; Antoine, M.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. Characterization of the Amino Acids Involved in Substrate Specificity of Methionine Sulfoxide Reductase A. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (28), 20484–20491. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702350200>.
- (38) Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Sanglier-Cianferani, S.; Talfournier, F.; Van Dorsselear, A.; Branlant, G. A Sulfenic Acid Enzyme Intermediate Is Involved in the Catalytic Mechanism of Peptide Methionine Sulfoxide Reductase From *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (46), 35908–35913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006137200>.
- (39) Lowther, W. T.; Brot, N.; Weissbach, H.; Honek, J. F.; Matthews, B. W. Thiol-Disulfide Exchange Is Involved in the Catalytic Mechanism of Peptide Methionine Sulfoxide Reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (12), 6463–6468. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6463>.
- (40) Olry, A.; Boschi-Muller, S.; Marraud, M.; Sanglier-Cianferani, S.; Van Dorsselear, A.; Branlant, G. Characterization of the Methionine Sulfoxide Reductase Activities of PILB, a Probable Virulence Factor from *Neisseria Meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (14), 12016–12022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112350200>.
- (41) Rouhier, N.; Kauffmann, B.; Tete-Favier, F.; Palladino, P.; Gans, P.; Branlant, G.; Jacquot, J.-P.; Boschi-Muller, S. Functional and Structural Aspects of Poplar Cytosolic and Plastidial Type A Methionine Sulfoxide Reductases. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (5), 3367–3378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605007200>.
- (42) Arias, D. G.; Cabeza, M. S.; Erben, E. D.; Carranza, P. G.; Lujan, H. D.; Téllez Iñón, M. T.; Iglesias, A. A.; Guerrero, S. A. Functional Characterization of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Trypanosoma Spp.* *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50* (1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.695>.

- (43) Tossounian, M.-A.; Pedre, B.; Wahni, K.; Erdogan, H.; Vertommen, D.; Van Molle, I.; Messens, J. Corynebacterium Diphtheriae Methionine Sulfoxide Reductase A Exploits a Unique Mycothiol Redox Relay Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (18), 11365–11375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.632596>.
- (44) Fukushima, E.; Shinka, Y.; Fukui, T.; Atomi, H.; Imanaka, T. Methionine Sulfoxide Reductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus Kodakaraensis*, an Enzyme Designed To Function at Suboptimal Growth Temperatures. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (19), 7134–7144. <https://doi.org/10.1128/JB.00751-06>.
- (45) Han, A.; Kim, M.-J.; Kwak, G.-H.; Son, J.; Hwang, K. Y.; Kim, H.-Y. Essential Role of the Linker Region in the Higher Catalytic Efficiency of a Bifunctional MsrA–MsrB Fusion Protein. *Biochemistry* **2016**, *55* (36), 5117–5127. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00544>.
- (46) Kim, H.-Y.; Gladyshev, V. N. Role of Structural and Functional Elements of Mouse Methionine- S -Sulfoxide Reductase in Its Subcellular Distribution. *Biochemistry* **2005**, *44* (22), 8059–8067. <https://doi.org/10.1021/bi0501131>.
- (47) Lee, B. C.; Lee, Y. K.; Lee, H.-J.; Stadtman, E. R.; Lee, K.-H.; Chung, N. Cloning and Characterization of Antioxidant Enzyme Methionine Sulfoxide-S-Reductase from *Caenorhabditis Elegans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *434* (2), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.11.012>.
- (48) Kim, H.-Y.; Gladyshev, V. N. Alternative First Exon Splicing Regulates Subcellular Distribution of Methionine Sulfoxide Reductases. *BMC Mol. Biol.* **2006**, *7* (1), 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-11>.
- (49) Devarie-Baez, N. O.; Silva Lopez, E. I.; Furdui, C. M. Biological Chemistry and Functionality of Protein Sulfenic Acids and Related Thiol Modifications. *Free Radic. Res.* **2016**, *50* (2), 172–194. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1090571>.
- (50) Harms, M. J.; Castañeda, C. A.; Schlessman, J. L.; Sue, G. R.; Isom, D. G.; Cannon, B. R.; García-Moreno E., B. The PKa Values of Acidic and Basic Residues Buried at the Same Internal Location in a Protein Are Governed by Different Factors. *J. Mol. Biol.* **2009**, *389* (1), 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.039>.
- (51) Witt, A. C.; Lakshminarasimhan, M.; Remington, B. C.; Hasim, S.; Pozharski, E.; Wilson, M. A. Cysteine p  $K_a$  Depression by a Protonated Glutamic Acid in Human DJ-1. *Biochemistry* **2008**, *47* (28), 7430–7440. <https://doi.org/10.1021/bi800282d>.
- (52) Snow, J. T.; Finley, J. W.; Friedman, M. Oxidation of Sulfhydryl Groups to Disulfides by Sulfoxides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *64* (1), 441–447. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(75\)90272-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(75)90272-7).
- (53) Epstein, W. W.; Sweat, F. W. Dimethyl Sulfoxide Oxidations. *Chem. Rev.* **1967**, *67* (3), 247–260. <https://doi.org/10.1021/cr60247a001>.
- (54) Arterburn, J. B.; Perry, M. C.; Nelson, S. L.; Dible, B. R.; Holguin, M. S. Rhenium-Catalyzed Oxidation of Thiols and Disulfides with Sulfoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (39), 9309–9310. <https://doi.org/10.1021/ja972013r>.
- (55) Wallace, T. J.; Mahon, J. J. Reactions of Thiols with Sulfoxides. III. Catalysis by Acids and Bases. *J. Org. Chem.* **1965**, *30* (5), 1502–1506. <https://doi.org/10.1021/jo01016a039>.
- (56) Balta, B.; Monard, G.; Ruiz-López, M. F.; Antoine, M.; Gand, A.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. Theoretical Study of the Reduction Mechanism of Sulfoxides by Thiols. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (24), 7628–7636. <https://doi.org/10.1021/jp0573036>.
- (57) Block, E. *Organosulfur Compound*.
- (58) Thiriot, E.; Monard, G.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G.; Ruiz-López, M. F. Reduction Mechanism in Class A Methionine Sulfoxide Reductases: A Theoretical Chemistry Investigation. *Theor. Chem. Acc.* **2011**, *129* (1), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s00214-011-0901-4>.

- (59) Kaiser, D.; Klose, I.; Oost, R.; Neuhaus, J.; Maulide, N. Bond-Forming and -Breaking Reactions at Sulfur(IV): Sulfoxides, Sulfonium Salts, Sulfur Ylides, and Sulfinic Salts. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (14), 8701–8780. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00111>.
- (60) Dokainish, H. M.; Gault, J. W. A Molecular Dynamics and Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Study of the Catalytic Reductase Mechanism of Methionine Sulfoxide Reductase A: Formation and Reduction of a Sulfinic Acid. *Biochemistry* **2013**, *52* (10), 1814–1827. <https://doi.org/10.1021/bi301168p>.
- (61) Boschi-Muller, S.; Branlant, G. Methionine Sulfoxide Reductase: Chemistry, Substrate Binding, Recycling Process and Oxidase Activity. *Bioorganic Chem.* **2014**, *57*, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.07.002>.
- (62) Robinet, J. J.; Dokainish, Hisham. M.; Paterson, D. J.; Gault, J. W. A Sulfonium Cation Intermediate in the Mechanism of Methionine Sulfoxide Reductase B: A DFT Study. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (29), 9202–9212. <https://doi.org/10.1021/jp111681e>.
- (63) Lim, J. C.; Gruschus, J. M.; Kim, G.; Berlett, B. S.; Tjandra, N.; Levine, R. L. A Low PK Cysteine at the Active Site of Mouse Methionine Sulfoxide Reductase A. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (30), 25596–25601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369116>.
- (64) Lim, J. C.; Kim, G.; Levine, R. L. Stereospecific Oxidation of Calmodulin by Methionine Sulfoxide Reductase A. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *61*, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.004>.
- (65) Kriznik, A.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. Kinetic Evidence That Methionine Sulfoxide Reductase A Can Reveal Its Oxidase Activity in the Presence of Thioredoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *548*, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.03.002>.
- (66) Tarafdar, S.; Kim, G.; Levine, R. L. Drosophila Methionine Sulfoxide Reductase A (MSRA) Lacks Methionine Oxidase Activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *131*, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.001>.
- (67) Coudeville, N.; Antoine, M.; Bouguet-Bonnet, S.; Mutzenhardt, P.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G.; Cung, M.-T. Solution Structure and Backbone Dynamics of the Reduced Form and an Oxidized Form of E. Coli Methionine Sulfoxide Reductase A (MsrA): Structural Insight of the MsrA Catalytic Cycle. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366* (1), 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.042>.
- (68) Ranaivoson, F. M.; Antoine, M.; Kauffmann, B.; Boschi-Muller, S.; Aubry, A.; Branlant, G.; Favier, F. A Structural Analysis of the Catalytic Mechanism of Methionine Sulfoxide Reductase A from Neisseria Meningitidis. *J. Mol. Biol.* **2008**, *377* (1), 268–280. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.021>.
- (69) Si, M.; Zhang, L.; Chaudhry, M. T.; Ding, W.; Xu, Y.; Chen, C.; Akbar, A.; Shen, X.; Liu, S.-J. Corynebacterium Glutamicum Methionine Sulfoxide Reductase A Uses Both Mycoredoxin and Thioredoxin for Regeneration and Oxidative Stress Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (8), 2781–2796. <https://doi.org/10.1128/AEM.04221-14>.
- (70) Kim, M.-J.; Jeong, J.; Jeong, J.; Hwang, K. Y.; Lee, K.-J.; Kim, H.-Y. Mechanism of 1-Cys Type Methionine Sulfoxide Reductase A Regeneration by Glutaredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *457* (4), 567–571. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.025>.
- (71) Dai, C.; Han, W.; Wang, M.-H. Two Highly Homologous Methionine Sulfoxide Reductase A from Tomato (*Solanum Lycopersicum*), Exhibit Distinct Catalytic Properties. *Protein J.* **2012**, *31* (4), 285–292. <https://doi.org/10.1007/s10930-012-9403-z>.
- (72) Trujillo, M.; Ferrer-Sueta, G.; Thomson, L.; Flohé, L.; Radi, R. Kinetics of Peroxiredoxins and Their Role in the Decomposition of Peroxynitrite. In *Peroxiredoxin Systems*; Flohé, L., Harris, J. R., Eds.; Harris, J. R., Biswas, B. B., Quinn, P., Series Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer Netherlands: Dordrecht, 2007; Vol. 44, pp 83–113. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_5).



- (73) Napolitano, S.; Reber, R. J.; Rubini, M.; Glockshuber, R. Functional Analyses of Ancestral Thioredoxins Provide Insights into Their Evolutionary History. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (38), 14105–14118. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009718>.
- (74) Ma, X.-X.; Guo, P.-C.; Shi, W.-W.; Luo, M.; Tan, X.-F.; Chen, Y.; Zhou, C.-Z. Structural Plasticity of the Thioredoxin Recognition Site of Yeast Methionine S-Sulfoxide Reductase Mxr1. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (15), 13430–13437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.205161>.
- (75) Hvidt, A.; Linderstrøm-Lang, K. Exchange of Hydrogen Atoms in Insulin with Deuterium Atoms in Aqueous Solutions. *Biochim. Biophys. Acta* **1954**, *14*, 574–575. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(54\)90241-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(54)90241-3).
- (76) Henzler-Wildman, K.; Kern, D. Dynamic Personalities of Proteins. *Nature* **2007**, *450* (7172), 964–972. <https://doi.org/10.1038/nature06522>.
- (77) Teilum, K.; Olsen, J. G.; Kragelund, B. B. Functional Aspects of Protein Flexibility. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (14), 2231–2247. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0014-6>.
- (78) Robic, S. Mathematics, Thermodynamics, and Modeling to Address Ten Common Misconceptions about Protein Structure, Folding, and Stability. *CBE—Life Sci. Educ.* **2010**, *9* (3), 189–195. <https://doi.org/10.1187/cbe.10-03-0018>.
- (79) Hare, S. R.; Tantillo, D. J. Correction to “Post-Transition State Bifurcations Gain Momentum – Current State of the Field.” *Pure Appl. Chem.* **2019**, *91* (1), 159–159. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-1016>.
- (80) Xu, Y.; Havenith, M. Perspective: Watching Low-Frequency Vibrations of Water in Biomolecular Recognition by THz Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **2015**, *143* (17), 170901. <https://doi.org/10.1063/1.4934504>.
- (81) Frauenfelder, H.; Sligar, S. G.; Wolynes, P. G. The Energy Landscapes and Motions of Proteins. *Science* **1991**, *254* (5038), 1598–1603. <https://doi.org/10.1126/science.1749933>.
- (82) Frauenfelder, H.; Petsko, G. A.; Tsernoglou, D. Temperature-Dependent X-Ray Diffraction as a Probe of Protein Structural Dynamics. *Nature* **1979**, *280* (5723), 558–563. <https://doi.org/10.1038/280558a0>.
- (83) Laurendeau, N. M. *Statistical Thermodynamics: Fundamentals and Applications*; Cambridge University Press: Cambridge, 2011.
- (84) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* **1967**, *159* (1), 98–103. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.159.98>.
- (85) Price, D. J.; Brooks, C. L. A Modified TIP3P Water Potential for Simulation with Ewald Summation. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121* (20), 10096–10103. <https://doi.org/10.1063/1.1808117>.
- (86) Mark, P.; Nilsson, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105* (43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>.
- (87) Levine, I. N. *Quantum Chemistry*, Seventh edition.; Pearson: Boston, 2014.
- (88) Nasiri, S.; Bubin, S.; Adamowicz, L. Treating the Motion of Nuclei and Electrons in Atomic and Molecular Quantum Mechanical Calculations on an Equal Footing: Non-Born–Oppenheimer Quantum Chemistry. In *Advances in Quantum Chemistry*; Elsevier, 2020; Vol. 81, pp 143–166. <https://doi.org/10.1016/bs.aiq.2020.05.004>.
- (89) Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*; Dover Publications: Mineola, N.Y., 1996.
- (90) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. V. Systematic Optimization of Exchange-Correlation Functionals. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107* (20), 8554–8560. <https://doi.org/10.1063/1.475007>.
- (91) van der Kamp, M. W.; Mulholland, A. J. Combined Quantum Mechanics/Molecular

- Mechanics (QM/MM) Methods in Computational Enzymology. *Biochemistry* **2013**, *52* (16), 2708–2728. <https://doi.org/10.1021/bi400215w>.
- (92) Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (7), 1198–1229. <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>.
- (93) Lin, H.; Truhlar, D. G. QM/MM: What Have We Learned, Where Are We, and Where Do We Go from Here? *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117* (2), 185. <https://doi.org/10.1007/s00214-006-0143-z>.
- (94) Eichinger, M.; Tavan, P.; Hutter, J.; Parrinello, M. A Hybrid Method for Solutes in Complex Solvents: Density Functional Theory Combined with Empirical Force Fields. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110* (21), 10452–10467. <https://doi.org/10.1063/1.479049>.
- (95) Maseras, F.; Morokuma, K. IMOMM: A New Integrated ab Initio + Molecular Mechanics Geometry Optimization Scheme of Equilibrium Structures and Transition States. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16* (9), 1170–1179. <https://doi.org/10.1002/jcc.540160911>.
- (96) Vreven, T.; Byun, K. S.; Komáromi, I.; Dapprich, S.; Montgomery, J. A.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2* (3), 815–826. <https://doi.org/10.1021/ct050289g>.
- (97) Lee, T.-S.; Cerutti, D. S.; Mermelstein, D.; Lin, C.; LeGrand, S.; Giese, T. J.; Roitberg, A.; Case, D. A.; Walker, R. C.; York, D. M. GPU-Accelerated Molecular Dynamics and Free Energy Methods in Amber18: Performance Enhancements and New Features. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *58* (10), 2043–2050. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00462>.
- (98) Bezanilla, F. Gating Currents. *J. Gen. Physiol.* **2018**, *150* (7), 911–932. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812090>.
- (99) Socher, E.; Sticht, H. Mimicking Titration Experiments with MD Simulations: A Protocol for the Investigation of pH-Dependent Effects on Proteins. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 22523. <https://doi.org/10.1038/srep22523>.
- (100) Yang, Y. I.; Shao, Q.; Zhang, J.; Yang, L.; Gao, Y. Q. Enhanced Sampling in Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2019**, *151* (7), 070902. <https://doi.org/10.1063/1.5109531>.
- (101) Yang, Y. I.; Shao, Q.; Zhang, J.; Yang, L.; Gao, Y. Q. Enhanced Sampling in Molecular Dynamics. *The Journal of Chemical Physics.* <https://doi.org/10.1063/1.5109531>.
- (102) Kästner, J. Umbrella Sampling: Umbrella Sampling. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1* (6), 932–942. <https://doi.org/10.1002/wcms.66>.
- (103) Zeida, A.; Babbush, R.; González Lebrero, M. C.; Trujillo, M.; Radi, R.; Estrin, D. A. Molecular Basis of the Mechanism of Thiol Oxidation by Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution: Challenging the S<sub>N</sub>2 Paradigm. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (3), 741–746. <https://doi.org/10.1021/tx200540z>.
- (104) Zeida, A.; González Lebrero, M. C.; Radi, R.; Trujillo, M.; Estrin, D. A. Mechanism of Cysteine Oxidation by Peroxynitrite: An Integrated Experimental and Theoretical Study. *Arch. Biochem. Biophys.* **2013**, *539* (1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.08.016>.
- (105) Hamelberg, D.; Mongan, J.; McCammon, J. A. Accelerated Molecular Dynamics: A Promising and Efficient Simulation Method for Biomolecules. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120* (24), 11919–11929. <https://doi.org/10.1063/1.1755656>.
- (106) Hamelberg, D.; de Oliveira, C. A. F.; McCammon, J. A. Sampling of Slow Diffusive Conformational Transitions with Accelerated Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2007**, *127* (15), 155102. <https://doi.org/10.1063/1.2789432>.
- (107) Sinko, W.; Miao, Y.; de Oliveira, C. A. F.; McCammon, J. A. Population Based Reweighting of Scaled Molecular Dynamics. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (42), 12759–12768. <https://doi.org/10.1021/jp401587e>.

- (108) Case, D. A.; et al. Amber18, 2019.
- (109) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from Ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>.
- (110) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- (111) Weiser, J.; Shenkin, P. S.; Still, W. C. Approximate Atomic Surfaces from Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO). *J. Comput. Chem.* **1999**, *20* (2), 217–230. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19990130\)20:2<217::AID-JCC4>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19990130)20:2<217::AID-JCC4>3.0.CO;2-A).
- (112) Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* **1983**, *22* (12), 2577–2637. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211>.
- (113) Miller, B. R.; McGee, T. D.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E. *MMPBSA.Py*: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3314–3321. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>.
- (114) Mongan, J.; Case, D. A.; McCammon, J. A. Constant PH Molecular Dynamics in Generalized Born Implicit Solvent. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (16), 2038–2048. <https://doi.org/10.1002/jcc.20139>.
- (115) Israilewitz, B.; Baudry, J.; Gullingsrud, J.; Kosztin, D.; Schulten, K. Steered Molecular Dynamics Investigations of Protein Function. *J. Mol. Graph. Model.* **2001**, *19* (1), 13–25. [https://doi.org/10.1016/s1093-3263\(00\)00133-9](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(00)00133-9).
- (116) Marcolongo, J. P.; Zeida, A.; Semelak, J. A.; Foglia, N. O.; Morzan, U. N.; Estrin, D. A.; González Lebrero, M. C.; Scherlis, D. A. Chemical Reactivity and Spectroscopy Explored From QM/MM Molecular Dynamics Simulations Using the LIO Code. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 70. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00070>.
- (117) Kästner, J. Umbrella Integration with Higher-Order Correction Terms. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136* (23), 234102. <https://doi.org/10.1063/1.4729373>.
- (118) Frisch, M. J.; et al. Gaussian09 Rev D01, 2016.
- (119) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cancès, E. The IEF Version of the PCM Solvation Method: An Overview of a New Method Addressed to Study Molecular Solutes at the QM Ab Initio Level. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1999**, *464* (1–3), 211–226. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(98\)00553-3](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(98)00553-3).
- (120) Fukui, K. The Path of Chemical Reactions - the IRC Approach. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14* (12), 363–368. <https://doi.org/10.1021/ar00072a001>.
- (121) Vazquez, D. S.; Zeida, A.; Agudelo, W. A.; Montes, M. R.; Ferrer-Sueta, G.; Santos, J. Exploring the Conformational Transition between the Fully Folded and Locally Unfolded Substates of *Escherichia Coli* Thiol Peroxidase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (17), 9518–9533. <https://doi.org/10.1039/D0CP00140F>.
- (122) de Oliveira, C. A. F.; Hamelberg, D.; McCammon, J. A. On the Application of Accelerated Molecular Dynamics to Liquid Water Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (45), 22695–22701. <https://doi.org/10.1021/jp062845o>.
- (123) Miao, Y.; Sinko, W.; Pierce, L.; Bucher, D.; Walker, R. C.; McCammon, J. A. Improved Reweighting of Accelerated Molecular Dynamics Simulations for Free Energy Calculation. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10* (7), 2677–2689. <https://doi.org/10.1021/ct500090q>.
- (124) Honorato, R. V.; Koukos, P. I.; Jiménez-García, B.; Tsaregorodtsev, A.; Verlato, M.; Giachetti, A.; Rosato, A.; Bonvin, A. M. J. J. Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 729513. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.729513>.

- (125) van Zundert, G. C. P.; Rodrigues, J. P. G. L. M.; Trellet, M.; Schmitz, C.; Kastiris, P. L.; Karaca, E.; Melquiond, A. S. J.; van Dijk, M.; de Vries, S. J.; Bonvin, A. M. J. J. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428* (4), 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>.
- (126) Hall, G.; Bradshaw, T. D.; Laughton, C. A.; Stevens, M. F.; Emsley, J. Structure of *Mycobacterium Tuberculosis* Thioredoxin in Complex with Quinol Inhibitor PMX464: Thioredoxin Inhibitor Complex. *Protein Sci.* **2011**, *20* (1), 210–215. <https://doi.org/10.1002/pro.533>.
- (127) van den Berg, S.; Löfdahl, P.-Å.; Härd, T.; Berglund, H. Improved Solubility of TEV Protease by Directed Evolution. *J. Biotechnol.* **2006**, *121* (3), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.006>.
- (128) Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th, completely revised and greatly enlarged edition ed.; Wiley-Blackwell: Weinheim, Germany, 2012.
- (129) Antoine, M.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. Kinetic Characterization of the Chemical Steps Involved in the Catalytic Mechanism of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Neisseria Meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (46), 45352–45357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307471200>.
- (130) Petersen, M. T. N.; Jonson, P. H.; Petersen, S. B. Amino Acid Neighbours and Detailed Conformational Analysis of Cysteines in Proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **1999**, *12* (7), 535–548. <https://doi.org/10.1093/protein/12.7.535>.
- (131) Bach, R. D.; Dmitrenko, O.; Thorpe, C. Mechanism of Thiolate–Disulfide Interchange Reactions in Biochemistry. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (1), 12–21. <https://doi.org/10.1021/jo702051f>.
- (132) Mechanism of Protein Stabilization by Disulfide Bridges: Calorimetric Unfolding Studies on Disulfide-Deficient Mutants of the  $\alpha$ -Amylase Inhibitor Tendamistat. *J. Mol. Biol.* **1995**, *254* (3), 481–496. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0632>.
- (133) Zabetakis, D.; Olson, M. A.; Anderson, G. P.; Legler, P. M.; Goldman, E. R. Evaluation of Disulfide Bond Position to Enhance the Thermal Stability of a Highly Stable Single Domain Antibody. *PLoS ONE* **2014**, *9* (12), e115405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115405>.
- (134) Palde, P. B.; Carroll, K. S. A Universal Entropy-Driven Mechanism for Thioredoxin–Target Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (26), 7960–7965. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504376112>.
- (135) Wynne-Jones, W. F. K.; Eyring, H. The Absolute Rate of Reactions in Condensed Phases. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3* (8), 492–502. <https://doi.org/10.1063/1.1749713>.
- (136) Cuevasanta, E.; Zeida, A.; Carballal, S.; Wedmann, R.; Morzan, U. N.; Trujillo, M.; Radi, R.; Estrin, D. A.; Filipovic, M. R.; Alvarez, B. Insights into the Mechanism of the Reaction between Hydrogen Sulfide and Peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *80*, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.017>.
- (137) Hammond, G. S. A Correlation of Reaction Rates. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (2), 334–338. <https://doi.org/10.1021/ja01607a027>.
- (138) Labet, V.; Morell, C.; Toro-Labbé, A.; Grand, A. Is an Elementary Reaction Step Really Elementary? Theoretical Decomposition of Asynchronous Concerted Mechanisms. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (16), 4142. <https://doi.org/10.1039/b924589h>.
- (139) Neves, R. P. P.; Fernandes, P. A.; Varandas, A. J. C.; Ramos, M. J. Benchmarking of Density Functionals for the Accurate Description of Thiol–Disulfide Exchange. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10* (11), 4842–4856. <https://doi.org/10.1021/ct500840f>.
- (140) Mistry, J.; Chuguransky, S.; Williams, L.; Qureshi, M.; Salazar, G. A.; Sonnhammer, E. L. L.; Tosatto, S. C. E.; Paladin, L.; Raj, S.; Richardson, L. J.; Finn, R. D.; Bateman,

- A. Pfam: The Protein Families Database in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.
- (141) Crooks, G. E.; Hon, G.; Chandonia, J.-M.; Brenner, S. E. WebLogo: A Sequence Logo Generator: Figure 1. *Genome Res.* **2004**, *14* (6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>.

## 7. Contribuciones científicas

La presente tesis dio lugar a las siguientes contribuciones en eventos científicos:

1. **Santiago Sastre**, Madia Trujillo, Dario Estrin, Rafael Radi y Ari Zeida. *Studying the catalytic cycle of methionine sulfoxide reductase A from Mycobacterium tuberculosis: a computational focus*. Presentado en formato póster el simposio “Redox Chemistry and Biology of Thiols” realizado en Montevideo, Uruguay, 2019.
2. **Santiago Sastre**, Madia Trujillo, Dario Estrin, Rafael Radi y Ari Zeida. Caracterización computacional del mecanismo catalítico de la metionina sulfóxido reductasa A de *Mycobacterium tuberculosis*. Presentado en formato poster el congreso “II Congreso Nacional de Biociencias 2019” realizado en Montevideo, Uruguay, 2019.
3. **Santiago Sastre**. *Catalytic cycle of methionine sulfoxide reductase A from Mycobacterium tuberculosis: a computational focus on the catalytic mechanism*. Presentado en formato elevator speech, seleccionado para presentación oral en el mismo evento en el congreso “4th Protein Biophysics at the end of the world” realizado en Montevideo, Uruguay, 2019.
4. **Santiago Sastre**, Jonathan Semelak, Bruno Manta, Dario Estrin, Madia Trujillo, Rafael Radi y Ari Zeida. *A comprehensive characterization of the catalytic mechanism from methionine sulfoxide reductase A*. Presentado en formato oral, en el simposio 5° Simposio Argentino de Jóvenes Investigadores en Bioinformática, realizado en forma virtual, en 2020.
5. **Santiago Sastre**, Jonathan Semelak, Bruno Manta, Dario Estrin, Madia Trujillo, Rafael Radi y Ari Zeida. Caracterización teórica del ciclo catalítico de la metionina sulfóxido reductasa A de *Mycobacterium tuberculosis*. Presentado en formato e-poster durante el 7 ENAQUI, realizado en forma semipresencial en Montevideo, Uruguay, 2021.

A su vez, durante la generación de estos estudios de posgrado se realizaron las siguientes publicaciones científicas no vinculados directamente al trabajo de tesis:

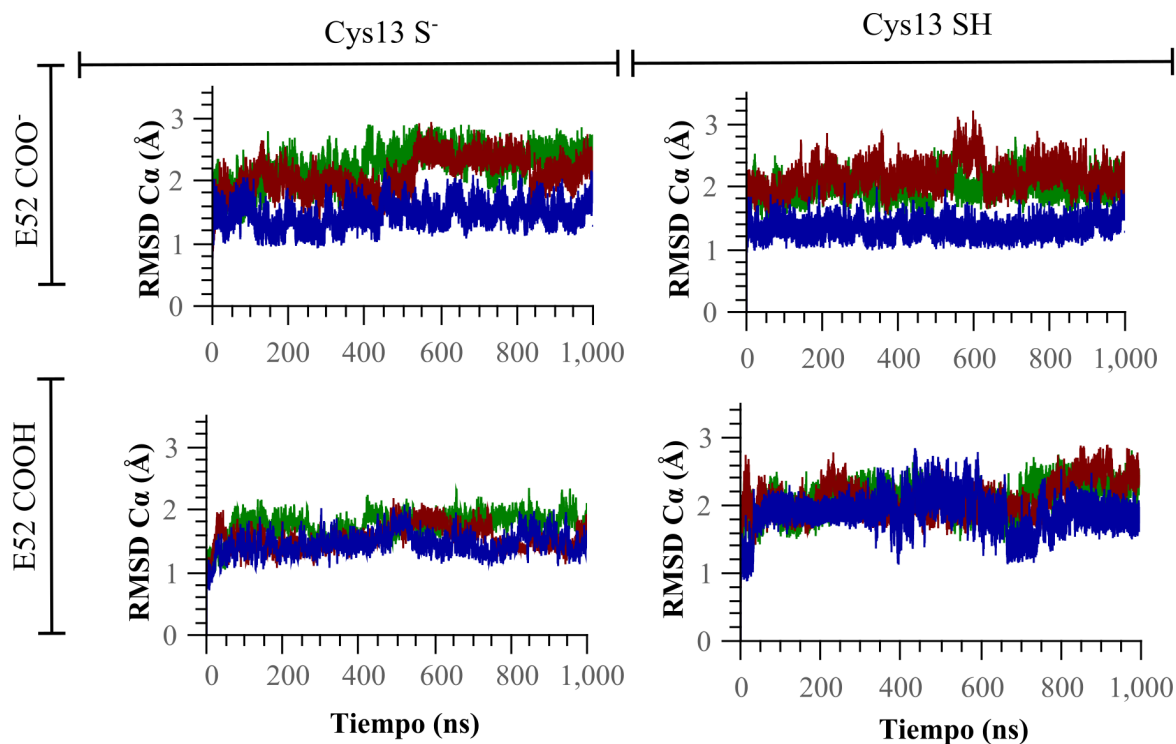
1. Veronica Demicheli, Florencia Tomasina, **Santiago Sastre**, Ari Zeida, Verónica Tórtora, Carlos Batthyány, Analía Lima y Rafael Radi (2021) “*Cardiolipin interactions with cytochrome c increase tyrosine nitration yields and site-specificity*” ABB, 703, 108824.
2. Yunlong Shi, Ari Zeida, Caitling E. Edwards, Michael L. Mallory, **Santiago Sastre**, Matias R. Machado, Raymod J. Pickles, Ling Fu, Keke Liu, Jing Yang, Ralph Baric, Richard C. Boucher, Rafael Radi y Kate S. Carrol (2022) “*Thiol-based chemical probes exhibit antiviral activity against SARS-CoV-2 via allosteric disulfide disruption in the spike glycoprotein*” PNAS, 119, e2120419119.

En ambos trabajos publicados el aporte realizado constó de la elaboración, producción y análisis de los resultados computacionales, así como la realización de figuras.

## Anexo

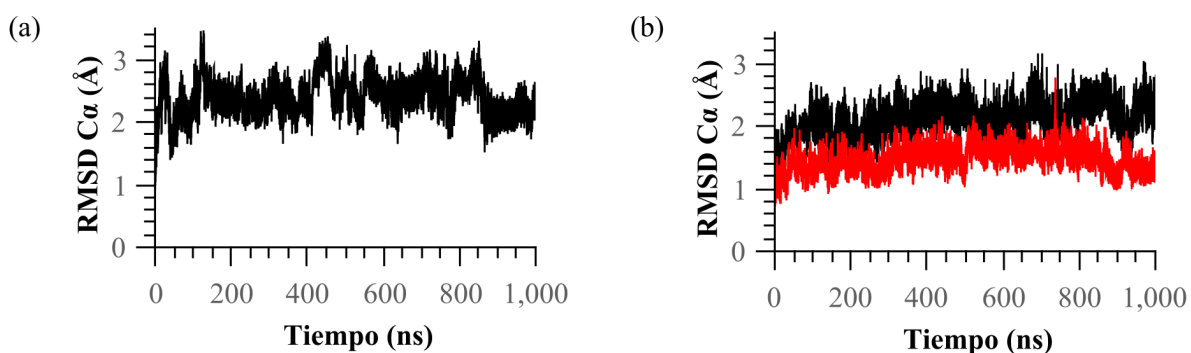
### A1. Análisis de convergencia de las simulaciones de *MtmsrA*

A continuación, se muestran los RMSD de los  $C\alpha$  de todos los sistemas simulados en la Sección 3.1 de la Tesis de Maestría.



**Figura A1.1** RMSD de los  $C\alpha$  de los diferentes complejos enzima:sustrato estudiado. En azul *MtmsrA*, en rojo *MtmsrA*+MetSO y en verde *MtmsrA*+Met.

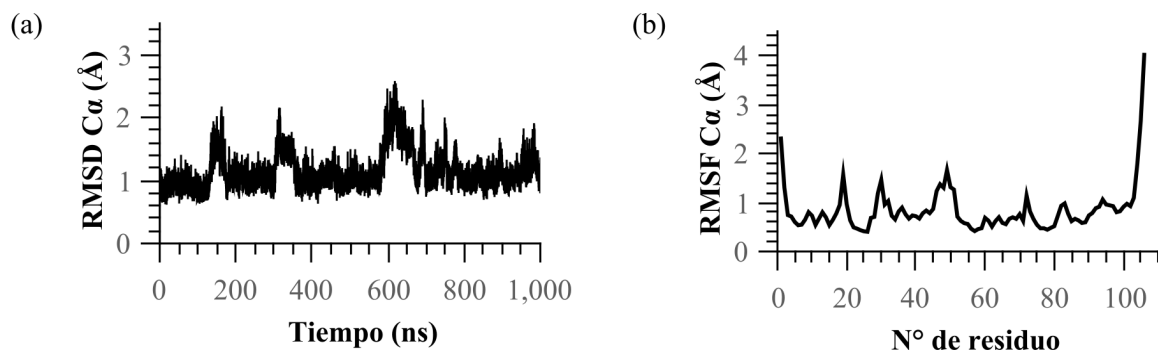
En la siguiente figura, se muestran los RMSD de  $C\alpha$  de los sistemas simulados en la Sección 3.2.



**Figura A1.2** RMSD de los  $C\alpha$  de los diferentes intermediarios estudiados, (a) Catión sulfonio y (b) sulfénico con el Glu52<sup>COO-</sup> (curva negra) o Glu52<sup>COOH</sup> (curva roja).

## A2. Caracterización estructural y dinámica de *MttrxC*

A continuación, se muestran los RMSD y el RMSF de los  $C\alpha$  del sistema *MttrxC*, en orden de caracterizar la estabilidad del sistema e identificar las regiones de mayor movilidad.



**Figura A2.1** RMSD (a) y RMSF (b) de los  $C\alpha$  del sistema *MttrxC*.

A continuación, se muestra el análisis de cluster realizado sobre la dinámica:

**Tabla 2.1** Análisis de clusters según RMSD de  $C\alpha$  de *MttrxC*

Cluster	1	2	3	4	5
Fracción	0.802	0.069	0.066	0.036	0.027
RMSD	1.142	1.322	1.393	1.296	1.352