



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POSIBLES SITIOS DE DESPROTONACIÓN DE
SUSTRATOS EN LA ENZIMA MONOAMINO OXIDASA A

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E
INGENIERA CIVIL QUÍMICA

PILAR ANDREA FERNÁNDEZ CHICAGO

PROFESOR GUÍA:
J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
GERALD ZAPATA TORRES
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por Proyecto FONDECYT N° 1120280
“Searching for possible deprotonation sites for substrates and inhibitors of human MAO-A”

SANTIAGO DE CHILE
2014

RESUMEN DE LA MEMORIA
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
E INGENIERA CIVIL QUÍMICA
POR: PILAR ANDREA FERNÁNDEZ CHICAGO
FECHA: 2014
PROF. GUÍA: J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POSIBLES SITIOS DE DESPROTONACIÓN DE SUSTRATOS EN LA ENZIMA MONOAMINO OXIDASA A

La enzima Monoamino oxidasa A (MAO-A) participa en las vías de degradación de diferentes neurotransmisores, entre ellos la serotonina, razón por la cual es punto de interés de investigadores para el desarrollo de antidepresivos inhibidores de la enzima. Estos comenzaron a desarrollarse en la década del 60, sin embargo paulatinamente se dejaron de utilizar debido a sus efectos secundarios, generados por el poco conocimiento específico que se tenía sobre la relación enzima/sustrato.

En este estudio se realiza una búsqueda en la estructura de la MAO-A para encontrar posibles sitios donde podría ocurrir la desprotonación del sustrato, paso previo necesario para que pueda desarrollarse la catálisis de la enzima. Para esto se pretende identificar y caracterizar el campo electrostático de la proteína y el carácter ácido/base de los aminoácidos, para luego determinar en la estructura los posibles sitios de desprotonación y caracterizarlos.

Así, se estudiaron las interacciones electrostáticas a partir de una dinámica molecular convencional de 10[ns], con el fin de definir la capacidad de desprotonación de cada aminoácido. Los factores que se consideraron fueron el valor del pKa de cada residuo y el campo electrostático de la proteína completa.

En base a esto se cree que el sitio de desprotonación está en la superficie de la enzima y no en la cavidad del sitio activo, ya que éste es en su mayoría hidrofóbico. Además este sitio estaría en la cara frontal de la proteína, ya que la cara reversa posee un campo electrostático positivo muy alto que repelería al grupo amino protonado del sustrato.

En particular, se encontraron dos zonas donde podría ocurrir la desprotonación del sustrato: en el aminoácido ARG-79, que se encuentra relativamente cerca de la región reportada como la entrada al sitio activo y posee una capacidad de desprotonación estable (desviación estándar = 0.5) y alta ($pK_{a_{mx}} = 17$); o los residuos LYS-90 y ARG-109, que se encuentran en el área reportada como entrada y por ello deberían interactúan directamente con el sustrato cuando éste ingresara al canal. El siguiente paso en esta línea de investigación es validar estos resultados en laboratorio mediante mutagénesis dirigida.

El desarrollo de este trabajo da pie a una línea de investigación que permita reunir el conocimiento químico y biológico de la interacción enzima/sustrato de la proteína MAO-A. Estos resultados se podrían aplicar en la modificación de la vía de degradación de la serotonina, por medio de fármacos que interfieran en su relación con la enzima MAO-A, desarrollando así antidepresivos específicos para este sustrato.

*A toda la gente
que puso un granito de arena,
o tuvo un buen deseo,
para este trabajo.*

Agradecimientos

A mi familia, en especial a mis abuelos y tios, por siempre darme su apoyo, por reirse conmigo y quitarle el peso a las situaciones complicadas.

A mis papas, por estar siempre conmigo, por enseñarme que la universidad es una fuente de aprendizaje que hay que aprovechar y no una carrera por salir rápido, por darme la oportunidad de que fuera así, por enseñarme a valorar la responsabilidad y el trabajo bien hecho, por entregarme todo lo necesario para que mi prioridad fuera estudiar, y por recordarme que también es necesario descansar y que siempre se puede volver a intentar.

A mi hermano, porque en esos bajoneos/llantos post-controles mechones sangrientos me subió el ánimo y me recordó que una nota no es todo.

A Pablo, por ser mi compañero desde que comenzamos la universidad, por compartir conmigo sus metas y sueños, por estar en las celebraciones y en las caidas, por ser mi coaching personal y por aterrizarme en los momentos de caos. Te amo y espero que pasemos juntos, lado a lado, todo lo que se venga este año.

A mis amigos “de primero año”, en especial a la Vivi, al Stefano y al Hernan, por acompañarme en esos días/tardes/noches de estudio. A mis amigos de la carrera: la Made, la Clau, Moises, la Maca, la Feña, Huepe y el Daniel, por estar como 4 años riendonos o despotricando por los trabajos/cursos industriales/profes/controles, y por los almuerzos, salidas, celebraciones, cumpleaños y momentos lindos que estuvimos juntos; en especial a Waldo, por ser mi compañero de puesto estos años de memoria, por darme su tiempo y consejo, y por escuchar y reirse de mis locuras. A las chicas superpoderosas, la Sandy y la Naty, por las risas, los consejos, las conversaciones y los happy hour. Los quiero mucho :)

A mis profes guía, co-guía y de comisión, por dar de su parte para que todo fuera más expedito en éste último período. En especial al profesor Gerald y al profesor Cristian, que confiaron en mi y me guiaron para que este trabajo llegara a su fin. Y también a Gina, por tener la paciencia para arreglar todos los asuntos administrativos y ayudarme para que pudieran terminar luego.

Creo que me falta mucha más gente que no tuvo una influencia tan directa en este momento, pero que de todas formas me han ayudado a estar aquí. Así que también un agradecimiento a todos ellos, los quiero mucho y los recuerdo.

Tabla de contenido

Índice de tablas	vii
Índice de ilustraciones	viii
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes Generales	1
1.2. Descripción del proyecto	3
1.3. Motivación y justificación del proyecto	3
2. Objetivos y Limitaciones	4
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos Específicos	4
2.3. Limitaciones	4
3. Antecedentes	6
3.1. Sobre la enzima MAO-A	6
3.2. Estructura de la enzima	8
3.3. Dinámica Molecular	10
3.3.1. Campo de Fuerza	11
3.3.2. Representación de moléculas de agua	11
3.4. Conceptos básicos sobre pKa	12
3.5. Protonación y desprotonación del Sustrato	13
4. Metodología	15
4.1. Materiales y equipo utilizado	15
4.2. Procedimiento	15
4.2.1. Análisis de Velocidades de Simulación	15
4.2.2. Reconocimiento de molécula FAD	16
4.2.3. Preparación previa	17
4.2.4. Dinámica molecular	17
4.2.4.1. Campo de fuerza	17
4.2.4.2. Dinámica Molecular Convencional	18
4.2.4.3. Etapas generales de simulación	19
4.2.4.4. Sobre esta simulación	20
4.2.5. Tratamiento de datos	21
5. Resultados	24

5.1. Optimización de parámetros de simulación	24
5.2. Dinámica Molecular de la proteína MAO-A	25
5.3. Caracter ácido/base y pKa de los aminoácidos	27
5.3.1. Estabilidad del carácter ácido/base	27
5.3.2. Comparación pre y post simulación	29
5.3.3. Aminoácidos con pKa relevante	30
5.3.3.1. Superficie	32
5.3.3.2. Canal de acceso a sitio activo	35
5.4. Campo electrostático de la proteína	36
6. Discusión	41
6.1. Velocidades de simulación	41
6.2. Simulación Molecular	42
6.3. Caracter ácido/base	44
6.3.1. Estabilidad	44
6.3.2. Comparación pre y post simulación	46
6.3.3. pKa relevante	46
6.4. Campo electrostático	48
6.5. Posibles sitios de desprotonación del sustrato	50
6.6. Trabajo realizado, futuro y enfoque del proyecto	51
7. Conclusiones	53
7.1. Recomendaciones	54
Bibliografía	56
A. Secuencia aminoacídica de enzima MAO-A	64
B. Modificación de Histidinas, Asparaginas y Glutaminas de acuerdo a resultados del servidor H++	65
C. Parámetros de simulación	67
D. Otras características de la simulación molecular	71
E. pKa promedio durante la simulación	74
F. Influencia del entorno en el pKa calculado por propKa	78
G. Detalle de los aminoácidos con pKa mayor al pKa de la serotonina	81
H. Intensidad de restricción en la estructura intermembrana	83

Índice de tablas

3.1. pKa de algunos sustratos de enzima MAO-A	13
5.1. Velocidad de simulación.	25
5.2. Variaciones máximas de pKa.	28
5.3. Aminoácidos que no mantienen permanentemente un pKa mayor al del sustrato	31
5.4. Aminoácidos que conforman la cavidad de paso al sitio activo.	35
5.5. Valores de pKa en canal de acceso al sitio activo.	35
A.1. Simbología de aminoácidos.	64
B.1. Protonación de Histidinas.	65
B.2. ASN y GLN modificados.	66
C.1. Parámetros utilizados en simulaciones de enzima MAO-A.	67
C.2. Parámetros utilizados en simulaciones de enzima MAO-A. Continuación	68
E.1. pKa promedio de cada aminoácido y su desviación estándar.	74
E.2. pKa promedio de cada aminoácido y su desviación estándar. (Continuación 2/4)	75
E.3. pKa promedio de cada aminoácido y su desviación estándar. (Continuación 3/4)	76
E.4. pKa promedio de cada aminoácido y su desviación estándar. (Continuación 4/4)	77
F1. Influencia del entorno en cada aminoácido - Aspartatos	78
F2. Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas	79
F3. Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas (Continuación 2/5)	79
F4. Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas (Continuación 3/5)	79
F5. Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas (Continuación 4/5)	80
F6. Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas (Continuación 5/5) y Lisina	80
G.1. Aminoácidos y su pKa máximo	81
G.2. Aminoácidos y su pKa máximo (Continuación)	82

Índice de ilustraciones

1.1. IMAO Iproniazid	2
3.1. Ciclo catalítico de la enzima.	7
3.2. Mecanismo de oxidación por ataque nucleofílico	7
3.3. Mecanismo de oxidación por traspaso de un solo electrón	8
3.4. Mecanismo de oxidación por transferencia de ion hidruro	8
3.5. Estructura de la enzima MAO-A y sus tres dominios.	9
3.6. Sobreposición de los sitios activos de hMAO-A, rMAO-A y hMAO-B.	10
3.7. Esquema de desprotonación en serotonina	14
4.1. Celda octaédrica rodeando a molécula en estudio	19
4.2. Etapas de una Dinámica Molecular.	19
4.3. Esquema del flujo de tratamiento de los datos	22
5.1. Velocidades de simulación con programas <i>sander</i> y <i>pmemd</i>	24
5.2. Estructura de proteína antes y después de la simulación	25
5.3. Perfil de RMSd de la simulación	26
5.4. Radio de giro de la proteína durante la simulación	26
5.5. Frecuencia de variaciones significativas en el pKa de los aminoácidos en el tiempo	27
5.6. Entorno de LYS-218	29
5.7. Comparación de pKa entre aminoácidos pre-simulación y durante simulación . .	30
5.8. Superficie molecular con aminoácidos de pKa mayor al de la serotonina - Frente	32
5.9. Superficie molecular con aminoácidos de pKa mayor al de la serotonina - Frente	33
5.10. Aminoácidos en la entrada hacia el sitio activo	34
5.11. Posición estructural de aminoácidos en cavidad	36
5.12. Campo electrostático de la proteína - Frente	37
5.13. Campo electrostático de la proteína - Reverso	38
5.14. Campo electrostático en el sitio activo durante la simulación	39
6.1. Disposición estructural de la cadena de anclaje a membrana.	43
6.2. Átomos importantes en las interacciones de LYS-218	45
D.1. Perfil de energías potencial, cinética y total durante la simulación.	71
D.2. Perfil de temperatura de la trayectoria.	72
D.3. Perfil del volumen presentado durante la simulación.	72
D.4. Perfil de la presión presentada en la trayectoria.	73
D.5. Perfil de la densidad presentada durante la simulación.	73

H.1. RMSd de la restricción en región de anclaje a membrana.	83
--	----

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes Generales

La enzima Monoamino oxidasa A (MAO-A) participa en el proceso de degradación de diferentes aminas presentes en el organismo, por lo que esta proteína se puede encontrar principalmente en el intestino, el hígado, en el tejido reproductivo y en el sistema nervioso central. Sustratos reconocidos de esta enzima son la tiramina, la triptamina y diversos neurotransmisores como la noradrenalina, la dopamina, la adrenalina y la serotonina. [1, 2]

Estos neurotransmisores, y en particular la serotonina, poseen una fuerte influencia en el comportamiento de los seres vivos, llegando a observarse conductas agresivas y peligrosas en individuos que poseen una alta concentración de estos [3–5], y depresión severa frente a concentraciones bajas [6, 7].

En particular, la depresión se puede desarrollar por diferentes factores como mantener una vida de alto estrés, tener antecedentes hereditarios o como un efecto secundario de alguna droga. [8] Sin embargo todas estas razones están relacionadas neurológicamente con variaciones en la concentración disponible de serotonina para señalización durante la sinápsis entre células, la cual se puede regular impidiendo su recaptación o actuando en sus vías metabólicas de degradación. [9] En este último punto, es donde influye la acción de la actividad catalítica de la MAO-A, la que de hecho ha sido relacionada con el desarrollo de depresión severa y depresión post parto. [7, 10]

Debido a esto, en la década de los 50's y principios de los 60's se identificaron los primeros antidepresivos que actuaban inhibiendo la proteína MAO-A. [11] Estos eran derivados de la molécula hidracina (Ver Figura 1.1), irreversibles y actuaban también en la isoforma de esta enzima, la proteína Monoamino Oxidasa B (MAO-B) (relacionada con la enfermedad de Parkinson [12]). [1]

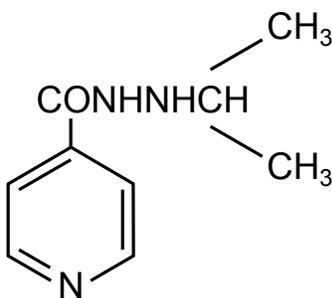


Figura 1.1: Inhibidor de Monoamino Oxidasa (IMAO) Iproniazid. Forma parte de los primeros antidepresivos aplicados. En un principio se desarrolló como fármaco para tratar la tuberculosis y luego de notar su efecto en el comportamiento de los paciente se consideró como tratamiento para la depresión. [11]

El uso masivo de estos antidepresivos demostró que generaban graves efectos colaterales, como crisis hipertensivas e intoxicación hepática, siendo esta última asociada a las moléculas derivadas de la hidracina, por lo que se continuó con el desarrollo de otro tipo de antidepresivos, como la tranilcipromina y la pargilina. Sin embargo, estos seguían siendo inhibidores irreversibles y por lo tanto provocaban crisis hipertensivas en los pacientes tratados debido a la incapacidad del cuerpo de degradar la tiramina presente en una gran cantidad de alimentos como el queso y la carne (gracias a la inhibición de la MAO-A en el intestino), generándose el llamado “Efecto Queso”. [1, 13]

Por estas razones el uso de antidepresivos inhibidores de la proteína MAO-A fue paulatinamente discontinuado, aunque se observara que los efectos adversos disminuyeran cuando se utilizaban inhibidores reversibles (como la moclobemida) y a comienzos de la primera década de este siglo se reconocieran IMAO's de acción selectiva en el cerebro. [1, 14] Así, en la actualidad sólo se utilizan estos medicamentos en el caso de que otros tipos de tratamiento (como los Inhibidores Selectivos de Recaptación de Serotonina, los Inhibidores de Recaptación de Serotonina y Norepinefrina y los tricíclicos) no den resultado en los pacientes. [12, 15]

Frente a esta situación es llamativa la necesidad de conocer, en mayor profundidad y de manera puntual, la forma de interactuar que presenta la MAO-A con sus sustratos e inhibidores. Siguiendo esta línea de estudios, posiblemente se podrían identificar interacciones selectivas entre las especies frente a distintos contextos y con ello poder desarrollar medicamentos que involucren una menor cantidad de moléculas ajenas a las enfermedades.

Una tipo de estudio puntual, es el fenómeno de la desprotonación de los sustratos de la MAO-A, donde se ha visto que es necesario un estado neutro en los neurotransmisores sustratos de la enzima, para que esta catalice la degradación de estos. Sin embargo, como se explica en detalle en el siguiente capítulo, se sabe que los neurotransmisores se encuentran en estado protonado a pH fisiológico, por lo que su desprotonación debe ocurrir previo a la catálisis en el sitio activo, en alguna zona de la enzima cuya localización no es conocida y su identificación es el objetivo de estudio en este proyecto.

1.2. Descripción del proyecto

A lo largo de este trabajo se realizó un estudio sobre las características electrostáticas de la proteína MAO-A, para identificar sitios en su estructura donde exista mayor posibilidad de que ocurra una desprotonación de los neurotransmisores.

Esto incluye desde un estudio del campo electrostático entorno a la molécula, a un análisis de la capacidad que tiene cada aminoácido para captar protones, teniendo especial interés en la región superficial de la enzima y en la cavidad reportada como entrada hacia el sitio activo.

Para ello primero se realizó una dinámica molecular convencional con solvente explícito de 10[ns] utilizando en la proteína los estados de protonación correspondientes a pH 7.5. Luego, en base a las diferentes conformaciones adoptadas por las cadenas laterales de los aminoácidos y las interacciones que estos presentaban con el entorno, se calculó el pKa de cada residuo durante toda la simulación, para conocer la capacidad que tendrían estos para captar protones externos.

Por otro lado, también en base a las conformaciones e interacciones dadas entre los aminoácidos de la proteína en la simulación, se analizó el campo electrostático de la molécula, observándose la distribución de carga que presentaba su estructura y los cambios de esta que se podían apreciar durante la trayectoria.

Finalmente, gran parte del análisis de este estudio se desarrolló aplicando programas diseñados para leer, reconocer y extraer la información requerida desde una gran concentración de datos recopilados, planteando los resultados en formas fáciles de leer y observar.

1.3. Motivación y justificación del proyecto

Con la realización de este trabajo se amplía el conocimiento a nivel atómico que se posee sobre las interacciones que presenta la proteína MAO-A con sus sustratos, aportando por un lado al desarrollo de fármacos antidepresivos que involucren las vías metabólicas de degradación de la serotonina, y por otro, para continuar con la búsqueda de medicamentos que actúen selectivamente, en el tejido correspondiente y afectando sólo a las moléculas involucradas con la enfermedad. De esta forma se ayuda a la generación de antidepresivos que no signifiquen un daño mayor para los pacientes debido a sus efectos secundarios.

Además, los resultados de este trabajo teórico permiten facilitar el estudio experimental de éste fenómeno, indicándose las características que debería presentar la proteína y cuáles aminoácidos deberían considerarse primero al momento de realizar la investigación, evitándose el gasto de tiempo y recursos en el análisis de residuos seleccionados al azar.

Capítulo 2

Objetivos y Limitaciones

2.1. Objetivo General

Identificar, mediante técnicas de modelación y simulación de dinámica molecular, posibles sitios de desprotonación del sustrato en la estructura de la enzima Monoamino oxidasa A.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar las características ácido/base de los aminoácidos superficiales de la enzima.
- Investigar el carácter electrostático en la superficie de la enzima.
- Investigar las características de sus cavidades.
- Determinar posibles sitios de desprotonación en la enzima Monoamino oxidasa A.
- Caracterizar los posibles sitios de desprotonación encontrados.

2.3. Limitaciones

La proteína es simulada en una celda de agua con carga neutralizada y protonada a pH 7.5. No hay otros componentes o iones extra que podrían permanecer cerca en el entorno celular real.

En las células, ésta enzima se encuentra inserta en una membrana fosfolipídica. En esta simulación se realizó una restricción de movimiento a la región C-Terminal de la proteína para simular este efecto, lo cual no incluye todas las interacciones que podría efecuarle entre ambas estructuras.

Para realizar este estudio, se utilizaron sólo herramientas de simulación computacional, específicamente dinámica molecular y análisis electrostático tanto global (campo electrostático

de toda la proteína) como puntual (pKa de cada aminoácido). No se incluyen estudios en laboratorio ni análisis cinético, por lo que en futuros trabajos se debe validar los resultados obtenidos por otro método.

Capítulo 3

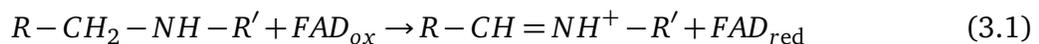
Antecedentes

3.1. Sobre la enzima MAO-A

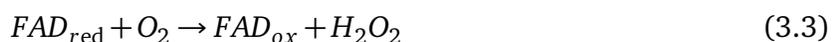
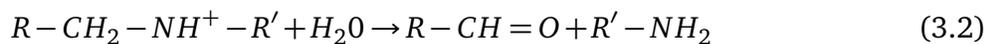
La enzima Monoamino oxidasa A pertenece a la familia de las flavoenzimas aminooxidasas, reconocidas por tener una molécula flavina como cofactor, y posee una isoforma conocida como la Monoamino oxidasa B (MAO-B). Ambas son codificadas en el núcleo celular desde el cromosoma X, aunque actúan ancladas en la membrana externa de la mitocondria [16–18].

Estas isoformas presentan diferente selectividad frente a algunos sustratos e inhibidores, observándose que la setoronina y la clorgilina son específicos de la MAO-A, mientras que la bencilamina y el deprenil son específicos de la enzima MAO-B [1]. Además, se ha reportado que estas enzimas se encuentran en diferente proporción en el organismo, viéndose por ejemplo una presencia predominante de MAO-A en el intestino [13], y se asocian a diferentes enfermedades como la depresión en el caso de la MAO-A y el Parkinson en el de la MAO-B [12].

Específicamente la función que realizan ambas MAO es oxidar el grupo amino de sus sustratos (por ejemplo serotonina en el caso de la MAO-A), obteniéndose la reducción del cofactor de la enzima y una imina protonada (Ec. 3.1) [16, 19].



Luego, esta imina se hidroliza de forma independiente a la catálisis de la enzima, obteniéndose un aldehído y una amina primaria (generalmente amoníaco), como se muestra en la Ec. 3.2. Mientras, la enzima vuelve a su estado inicial para oxidar a otra molécula sustrato liberando peróxido de hidrógeno en el proceso (Ec. 3.3) [16, 19].



El ciclo catalítico de la enzima MAO-A se presenta en la siguiente figura:

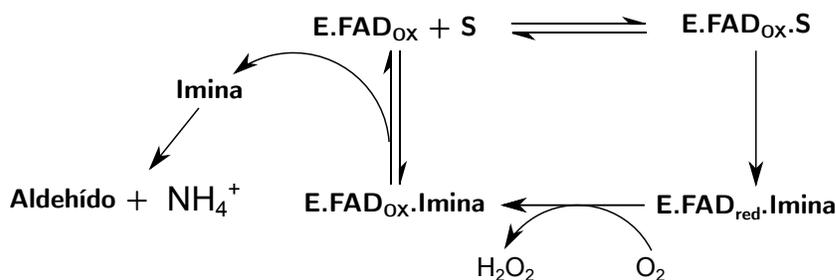


Figura 3.1: Ciclo catalítico de la enzima. [20]

Por otro lado, se han postulado tres mecanismos par describir la forma en que ocurre la catálisis. Todos ellos plantean que la oxidación ocurre rompiendo el enlace C-H del $C\alpha$ del sustrato, sin embargo difieren en la razón de porque ocurre. Estos son: [19, 20]

Ataque Polar Nucleofílico [19] El cual plantea que la oxidación comienza con un ataque nucleofílico desde el grupo amino del sustrato al carbono 4 del cofactor FAD.

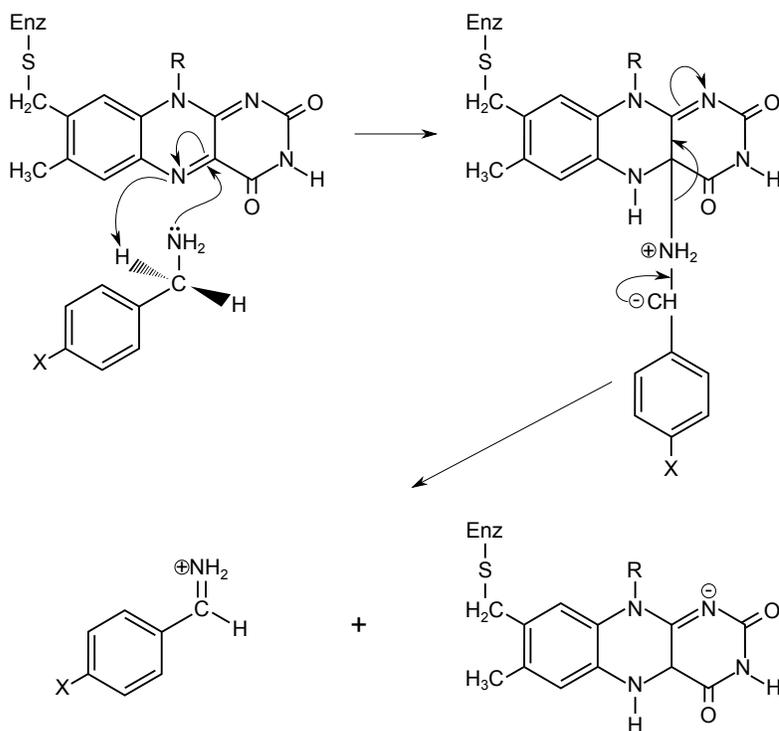


Figura 3.2: Mecanismo de oxidación por ataque nucleofílico [19]

Transferencia de un solo electrón [21] Que plantea que el comienzo de la catálisis ocurre por el traspaso de un sólo electrón del grupo amino del sustrato a la flavina.

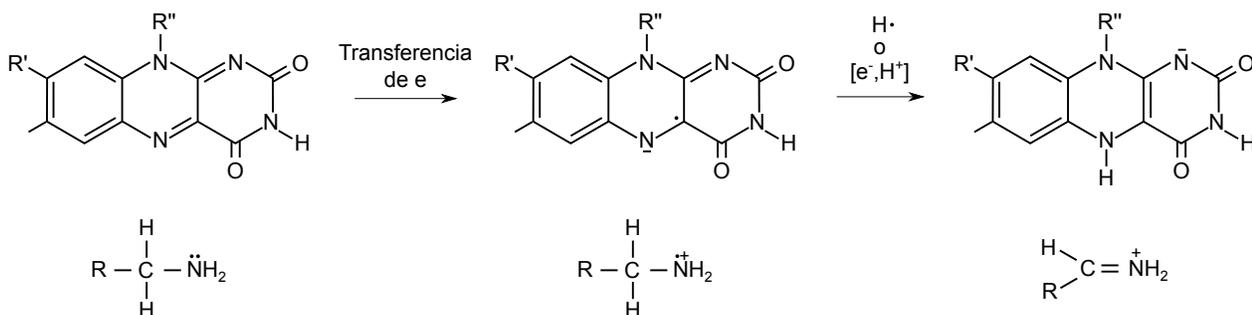


Figura 3.3: Mecanismo de oxidación por traspaso de un solo electrón [21]

Transferencia de ion hidruro Planteado de forma generalizada para flavoenzimas en [22] y de forma específica para MAO en [23], proponiendo que se genera el traspaso directo del hidrógeno del C α a la flavina como un ion hidruro.

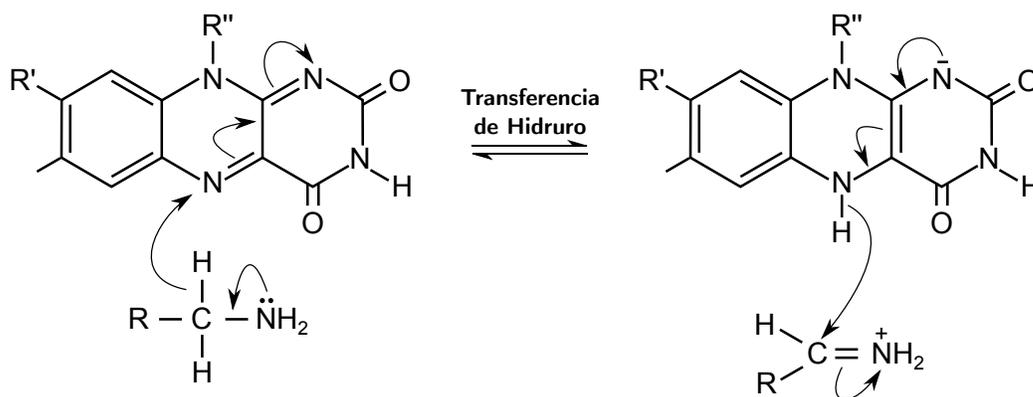


Figura 3.4: Mecanismo de oxidación por transferencia de ion hidruro [23]

Como se puede observar, todas ellas comienzan con un sustrato de grupo amino desprotonado y se obtiene una imina protonada más el cofactor en el mismo estado inicial.

3.2. Estructura de la enzima

Esta enzima está conformada por 527 aminoácidos (Ver secuencia en Apéndice A), los cuales se pliegan en tres regiones diferentes: un dominio de unión al cofactor FAD, un dominio de unión al sustrato y una región de anclaje a la membrana de la mitocondria (Ver Figura 3.5) [24].

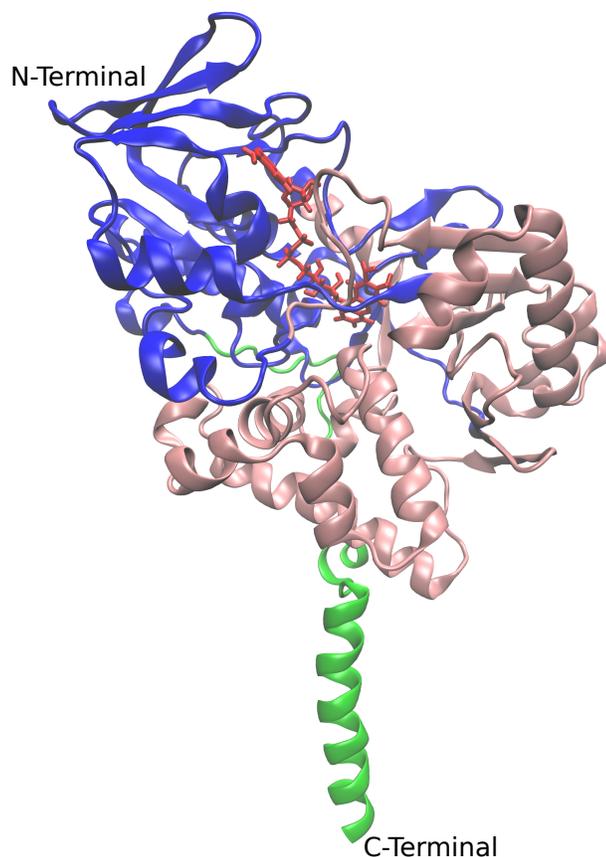


Figura 3.5: Estructura de la enzima MAO-A y sus tres dominios. **Azul:** Dominio de unión al cofactor, **Rosado:** Dominio de unión al sustrato, **Verde:** Dominio de anclaje a membrana, **Rojo:** Cofactor FAD.

El cofactor de la enzima MAO-A humana (hMAO-A) se encuentra enlazado covalentemente con su dominio unión, en Cys-406. [25] Se ha visto que este junto con otras dos tirosinas, Tyr-407 y Tyr-444, conforman un “sandwich aromático” que ayuda a la estabilización del sustrato en la cavidad catalítica [24, 25].

Se han realizado diferentes estudios comparado la estructura de la enzima MAO-A humana (hMAO-A), con las estructuras de la MAO-A de rata (rMAO-A) y la MAO-B humana (hMAO-B). [24, 26, 27] En estos se ha observado que las enzimas hMAO-A y hMAO-B poseen un 70% de identidad aminoacídica, mientras que entre las enzimas hMAO-A y rMAO-A existe más de un 80% de similitud [26].

Además se ha reportado que la estructura de la enzima hMAO-A cristaliza como un monómero, a diferencia de las enzimas hMAO-B y rMAO-A que cristalizan como dímeros. [24] Se ha planteado que una de las razones de esta diferencia es el aminoácido LYS-151 de la enzima hMAO-A, ya que que en las MAO-A's de otras especies es un ácido glutámico. El residuo GLU-151 intervendría en la región de interacción del dímico estabilizando su estructura, mientras que LYS-151 ayudaría a repeler esta conformación [24, 27].

Por otro lado se han reconocido los aminoácidos que componen la cavidad del sitio activo de la enzima hMAO-A. Estos son: TYR-69, LEU-97, PHE-108, ILE-180, ASN-181, ILE-207, PHE-208, VAL-210, GLN-215, CYS-323, ILE-325, ILE-335, LEU-337, PHE-352, TYR-407 y TYR-444. Comparando esta cavidad con los sitios activos de las enzimas rMAO-A y hMAO-B se reconoció que todos los aminoácidos se conservan en la proteína rMAO-A y sólo 4 residuos varían entre las isoformas MAO-A y MAO-B. Además el RMSd observado entre las cavidades de hMAO-A/hMAO-B fue de 0.545[Å], mientras que el presentado por las cavidades de hMAO-A/rMAO-A fue de 0.612[Å]. La imagen comparativa que presenta Son *et al.* en este estudio se muestra en la Figura 3.6 [26].

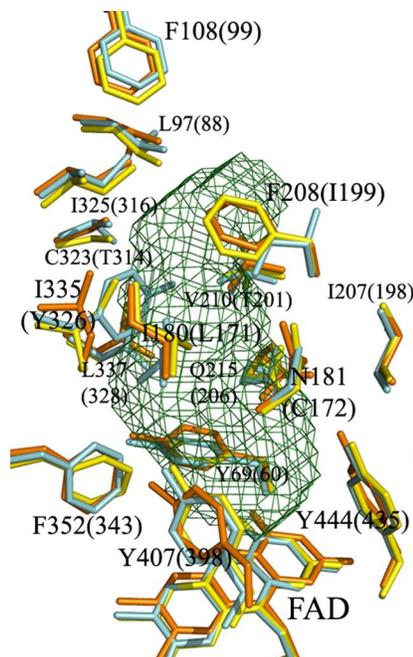


Figura 3.6: Vista de la sobreposición de las cavidades de los sitios activos de hMAO-A, rMAO-A y hMAO-B. [26] Esta imagen pertenece al estudio realizado por Son *et al.* La numeración de los residuos está hecha de acuerdo a la posición de los aminoácidos en la enzima hMAO-A (y rMAO-A), mientras que la numeración en hMAO-B está entre paréntesis. En **Amarillo**, residuos de hMAO-A; en **Naranja**, residuos de rMAO-A; en **Cyan**, residuos de hMAO-B; y en **Verde**, superficie de la cavidad en MAO-A.

El sitio catalítico de la enzima MAO-A se encuentra en su interior junto al cofactor FAD, por lo que el sustrato debe ingresar por un canal para poder ser oxidado. Se ha reportado que esta entrada está dada por 3 grupos de aminoácidos: 92-95, 109-112 y 208-212 [26].

3.3. Dinámica Molecular

Existen diferentes métodos para representar computacionalmente la configuración electrónica, la conformación y el movimiento a nivel atómico que presenta una biomolécula. Entre ellos se destacan por ejemplo las técnicas AB initio o semi-empíricas pertenecientes a la química

ca cuántica, que debido a su exactitud y alta complejidad en el cálculo sólo se pueden aplicar a una pequeña cantidad (cientos) de átomos.

Por otro lado, la química clásica realiza estos estudios utilizando aproximaciones que no incluyen cálculos como el desarrollo de funciones de onda, disminuyendo su complejidad. Esto permite trabajar con proteínas de miles de átomos usando incluso ambientes de solvente explícito, agregando en las simulaciones el efecto a nivel atómico de las moléculas de solvente que se encontrarían alrededor de la proteína en estudio.

En particular, la dinámica molecular es una técnica de la química clásica, que define la energía total como una ecuación algebraica simple que utiliza parámetros empíricos como aproximación y modela a las moléculas y sus átomos como esferas conectadas por resortes [28]. Su aplicación se ha planteado desde los años 70 hasta la actualidad, donde se ha utilizado exitosamente para poder representar y estudiar la relación entre la estructura y la dinámica de las biomoléculas (incluso en proteínas de membrana), que no serían fáciles de observar en laboratorio [29–31].

3.3.1. Campo de Fuerza

Específicamente, la dinámica molecular calcula la trayectoria de una molécula resolviendo numéricamente ecuaciones de movimiento para cada átomo presente. La influencia de las interacciones entre los átomos se plantea como un *Campo de Fuerza*, que consiste en la unión de funciones de energía potencial junto con parámetros encontrados empíricamente [32].

3.3.2. Representación de moléculas de agua

Desde los años 70, donde se comenzó a simular agua líquida con dinámica molecular, se han desarrollado una gran variedad de modelos de esta molécula con el fin de representar computacionalmente sus propiedades y utilizarla como solvente en los estudios de proteínas y ácidos nucleicos [33].

Actualmente, la mayor parte de los modelos pueden dividirse entre los de estructura rígida, en que los enlaces y los ángulos se encuentran fijos y por lo tanto no hay estiramiento entre los enlaces o variación angular (TIP3P, SPC, TIP4P [34]); y los de estructura flexible (SPC/F [35]), en los que se liberó alguna de estas interacciones o se realizó una función potencial intramolecular exclusiva para parametrizar completamente este fenómeno. Esta flexibilización permitió representar de mejor manera situaciones especiales como el cambio de estado entre vapor y agua líquida, sin embargo en algunos modelos también significó que en las simulaciones de agua en estado líquido ésta presentara una modificación importante de su ángulo molecular, lo que derivaba en un aumento de su momento dipolar, distinto a lo observado experimentalmente [36].

A pesar de su simplicidad, los modelos de agua más utilizados para dinámicas moleculares son TIP3P, SPC y TIP4P, por lo que los distintos programas de simulación han adaptado sus

campos de fuerza a estos modelos. Los dos primeros consisten en una distribución de cargas en 3 puntos de interacción en el núcleo, dos positivas y una negativa, con las que se realizan las interacciones electrostáticas, y un punto de interacción sólo entre oxígenos para el potencial Lennard–Jones (interacciones de van der Waals, ver sección Sección 4.2.4.1); y el último modelo, desplaza la carga negativa del oxígeno a un punto intermedio para mejorar las propiedades y la estructura del agua líquida en simulación [33,36].

3.4. Conceptos básicos sobre pKa

El pKa es una forma de representar la capacidad que posee un ácido de donar un protón. El fenómeno químico está dado por la ecuación:



En que:

HA	Ácido
H ₂ O	Solvente
H ₃ O ⁺	Ion hidronio
A ⁻	Base conjugada

Asumiendo que la cantidad de agua es mucho mayor a las otras especies, se obtiene la constante de equilibrio o disociación de esta ecuación, K_a , que está dada por:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (3.5)$$

A partir de esto se puede obtener la concentración de protones liberados en la solución:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \Rightarrow [H_3O^+] = K_a \cdot \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (3.6)$$

Y hablando en términos de pH se tiene:

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad (3.7)$$

En esta relación se ve que el pKa equivale a un pH al que las concentraciones de ácido protonado y base conjugada son iguales. Es decir, a otros pH se mantiene un equilibrio entre las dos especies (protonada y desprotonada) en que existe una mayor proporción de una u otra molécula.

Además, también se puede entender que comparando dos moléculas con diferente pK_a pK_{a_1} y pK_{a_2} , en que $pK_{a_1} < pK_{a_2}$, a un mismo pH la segunda molécula tendrá una mayor tendencia a captar protones que la primera, o dicho de otra forma, la primera molécula tendrá una mayor tendencia a ceder protones.

3.5. Protonación y desprotonación del Sustrato

Se sabe que varios neurotransmisores sustratos de la proteína MAO-A presentan un pK_a de características básicas (ver Tabla 3.1), por lo que frente a pH fisiológico estos sustratos se deben encontrar mayormente protonados. Sin embargo, los mecanismos de catálisis propuestos para la oxidación de estas moléculas requieren que el sustrato se encuentre desprotonado [19, 21, 23], lo cual se ha visto reflejado en estudios de actividad enzimática frente a variaciones de pH [20].

Tabla 3.1: pK_a de algunos sustratos de enzima MAO-A. [37]

Sustrato	pK_a
Serotonina	9.97
Dopamina	8.93
Norepinefrina	8.58

Otro estudio muestra que al realizar simulaciones computacionales sobre las fuerzas de interacción entre la enzima y el sustrato serotonina (5-HT), la especie neutra de esta última presenta una mayor cantidad de interacciones dentro del sitio activo, mientras que la molécula protonada tiene mayores fuerzas de interacción con residuos en la cavidad de entrada. Estos resultados coinciden con la afinidad observada del sustrato neutro durante el estudio de actividad enzimática mencionado anteriormente [38].

Es por ello que se ha propuesto que debe haber un paso previo a la catálisis, en que el grupo amino del sustrato es desprotonado gracias a la acción de la enzima (Ver Figura 3.7). Si bien se desconoce dónde ocurre este fenómeno, se ha sugerido que es debido a aminoácidos superficiales cercanos a la cavidad de entrada de la enzima, dado que dentro de ésta y en el sitio activo no hay residuos suficientemente básicos para retirar el protón. Por otro lado, otro estudio propone que posiblemente la desprotonación se desarrolla al interior del canal o en el sitio activo, gracias a una disminución del pK_a del sustrato (serotonina) dado por sus interacciones con los aminoácidos del entorno [20, 38].

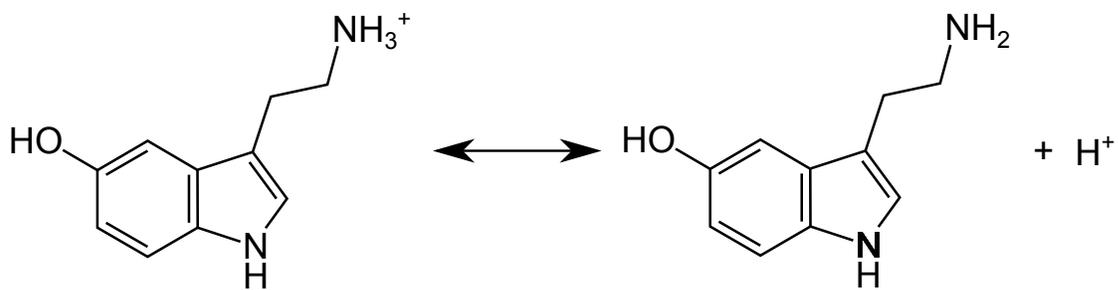


Figura 3.7: Esquema de desprotonación en serotonina.

Una forma de reconocer qué aminoácidos podrían influir en la captación del protón y, con ello, en la actividad catalítica, es predecir el pKa de los residuos de forma teórica para luego analizar su capacidad de captar y liberar protones. Diferentes estudios han utilizado exitosamente esta herramienta para el análisis de sitios activos de proteínas y su actividad catalítica [38,39].

Capítulo 4

Metodología

4.1. Materiales y equipo utilizado

- Suite Amber 12 [40]
- Suite Amber 09 [41]
- GaussView [42]
- Gaussian 98 [43]
- PropKa 3.1 [44, 45]
- PDB2PQR [46, 47]
- APBS: Adaptive Poisson-Boltzmann Solver [48]
- Caver: Software tool for protein analysis and visualization [49, 50]
- PyMOL: Molecular Graphics System [51]
- UCSF Chimera Package [52, 53]
- VMD: Visual Molecular Dynamics [54]
- H++: Web-based computational prediction of protonation states [55, 56]
- Clúster de producción Eowyn - 80 Núcleos, CPU Quad Core AMD Opteron™, 16 x 10 GBi RAM, 1 TBi de espacio en disco RAID1, conectado a través de una red de 1 Gbs.

4.2. Procedimiento

4.2.1. Análisis de Velocidades de Simulación

Se experimentó con la capacidad computacional disponible, trabajando en paralelo con los programas de simulación, para definir los parámetros de la Dinámica Molecular y así plantear cómo se desarrollaría la simulación definitiva.

Primero se midió las velocidades alcanzadas ([ns/día]) utilizando el programa *sander*, en modo paralelo, con 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 21 y 24 CPU's.

Luego se experimentó utilizando el programa *pmemd*, una versión de *sander* optimizada para simulaciones de solvente explícito con condiciones periódicas de borde y mejor escalabilidad en paralelo. Esta prueba se realizó con 16 y 21 CPU's, y después, aumentando la capacidad de transferencia de datos entre los nodos, nuevamente se midió la velocidad a 8, 16, 24 y 32 CPU's.

Finalmente, mientras se realizaron estos estudios se aumentó la capacidad del ancho de banda, agregandose 2 cables de red categoría 5e a los últimos nodos del clúster, por lo que se probó su velocidad con 24 CPU's.

Las modificaciones de hardware se realizaron para aumentar la velocidad de la transferencia de información entre las CPU's, ya que ésta es una etapa limitante para el desarrollo de la simulación.

4.2.2. Reconocimiento de molécula FAD

En el área de proteínas, Amber sólo reconoce directamente los aminoácidos estándar. Sin embargo, si se necesita incluir otras moléculas en las simulaciones, éstas se pueden parametrizar en los campos de fuerza de la suite. En este caso se requirió parametrizar la molécula FAD, para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

- Se extrajo la posición espacial del FAD y de CYS-395 desde la estructura cristalina de la proteína completa (Protein Data Bank ID: 2Z5X). El archivo creado contenía además los aminoácidos anterior (GLY-394) y siguiente a la cisteína (TYR-396), para la posterior creación de los “caps” que simulan los enlaces peptídicos.
- Se editó la estructura FAD-CYS con el programa *xLEaP* de Amber 12, dibujando todos los enlaces correspondientes y agregando los hidrógenos necesarios, para después generar un archivo *.pdb.
- Con el programa *GaussView* se guardó este archivo en formato *.com y se limpió para que pudiera utilizarse en las optimizaciones siguientes.
- Se editó este archivo en *GaussViewv*: borrando los átomos sobrantes para dejar “caps” metilo enlazados a la cisteína, borrando los hidrógenos sobrantes y modificando los enlaces correspondientes.
- Se optimizó y se calcularon las cargas ESP utilizando el programa *Gaussian 9*, manteniendo fijas las moléculas de los anillos.
- Se obtuvieron las cargas ESP con programa *antechamber* de Amber 9, ya que Amber 12 presenta un bug para realizar este cálculo.
- Se calcularon las cargas RESP con *antechamber* de Amber 12, utilizando además los comandos *respgen*, *resp* y *prepgen*. Se modificó el archivo .ac con los datos entregados por uno de los archivo de salida “punch”.
- Se parametrizó la molécula con comando *parmchk* de Amber 12, incluyéndose manualmente los parámetros (enlaces, ángulos, dihedros, etc.) que presenten “ATT”. Los valores utilizados se recopilaron desde el archivo parm del campo de fuerza ff99SB.
- Se leyó el archivo *.prepin en *xLEaP* de Amber 12. Se borraron los “caps” metilos y se verificó que la carga de la molécula sea -2.

- En este mismo programa se generó el residuo modificado CYP, para representar a la cisteína enlazada al FAD. Se cambió el nombre de sus átomos a los utilizados por Amber, se agregó el nombre de la unidad y del residuo, definiendo “cabeza”, “cola” y tipo (protein) de la molécula, y generando la biblioteca *.lib del residuo CYP. Además se modificó este archivo cambiando los “CYN” por “CYP”.
- Se generó residuo para el ligando FAD. Se modificó el nombre de sus átomos por los utilizados en el archivo *.pdb inicial, se agregó el nombre de la unidad y del residuo, definiendo “cabeza” (átomo C8M) de la molécula y generando la biblioteca *.lib de FAD.
- Se abrieron los archivos *.fromod y *.lib de ambas moléculas y el archivo *.pdb de la proteína MAO-A con el programa *xLEaP* de Amber 12. Se formó un enlace entre los átomos C8M del FAD y SG del CYP, y se generaron archivos *.lib de la proteína completa.
- En *xLEaP* se solvató la proteína con TIP3P, formando un octaedro con un largo mínimo entre la molécula y el borde de la celda de 10 Angstroms. Se verificó que la molécula es neutra, por lo que no se agregaron iones extra. Finalmente se generaron los archivos *.inpcrd y *.prmtop para utilizar en las simulaciones.

4.2.3. Preparación previa

Para representar a la proteína MAO-A, se utilizó la estructura cristalina de ID 2Z5X (Protein Data Bank). Su estado de protonación a pH 7.5 se definió con el servidor H++, con el cual también se definió la posición de los nitrógenos y oxígenos en los grupos amida de las Asparaginas y Glutaminas, ya que según se ha reportado, pueden existir inexactitudes en el orden de estos en los archivos de estructuras cristalinas [57]. Todas las modificaciones realizadas a la molécula están detalladas en el Apéndice B.

Luego esta molécula se ingresó en el programa *LEaP* de Amber para solvatarla en una celda octaédrica con una distancia de 10[Å] entre la proteína y el borde de la celda.

4.2.4. Dinámica molecular

4.2.4.1. Campo de fuerza

La estructura general de la función potencial está dada por:

$$U(\vec{r}) = \sum U_{\text{enlazante}}(\vec{r}) + \sum U_{\text{noenlazante}}(\vec{r}) \quad (4.1)$$

La sección de interacciones enlazantes considera el movimiento dado en enlaces (2 átomos i, j), ángulos (3 átomos i, j, k) y torsiones o rotaciones (4 átomos i, j, k, l). Cada una está representada con la expresión respectiva en la siguiente función: [32]

$$U_{\text{enlazante}} = \sum k(r_{ij} - r_0)^2 + \sum k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum k_n(1 + \cos(n\varphi + \phi)) \quad (4.2)$$

Donde $r_{ij} = \|\vec{r}_j - \vec{r}_i\|$ es la distancia entre los átomos, θ es el ángulo entre \vec{r}_{ij} y \vec{r}_{kj} ; r_0 es la distancia de equilibrio, θ_0 es el ángulo de equilibrio; k y k_θ son las constantes elástica y del ángulo, respectivamente; φ es el ángulo entre los planos (i,j,k) y (j,k,l) ; y n indica periodicidad donde si $n > 0$, ϕ es el ángulo de cambio de fase y k es la constante multiplicativa, y para el caso $n = 0$, ϕ indica el ángulo de equilibrio y k tiene unidades de *potencial/rad*².

La sección no enlazante considera las interacciones entre todo par (i,j) de átomos, excluyendo los pares enlazados. Debido a la gran cantidad de cálculo que requiere, esta etapa es la que tiene mayor costo computacional. Incluye las interacciones de van der Waals, que se plantean como el potencial Lennard-Jones, una atracción dipolo débil entre átomos lejanos y una repulsión entre los cercanos; y las interacciones electrostáticas, que son atractivas para cargas de distinto signo y repulsivas para las de carga similar. Ambas se plantean siguiendo la forma: [32]

$$U_{noenlazante} = \sum -E_{min} \left[\left(\frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum \epsilon_{14} \frac{Cq_iq_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (4.3)$$

Donde $r_{ij} = \|\vec{r}_j - \vec{r}_i\|$; $E_{min} = U_{LJ}(R_{min})$; q_i, q_j son las cargas de los respectivos átomos; C es la constante de Coulomb; ϵ_0 es la constante dieléctrica; y ϵ_{14} interpreta las interacciones entre átomos relacionados por torciones.

4.2.4.2. Dinámica Molecular Convencional

Hay una gran variedad de tipos de dinámica molecular, que se utilizan dependiendo de las características del caso de estudio. En particular existen diferencias importantes sobre cómo tratar la interacción de la proteína con el solvente, ya que *in vivo* la proteína está en contacto con otras moléculas (especialmente agua) que influyen en su comportamiento.

Para incluir estos posibles efectos existen tres tipos de simulación:

- *En vacío*: Se simula sólo la molécula, como si estuviera en vacío.
- *Solvente implícito*: Se aplican constantes dieléctricas simulando el efecto del solvente.
- *Solvente explícito*: En la simulación se incluye una gran cantidad de moléculas de solvente, aumentando la cantidad de cálculo y el costo computacional.

Cuando se trabaja con solvente explícito, la molécula se ingresa a una “celda” de solvente que puede tener diferentes formas: cúbica, octahédrica, etc. Un ejemplo de celda octahédrica se presenta en la Figura 4.1.

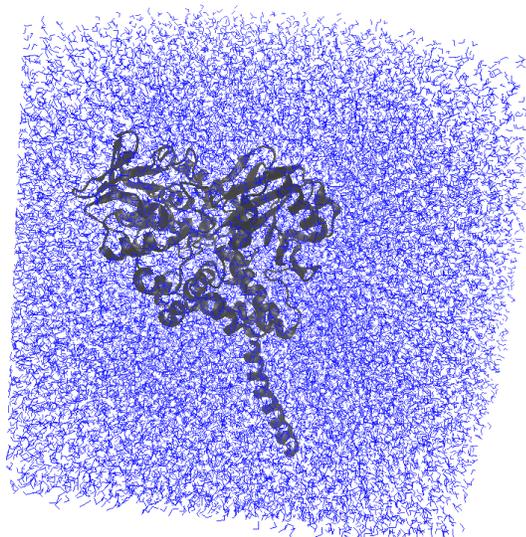


Figura 4.1: Celda octaédrica rodeando a molécula en estudio.

4.2.4.3. Etapas generales de simulación

El siguiente diagrama esquematiza de forma gruesa los pasos que se deben seguir para desarrollar una simulación completa:

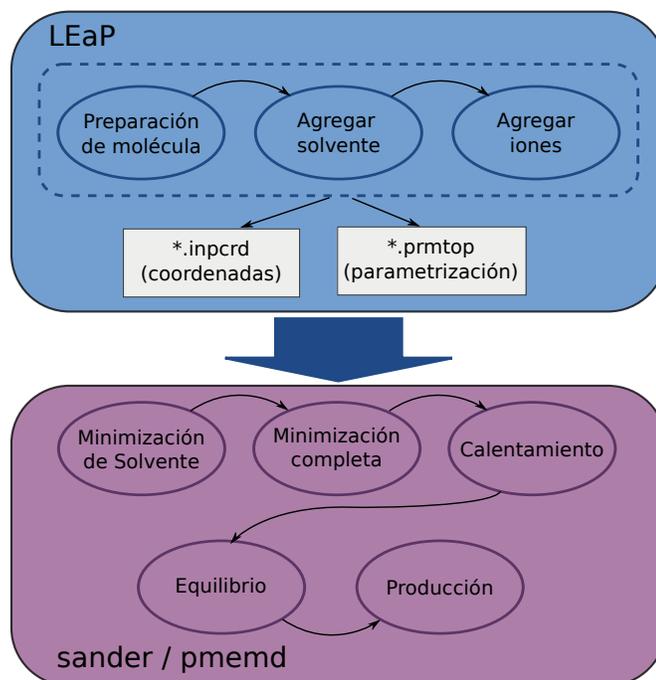


Figura 4.2: Etapas de una Dinámica Molecular.

Primero se prepara la molécula retirando o modificando el archivo de la estructura cristalina. Luego se solvata y se agregan los iones necesarios para dejar el sistema neutro. Cuando se

utiliza la suite Amber esto se realiza con el programa *LEaP*, con el que también se obtienen los archivos con las coordenadas (*inpcrd*) y la parametrización del sistema en el campo de fuerza que se utilizará en el estudio (*prmtop*).

La simulación comienza con una primera minimización del solvente (en que se restringe sólo el movimiento de la proteína), luego se recomienda hacer una segunda minimización del sistema completo. Después se realiza una etapa de calentamiento, la cual puede desarrollarse directamente en una oportunidad o aumentando la energía en varios ciclos. Sigue una etapa de equilibrio en que se espera que las características de la simulación alcancen cierta estabilidad; esta etapa generalmente se la conoce como NTP, ya que se mantienen constantes los moles, la temperatura y la presión del sistema. Finalmente se desarrolla la etapa de Producción, donde se realiza el estudio de alguna característica en particular de la molécula, alcanzando grandes períodos de tiempo del orden de [ns].

4.2.4.4. Sobre esta simulación

Como se mencionó en la sección anterior, la dinámica molecular realizada en este trabajo se desarrolló con solvente explícito en una celda octaédrica. El modelo de agua utilizado es TIP3P, el cual se escogió principalmente porque el tipo de interacción solvente-sustrato donde se utilizará no requiere condiciones o propiedades especiales de la molécula de agua y por lo tanto su modelo más simple representa bien el comportamiento del líquido, sin requerir un excesivo costo en el cálculo computacional, debido a que su estructura rígida evita los movimientos vibracionales y angulares de los hidrógenos.

Se siguieron todas las etapas de simulación explicadas anteriormente, primero aplicando una minimización de solvente de 1000 pasos, con *cutoff* de 10[Å] y restricción armónica de toda la proteína; y luego una segunda minimización realizada con todo el sistema liberado por 1000 pasos.

La dinámica molecular comenzó con un calentamiento progresivo del sistema en tres etapas de 100[K] y duración de 20[ps] cada una, llegando hasta los 100[K], 200[K] y 300[K] respectivamente. Para ello se utilizó la dinámica de Langevin ya que es una forma rápida y segura de alcanzar las temperaturas finales, aplicando una inicialización de velocidades iniciales aleatoria ($ig=-1$). Esta etapa de la simulación se desarrolló aplicando condiciones periódicas de borde con volumen constante, para así evitar los cálculos de presión que pueden llevar a inestabilidades debido a la baja exactitud que tienen a baja temperatura, manteniendo además a la proteína restringida armónicamente.

Una vez alcanzados los 300[K], tanto en el equilibrio como en la producción se cambiaron las condiciones periódicas de borde, para mantener tanto la temperatura como la presión constante a 1[bar]. Sin embargo durante la última etapa se modificó el termostato por el sistema de Berendsen, el cual no mantiene la temperatura de manera forzada. Las condiciones periódicas de borde a presión constante permiten relajar la estructura de la celda para que se distribuyan debidamente las partículas de agua y se mantenga estable su densidad.

Durante todas las etapas de la dinámica se restringió el movimiento de los enlaces de los hidrógenos, utilizando una versión del algoritmo SHAKE especialmente desarrollado para modelos de agua rígidos, como TIP3P [58]. Por otro lado, también se mantuvo un tiempo de 2[fs] para cada paso de la dinámica. Para una descripción más detallada de los parámetros utilizados en todas las etapas de la simulación se puede ver el Apéndice C.

La simulación completa se realizó aplicando el programa *pmemd*, de forma paralela, utilizando 24 CPU's del cluster disponible. El cálculo de toda la dinámica molecular tuvo una duración aproximada de 11 días.

Con el fin de realizar la simulación más cercana a la realidad, considerando que la enzima se encuentra inserta en la membrana de la mitocondria, se quiso aplicar una restricción lo suficientemente fuerte en la estructura intermembrana de la proteína, para que ésta mantuviera una conformación semi-rígida. Tutoriales y manuales de Amber recomiendan no utilizar intensidades de restricción mayores a $10[kcal/(mol \cdot a^2)]$ debido a inestabilidades que pueden ocurrir debido a interacciones con el algoritmo SHAKE. Por ello, en base a pruebas de RMSd a distintos valores de intensidad de restricción (trabajo previo, Apéndice H), se realizó la dinámica molecular manteniendo una restricción permanente en la zona de inserción a membrana (Residuos: 495-513) con una intensidad de $10[kcal/(mol \cdot a^2)]$. [59]

4.2.5. Tratamiento de datos

Debido a la gran cantidad de información que se tenía que analizar, se desarrolló un script en BASH para extraer los datos de la simulación y con estos hacer los cálculos de pKa y del campo electrostático. En la Figura 4.3 se bosqueja su funcionamiento.

Como se puede ver en el Apéndice C, la dinámica molecular en la etapa de producción se desarrolló registrando el estado de la simulación cada 1,500 pasos, por lo que considerando el tiempo transcurrido por paso (0.002[ps]) y el tiempo de simulación (10,000[ps]), significa que se recopilaron 3,333 estados correspondientes a toda la etapa de producción.

El script comienza extrayendo 1 estado por cada 2, desde el total de 3,333 estados generados por la dinámica molecular, recuperandose 1,667 estados correspondientes a la etapa de producción. Para esto se utilizó el programa VMD, con el que se pudo obtener 1,667 archivos PDB representativos de cada estado de la proteína a las que se les extrajo su solvente. Estos archivos después son agrupados en una carpeta nombrada PDB.

Luego, estos archivos son modificados para que puedan ser reconocidos por los programas utilizados en los pasos posteriores. Esto se hace eliminando los iones y cambiando todas las notaciones especiales de las moléculas por la notación común: las variantes de histidinas HIP, HID e HIE por HIS, la cisteína especial CYP por la estándar CYS y cambiando el nombre de la cadena de X por A. Es importante notar que las modificaciones hechas en las histidinas no se aplicaron para el programa APBS, por lo que estos archivos PDB fueron guardados en una nueva carpeta destinada a estos cálculos (llamada APBS).

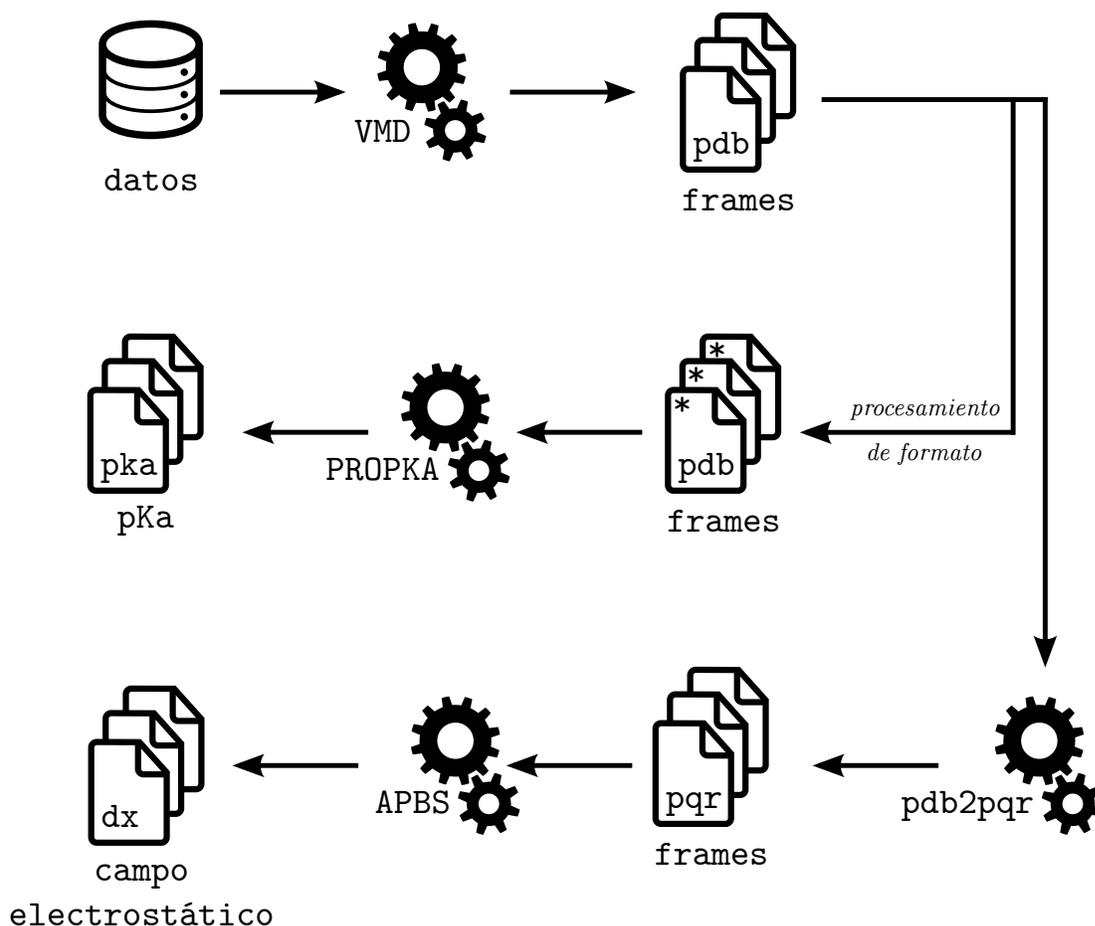


Figura 4.3: Esquema del flujo de tratamiento de los datos.¹

En cada archivo presente en la carpeta PDB se calcula el pKa de los aminoácidos utilizando el programa propKa 3.1, y luego se aplica un programa propio que transforma estos resultados en archivos CSV, los cuales son más fáciles de manipular y leer. Cada archivo resultado del cálculo de propKa se agrupa en una carpeta definida para eso (llamada PROPKA), y cada archivo CSV se agrupa en otra carpeta nombrada CSV.

Por otro lado, en la carpeta APBS se realizan todos los cálculos de este programa. Comenzando con la generación de los archivos PQR por el programa PDB2PQR, utilizando el campo de fuerza de Amber, y con el cual también se crearon los input para utilizar APBS.

La visualización de los campos electrostáticos y las imágenes presentadas en el desarrollo de este trabajo se hicieron con los programas VMD y Chimera.

¹El ícono de datos fue hecho por Shmidth Sergey y el de engranajes por Márcio Duarte ambos bajo licencia Creative Commons (CC BY 3.0) descargados desde <<http://www.thenounproject.com>>

En cuanto al análisis de pKa, se realizaron 5 programas en Python que facilitaban la recolección de datos en los archivos CSV, los cuales se fueron desarrollando a medida que se iban requiriendo durante el transcurso del estudio. Entre ellos se encuentran:

- Recopilación ordenada del pKa de todos los aminoácidos en los 1,667 estados. Útil para definir el valor de pKa promedio y la desviación estándar de cada aminoácido.
- Cálculo de la variación del pKa de cada aminoácido entre estados, equivalente a medir la variación de pKa en el tiempo, cada 6[ps]. Útil para ver la estabilidad o una tendencia del pKa en los 10[ns].
- Identificación de los aminoácidos que tienen un pKa dentro de un rango planteado por el usuario. Útil para encontrar en cada estado todos los aminoácidos con pKa dentro de un grupo definido de valores.
- Identificación de los aminoácidos que presentan un pKa mayor a un valor impuesto por el usuario. Útil para reconocer en cada estado todos los aminoácidos con pKa mayor al del sustrato, para ver la frecuencia con que mantenían esta restricción, el valor máximo, el promedio y la desviación estándar.

Finalmente la identificación de los aminoácidos en la entrada al sitio activo se realizó mediante el programa Caver, utilizando un radio de prueba de 0.9[Å] y el resto de los parámetros definidos por defecto. Como estructura de la proteína se usó el primer estado obtenido a partir de la extracción de datos.

Capítulo 5

Resultados

5.1. Optimización de parámetros de simulación

El tiempo que demora ejecutar una misma simulación distribuyendo los cálculos en más de una CPU de forma paralela, varía dependiendo del tipo de hardware y la cantidad de CPU's que se utilicen, además del tipo de programa con que se realice el trabajo.

En particular, a continuación se detallan algunas velocidades de ejecución obtenidas en un cluster de 80 Núcleos, CPU Quad Core AMD Opteron™, realizando la misma simulación con los programas *sander* y *pmemd* de la suite Amber 12.

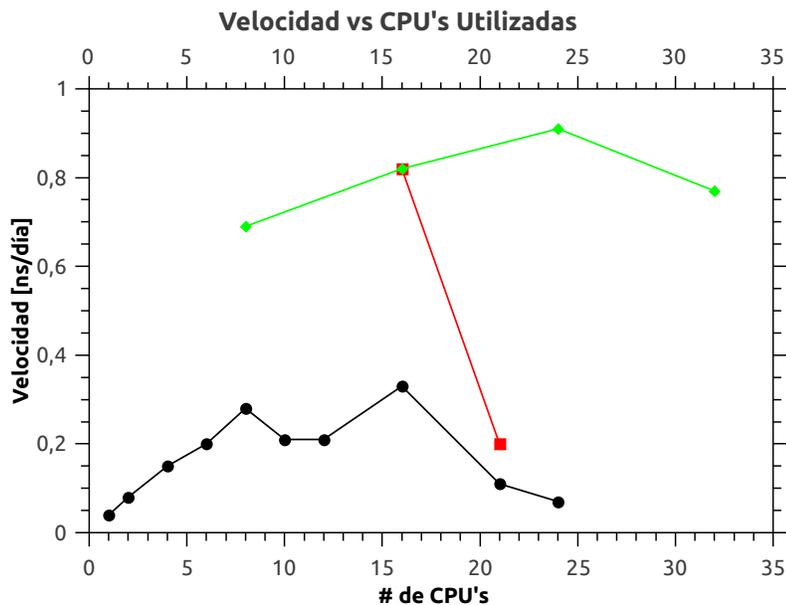


Figura 5.1: Velocidades de simulación [ns/día] con programas *sander* y *pmemd*. La curva **negra** corresponde al programa *sander*. El perfil **rojo** corresponde al programa *pmemd*, usando exactamente el mismo hardware utilizado en el programa *sander*. Las velocidades presentadas en la curva **verde** se midieron luego de hacer modificaciones en las conexiones internas del hardware.

Se puede ver que la mayor velocidad alcanzada fue 0.91[ns], alcanzada con el programa *pmemd* utilizando 24 CPU's.

En base a las tendencias presentadas por los perfiles, se entendió que la transferencia entre nodos era una etapa limitante para la alcanzar mayores velocidades, por lo que se aumentó el ancho de banda. Así, se alcanzó la velocidad más alta para desarrollar simulaciones:

Tabla 5.1: Velocidad de simulación.

# de CPU's	Velocidad [ns/día]
24	1.01

5.2. Dinámica Molecular de la proteína MAO-A

La simulación de la proteína en solvente explícito durante 10[ns] presentó un comportamiento relativamente estable, en el cual mantuvo su conformación estructural a pesar de la flexibilidad observada (Ver Figura 5.2).

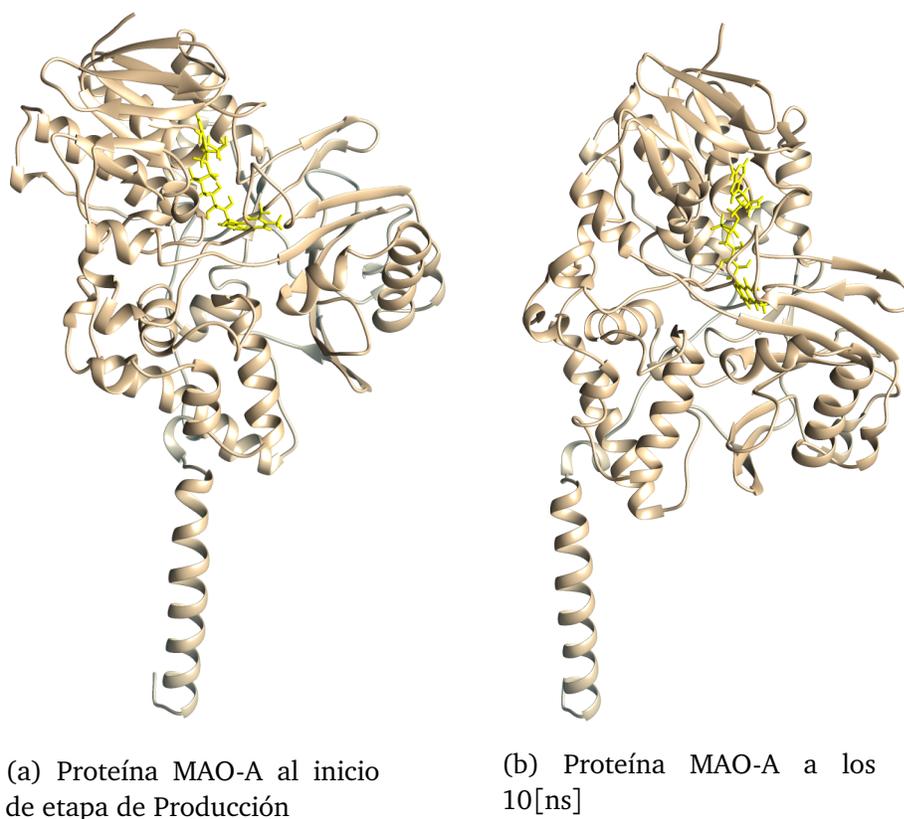


Figura 5.2: Estructura de proteína antes y después de la simulación.

Esto se ve reflejado en el RMSd de la cadena principal de la proteína y en su radio de giro, que se muestran en la Figura 5.3 y la Figura 5.4, respectivamente. Ambos perfiles, especialmente el último, presentan una tendencia estable durante toda la simulación. Los valores de

RMSd más altos al final de ésta pueden ser atribuibles al movimiento que se observa en la Figura 5.2b, sin embargo como se aprecia en el radio de giro, el empaquetamiento de la estructura no varía por este movimiento.

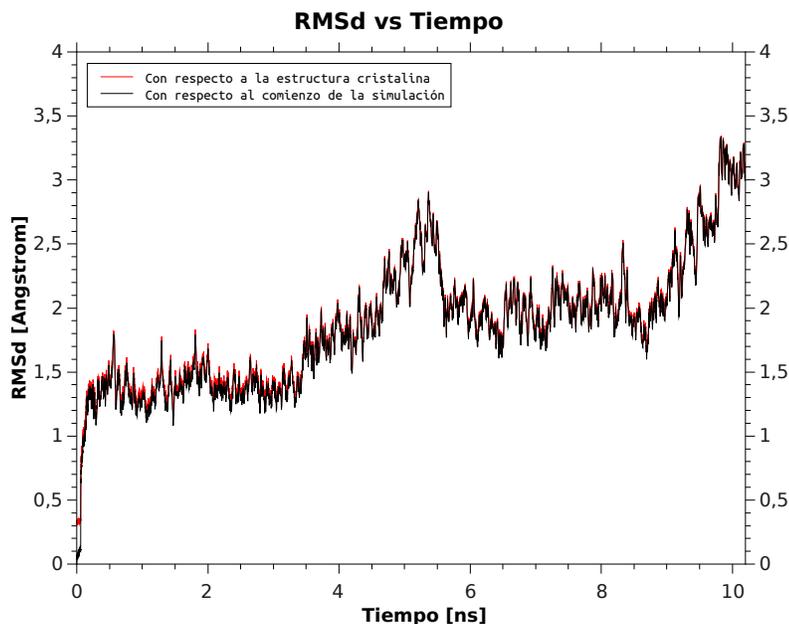


Figura 5.3: Perfil de RMSd de la simulación.

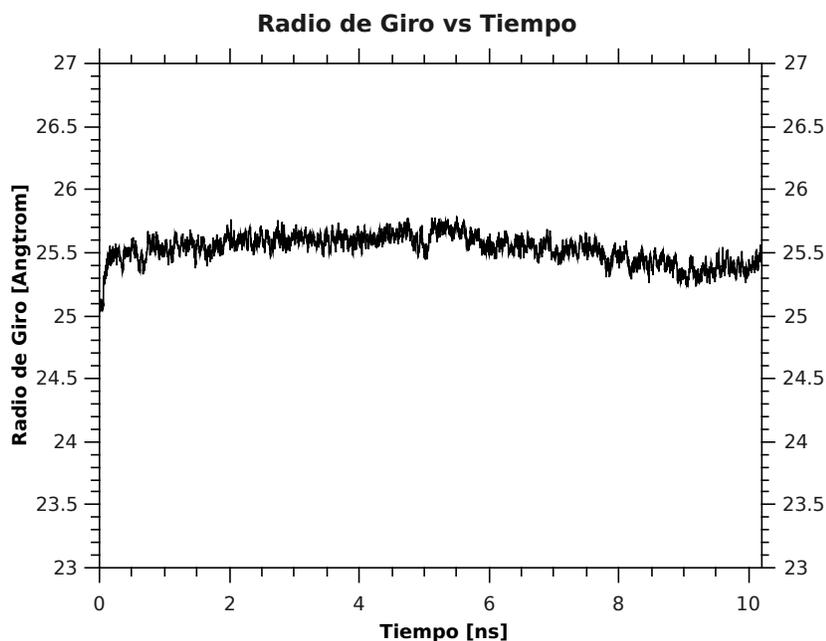


Figura 5.4: Radio de giro de la proteína durante la simulación.

Otras características registradas para corroborar la estabilidad de la dinámica molecular, como Temperatura, Energía, Volumen y Presión, se presentan en Apéndice D.

El comportamiento de todas ellas indican que la simulación alcanzó un estado de equilibrio, el cual se mantuvo estable durante toda la producción, a pesar de las ligeras variaciones en el RMSd.

5.3. Caracter ácido/base y pKa de los aminoácidos

El cálculo de pKa de todos los aminoácidos en los 1,667 estados correspondientes a los 10[ns] de simulación, permite conocer sus caracteres ácido/base, los cuales están influenciados por el entorno de cada aminoácido. Debido a la gran cantidad de datos que incluyen estos resultados sólo se presentará la información más representativa y atinente al objetivo de estudio.

En general se pudo observar que el valor de pKa de cada aminoácido tenía un comportamiento relativamente oscilatorio, sin mostrar alguna tendencia creciente o decreciente que permaneciera durante la simulación. Considerando que se trataban de 1,667 estados, con más de 150 aminoácidos cada uno, una forma de presentar estos resultados fue calcular el pKa promedio de cada aminoácido ($pK_{a_{prom}}$) y su desviación estándar, los cuales se presentan en Apéndice E.

5.3.1. Estabilidad del carácter ácido/base

Con el fin de identificar los aminoácidos que mostraron una mayor variación de su pKa en el tiempo, se calculó la diferencia de los pKa's entre estados y se registró la cantidad de veces que los residuos tenían una variación mayor a una unidad. A continuación, en la Figura 5.5, se presenta esta frecuencia en porcentajes. Para facilitar su lectura, sólo se detallan los aminoácidos que presentaron esta gran variación de su pKa durante más del 10% de la simulación.

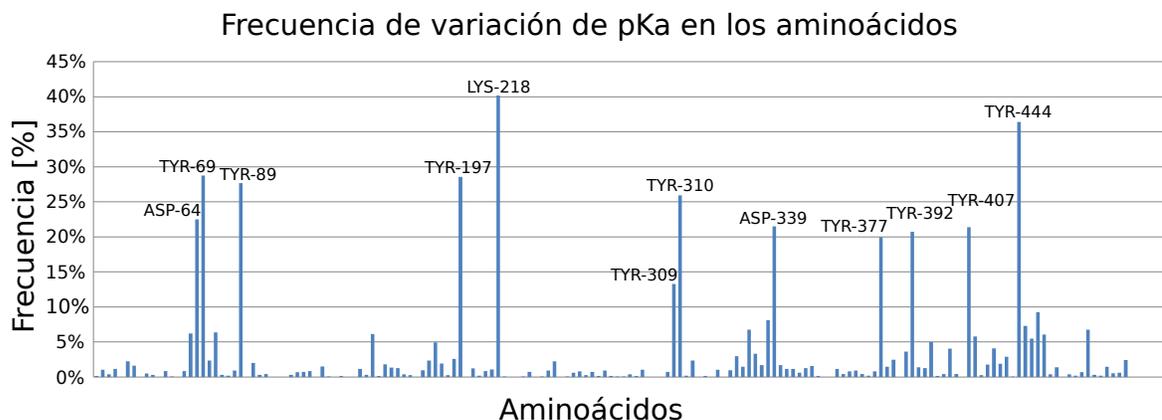


Figura 5.5: Frecuencia (%) de variaciones mayores a una unidad, en el pKa de los aminoácidos durante la simulación. Permite identificar los aminoácidos que con más frecuencia presentaron cambios significativos en su pKa.

Es importante recordar que los porcentajes se calcularon en función de los 1,667 estados extraídos, que corresponden aproximadamente a la mitad de los estados existentes en la simulación (3333 en total). Es decir que por cada 2 estados consecutivos, se consideró 1 durante el cálculo (para más detalle revisar Sección 4.2.5, en el Capítulo 4). Esto significa que entre cada estado considerado transcurren 6[ps], y es durante este tiempo que ocurren las variaciones de pKa que se están mostrando.

Las mayores variaciones entre estados que presentaron los 12 aminoácidos resaltados en la figura anterior se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Variaciones máximas de pKa entre estados de la dinámica molecular. *Se incluyen los aminoácidos que más frecuentemente variaron su pKa durante la simulación. También se indica si el aporte en el pKa resultó en un aumento (+) o disminución (-) del valor.*

Residuo	Variación de pKa []
ASP-64	-2.67
TYR-69	+4.25
TYR-89	+4.67
TYR-197	+4.39
LYS-218	+5.70
TYR-309	+2.98
TYR-310	-3.33
ASP-339	-3.32
TYR-377	-2.75
TYR-392	-2.98
TYR-407	+4.57
TYR-444	+5.08

En base a esto se puede observar que el aminoácido LYS-218 fue el que más frecuentemente varió su pKa. Además, fue el que presentó una mayor modificación y un mayor aumento, aunque su pKa máximo no fue el más alto entre los encontrados (ver Apéndice G). Por otro lado, las tirosinas también mostraron las más grandes variaciones de pKa, siendo TYR-444 la de valor más alto.

Si se comparan los resultados de la Figura 5.5 y la Tabla 5.2 con las desviaciones estándar de sus aminoácidos (Apéndice E), se puede ver que gran parte de estos residuos poseen desviaciones estándar altas, cercanas a la unidad, a diferencia de la mayoría del resto de los aminoácidos que tienen valores entre 0 y 0.5.

Además, debido a la gran frecuencia con que estos aminoácidos cambian su valor de pKa, en más de una unidad, se puede decir que estos residuos no mantienen un pKa estable en el tiempo.

Por otro lado, el aumento o disminución en el valor de pKa ocurre debido a las interacciones que presenta el aminoácido con su entorno. El aporte que este ambiente realizó para la generación del pKa de los aminoácidos anteriormente descritos en un cierto tiempo de la simulación, se presenta en el Apéndice F.

En particular, el entorno del aminoácido LYS-218, que tiene la menor estabilidad y además tiene la mayor variación de pKa, se muestra en la siguiente figura.

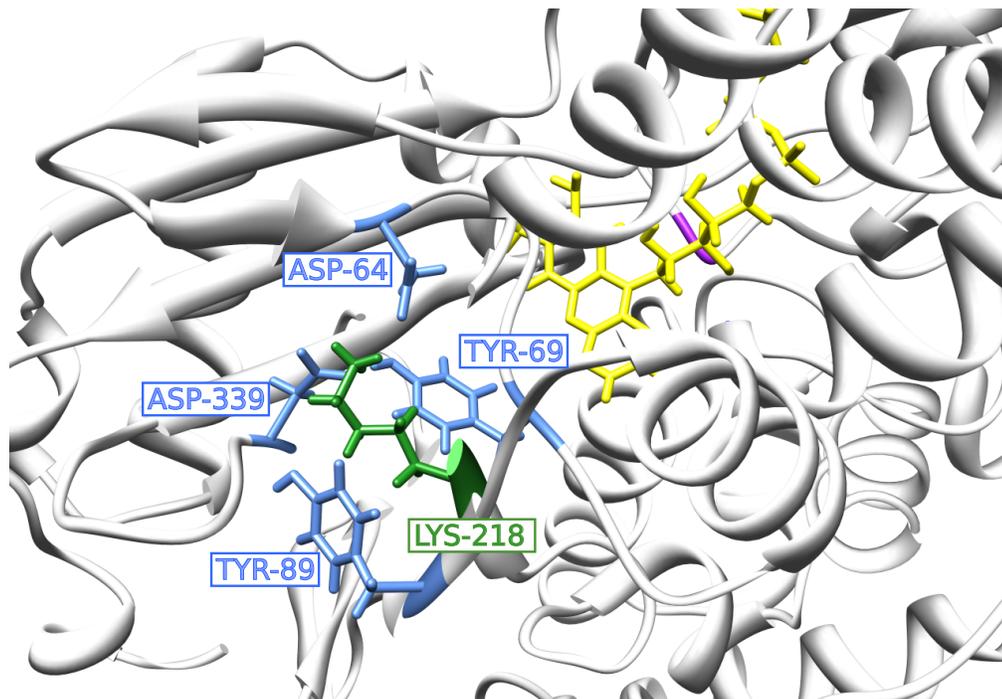


Figura 5.6: Aminoácidos del entorno que interactúan con LYS-218. Cadenas laterales en **celeste**: TYR-69, TYR-89, ASP-64 y ASP-339. Cadena lateral en **verde**: LYS-218. En **amarillo**: Cofactor FAD. Las cadenas peptídicas de LYS-218 y ASP-339 se encuentran cortadas para facilitar la visión de la zona de interacción.

5.3.2. Comparación pre y post simulación

Por otro lado, también es interesante realizar la comparación entre el comportamiento de los pKa obtenidos en la simulación y el presentado por los residuos antes de ella, como se muestra en la Figura 5.7. En ésta se indica la diferencia entre el pKa de los aminoácidos de la estructura cristalina y los valores promedio obtenidos de la dinámica.

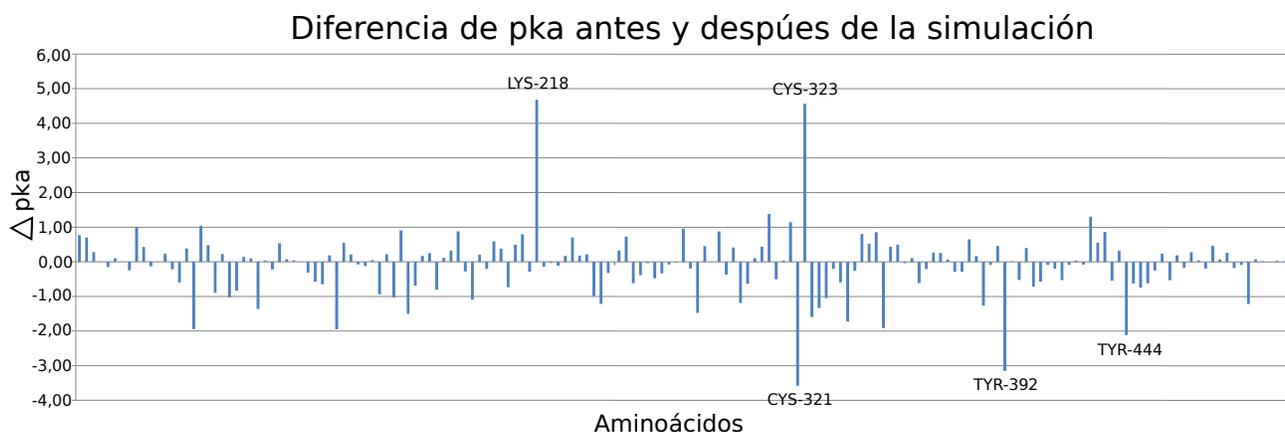


Figura 5.7: Gráfico de comparación de pKa entre aminoácidos pre-simulación y durante simulación.

Se puede notar que, además de algunos aminoácidos que también variaron su pKa frecuentemente durante toda la simulación (ver Figura 5.5), hay dos cisteínas que cambiaron en más de 3 unidades su pKa. Esto se puede deber a cambios conformacionales durante las etapas de la dinámica molecular, como se discute más adelante en la Sección 6.3.2 en el siguiente capítulo.

5.3.3. Aminoácidos con pKa relevante

Para que un residuo favorezca la desprotonación del sustrato es necesario que su capacidad de captar protones sea mayor a la observada en este último, lo que es equivalente a poseer un mayor pKa.

Considerando como base el pKa de la serotonina de 9.97 (presentado en la Sección 3.5 del Capítulo 3), se definió como primer criterio de selección que los aminoácidos muestren alguna vez durante la simulación un pKa igual o mayor a 9.97. Entonces, utilizando uno de los programas de extracción de datos desarrollados que se mencionan en la Sección 4.2.5 del Capítulo 4, se revisó el pKa de cada residuo en cada uno de los 1,667 estados de la simulación y se recopiló todos los que cumplieran con el criterio.

Así, se encontraron 95 residuos en toda la proteína que cumplen con este criterio de selección y por lo tanto en algún momento de la simulación demostraron tener una capacidad mayor que el sustrato de retener (y captar) el protón de su grupo amino. La identidad de todos los aminoácidos seleccionados y sus pKa máximos ($pK_{a_{max}}$) observados durante la simulación, se presentan en el Apéndice G.

Dentro de estos 95 residuos, 68 mostraron valores de pKa mayores o iguales al de la serotonina durante *todos* los estados estudiados de la simulación; los otros 27 aminoácidos, sobrepasaron el valor sólo en ciertos momentos de la simulación. En la Tabla 5.3 se muestra cuan frecuentemente, en términos de porcentaje, estos 27 residuos alcanzaron este criterio.

Tabla 5.3: Aminoácidos que no mantienen un pKa mayor al del sustrato permanentemente durante la simulación. La frecuencia corresponde a las proporción entre los estados en que sí se cumplió el criterio, y la cantidad total de estados estudiados. El rango de pKa incluye los valores mínimos y máximos alcanzados en la trayectoria.

(a) Aminoácidos 35-267

Residuo	Frecuencia [%]	Rango de pKa
TYR-35	96	9.18 - 10.77
ARG-47	90	9.23 - 11.95
TYR-53	99	9.65 - 11.30
LYS-90	97	9.74 - 11.15
TYR-100	90	9.39 - 11.35
LYS-102	94	9.58 - 11.63
TYR-106	94	9.18 - 10.48
TYR-121	99	9.63 - 12.89
LYS-158	99	9.70 - 12.57
LYS-163	99	9.63 - 12.54
LYS-168	95	9.64 - 10.44
TYR-175	99	9.41 - 12.79
LYS-267	99	9.88 - 11.56

(b) Aminoácidos 268-440

Residuo	Frecuencia [%]	Rango de pKa
TYR-268	93	9.32 - 11.01
LYS-280	55	9.04 - 11.19
ARG-291	41	9.13 - 10.52
LYS-318	98	9.72 - 10.91
TYR-320	97	9.46 - 11.26
CYS-321	1	7.07 - 11.92
LYS-341	1	7.52 - 11.41
LYS-357	16	7.71 - 11.39
LYS-395	76	8.10 - 12.06
CYS-398	99	9.61 - 11.47
TYR-402	99	9.53 - 11.36
TYR-419	88	8.79 - 10.58
ARG-424	98	9.66 - 12.92
LYS-440	35	9.01 - 11.02

Es importante hacer esta distinción en los aminoácidos identificados, porque si estos no mantienen un pKa mayor al del sustrato durante la mayor parte de la trayectoria (como los residuos ARG-291, TYR-321, TYR-341, ARG-357 y LYS-440, mencionados en la Tabla 5.3b), es menos esperable que tengan la capacidad para retirar su protón en caso de que pudieran interactuar.

La relación entre la frecuencia con que estos 27 aminoácidos sí cumplen el criterio, sus rangos de pKa observados, sus promedios y sus desviaciones estandar se discutirá en la siguiente sección.

A continuación, se muestran los aminoácidos que además de mostrar pKa mayor a 9.97, pueden presentar alguna interacción con el sustrato gracias su disposición estructural en la proteína. Es decir, los residuos ubicados en la superficie de la proteína y los que se encuentran en la cavidad de entrada al sitio activo o en el sitio activo mismo.

5.3.3.1. Superficie

En las siguientes figuras se muestra la superficie no accesible al solvente de la proteína MAO-A y la participación en ésta de los aminoácidos que tienen un pKa mayor al del sustrato, coloreando los valores de pKa máximos ($pK_{a_{max}}$) que alcanzaron estos residuos durante la simulación.

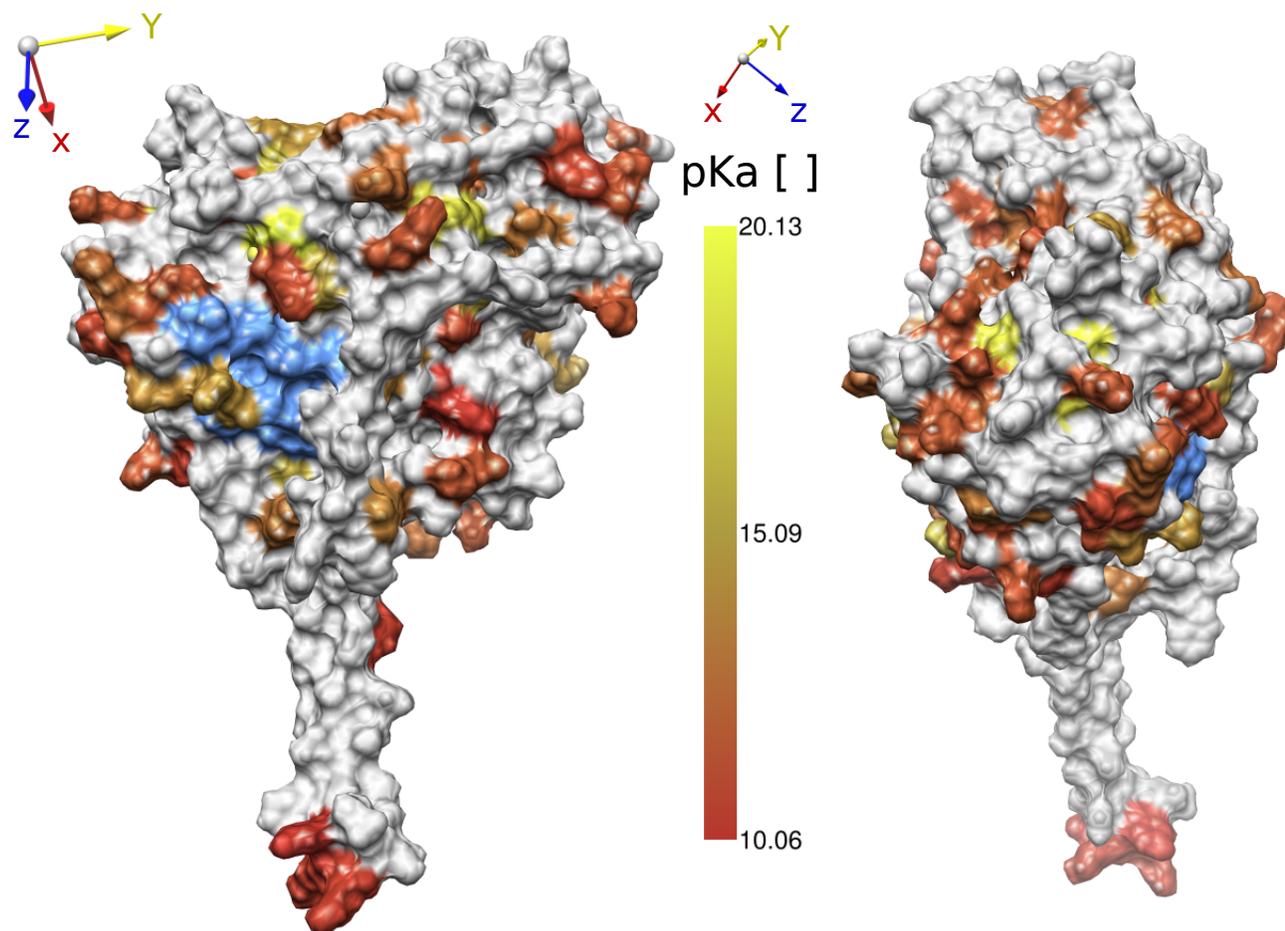


Figura 5.8: Superficie no accesible al solvente de la proteína, con coloración de los aminoácidos de pKa mayor al de la serotonina - Frente (derecha) y Lado (izquierda). La superficie coloreada en **celeste** corresponde a la entrada hacia el sitio activo reportada por Son et al. (2008) [26]. El rango de pKa coloreado representa el $pK_{a_{max}}$ observado en cada aminoácido. Frente: Los únicos dos residuos en **amarillo** corresponden a TYR-89 (izquierda) y ARG-79 (derecha). Lado: Los tres residuos en **amarillo** corresponden a TYR-392 (izquierda), TYR-309 (derecha) y TYR-310 (abajo). El radio de prueba utilizado fue $1.4[\text{\AA}]$ y para la visualización de utilizó el programa UCSF Chimera [52].

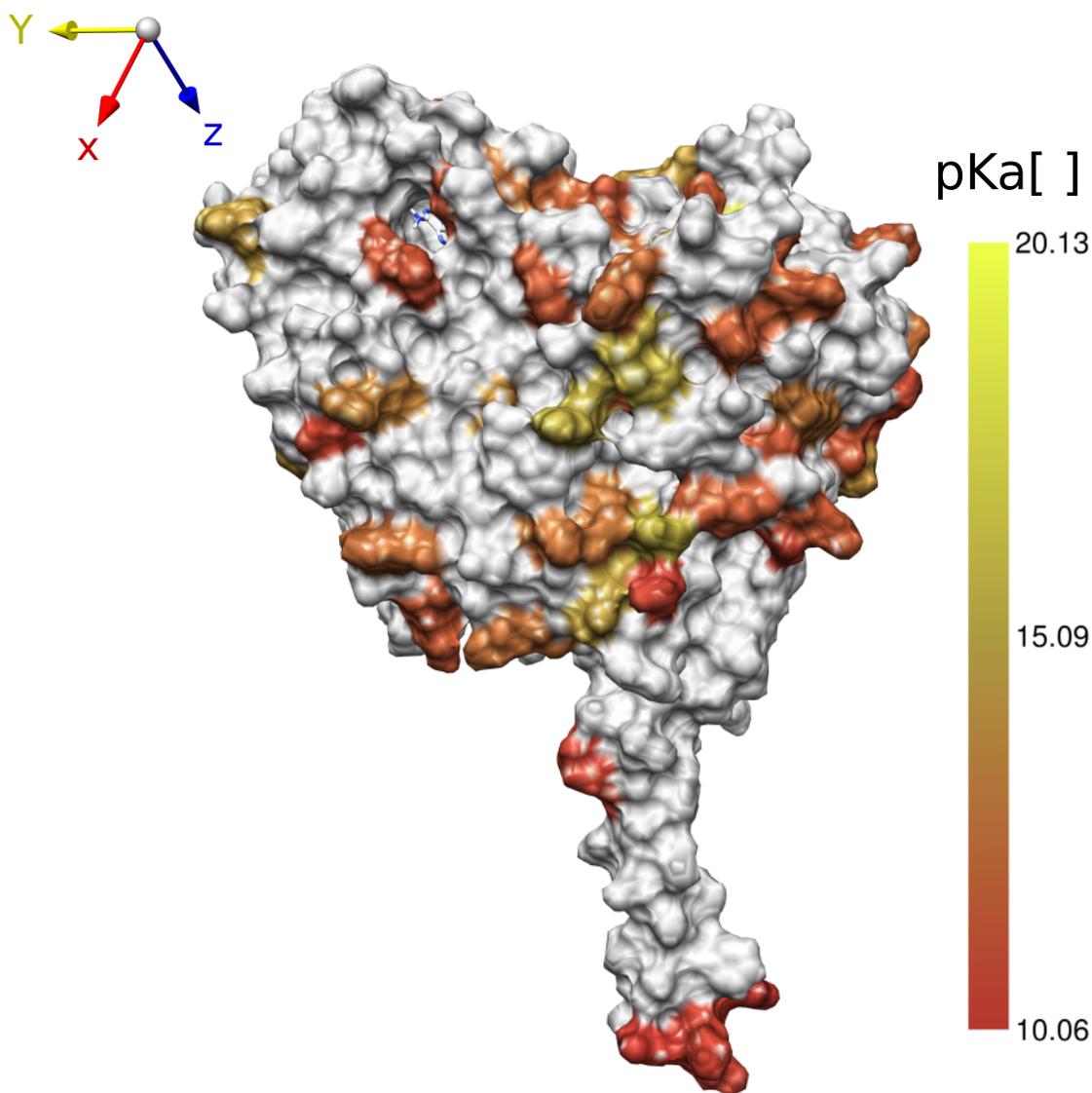


Figura 5.9: Superficie no accesible al solvente de la proteína, con coloración de los aminoácidos de pKa mayor al de la serotonina - Reverso. El rango de pKa coloreado representa el $pK_{a_{max}}$ observado en cada aminoácido. El radio de prueba utilizado fue $1.4[\text{\AA}]$ y para la visualización de utilizó el programa UCSF Chimera [52].

A partir de la Figura 5.8 y la Figura 5.9 se ve que los aminoácidos más básicos en la superficie se encuentran distribuidos alrededor de toda la proteína, excepto en la zona de inserción a la membrana mitocondrial, lo que es esperable dada su hidrofobicidad. El rango general indica que el pKa de los aminoácidos superficiales varían entre 10 y 20, sin embargo se reconoce una prevalencia de aminoácidos con pKa entre 10 y 15 en ambas caras. Los únicos valores más altos se observan en la cara frontal y lateral, los cuales corresponden a ARG-79 ($pK_{a_{max}} = 17,31$), TYR-89 ($pK_{a_{max}} = 19,85$), TYR-309 ($pK_{a_{max}} = 18,56$), TYR-310 ($pK_{a_{max}} = 17,57$) y TYR-392 ($pK_{a_{max}} = 18,08$).

Por otro lado, como se explicó en Antecedentes, se sabe que la enzima MAO-A posee una entrada en su estructura desde donde los sustratos pueden ingresar hacia el sitio activo. En-

tonces, es importante reconocer qué aminoácidos se encuentran en ésta zona y cuales son sus características, ya que debido a su función es más probable que exista interacción entre estos residuos y el sustrato a catalizar. Son *et al.* (2008) ha propuesto la ubicación de esta entrada, por lo que en base a ésta se identificaron los aminoácidos correspondientes y se reconocieron sus pKa máximos, como se muestra en la Figura 5.10. [26]

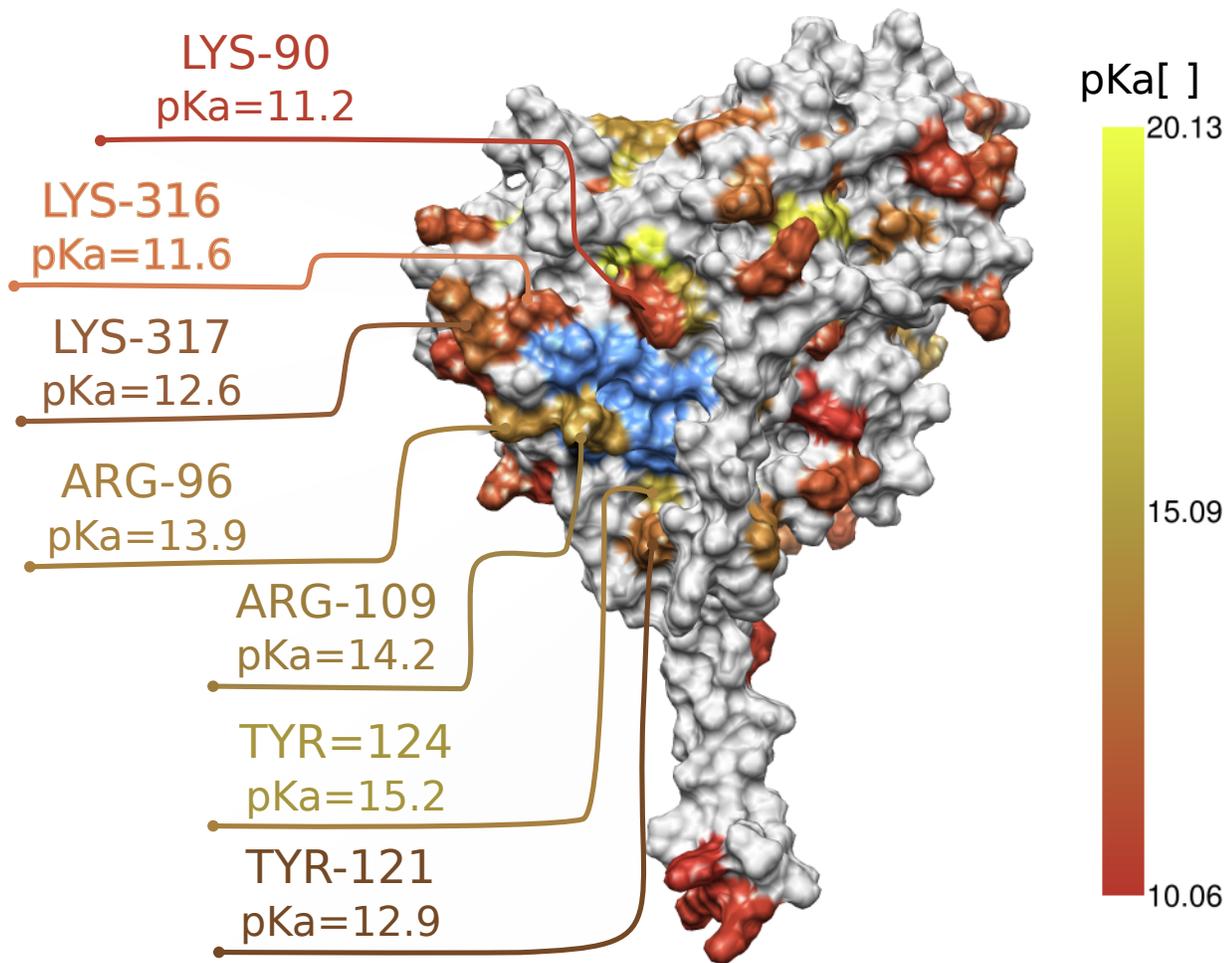


Figura 5.10: Aminoácidos en la entrada hacia el sitio activo. La superficie *celeste* corresponde a la entrada hacia el sitio activo reportada por Son *et al.* (2008) [26]. La identificación de los aminoácidos se realizó de forma visual, incluyendo tanto los residuos que rodean la entrada como los reportados. El rango de pKa coloreado representa el valor máximo de cada aminoácido.

El valor máximo de pKa (pKa_{max}) en los aminoácidos que están cerca de la entrada al sitio activo, está entre 11 y 15 (Ver Figura 5.10). Si se compara esto con los resultados del Apéndice E, se observa que sus valores promedios (pKa_{prom}) se encuentran entre 10 y 14, manteniéndose sin grandes variaciones durante la trayectoria.

5.3.3.2. Canal de acceso a sitio activo

Para reconocer los aminoácidos que se encontraban en el canal de acceso al sitio activo se utilizó el programa Caver [49], con lo que se identificaron los residuos que se listan a continuación:

Tabla 5.4: Aminoácidos que conforman la cavidad de paso al sitio activo. *Esta cavidad fue identificada por el programa Caver 3.0.1 [49], con radio de prueba 0.9[Å]. Los residuos resaltados en verde, son los identificados como parte del sitio activo por Sonet al. (2008) [26]*

VAL-93	PHE-112	PHE-208	CYS-323	PHE-352
LEU-97	PRO-113	SER-209	MET-324	LEU-354
PHE-108	ILE-180	VAL-210	ILE-325	TYR-407
ARG-109	ASN-181	THR-211	ILE-335	TRP-441
GLY-110	THR-183	GLY-214	THR-336	TYR-444
ALA-111	ILE-207	GLN-215	LEU-337	

Como se puede observar gran parte de los aminoácidos corresponden con los reportados por Son *et al.* (2008) [26], como conformadores del sitio activo de la proteína. De hecho, solamente no se incluye el residuo TYR-69, mencionado en el estudio previo.

Entre todos éstos, sólo 4 aminoácidos poseen capacidad de ceder y captar protones: ARG-109, CYS-323, TYR-407 y TYR-444. En la Tabla 5.5 se recopilan los pKa promedio ($pK_{a_{prom}}$) y máximo ($pK_{a_{max}}$) obtenidos, la desviación estándar y la frecuencia con que mantuvieron un pKa mayor al del sustrato durante la simulación.

Tabla 5.5: Valores de pKa en canal de acceso al sitio activo.

Residuo	$pK_{a_{max}}$	$pK_{a_{prom}}$	Desviación Estándar	Frecuencia [%]
ARG-109	14.23	12.42	0.22	100
CYS-323	19.21	17.95	0.66	100
TYR-407	17.82	13.96	1.15	100
TYR-444	19.03	15.71	1.60	100

A partir de esta tabla se puede ver que los aminoácidos mantuvieron un pKa mayor al del sustrato durante toda la trayectoria, aunque las dos últimas tirosinas presentaron una gran fluctuación de sus valores, como ya se demostró en la sección Sección 5.3.1.

También se puede reconocer que entre todos los aminoácidos identificados como conformadores de un posible canal de paso hacia al sitio activo, los único que no son hidrofóbicos y poseen alguna capacidad de retirar el protón pertenecen a la región superficial de la entrada (como ARG-109) o forman parte del sitio activo (como CYS-323, TYR-407 y TYR-444). No se identifican otros residuos con esta capacidad dentro del canal.

La posición estructural de estos aminoácidos se detalla en la Figura 5.11.

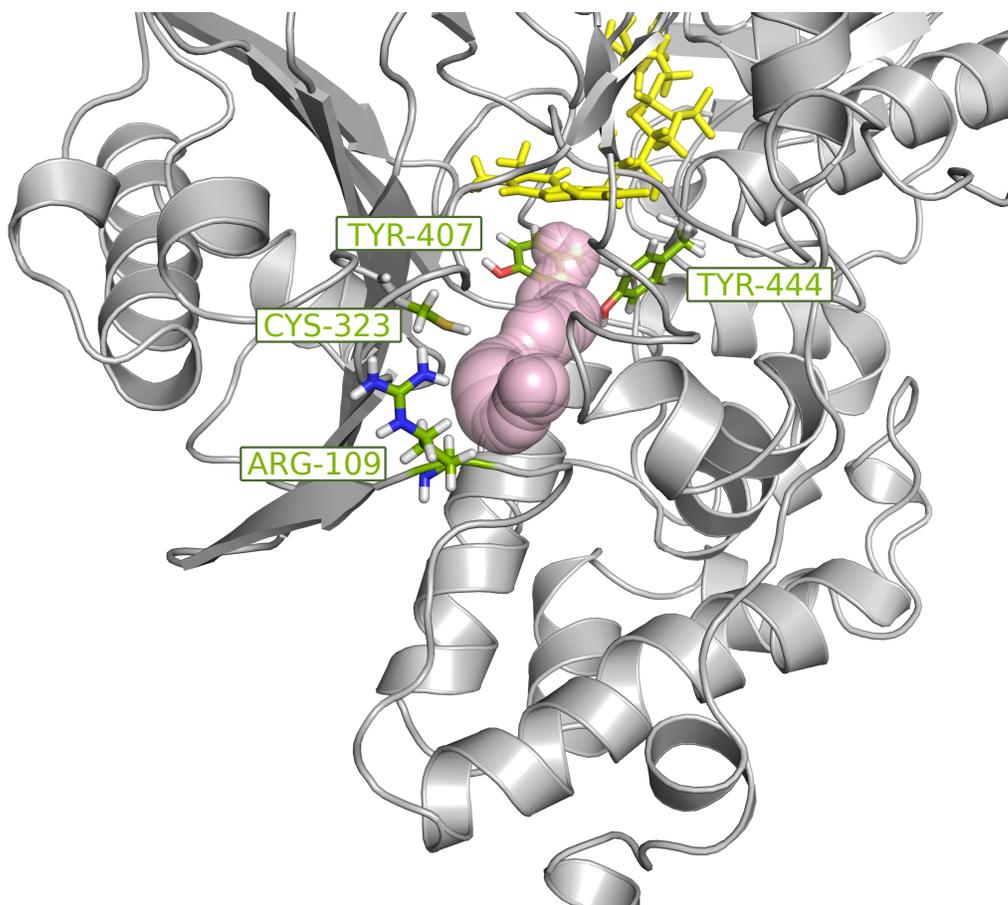


Figura 5.11: Posición estructural de los aminoácidos en la cavidad hacia el sitio activo. En color **rosado** se muestra la cavidad de entrada realizada en Caver 3.0.1 [49], con radio de prueba 0.9[Å]. En color **verde** se muestran los aminoácidos que conforman la cavidad y que presentan pKa. ARG-109 y CYS-323, pertenecen a la región de unión al sustrato; TYR-407 y TYR-444, están en la región de unión al cofactor. En **amarillo** se muestra el cofactor FAD. Imagen realizada con PyMOL 1.5.0.1

5.4. Campo electrostático de la proteína

A partir del programa APBS se calculó el campo electrostático para cada uno de los 1,667 estados de la simulación. Debido a la gran cantidad de información y espacio que se requiere para que sean presentados, sólo se escogieron 4 estados cada 3,420[ps] aproximados de la simulación. Se comenzó con el primer estado a los 0[ns] (después de las minimizaciones, antes del calentamiento), luego a los 3.4[ns], a los 6.8[ns], hasta el último estado a los 10[ns].

En las tres páginas siguientes se presenta el campo electrostático de la proteína durante el desarrollo de la simulación, como se describió anteriormente. Primero se muestra la cara frontal de la estructura, luego su cara reversa y finalmente la entrada reportada hacia el sitio activo [26] resaltada en la cara frontal de la proteína.

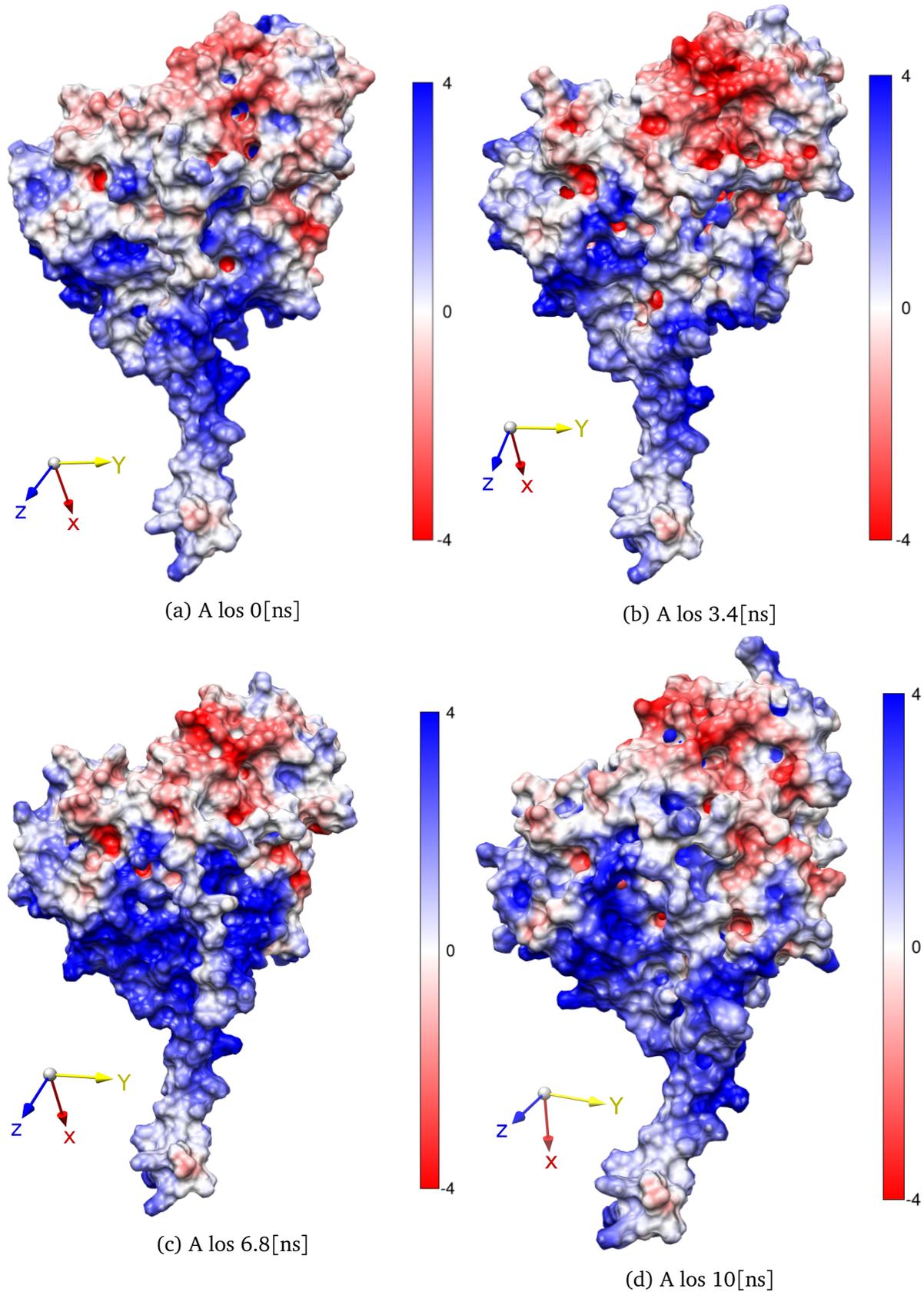
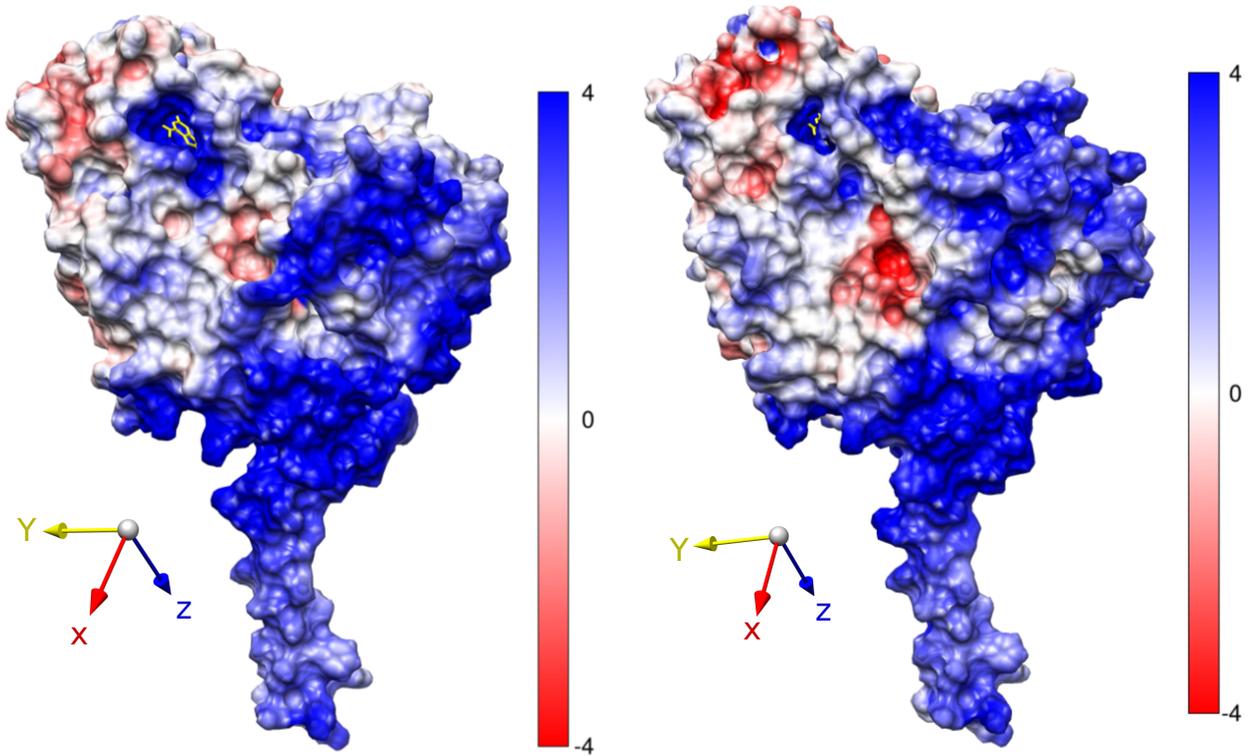
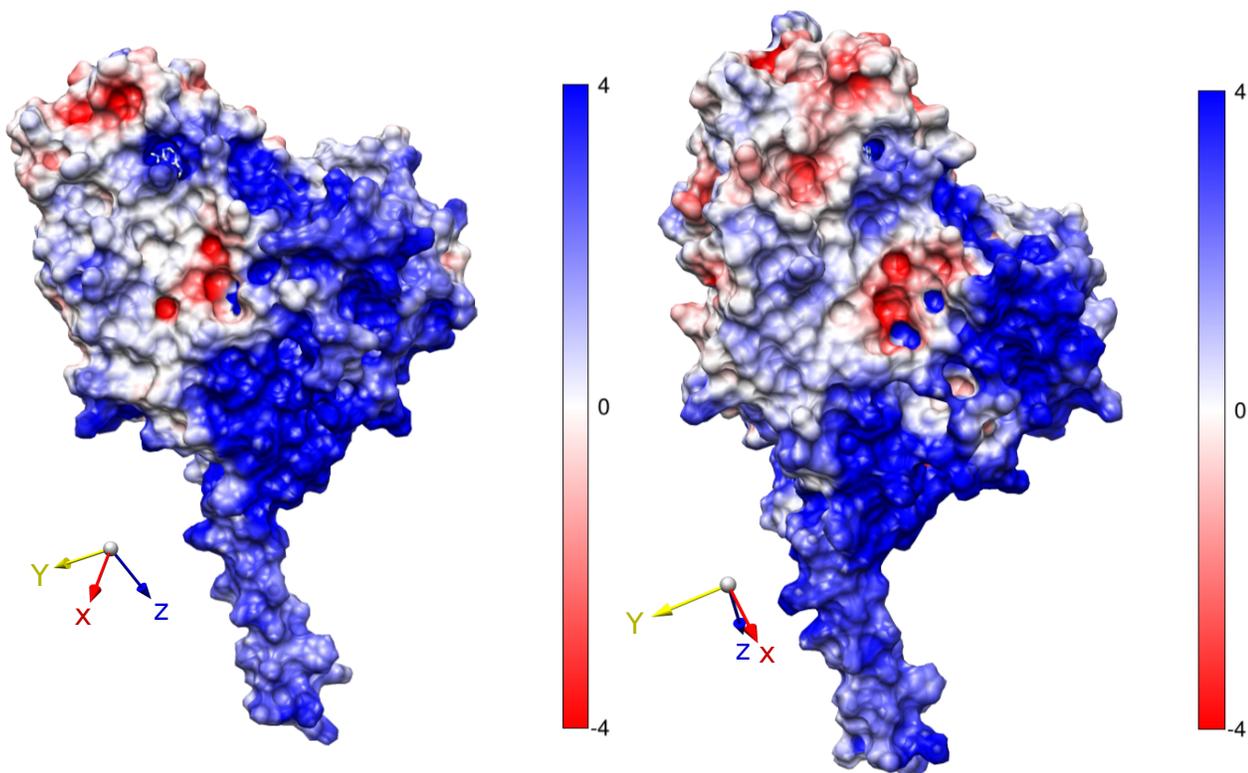


Figura 5.12: Campo electrostático de la proteína durante la simulación - Frente. Durante la simulación la proteína presentó cambios conformacionales en su estructura, por lo que para poder presentar estas imágenes se modificó su orientación. Este cambio se ve representado en la rotación de los ejes en cada figura.



(a) A los 0 [ns]

(b) A los 3.4[ns]



(c) A los 6.8[ns]

(d) A los 10[ns]

Figura 5.13: Campo electrostático de la proteína durante la simulación - Reverso. Durante la simulación la proteína presentó cambios conformacionales en su estructura, por lo que para poder presentar estas imágenes se modificó su orientación. Este cambio se ve representado en la rotación de los ejes en cada figura.

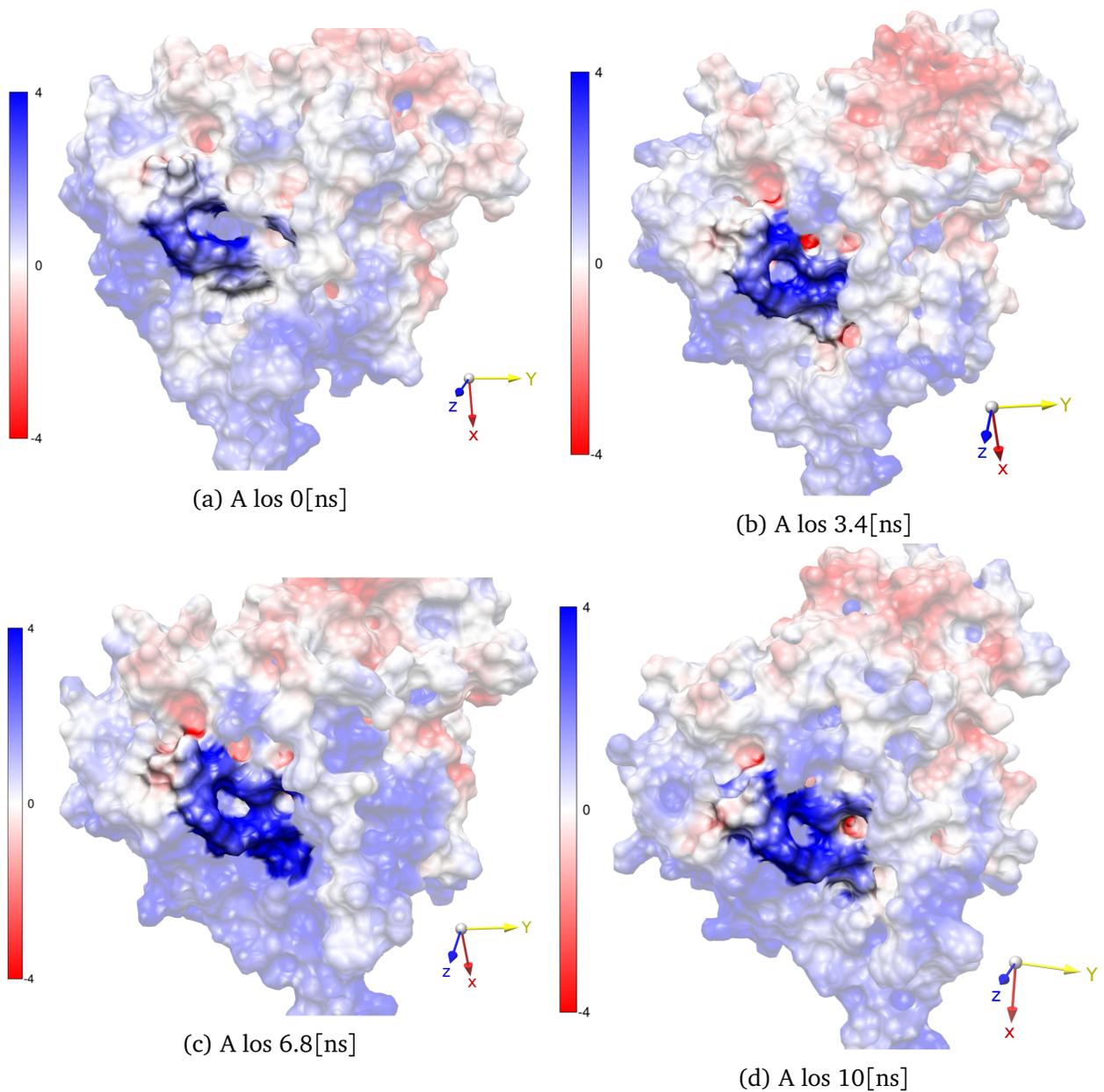


Figura 5.14: Campo electrostático en el sitio activo durante la simulación. Durante la simulación la proteína presentó cambios conformacionales en su estructura, por lo que para poder presentar estas imágenes se modificó su orientación. Este cambio se ve representado en la rotación de los ejes en cada figura. La estructura sobresaliente de carga neutra en el lado superior izquierdo de la entrada está conformada por las cadenas laterales de SER-94 y GLU-95.

En base a los campos electrostáticos presentados en las páginas anteriores, correspondientes a distintos momentos durante el desarrollo de la simulación, se pueden reconocer ciertas distribuciones de carga que se mantienen durante toda la trayectoria.

Por un lado, en la cara “frontal” de la proteína (Ver Figura 5.12), en la zona superior de la estructura se puede reconocer un área de carga negativa, donde en general la intensidad aumenta en la zona superior derecha, a pesar de que también se observen valores neutros o

ligeramente positivos. En la zona inferior, en la región de anclaje a la membrana, se distingue un campo de carga positiva que primero disminuye su intensidad hasta ser neutro y luego vuelve a aumentar en los últimos aminoácidos.

En la zona intermedia de la estructura se puede identificar un área de carga positiva de magnitud variable que se ve interrumpida en el centro por una franja delgada de menor intensidad o de carga neutra. Esta franja se puede apreciar de mejor manera en la Figura 5.12c y corresponde a la cadena de aminoácidos 481-491 que luego continua como la zona de inserción a membrana C-Terminal.

Por otro lado, en la cara “reversa” de la proteína (Ver Figura 5.13) se observa que la estructura posee carga intensamente positiva, especialmente en la zona derecha (correspondiente al área izquierda de la cara “frontal”), la cual disminuye su carga en el espacio inter-membrana, pero aún así permanece positiva. El área derecha de la proteína es mayormente neutra o ligeramente negativa dependiendo de la etapa de la trayectoria, sin embargo se puede identificar un cluster negativo en la estructura que, a pesar de variar en intensidad durante la simulación, permanece presente.

El cluster corresponde a los aminoácidos 183-185, 188, 300-302, 355, 398, 399, que ya sea por sus cadenas laterales o por el oxígeno de su cadena peptídica, en conjunto mantienen un grupo de carga negativa que rompe con el campo neutro de su izquierda y positivo en su derecha.

En cuanto al sitio activo, en la Figura 5.14 se puede ver que éste pertenece a la zona intermedia positiva del campo electrostático. Sólo en el estado inicial (antes de comenzar con las simulaciones) se observan zonas neutras justo en la entrada al canal, en todas las otras etapas de la trayectoria se observa que éste se encuentra rodeado por un campo electrostático positivo de baja intensidad que no alcanza los niveles observados en la cara reversa de la proteína.

A pesar del campo electrostático positivo en la entrada a la cavidad, se observa un cluster de aminoácidos en la zona superior izquierda de la entrada correspondientes a la cadena de aminoácidos 92-95, que durante toda la simulación mantienen una carga neutra o levemente negativa. La posibilidad de que ésta sea una vía de acceso para el sustrato se discute en la siguiente sección.

Capítulo 6

Discusión

6.1. Velocidades de simulación

A partir de las velocidades registradas en la Figura 5.1 se ve que utilizando *sander* las mayores velocidades se obtienen con 8 y 16 CPU's. Esto se puede deber a que el clúster está diseñado con 10 nodos con 8 CPU's cada uno, lo que quiere decir que al simular utilizando un nodo completo se alcanza la mayor cantidad de hardware disponible sin tener que compartir y transferir datos a otro equipo; en caso contrario, la transferencia de datos implica un costo extra de tiempo que disminuye la velocidad de simulación, por lo que se puede considerar una etapa limitante en este proceso.

Por otro lado, en la Figura 5.1 se puede ver que Amber no presenta un rendimiento creciente con respecto al número de nodos, el aumento de velocidad sólo llega a un peak, que en el caso de *sander* bajo las condiciones del equipo, fue a 16 CPU's.

Utilizando el programa especializado para trabajar en paralelo, *pmemd*, se ve un aumento de las velocidades alcanzadas, las cuales luego de las modificaciones al hardware aumentaron desde un máximo de 0,82[ns/día] con 16 CPU's a 1.01[ns/día] con 24 CPU's (Ver Figura 5.1). Ésto demuestra que independientemente de la capacidad del hardware que se posea, es muy importante utilizar herramientas acordes para la transferencia de datos entre CPU's, ya que esto permite reducir esta etapa limitante, de la que depende el tiempo que finalmente demorará desarrollar las simulaciones.

Una velocidad alta de simulación ayuda al estudio de moléculas de mayor tamaño (mayor cantidad de átomos), ya que por cada partícula en el sistema se deben realizar más cálculos que requieren de cierto tiempo, extendiendo la duración de la simulación. En este caso se está trabajando con una proteína de más de 500 residuos, cada uno con sus propios átomos, en que además se está utilizando solvente explícito por lo que la celda de simulación se encuentra repleta de moléculas de agua, aumentando la cantidad de cálculo que se debe realizar.

Es por eso que se realiza este estudio, que permite conocer cómo se desenvuelven los programas de simulación de la suite Amber 12 en el hardware disponible, ya que la eficiencia variará según las herramientas que posea cada usuario. Así, se puede conseguir el máximo provecho de las condiciones que se disponen, alcanzando velocidades de simulación más altas y reduciendo el tiempo de cálculo de esta dinámica.

6.2. Simulación Molecular

A partir de los gráficos entregados en el Apéndice D, se puede ver que las propiedades características de la dinámica molecular (Temperatura, Presión, Energía, Volumen y Densidad) se comportan de manera estable, por lo que se considera que la simulación de la trayectoria observada se pudo desarrollar bajo las condiciones impuestas (Apéndice C).

Esto también se corrobora por los perfiles presentados por el RMSd y el Radio de Giro. Éste último se mantiene constante, indicando que a pesar de la facilidad de movimiento mostrado por la proteína durante la dinámica (Ver Figura 5.2) su compactación no varía, manteniendo un contacto similar entre todos los aminoácidos.

En el caso del RMSd se observa que la estructura presenta dos ligeras variaciones: una a los 5[ns], que luego vuelve a un relativo equilibrio; y la segunda a los 9[ns], que alcanza aproximadamente los 3[Å] y se puede asociar al giro que presenta la zona superior de la proteína (Ver Figura 5.2b). Variaciones de este orden de magnitud se han visto en otras simulaciones de larga duración, como en [60,61].

A pesar de estas fluctuaciones en el RMSd, en que la de mayor magnitud se da al final de la dinámica, la compactación y las características de la simulación no se vieron afectadas, lo que demuestra que sí se puede considerar esta trayectoria como base para el estudio del campo electrostático y su capacidad ácido/base.

En cuanto al giro presentado por la proteína al final de la simulación, hay que considerar que la zona inferior de la proteína se encuentra restringida para representar el comportamiento de ésta al estar inserta en la membrana lipídica. Sería interesante realizar simulaciones de mayor tiempo para ver si la estructura de la proteína vuelve a su posición original, demostrando que este movimiento se podría deber a una gran flexibilidad (que la proteína pueda moverse fácilmente y volver a su posición original sin perder su estructura), o si quizás la estructura se mantenga debido a una interacción con la membrana.

Ésta posibilidad podría ser estudiada más a fondo realizando simulaciones que consideren la membrana lipídica, para incluir los efectos estéricos y electrostáticos de ésta en la movilidad de la molécula. Esto sería especialmente recomendable, ya que además estudios indican que la presencia de la membrana permite conformaciones en la región de entrada del sustrato que ayudan en su ingreso, lo que se ve en desmedro en experimentos de la proteína en solitario [26].

En cuanto a la rigidez de movimiento dada por los aminoácidos de la estructura de la proteína, la región exterior de la membrana se encuentra “sujeta” a la región de anclaje sólo

por una cadena, con la que interacciona para mantener su estructura erguida. Los puntos que permiten el giro en la estructura se encuentran en esta cadena, la cual casi no posee aminoácidos que le aporten rigidez (sólo una prolina en la zona horizontal), por lo que no es extraño que ocurra este movimiento. En la siguiente figura se puede observar este residuo y las zonas que interaccionan con la cadena de anclaje.

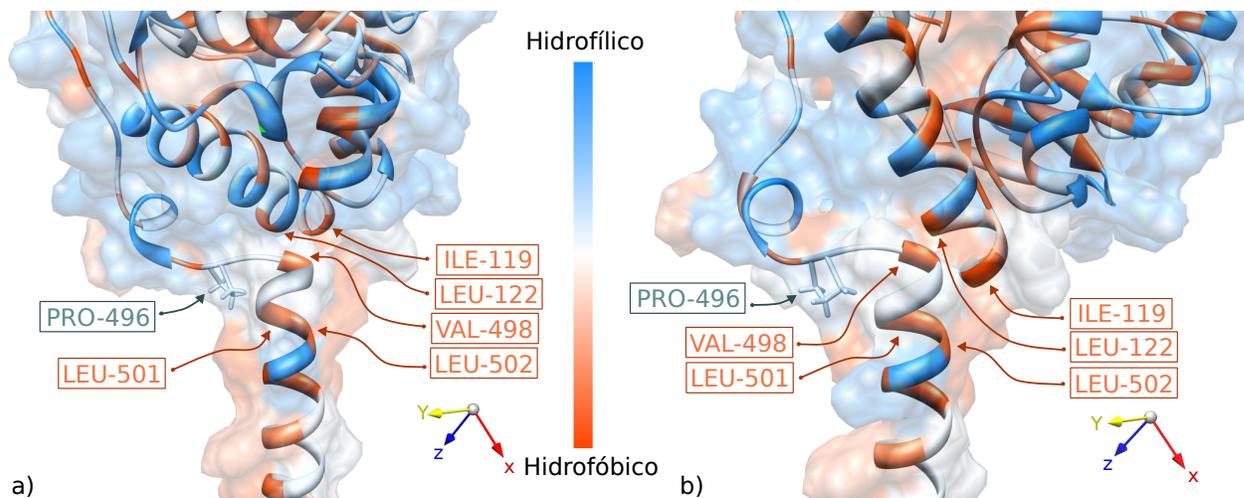


Figura 6.1: Disposición estructural de la zona de interacción de la cadena de anclaje y la región extra-membrana. *a) Estructura al inicio de etapa de producción, la región extra-membrana se encuentra sobre la cadena horizontal en la que se encuentra PRO-496. b) Estructura a los 10[ns] de simulación, los aminoácidos ILE-119 y LEU-122 de la hélice de la región extramembrana se acercan a los residuos VAL-498, LEU-501 y LEU-502. PRO-496 es el único aminoácido rígido que se reconoció en esta zona de la estructura.*

Debido al movimiento que presenta la hélice de la región extra-membrana que se observa en la Figura 6.1, en que en la estructura final posee más interacciones que en la estructura inicial, y considerando que los aminoácidos involucrados son mayormente hidrofóbicos, podría esperarse que más adelante en el tiempo estas interacciones mantengan esta posición y la proteína no vuelva a su forma erguida inicial, ya que así se evitan la cercanía de las moléculas de agua que se encuentran alrededor.

Por último, es interesante notar que los resultados del RMSd realizado con respecto al inicio de la trayectoria (en la etapa de calentamiento), son muy similares a los que fueron hechos con respecto a la estructura cristalina. Esto demuestra que en las etapas de minimización no se tuvo que realizar mayores cambios en su estructura para llevarla a un estado de menor energía.

6.3. Caracter ácido/base

6.3.1. Estabilidad

A partir de la Figura 5.5 y la Tabla 5.2 se pueden reconocer los aminoácidos que frecuentemente presentaron variaciones relevantes de pKa (mayor a una unidad) a través del tiempo. Algunos de estos aminoácidos también presentaron variaciones de pKa entre estados de más de 4 unidades como es el caso de LYS-218 (con el valor mayor) y un conjunto de tirosinas. Como se comenta en resultados, estos valores además presentan desviaciones estándar altas (cercanas a 1).

Sin embargo, es interesante resaltar que ambas formas de análisis de resultados no significan lo mismo. Esto se puede observar en un caso llamativo presentado por TYR-309: cuya frecuencia de variación es la más baja entre los 12 aminoácidos y su variación máxima entre estados también es relativamente menor, sin embargo su desviación estándar es de 1.49, el tercer valor más alto.

Lo que se reconoce viendo la Figura 5.5 y la Tabla 5.2 es si la variación entre estados “en el tiempo” es o no brusca, notándose si se mantiene o no un tipo de tendencia relativa y continua (independiente de si no se mantiene creciente o decreciente), a diferencia de la desviación estándar que muestra la dispersión de los valores con respecto a su promedio. En el caso de TYR-309, se puede observar que apesar de no presentar cambios bruscos de pKa a través del tiempo, sí muestra valores de pKa bastante lejanos al promedio total en la simulación.

En base a estos resultados se puede reconocer que el resto de los aminoácidos, los que no se incluyen en entre los 12 mencionados anteriormente, no presentan grandes variaciones de su pKa en el tiempo y en general tampoco muestran grandes desviaciones de su pKa promedio, como se puede observar en el Apéndice E, donde sus desviaciones estándar se mantienen menores a 1. Entonces, estos se pueden considerar “estables” durante toda la trayectoria, manteniendo su capacidad de ceder o captar protones durante toda la simulación (independientemente de cuanto tiempo comprenda).

En cuanto a por qué los otros 12 aminoácidos se muestran inestables, el valor de pKa de cada residuo está conformado por las interacciones (o aportes) que tiene éste con los aminoácidos de su entorno. Los aportes realizados para la formación del pKa de los residuos mencionados anteriormente se muestran en el Apéndice F. Así en el caso de la lisina 218, se puede ver que los aspartatos y las tirosinas 69 y 89, presentan la mayor influencia para el cambio del pKa, específicamente por sus interacciones coulombicas (Ver disposición espacial en Figura 5.6).

En la Figura 6.2 se observa la posición que presentan los iones carboxilo de los aspartatos y los oxígenos del grupo fenólico de las tirosinas, con respecto al grupo amino de la lisina 218. Esta gran cercanía influye aumentando hasta en 8 unidades su pKa debido a las interacciones coulombicas que son dependientes a la movilidad que posea cada molécula. En el caso de los aspartatos, debido a su menor tamaño y a la movilidad de los oxígenos del grupo carboxilo, presenta más posibilidades de variar su ubicación, a diferencia de las tirosinas en que su grupo fenólico tiene mayor impedimento estérico y su oxígeno no posee movilidad independiente.

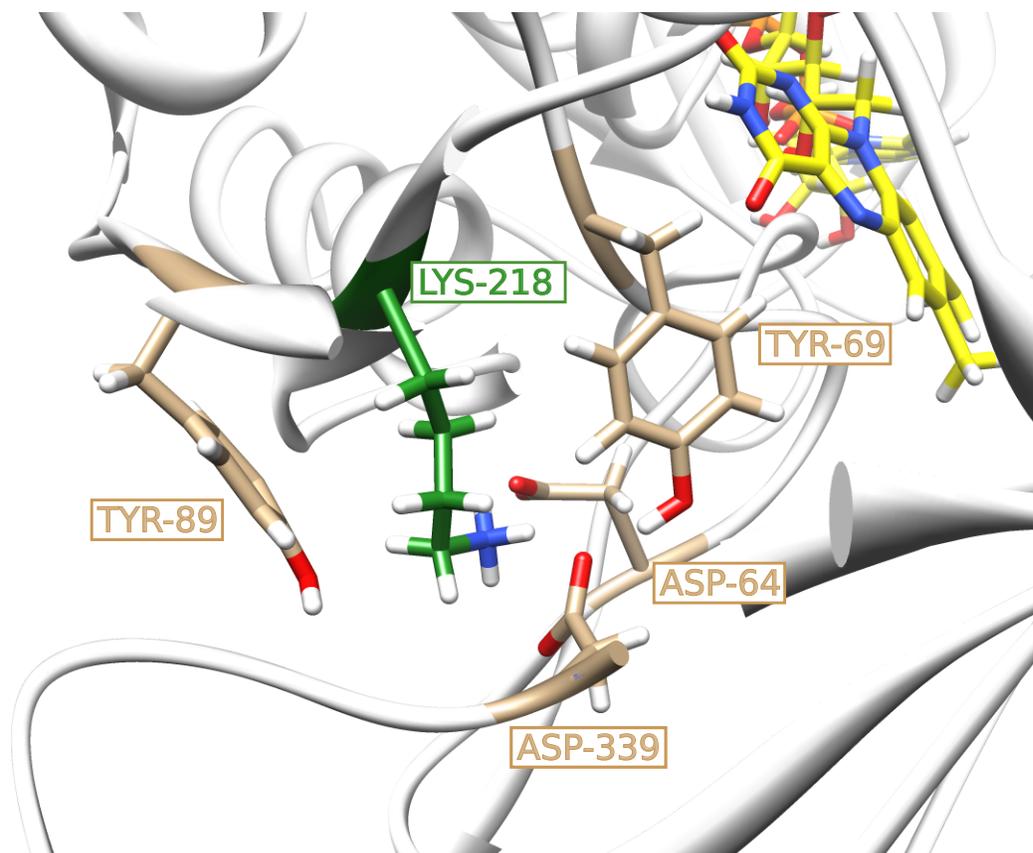


Figura 6.2: Átomos importantes en las interacciones de LYS-218 con su entorno. La coloración de esta imagen indica en **azul** al átomo de nitrógeno de LYS-218 y la cadena peptídica de los otros aminoácidos (correspondiente a la Figura 5.6); en **rojo** los oxígenos de los aspartatos y las tirosinas; en **verde** la cadena peptídica de LYS-218 (correspondiente a la Figura 5.6); en **amarillo** el cofactor FAD.

Esto también explica las grandes variaciones en el pKa que presentan las moléculas en el entorno de la lisina, que también se ven afectadas por estas interacciones.

De los 12 aminoácidos identificados, las tirosinas 407 y 444 se encuentran en el interior del sitio activo, junto al cofactor FAD, con el que forman la llamada “caja aromática” planteado por De Colibus *et al.* (2005) [24], Edmondson *et al.* (2007) [19] y Geha *et al.* (2002) [25]. Las influencias en el pKa de estos aminoácidos son mayormente interacciones coulombicas por tirosinas y cisteínas cercanas, cuyos átomos de oxígeno en los grupos fenólicos y de azufre en el grupo tiol aumentan su pKa. Si bien no se incluyen las posibles interacciones dadas por el cofactor, debido a la imposibilidad de su reconocimiento con el programa de cálculo, se cree que gracias la disposición espacial de los aminoácidos, sus grupos fenólicos se encuentran alejados de los anillos pertenecientes la flavina y no se deberían realizar al menos puentes de hidrógeno entre ellos que afecten sus pKa.

6.3.2. Comparación pre y post simulación

La diferencia entre los pKa de la estructura cristalina y los observados en la proteína resultante de la simulación ($pK_{a_{prom}}$) es que se realizaron las etapas de minimización, calentamiento y equilibrio de por medio entre ellas. Ésto significa que primero se realizaron ligeros cambios conformacionales para estabilizar a la molécula en una posición de menor energía, luego se desarrollaron 60[ps] aumentando su temperatura y se dejaron otros 200[ps] para relajar la estructura. Si se considera el tiempo total que comprenden estas dos últimas etapas (0.26[ns]), esto equivale a tiempo muy pequeño en comparación a los 10[ns] de producción, por lo cual incluso podría considerarse despreciable.

Ademas, en cuanto a la etapa de minimización, se puede entender que no ocurrieron cambios conformacionales trascendentales para las variaciones de pKa observadas, ya que como muestra en la Figura 5.3, las estructuras antes y después de la minimización fueron utilizadas como referencia y presentaron perfiles de RMSd similares en cada etapa de la trayectoria.

Esto muestra que es probable que la mayor parte de los cambios se realizaran durante la etapa de producción, ya que en ella transcurrió una mayor cantidad de tiempo donde las cadenas laterales de la proteína fueron modificando sus posiciones. Si bien, para realizar esta comparación se utilizó un valor promedio para representar el comportamiento de la proteína, durante los 10[ns] de trayectoria se formaron diferentes conformaciones que quedan representadas por la desviación estandar de los datos y estos modifican el valor del pKa.

A pesar de ello, la mayor parte de los residuos no presentan variaciones en su pKa mayores a 2 unidades (ver Figura 5.7), lo que se puede entender como que el comportamiento de la mayor parte de los aminoácidos durante la simulación es similar al de la estructura cristalina y a lo que se observa experimentalmente.

Por otro lado, es interesante notar que sólo 3 de los 12 aminoácidos mencionados en la Sección 6.3.1 (LYS-218, TYR-392 y TYR-444) presentan también una gran variación de pKa con respecto a la estructura cristalina. Esto se puede significar que los cambios conformacionales ocurridos durante los 10[ns] en estos aminoácidos son lo suficientemente marcados para modificar su capacidad ácido/base inicial, a diferencia de lo que ocurre con los otros 9 aminoácidos que apesar de sus grandes fluctuaciones, mantienen un pKa promedio similar al inicial.

6.3.3. pKa relevante

Como se menciona en los resultados, para que un aminoácido tenga la capacidad para retirar el protón del sustrato es necesario que posea un pKa mayor a éste. Mientras más tiempo mantenga estos valores de pKa, su capacidad para captar el protón será más prolongada. Sin embargo, 27 de los 95 aminoácidos que cumplieron este criterio no siempre alcanzan el pKa necesario, como se puede ver en la Tabla 5.3.

Una razón por la que puede ocurrir esto, es debido a que la naturaleza del aminoácido hace que su pKa sea bajo. Esto provoca que debido a algunas interacciones más fuertes con su

entorno su pKa puede aumentar y superar el valor del sustrato, pero luego puede volver a bajar, manteniéndose más frecuentemente de esa forma. Según los valores que utiliza propKa [45] como pKa propio de cada aminoácido (“pKa estándar”), sólo las cisteínas (pKa=9) tienen un pKa estándar bajo el valor de la serotonina, mientras que las tirosinas (pKa=10) tienen un pKa 0.3 unidades sobre el sustrato. Esto podría explicar el comportamiento de las cisteínas CYS-398 y CYS-321 (en especial esta última que debido a su entorno presenta un pKa promedio igual a 7.9), y las infrecuentes disminuciones de pKa que muestran la mayor parte de las tirosinas, además de TYR-419 que gracias a las interacciones con sus aminoácidos cercanos presenta un pKa mínimo de 8.97.

Además, es llamativo que gran parte de estos aminoácidos sean lisinas y que todas, incluso las que superan el pKa del sustrato pocas veces, posean pKa promedio mayor a 9 (ver Apéndice E). Esto podría ocurrir gracias a que muchos de los valores, si bien no alcanzan el pKa de la serotonina, se encuentren agrupados dentro del rango 9-9.97, haciendo que esto se refleje en su promedio.

Por otro lado, todos estos aminoácidos no presentan grandes fluctuaciones de pKa entre estados, lo que significa que las disminuciones en su pKa no se dan bruscamente en el tiempo si no que ocurren siguiendo un comportamiento mantenido. En el otro caso, los residuos básicos que anteriormente fueron considerados “inestables” por sí presentar cambios bruscos en su pKa en el tiempo, varían en valores suficientemente altos como para no traspasar el pKa del sustrato.

Entonces, frente a esta situación se puede ver que varios de estos aminoácidos no superan el pKa del sustrato la mayor en parte de la simulación, así que no presentarían una capacidad suficiente como para ser candidatos de captar su protón. Entre estos se incluyen: LYS-280, ARG-291, CYS-321, LYS-341, LYS-357 y LYS-440. Además, si los residuos alcanzan valores mínimos menores a 9 y no presentan cambios bruscos de pKa, significa que su capacidad básica también se verá muy disminuida y pueden descartarse como candidatos para captar el protón del sustrato, como ocurre con LYS-395 y TYR-419.

Cambiando el punto de análisis a los resultados obtenidos en la superficie y en la cavidad del sitio activo, se decidió realizar los estudios utilizando el valor máximo observado de los pKa (pKa_{max}) en vez de el valor promedio (pKa_{prom}). Esto fue debido a que para reconocer los aminoácidos que puedan desprotonar al sustrato es importante destacar a los que muestren la capacidad más alta para captar su protón, lo cual se puede reconocer en base a su pKa_{max} . Sin embargo, este parámetro también se debe contrastar con la desviación estandar de los aminoácidos encontrados y con su pKa_{prom} para analizar si su gran pKa observado se debe a una situación fugaz dada en la simulación o si es un comportamiento más estable.

Entonces, mientras más alto sea su pKa, más posibilidades tendrían de captar el protón del sustrato en caso de interacción lo que los hace candidatos como sitios de desprotonación. Como se menciona en los resultados (ver Sección 5.3.3.1), los aminoácidos que muestran alguna participación en la superficie y cumplen con esto son: TYR-89, TYR-309, TYR-310, TYR-392 y ARG-79. Sin embargo, como se discute en la Sección 6.3.1, todas estas tirosinas fueron consideradas de pKa “inestable”, ya que presentan una gran variación en sus resultados, sin mantener un comportamiento entre estados a través del tiempo y mostrando una gran dispersión de los datos, por lo que no deben ser consideradas como candidatos confiables.

Por otro lado, como se comenta en el párrafo siguiente a la Figura 5.10, ninguno de los aminoácidos encontrados junto a la entrada del sitio activo poseen valores de pKa altos aunque se encuentren mayormente por sobre el pKa del sustrato. Esto si bien disminuye sus posibilidades de desprotonarlo, no significa que estén impedidos de hacerlo ya que de todas formas tienen una mayor capacidad para captar su protón. En este caso toma especial importancia la posibilidad de interacción que exista entre el sustrato y los aminoácidos: entre todos los residuos identificado sólo ARG-109 y LYS-90 podrían efectivamente tener contacto con el sustrato cuando éste ingresa directamente hacia el sitio activo.

En el caso de la cavidad de entrada hacia el sitio activo, en los resultados se identificó que la mayor parte de estos eran hidrofóbicos, como también se ha reportado que ocurre en el sitio activo en otros estudios [24], por lo que en esta región estructural casi no se encuentra capacidad suficiente para desprotonar al sustrato. Entre los únicos aminoácidos encontrados está CYS-323 y las tirosinas TYR-407 y TYR-444.

Entonces, recopilando toda la información, de acuerdo a la orientación que tiene cada aminoácido en la estructura de la proteína, los residuos que podrían ser candidatos para desprotonar al sustrato de acuerdo a su capacidad básica para retirar el protón son ARG-79, LYS-90 y ARG-109 en la superficie, y CYS-323, TYR-407 y TYR-444 en cavidad/sitio activo. Sin embargo, esto se reduciría a los cuatro primeros residuos si se incluyen sólo los valores que no presentan grandes fluctuaciones (valores “estables”) durante la simulación.

6.4. Campo electrostático

La proteína muestra un campo electrostático que mantuvo ciertas tendencias en sus características durante toda la trayectoria, específicamente en 3 zonas de la cara “frontal” (ver Figura 5.12), donde está la entrada reportada al sitio activo, y 2 zonas en la cara “reversa” (ver Figura 5.13).

Estas distribuciones de carga pueden tener una explicación funcional. La gran área de campo electrostático negativo/neutro en la zona superior de la proteína permite la atracción de los sustratos protonados desde el seno de la célula. Considerando que la enzima MAO-A oxida moléculas que en gran parte son básicas, como los neurotransmisores que se muestran en la Tabla 3.1 (ver Capítulo 3), a pH fisiológico estados se encuentran protonados y es muy útil que la región estructural que da hacia el seno de la célula posea una carga negativa para atraerlos.

Por otro lado, el campo positivo en la zona intermedia de la proteína puede ayudar en su interacción con la membrana lipídica mitocondrial. Ésta posee una superficie polar negativa debido a los grupos fosfato de sus fosfolípidos, por lo que la distribución de carga positiva en las regiones de la proteína que interactúan con ella afianza el anclaje de ésta. Esto también explicaría la carga positiva que presentan los aminoácidos finales de la región inferior de la proteína, los cuales deben interactuar con la cara interna de la membrana mitocondrial.

Un caso fuera de lo esperado se observa en esta última región, en que el campo electrostático de la proteína dentro de la zona intermembrana, presenta una carga ligeramente positiva.

Esto es llamativo debido a que la zona interior de la membrana lipídica está conformada por ácidos grasos, los cuales son apolares, y por lo tanto presentarían una mejor interacción con aminoácidos de carga neutra. Sin embargo, existen reportes previos de proteínas de intermembrana en las que se reconocía la presencia de aminoácidos cargados positivamente en esta zona y no presentaban problemas para el anclaje de esta en la membrana mitocondrial. [62]

En cuanto a la cara reversa de la proteína, se consideran diferentes opciones por las que ésta presenta una distribución tan alta de carga positiva. Una razón es que podría ayudar a repeler a los sustratos protonados de esta región y de esta forma las moléculas sólo interaccionarían con la zona superior o la cara frontal de la enzima. La otra opción es que la carga positiva permita una mejor interacción de esta parte de la estructura con la membrana mitocondrial, lo que permitiría dejar más despejada la cara frontal de la proteína, especialmente las regiones de carga negativa/neutra, hacia el seno de la célula, interactuando con el solvente y atrayendo a los sustratos. Para clarificar esta situación se podría continuar este estudio realizando una simulación de la proteína inserta en la membrana lipídica.

Por otro lado, dejando de lado el análisis funcional de la distribución de carga, en base a los resultados observados se puede ver que la entrada al sitio activo de la proteína es mayormente positiva, por lo que podría repeler al grupo amino protonado del sustrato. Sin embargo, en la Figura 5.14 se puede notar que esta carga no posee una alta intensidad por lo tanto podría no ser suficiente para mantener alejado al sustrato protonado de esta estructura. Además se reconocen al menos dos zonas cercanas de carga neutra/negativa las cuales podrían servir como paso para el acercamiento del sustrato: una de estas es la cadena que continúa la región de anclaje a la membrana y la segunda corresponde al lazo 92-95, las cuales se discutirán a continuación.

La primera zona, debido a su carga relativamente neutra, podría permitir el paso de la serotonina protonada desde la región superior de la proteína hasta quedar a la misma altura que la entrada sitio activo, sin embargo ésta se encuentra a cierta distancia de la cavidad y gracias al movimiento estructural de la proteína durante la simulación esta cadena no permanece junto a la entrada al sitio activo, por lo que sería recomendable ver que posición adopta esta estructura cuando se incluye en la dinámica molecular la membrana lipídica. Por otro lado, en esta cadena no se encuentran aminoácidos que posean un pKa alto, pero en el área superior de ésta se encuentran los aminoácidos ARG-79 y TYR-89, algunos de los que fueron reconocidos por tener gran capacidad para captar protones y donde está uno de los candidatos para realizar la desprotonación del sustrato, por lo que también es una opción que esta estructura podría ejercer como paso del sustrato desprotonado, hasta cercanías de la entrada al sitio activo.

La segunda zona corresponde al primero de los 3 lazos propuestos por Sonet *al.* [26] como parte de la entrada hacia el sitio activo. Debido a la carga neutra de estos aminoácidos, en particular de SER-94 y GLU-95, el sustrato protonado podría alcanzar directamente la entrada por esta área sin presentarse algún rechazo electrostático. A pesar de que el único residuo que presenta pKa en este lazo es GLU-95, mostrando mayor tendencia a ceder protones (como se ve reflejado en la ligera carga negativa que muestra su superficie), al rededor de esta estructura se encuentran los aminoácidos LYS-316, LYS-90 y ARG-109, todos ellos con pKa mayor al del sustrato y donde se encuentran dos de los residuos candidatos para desprotonar el sustrato. De esta forma, esta zona podría servir como paso para la serotonina para ser desprotonada sin

verse tan afectada por el campo de carga positiva de la entrada al sitio activo.

Analizando ahora los aminoácidos superficiales considerados como “candidatos” para desprotonar al sustrato, se puede reconocer que el residuo ARG-79, el cual muestra de forma permanente la capacidad más alta de captar el protón, posee un campo electrostático negativo (conformado por la estructura no amino de su cadena lateral), el cual podría ser muy útil para atraer al sustrato. Por otro lado, los aminoácidos LYS-90 y ARG-109 poseen campos electrostáticos de carga positiva, por lo que no podrían atraer por sí mismos al sustrato protonado, y por lo tanto deberían recibir ayuda de otros aminoácidos para acercarse al sustrato.

6.5. Posibles sitios de desprotonación del sustrato

Basándose en la premisa de que se requieren aminoácidos de pKa más alto para retirar el protón del sustrato, la opción principal que se considera como posible sitio de desprotonación es la región superficial de la proteína, ya que en su interior se encuentran residuos mayormente hidrofóbicos, como se ha explicado anteriormente.

En la cara reversa de la proteína, si bien se pudo reconocer un cluster negativo y un área neutra (ver Figura 5.13), se cree que la alta carga positiva que posee el resto de la región haría que el sustrato sea repelido por ésta, siendo poco probable que pueda ser desprotonado, considerando además que sus valores de pKa no son mayores a los observados en la otra cara de la proteína. Por otro lado, el cluster negativo y el área neutra observadas se encuentran en la zona más alejada a la entrada del sitio activo reportado.

En la cara frontal de la proteína, se pueden tomar varios puntos en consideración. Por un lado se tiene el aminoácido ARG-79 en la región superior derecha de la proteína, que como se dijo anteriormente posee un alto pKa y un campo electrostático ligeramente negativo con el cual podría atraer al sustrato para desprotonarlo. Siguiendo a este aminoácido se tiene además la cadena neutra que cruza la proteína hasta la región de anclaje a la membrana, que podría servir como camino a la serotonina desprotonada hasta la altura del sitio activo.

Por otro lado, el área cercana a la entrada al sitio activo si bien posee un campo ligeramente positivo, se encuentra rodeado por aminoácidos con pKa más alto que el del sustrato, que por lo tanto podrían retirar su protón. Pero siendo más estrictos, los únicos residuos que podrían interactuar con él en la entrada debido a su disposición en el espacio serían LYS-90 y ARG-109 (de campo electrostático positivo), aunque entre estos aminoácidos se encuentran SER-94 y GLU-95 que poseen un campo electrostático neutro/negativo que podría actuar como paso para que el sustrato protonado pueda acercarse a la entrada y a ésta potencial área de desprotonación.

Esto deja patente que para que ocurra la desprotonación del sustrato es posible que se vean involucrados varios aminoácidos que no necesariamente aporten con su capacidad de captar protones. Ejemplos de esto podrían ser las estructuras de campo electrostático neutro o negativo que se encuentran en la superficie de la proteína, y podrían ayudar a guiar o situar al sustrato en el lugar correcto para la desprotonación o para entrar al sitio activo.

En cuanto a la otra opción posible para la desprotonación del sustrato, dentro de la cavidad del sitio activo, los aminoácidos que tienen las características suficientes para retirar el protón son TYR-407, TYR-444 y CYS-323. En el caso de este último residuo, si bien posee las características necesarias, se ha reportado en estudios de mutagénesis que no influye en la actividad catalítica [63], por lo que no podría ser necesario para la desprotonación. A partir de este mismo estudio, se ha generado discusión sobre la importancia que posee otra cisteína (CYS-374) que se encuentra en la superficie de la enzima, sin embargo publicaciones más recientes han desmentido que posea un rol trascendental en la actividad catalítica [64], debido a que la proteína generada con una mutación de su codon continúa presentando actividad.

En el caso de las tirosinas, que muestran una gran inestabilidad (es decir grandes fluctuaciones, incluso con respecto a la estructura cristalina) en el valor de sus pKa, éstas tienen como función formar la caja aromática que posiciona el sustrato frente al cofactor FAD y luego potenciar el ataque nucleofílico durante la catálisis [65]. Se sabe que para que esto ocurra, el grupo amino del sustrato ya debe estar neutro, por lo tanto la desprotonación debe ocurrir antes de que el sustrato llegue a estas estructuras.

Sería muy recomendable desarrollar un próximo estudio que incluya la molécula FAD en el cálculo del pKa, para ver si éste podría aportar directamente en la desprotonación del sustrato o efectivamente influenciar el carácter de los aminoácidos cercanos, como en la estabilización del pKa de las tirosinas 407 y 444. Actualmente, aún con el software propKa 3.1 no fue posible incluir esta variable en los cálculos masivos de datos a pesar de que se realizaron diferentes intentos.

Cambiando el punto de vista, se puede considerar otra premisa, que también es factible, para que ocurra la desprotonación del sustrato. Como se ha visto en este estudio, la capacidad que posee una molécula para retener o liberar un protón se ve muy influenciada por las interacciones de ésta con su entorno. Por lo tanto, puede que la influencia del campo electrostático y las interacciones de la proteína generen una variación en el pKa del sustrato, especialmente si según se ha reportado, el sustrato protonado presenta gran interacción con los residuos de la entrada al canal [38]. Esto significaría que gracias a esta influencia, el sustrato podría volverse menos básico y perder su capacidad para mantener el protón, quedando el grupo amino neutro sin que tenga que actuar directamente la capacidad básica de un aminoácido para captar su protón.

Por esta razón sería interesante continuar con este estudio realizando docking del sustrato con la proteína en sitios cercanos al canal de entrada, para analizar en estas conformaciones el pKa del ligando dadas las nuevas interacciones y el campo electrostático en su conjunto. De esta manera también se podría comprobar cómo afecta la carga positiva de la entrada al sustrato protonado.

6.6. Trabajo realizado, futuro y enfoque del proyecto

La trayectoria dada en esta simulación fue realizada en base a velocidades iniciales aleatorias dadas por el software [66]. Por ello, si se repitiera esta dinámica molecular lo más probable

es que se desarrollara otra trayectoria que sólo podría ser comparable con ésta desde un punto de vista global.

Es por eso que el fin de esta dinámica es ver posibles conformaciones en la estructura que cambien las características electrostáticas de la proteína como también ocurre en la realidad, y por eso no se debe dar tanta importancia a situaciones puntuales que ocurren en la trayectoria, si no más bien tener una idea del comportamiento global o las tendencias que se muestren. Así que ésta fue una de las razones por las que para el análisis de este estudio se consideraron valores promedio, desviaciones estándar y máximos para definir las tendencias presentadas.

El desarrollo de este trabajo incluyó el uso de una batería de softwares especializados, el manejo de una gran cantidad de datos, el desarrollo de herramientas que permitieran filtrar la información importante y la mostraran de una forma adecuada, y el entendimiento para analizar esos datos. Para lograr esto fue muy útil el uso en conjunto de conocimiento especializado en el área, habilidades computacionales, algorítmicas y matemáticas.

Por otro lado, el siguiente paso con que se debería continuar esta investigación es la validación de los resultados y las ideas propuestas en este trabajo. Esto se puede realizar en laboratorio, mediante la mutagénesis dirigida de los aminoácidos presentados y un estudio de la actividad catalítica de las proteínas mutantes. La corroboración de la transcripción del mRNA y la expresión de las proteínas modificadas podría desarrollarse por las técnicas de Northern Blot y Western Blot, respectivamente. También sería importante asegurar que el potencial efecto que pudieran tener estos aminoácidos no se debiera a cambios en la conformación estructural de la proteína.

Las modificaciones se podrían aplicar a los residuos LYS-90 y ARG-109, a la vez y por separado, para verificar la influencia en específico y en conjunto de estos aminoácidos. Y además, realizar una modificación aparte para ARG-79.

Sería recomendable utilizar un aminoácido sustituto apolar, para que no posea capacidad de interactuar con el protón del sustrato, y de configuración estructural parecida a la de los antiguos aminoácidos, para que no influya un tema estérico en la efectividad de la actividad catalítica. Entre los aminoácidos que cumplen estas características están la metionina y la isoleucina, aunque se podría preferir la última por los efectos que pudiera traer el componente azufre de la metionina.

Desde un punto de vista más global, el fin de desarrollar este tipo de investigación es profundizar en un conocimiento puntual sobre la interacción enzima/sustrato, para que la recopilación de estos estudios y otros relacionados se pueda aplicar en la modificación de la vía de degradación de la serotonina, interfiriendo en la relación que se mantiene con la enzima MAO-A. Sería ideal, que a partir de estas líneas de trabajo se pueda encontrar la especificidad única que tiene la proteína con la serotonina, de forma desarrollar fármacos que sólo influyan en esta vía de degradación.

Capítulo 7

Conclusiones

Se investigó el carácter ácido/base de los aminoácidos y las características del campo electrostático de la proteína, por lo que en conjunto se pudo determinar y caracterizar posibles sitios de desprotonación del sustrato.

Se cree que el sitio de desprotonación está en la superficie de la enzima y no en la cavidad del sitio activo ya que éste es en su mayoría hidrofóbico. Además este sitio estaría en la cara frontal de la proteína, ya que la cara reversa posee un campo electrostático positivo más alto que repelería al protón.

Se encontraron dos zonas en la cara frontal donde podría ocurrir la desprotonación del sustrato: en el aminoácido ARG-79 que se encuentra relativamente cerca de la entrada al sitio activo y posee una capacidad de desprotonación estable y muy alta; o los residuos LYS-90 y ARG-109 que se encuentran en la entrada e interactúan directamente con el sustrato cuando éste debe ingresar al canal, estos poseen una capacidad de desprotonación estable aunque no tan alta como la del otro aminoácido.

También se considera importante el aporte que podrían tener otros aminoácidos que aunque no influyan directamente en la desprotonación del sustrato por su capacidad química, podrían ayudar a situar a la molécula en los sitios de desprotonación o en la entrada al sitio activo.

Se considera la opción de que la desprotonación del sustrato ocurra por la disminución de su pKa, debido a las interacciones que éste realice con los aminoácidos de la proteína, por lo que se propone continuar estudiando esta premisa.

Salvo pequeñas excepciones, los valores de pKa estudiados se mantienen estables durante toda la simulación, permitiendo definir su comportamiento en períodos de tiempo más largos.

Los aminoácidos que presentan mayor capacidad para captar protones, en su mayoría no mantienen esta tendencia a lo largo de la simulación, presentando grandes desviaciones estándar en sus valores. Mientras que la mayoría de los aminoácidos con capacidad de captar el protón del sustrato, tienen valores de pKa entre 10 y 15.

La proteína tiene una distribución de carga electrostática que comienza negativa y neutra en la región superior, continúa con carga positiva en la zona intermedia (y en el sitio activo), y termina con una carga positiva de baja intensidad en la región C-Terminal de anclaje a la membrana. Estas configuraciones se pueden asociar al comportamiento funcional de la proteína.

La simulación realizada permite conocer el carácter electrostático y ácido/base de la proteína tanto de forma global, con los campos electrostáticos, como particular, con los valores de pKa de cada aminoácido.

Los cambios conformacionales realizados por las etapas de minimización, calentamiento y equilibrio son muy pequeños en comparación con las variaciones de estructura que ocurren durante la producción de la dinámica molecular, y además los valores de pKa promedio de la mayor parte de los residuos son similares a los de la estructura cristalina.

El desarrollo de este trabajo da pie a una línea de investigación que permita reunir el conocimiento químico y biológico de la interacción enzima/sustrato de la proteína MAO-A. Estos resultados se podrían aplicar en la modificación de la vía de degradación de la serotonina, por medio de fármacos que interfieran en su relación con la enzima MAO-A, desarrollando así antidepresivos específicos para este sustrato.

7.1. Recomendaciones

A continuación se detallan formas en que se podría realizar este estudio, para lograr resultados más representativos, y maneras de continuar con este trabajo a futuro.

Aumentar tiempo de simulación

Este trabajo fue realizado con una simulación de 10[ns] en que se vio una gran flexibilidad de la proteína al final de la trayectoria. Se podría aumentar el tiempo de la dinámica a 20[ns] o más, para asegurar que el movimiento de la molécula se deba a sus propias facultades y no por un problema de estabilidad. Para realizar esto sería recomendable utilizar un hardware capacitado para reducir el tiempo que requiere resolver las ecuaciones del campo de fuerza durante toda la trayectoria.

Simulación con membrana lipídica

Como se ha mencionado, la proteína MAO-A se ubica en la membrana externa de la mitocondria, por lo que sería muy recomendable desarrollar un estudio incluyendo la membrana lipídica para así incluir las interacciones que esta pueda tener con la proteína en el desarrollo de la trayectoria.

Mayor cantidad de simulaciones

En este caso sólo se realizó una simulación. Para utilizar valores más representativos se podría realizar una mayor cantidad de dinámicas moleculares, con lo cual se revisaría si sus resultados muestran algún tipo de tendencia.

Docking

Como se discutió previamente, en base a los resultados obtenidos en esta ocasión se podría utilizar docking para definir conformaciones energéticamente aceptables de la proteína con el sustrato ubicado en las inmediaciones de la entrada al sitio activo, o junto al aminoácido ARG-79. De esta forma se podrían realizar posteriores estudios sobre pKa y campo electrostático.

Estudio del campo electrostático de la proteína con el sustrato

Con las conformaciones entregadas por el docking se podría estudiar por un lado el campo electrostático que presentaría la proteína en conjunto con el sustrato y de esta forma definir si la carga positiva de campo en el área de entrada al sitio activo es suficientemente grande como para repeler al grupo amino del sustrato.

Estudio del carácter ácido/base del sustrato

Utilizando las conformaciones entregadas por el docking mencionado anteriormente, sería muy interesante probar el efecto del entorno en el pKa del sustrato para conocer si éste podría disminuir su capacidad de captar protones y con ello que más fácil para los aminoácidos retirar su protón.

Utilizar serotonina como sustrato

En gran parte de los estudios revisados que se enumeran en bibliografía se analiza el comportamiento de la enzima con otro tipo de sustratos o inhibidores, lo que sí entrega información sobre la proteína pero no se trata del comportamiento específico que presenta con la serotonina. Dado que el fin de este proyecto es buscar nuevos fármacos para la depresión, sería más representativo utilizar este sustrato en los estudios de simulación.

Validación de los resultados

Como ya se discutió en la sección anterior, este estudio basa sus resultados en una simulación computacional desarrollada resolviendo un modelo matemático que se asemeja a la realidad. El próximo paso que se debería desarrollar en esta línea de investigación es un estudio de mutagénesis dirigida al menos a los residuos LYS-90, ARG-79 y ARG-109, con la que se podría validar los resultados obtenidos en este trabajo.

Bibliografía

- [1] M. B. Youdim, D. Edmondson, and K. F. Tipton, “The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 7, no. 4, pp. 295–309, 2006.
- [2] N. Ginovart, J. H. Meyer, A. Boovariwala, D. Hussey, E. A. Rabiner, S. Houle, and A. A. Wilson, “Positron emission tomography quantification of ^{11}C -harmine binding to monoamine oxidase-a in the human brain,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 26, no. 3, pp. 330–344, 2005.
- [3] O. Cases, I. Seif, J. Grimsby, P. Gaspar, K. Chen, S. Pournin, U. Müller, M. Aguet, C. Babinet, J. C. Shih, *et al.*, “Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking maoa,” *Science (New York, NY)*, vol. 268, no. 5218, p. 1763, 1995.
- [4] H. G. Brunner, M. Nelen, P. Van Zandvoort, N. Abeling, A. Van Gennip, E. Wolters, M. Kuiper, H. Ropers, and B. Van Oost, “X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism,” *American Journal of Human Genetics*, vol. 52, no. 6, p. 1032, 1993.
- [5] L. Ellis, “Monoamine oxidase and criminality: Identifying an apparent biological marker for antisocial behavior,” *Journal of Research in Crime and Delinquency*, vol. 28, no. 2, pp. 227–251, 1991.
- [6] J. J. Schildkraut, S. S. Kety, *et al.*, “Biogenic amines and emotion,” *Science*, vol. 156, no. 771, pp. 21–37, 1967.
- [7] J. H. Meyer, N. Ginovart, A. Boovariwala, S. Sagrati, D. Hussey, A. Garcia, T. Young, N. Praschak-Rieder, A. A. Wilson, and S. Houle, “Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression,” *Archives of general psychiatry*, vol. 63, no. 11, p. 1209, 2006.
- [8] V. Krishnan and E. J. Nestler, “The molecular neurobiology of depression,” *Nature*, vol. 455, no. 7215, pp. 894–902, 2008.
- [9] G. V. Carr and I. Lucki, “The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies,” *Psychopharmacology*, vol. 213, no. 2-3, pp. 265–287, 2011.

- [10] J. Sacher, A. A. Wilson, S. Houle, P. Rusjan, S. Hassan, P. M. Bloomfield, D. E. Stewart, and J. H. Meyer, "Elevated brain monoamine oxidase a binding in the early postpartum period," *Archives of general psychiatry*, vol. 67, no. 5, p. 468, 2010.
- [11] A. Pletscher, "The discovery of antidepressants: a winding path," *Experientia*, vol. 47, no. 1, pp. 4–8, 1991.
- [12] M. B. Youdim and Y. Bakhle, "Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in parkinson's disease and depressive illness," *British journal of pharmacology*, vol. 147, no. S1, pp. S287–S296, 2006.
- [13] M. C. Anderson, F. Hasan, J. M. McCrodden, and K. F. Tipton, "Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect," *Neurochemical research*, vol. 18, no. 11, pp. 1145–1149, 1993.
- [14] S. Gal, H. Zheng, M. Fridkin, and M. B. Youdim, "Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. in vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of mptp-induced striatal dopamine depletion," *Journal of neurochemistry*, vol. 95, no. 1, pp. 79–88, 2005.
- [15] M. Wimbiscus, O. Kostenko, and D. Malone, "Mao inhibitors: risks, benefits, and lore," *Cleveland Clinic journal of medicine*, vol. 77, no. 12, pp. 859–882, 2010.
- [16] C. Binda, A. Mattevi, and D. E. Edmondson, "Structure-function relationships in flavoenzyme-dependent amine oxidations a comparison of polyamine oxidase and monoamine oxidase," *Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 27, pp. 23973–23976, 2002.
- [17] J. Grimsby, K. Chen, L.-J. Wang, N. C. Lan, and J. C. Shih, "Human monoamine oxidase a and b genes exhibit identical exon-intron organization.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88, no. 9, pp. 3637–3641, 1991.
- [18] C. Schnaitman, V. G. Erwin, and J. W. Greenawalt, "The submitochondrial localization of monoamine oxidase an enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria," *The Journal of cell biology*, vol. 32, no. 3, pp. 719–735, 1967.
- [19] D. E. Edmondson, C. Binda, and A. Mattevi, "Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases a and b," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 464, no. 2, pp. 269–276, 2007.
- [20] R. V. Dunn, K. R. Marshall, A. W. Munro, and N. S. Scrutton, "The ph dependence of kinetic isotope effects in monoamine oxidase a indicates stabilization of the neutral amine in the enzyme–substrate complex," *Febs Journal*, vol. 275, no. 15, pp. 3850–3858, 2008.
- [21] R. B. Silverman, "Radical ideas about monoamine oxidase," *Accounts of chemical research*, vol. 28, no. 8, pp. 335–342, 1995.
- [22] S. Umhau, L. Pollegioni, G. Molla, K. Diederichs, W. Welte, M. S. Pilone, and S. Ghisla, "The x-ray structure of d-amino acid oxidase at very high resolution identifies the

- chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 23, pp. 12463–12468, 2000.
- [23] C. W. Kay, H. El Mkami, G. Molla, L. Pollegioni, and R. R. Ramsay, “Characterization of the covalently bound anionic flavin radical in monoamine oxidase a by electron paramagnetic resonance,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 51, pp. 16091–16097, 2007.
- [24] L. De Colibus, M. Li, C. Binda, A. Lustig, D. E. Edmondson, and A. Mattevi, “Three-dimensional structure of human monoamine oxidase a (mao a): relation to the structures of rat mao a and human mao b,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 36, pp. 12684–12689, 2005.
- [25] R. M. Geha, K. Chen, J. Wouters, F. Ooms, and J. C. Shih, “Analysis of conserved active site residues in monoamine oxidase a and b and their three-dimensional molecular modeling,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 19, pp. 17209–17216, 2002.
- [26] S.-Y. Son, J. Ma, Y. Kondou, M. Yoshimura, E. Yamashita, and T. Tsukihara, “Structure of human monoamine oxidase a at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 15, pp. 5739–5744, 2008.
- [27] A. M. Andrés, M. Soldevila, A. Navarro, K. K. Kidd, B. Oliva, and J. Bertranpetit, “Positive selection in maoa gene is human exclusive: determination of the putative amino acid change selected in the human lineage,” *Human genetics*, vol. 115, no. 5, pp. 377–386, 2004.
- [28] K. Ramachandran, D. Gopakumar, and K. P. Namboori, *Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications*. Springer, 2008.
- [29] J. Janin, S. Wodak, M. Levitt, and B. Maigret, “Conformation of amino acid side-chains in proteins,” *Journal of molecular biology*, vol. 125, no. 3, pp. 357–386, 1978.
- [30] M. Karplus and J. Kuriyan, “Molecular dynamics and protein function,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 19, pp. 6679–6685, 2005.
- [31] O. Edholm, O. Berger, and F. Jähnig, “Structure and fluctuations of bacteriorhodopsin in the purple membrane: a molecular dynamics study,” *Journal of molecular biology*, vol. 250, no. 1, pp. 94–111, 1995.
- [32] M. Bhandarkar, R. Brunner, C. Chipot, A. Dalke, S. Dixit, P. Grayson, J. Gullingsrud, A. Gursoy, D. Hardy, W. Humphrey, *et al.*, “Namd user’s guide,” *Urbana*, vol. 51, p. 61801, 2003.
- [33] W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives, “Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 19, pp. 6665–6670, 2005.

- [34] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water," *The Journal of chemical physics*, vol. 79, no. 2, pp. 926–935, 1983.
- [35] K. Toukan and A. Rahman, "Molecular-dynamics study of atomic motions in water," *Phys. Rev. B*, vol. 31, pp. 2643–2648, Mar 1985.
- [36] B. Guillot, "A reappraisal of what we have learnt during three decades of computer simulations on water," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 101, no. 1, pp. 219–260, 2002.
- [37] NLM, "Chenidplus advanced: Chemical information with sercheable synonyms, structures and formulas." [en línea] <http://www.test.org/doi/>, Consulta: Diciembre 2013.
- [38] G. Zapata-Torres, A. Fierro, S. Miranda-Rojas, C. Guajardo, P. Saez-Briones, J. C. Salgado, and C. Celis-Barros, "Influence of protonation on substrate and inhibitor interactions at the active site of human monoamine oxidase-a," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 52, no. 5, pp. 1213–1221, 2012.
- [39] J. Alikhajeh, K. Khajeh, M. Naderi-Manesh, B. Ranjbar, R. H. Sajedi, and H. Naderi-Manesh, "Kinetic analysis, structural studies and prediction of pK_a values of *Bacillus* kr-8104 α -amylase: The determinants of ph-activity profile," *Enzyme and microbial technology*, vol. 41, no. 3, pp. 337–345, 2007.
- [40] D. Case, T. Darden, T. Cheatham III, C. Simmerling, J. Wang, R. Duke, R. Luo, R. Walker, W. Zhang, K. Merz, *et al.*, "Amber 12," *University of California, San Francisco*, 2012.
- [41] D. Case, T. Darden, T. Cheatham, C. Simmerling, J. Wang, *et al.*, "Amber9, version university of california," *San Francisco, CA*, 2006.
- [42] R. Dennington, T. Keith, and J. Millam, "Gaussview, version 5," *Semichem Inc., Shawnee Mission KS*, 2009.
- [43] M. Frisch, G. Trucks, H. Schlegel, G. Scuseria, M. Robb, J. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. Petersson, *et al.*, "Gaussian 09 references," *Gaussian, Inc., Wallingford CT, Revision B*, vol. 1, 2010.
- [44] C. R. Sondergaard, M. H. Olsson, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, "Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pK_a values," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 7, no. 7, pp. 2284–2295, 2011.
- [45] M. H. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, "Propka3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pK_a predictions," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 7, no. 2, pp. 525–537, 2011.
- [46] T. J. Dolinsky, P. Czodrowski, H. Li, J. E. Nielsen, J. H. Jensen, G. Klebe, and N. A. Baker, "Pdb2pqr: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations," *Nucleic acids research*, vol. 35, no. suppl 2, pp. W522–W525,

2007.

- [47] T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, and N. A. Baker, “Pdb2pqr: an automated pipeline for the setup of poisson–boltzmann electrostatics calculations,” *Nucleic acids research*, vol. 32, no. suppl 2, pp. W665–W667, 2004.
- [48] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, and J. A. McCammon, “Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 18, pp. 10037–10041, 2001.
- [49] E. Chovancova, A. Pavelka, P. Benes, O. Strnad, J. Brezovsky, B. Kozlikova, A. Gora, V. Sustr, M. Klvana, P. Medek, *et al.*, “Caver 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures,” *PLoS computational biology*, vol. 8, no. 10, p. e1002708, 2012.
- [50] P. Medek, P. Beneš, and J. Sochor, “Computation of tunnels in protein molecules using delaunay triangulation,” *Journal of WSCG, University of West Bohemia, Pilsen*, vol. 15(1-3), pp. 107–114, 2007.
- [51] Schrödinger, LLC, “The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1.” August 2010.
- [52] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, “Ucsf chimera—a visualization system for exploratory research and analysis,” *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [53] M. F. Sanner, A. J. Olson, and J.-C. Spohner, “Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces,” *Biopolymers*, vol. 38, no. 3, pp. 305–320, 1996.
- [54] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, “VMD – Visual Molecular Dynamics,” *Journal of Molecular Graphics*, vol. 14, pp. 33–38, 1996.
- [55] R. Anandkrishnan, B. Aguilar, and A. V. Onufriev, “H++ 3.0: automating pk prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations,” *Nucleic acids research*, vol. 40, no. W1, pp. W537–W541, 2012.
- [56] V. Tech, “H++: Web-based computational prediction of protonation states.” [en línea] <http://biophysics.cs.vt.edu/>, Consulta: Septiembre 2013.
- [57] A. S. Bayden, M. Fornabaio, J. N. Scarsdale, and G. E. Kellogg, “Web application for studying the free energy of binding and protonation states of protein–ligand complexes based on hint,” *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 23, no. 9, pp. 621–632, 2009.
- [58] S. Miyamoto and P. A. Kollman, “Settle: an analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models,” *Journal of computational chemistry*, vol. 13, no. 8, pp. 952–962, 1992.
- [59] J. E. Kerrigan, “Amber 11.0 introductory tutorial.” [en línea] http://cinjweb.umdncj.edu/~kerrigje/pdf_files/AMBER8_intro.pdf, Consulta:

Agosto 2013.

- [60] A. W. Götz, M. J. Williamson, D. Xu, D. Poole, S. Le Grand, and R. C. Walker, "Routine microsecond molecular dynamics simulations with amber on gpus. 1. generalized born," *Journal of chemical theory and computation*, vol. 8, no. 5, pp. 1542–1555, 2012.
- [61] D. Matthes and B. L. De Groot, "Secondary structure propensities in peptide folding simulations: a systematic comparison of molecular mechanics interaction schemes," *Biophysical journal*, vol. 97, no. 2, pp. 599–608, 2009.
- [62] B. Meineke, G. Engl, C. Kemper, A. Vasiljev-Neumeyer, H. Paulitschke, and D. Rapaport, "The outer membrane form of the mitochondrial protein mcr1 follows a tom-independent membrane insertion pathway," *FEBS letters*, vol. 582, no. 6, pp. 855–860, 2008.
- [63] H. Wu, K. Chen, and J. C. Shih, "Site-directed mutagenesis of monoamine oxidase a and b: role of cysteines.," *Molecular pharmacology*, vol. 43, no. 6, pp. 888–893, 1993.
- [64] A. P. B. Vintém, N. T. Price, R. B. Silverman, and R. R. Ramsay, "Mutation of surface cysteine 374 to alanine in monoamine oxidase a alters substrate turnover and inactivation by cyclopropylamines," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 3487–3495, 2005.
- [65] M. Li, C. Binda, A. Mattevi, and D. E. Edmondson, "Functional role of the "aromatic cage" in human monoamine oxidase b: structures and catalytic properties of tyr435 mutant proteins," *Biochemistry*, vol. 45, no. 15, pp. 4775–4784, 2006.
- [66] A. 12, "Reference manual." [en línea] <http://ambermd.org/doc12/Amber12.pdf>, Consulta: Agosto 2013.
- [67] UniProt, "Amine oxidase a - maoa - homo sapiens p21397." [en línea] <http://www.uniprot.org/uniprot/P21397>, Consulta: Enero 2013.
- [68] NCBI, "Ccdc data base. report for ccds14260 (h-mao-a)." [en línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&ORGANISM=0&BU513ILDS=CURRENTBUILDS&DATA=CCDS14260.1>, Consulta: Enero 2013.
- [69] H. G. Brunner, M. Nelen, X. Breakefield, H. Ropers, and B. Van Oost, "Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase a," *Science*, vol. 262, no. 5133, pp. 578–580, 1993.
- [70] M. O. Kim, S. E. Nichols, Y. Wang, and J. A. McCammon, "Effects of histidine protonation and rotameric states on virtual screening of m. tuberculosis rmlc," *Journal of computer-aided molecular design*, pp. 1–12, 2013.
- [71] R. Apweiler, C. O'onovan, M. Magrane, Y. Alam-Faruque, R. Antunes, B. Bely, M. Bingley, L. Bower, B. Bursteinas, G. Chavali, *et al.*, "Reorganizing the protein space at the universal protein resource (uniprot).," *Nucleic acids research*, vol. 40, no. Database issue, pp. D71–5, 2012.

- [72] K. D. Pruitt, J. Harrow, R. A. Harte, C. Wallin, M. Diekhans, D. R. Maglott, S. Searle, C. M. Farrell, J. E. Loveland, B. J. Ruef, *et al.*, “The consensus coding sequence (ccds) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes,” *Genome research*, vol. 19, no. 7, pp. 1316–1323, 2009.
- [73] C. Lee and S. Ham, “Characterizing amyloid-beta protein misfolding from molecular dynamics simulations with explicit water,” *Journal of computational chemistry*, vol. 32, no. 2, pp. 349–355, 2011.
- [74] Q. Wang, N. H. Werstiuk, J. R. Kramer, and R. A. Bell, “Effects of cu ions and explicit water molecules on the copper binding domain of amyloid precursor protein app (131–189): A molecular dynamics study,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, no. 29, pp. 9224–9235, 2011.
- [75] H. Lei, C. Wu, H. Liu, and Y. Duan, “Folding free-energy landscape of villin headpiece subdomain from molecular dynamics simulations,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 12, pp. 4925–4930, 2007.
- [76] T. Cheatham III and P. Kollma, “Observation of the *a*-dna to *b*-dna transition during unrestrained molecular dynamics in aqueous solution,” *Journal of molecular biology*, vol. 259, no. 3, pp. 434–444, 1996.
- [77] B. Barz and B. Urbanc, “Dimer formation enhances structural differences between amyloid β -protein (1–40) and (1–42): An explicit-solvent molecular dynamics study,” *PloS one*, vol. 7, no. 4, p. e34345, 2012.
- [78] B. Xia, V. Tsui, D. A. Case, H. J. Dyson, and P. E. Wright, “Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized born model, and with explicit water,” *Journal of biomolecular NMR*, vol. 22, no. 4, pp. 317–331, 2002.
- [79] M. C. Lee and Y. Duan, “Distinguish protein decoys by using a scoring function based on a new amber force field, short molecular dynamics simulations, and the generalized born solvent model,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 55, no. 3, pp. 620–634, 2004.
- [80] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. Berendsen, “Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of *n*-alkanes,” *Journal of Computational Physics*, vol. 23, no. 3, pp. 327–341, 1977.
- [81] D. S. Cerutti, R. Duke, P. L. Freddolino, H. Fan, and T. P. Lybrand, “A vulnerability in popular molecular dynamics packages concerning langevin and andersen dynamics,” *Journal of chemical theory and computation*, vol. 4, no. 10, pp. 1669–1680, 2008.
- [82] X. Wu and B. R. Brooks, “Self-guided langevin dynamics simulation method,” *Chemical Physics Letters*, vol. 381, no. 3, pp. 512–518, 2003.
- [83] H. J. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. Haak, “Molecular dynamics with coupling to an external bath,” *The Journal of chemical physics*, vol. 81,

p. 3684, 1984.

- [84] J. A. Izaguirre, D. P. Catarello, J. M. Wozniak, and R. D. Skeel, "Langevin stabilization of molecular dynamics," *The Journal of chemical physics*, vol. 114, p. 2090, 2001.

Apéndice A

Secuencia aminoacídica de enzima MAO-A

Secuencia obtenida desde las bases de datos de Universal Protein Resource (UniProt) [67, 71] y 525 Consensus Coding Sequence (CCDS) proyect [68, 72].

```

10      20      30      40      50      60
MENQEKASIA  GHMFDVVVIG  GGISGLSAAK  LLTEYGVSVL  VLEARDRVGG  RTYTIRNEHV
70      80      90     100     110     120
DYVDVGGAYV  GPTQNRILRL  SKELGIETYK  VNVSERLVQY  VKGKTYPFRG  AFPPVWNPIA
130     140     150     160     170     180
YLDYNNLWRT  IDNMGKEIPT  DAPWEAQHAD  KWDMKMTMKEL  IDKICWTKTA  RRFAYLFVNI
190     200     210     220     230     240
NVTSEPEEVS  ALWFLWYVKQ  CGGTTRIFSV  TNGGQERKFV  GGSGQVSERI  MDLLGDQVKL
250     260     270     280     290     300
NHPVTHVDQS  SDNIIHETLN  HEHYECKYVI  NAIPPTLTAK  IHFRPELPAE  RNQLIQRLPM
310     320     330     340     350     360
GAVIKMMYY  KEAFWKKKDY  CGCMIIEDD  APISITLDDT  KPDGSLPAIN  GFILARKADR
370     380     390     400     410     420
LAKLHKEIRK  KKICELYAKV  LGSQEALHPV  HYEKNWCEE  QYSGGCYTAY  FPPGIMTQYG
430     440     450     460     470     480
RVIRQPVGRI  FFAGTETATK  WSGYMEGAVE  AGERAAREVL  NGLGKVTEKD  IWVQEPESKD
490     500     510     520     552
VPAVEITHTF  WERNLPSVSG  LLKIIGFSTS  VTALGFVLYK  YKLLPRS

```

Tabla A.1: Simbología de aminoácidos.

M: Metionina	A: Alanina	F: Fenilalanina
E: Ac. Glutámico	S: Serina	D: Ac. Aspártico
N: Asparagina	I: Isoleucina	V: Valina
Q: Glutamina	G: Glicina	L: Leucina
K: Lisina	H: Histidina	T: Treonina
Y: Tirosina	R: Arginina	P: Prolina
W: Triptofano	C: Cisteína	

Apéndice B

Modificación de Histidinas, Asparaginas y Glutaminas de acuerdo a resultados del servidor H++

A partir de los estados de protonación entregados por el servidor H++, se modificó el archivo PDB de la proteína para que la suite Amber reconociera la asignación de protones en las Histidinas correspondientes (mediante los nombres HID, HIE o HIP). [70] Asimismo se corrigió la rotación de nitrógenos u oxígenos en ciertas Asparaginas y Glutaminas, de acuerdo a lo entregado por el programa. [57]

En la Tabla B.1 se muestra el estado de protonación asignado a las Histidinas, y en la Tabla B.2 los aminoácidos en que se intercambié la posición de los nitrógenos y oxígenos (rotación).

Tabla B.1: Protonación de Histidinas.

Residuo	Protonación
12	HIP
59	HIP
148	HIP
187	HIE
242	HIE
246	HIE
261	HIE
263	HIP
282	HIE
365	HIE
388	HIE
391	HIE
488	HIE

Tabla B.2: ASN y GLN modificados.

Residuo	N°
ASN	126
ASN	253
ASN	260
ASN	271
ASN	292
GLN	296
GLN	418
GLN	425

Apéndice C

Parámetros de simulación

Tabla C.1: Parámetros utilizados en simulaciones de enzima MAO-A.

Parámetro	Rangos Observados	Min 1°	Min 2°	Heat 1°	Heat 2°	Heat 3°
<i>imin</i>	-	1	1	0	0	0
<i>maxcyc</i>	1,000-2,500	1,000	1,000	-	-	-
<i>ncyc</i>	0-1,100	500	500	-	-	-
<i>nstlim</i>	1,000-25,000,000	-	-	10,000	10,000	10,000
<i>dt</i>	0.001-0.002	-	-	0.002	0.002	0.002
<i>irest</i>	-	-	-	0	1	1
<i>ntx</i>	-	-	-	1	5	5
<i>ntb</i>	-	1	1	1	1	1
<i>cut</i>	9.0-14.0	10	10	10	10	10
<i>pres0</i>	-	-	-	-	-	-
<i>ntp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>taup</i>	0.1-2	-	-	-	-	-
<i>ntr</i>	-	1	0	1	1	1
<i>ntc</i>	-	-	-	2	2	2
<i>ntf</i>	-	-	-	2	2	2
<i>tempi</i>	0-300	-	-	0.0	100.0	200.0
<i>temp0</i>	298-310	-	-	100.0	200.0	300.0
<i>ntt</i>	-	-	-	3	3	3
<i>gamma_ln</i>	1.0-5.0	-	-	1.0	1.0	1.0
<i>ig</i>	-	-	-	-1	-1	-1
<i>tautp</i>	0.1-5	-	-	-	-	-
<i>ntpr</i>	-	-	-	100	100	100
<i>ntwx</i>	-	-	-	100	100	100
<i>ntwr</i>	-	-	-	-	-	-

Tabla C.2: Parámetros utilizados en simulaciones de enzima MAO-A.
Continuación

Parámetro	Equilibrio	Producción	Fuente
<i>imin</i>	0	0	-
<i>maxcyc</i>	-	-	[66, 73–76]
<i>ncyc</i>	-	-	[73, 74, 77]
<i>nstlim</i>	100,000	5,000,000	[73, 74, 77]
<i>dt</i>	0.002	0.002	[66, 73–75, 77–79],
<i>irest</i>	1	1	-
<i>ntx</i>	5	5	-
<i>ntb</i>	2	2	[66, 73, 74, 77]
<i>cut</i>	10.0	10.0	[66, 75–77],
<i>pres0</i>	1.0	1.0	[73, 77]
<i>ntp</i>	1	1	-
<i>taup</i>	2.0	2.0	[66, 75–77]
<i>ntr</i>	1	1	[73, 76, 78]
<i>ntc</i>	2	2	[73, 75, 76, 80]
<i>ntf</i>	2	2	[66]
<i>tempi</i>	300.0	300.0	[66, 73, 74, 76–79]
<i>temp0</i>	300.0	300.0	[66, 73, 74, 76–79]
<i>ntt</i>	3	1	[73, 75, 76, 78, 81–84]
<i>gamma_ln</i>	1.0	-	[66, 81, 82]
<i>ig</i>	-1	-	[81]
<i>tautp</i>	-	2	[66, 76, 78, 83]
<i>ntpr</i>	200	1,500	-
<i>ntwx</i>	200	1,500	-
<i>ntwr</i>	50,000	50,000	-

Explicación sobre cada parámetro:

imin Define qué tipo de simulación se realizará (DM, MIN).

maxcyc Es preferible no hacer minimizaciones muy cortas para asegurarse que la proteína alcance una estructura relajada y las partículas interactúen correctamente. Sin embargo, minimizaciones excesivas pueden alcanzar estructuras no naturales.

ncyc Cambia el tipo de minimización de Steepest Descent a Gradiente Conjugado.

nstlim Cantidad de pasos necesarios de simulación para que se realice el estudio de un cierto período de tiempo. Estos valores fueron tabulados considerando tiempos reportados entre 20[ps] y 50[ns] en las distintas etapas y un $dt=0.002$.

dt Autores recomiendan usar 0.002 sólo si se está usando SHAKE a no más de 300 K. Dependiendo del tipo de simulación, tiempos mayores a 0.002 pueden significar la pérdida de información relevante para la investigación.

- irest** Indica si se continuará una simulación o partirá desde cero.
- ntx** Indica qué se debe leer del archivo *.inpcrd. Si se está comenzando una simulación, se leen sólo las coordenadas del archivo correspondiente. Si se continua una simulación se deben leer además las velocidades y los parámetros de celda.
- ntb** Como se está simulando con solvente explícito, se utilizarán condiciones periódicas de borde y PME. Los autores recomiendan trabajar a volumen constante durante las minimizaciones y los cambios de temperatura, se debe fijar a presión constante para que se aplique la regulación de presión.
- cut** Generalmente se utilizan valores mayores o iguales a 10[Å] aunque autores de AMBER recomiendan 8 [Å] como valor mínimo. Se pueden utilizar distancias mayores cuando la simulación tiene especial interés en la influencia de las interacciones de Van der Waals, considerando que no es despreciable su aporte energético a esas distancias.
- pres0** Presión a la que se debe mantener el sistema. Se escoge para mantener una condición similar a la observada en un ambiente abierto de laboratorio.
- ntp** Dado que no se simula la proteína inserta en la membrana, se considera que no cambia la presión con respecto a la distancia. Éste parámetro no se utiliza en las etapas anteriores al equilibrio.
- taup** Valores menores a 0.1 aumentan fluctuaciones de volumen e inestabilizan la simulación. Se han visto reportados tiempos hasta de 2 [ps]. Se recomiendan valores entre 1 y 5, y mayores a 1 si las trayectorias son inestables.
- ntr** Dependiendo de la etapa de simulación se restringen los átomos de la proteína de forma fuerte, baja o no se aplica. Éste método obliga a los átomos a permanecer muy cerca de una cierta posición al aplicarle una fuerza contraria que limita su movimiento como si fuera un resorte.
- ntc** En las simulaciones de dinámica molecular se dejarán fijos estos enlaces porque se está trabajando con moléculas de agua de ángulo fijo (TIP3P), y se necesita que se fije la vibración de los átomos de hidrógeno para evitar errores en la simulación.
- ntf** Como se fijan los enlaces de los Hidrógenos, no se incluyen estas interacciones en el cálculo de las fuerzas.
- tempi** Temperatura en [K] con la que se comienza la simulación.
- temp0** Temperatura en [K] a la que debe permanecer la simulación. El valor máximo en el rango se utiliza para referenciar la temperatura de un ser vivo (37°C).
- ntt** Se considera que la estabilización por el método de Langevin (3) “fuerza.^a la molécula a alcanzar una temperatura, mientras que el termostato de Berendsen (1) la acopla de forma “débilz menos forzada. Autores y usuarios recomiendan usar el termostato de Langevin sólo para las etapas de equilibrio y calentamiento debido a que “apura” las simulaciones, perdiéndose la relación entre un fenómeno y el tiempo en que se realizó.

gamma_1 Frecuentemente se usan frecuencias entre estos rangos.

ig El termostato de Langevin requiere aplicar diferentes fuerzas a las particular para variar sus velocidades. Estas fuerzas “al azar” no pueden seguir patrones repetibles cada vez que se realiza la simulación, sino ocurren comportamientos erróneos como por ejemplo denaturación. El valor -1 asocia este “azar” al tiempo y fecha en que se utiliza el termostato.

tautp Parámetro para el termostato de Berendsen. Se recomienda usar tiempos igual o mayores a 0.1. Tiempos anteriores afectan las propiedades termodinámicas de la simulación.

ntpr Indica cada cuantos pasos se escribirá un archivo de salida (*.out), con la información de la evolución de la simulación. En este caso el archivo se escribirá cada 0.2[ps], 0.4[ps] y 3[ps] en las etapas de heating, equilibrio y producción, respectivamente.

ntwx Indica cada cuantos pasos se escribirá un archivo con la trayectoria de la simulación (*.mdcrd). En este caso se escribirá cada 0.2[ps], 0.4[ps] y 3[ps] en las etapas de heating, equilibrio y producción, respectivamente.

ntwr Indica cada cuantos pasos se guardará un checkpoint (en este caso archivo *.rst). Guardar la información es conveniente cuando se están realizando simulaciones de período prolongado (mayor a 3-4 horas) en las que sí significa un problema tener que repetir las.

Apéndice D

Otras características de la simulación molecular

A continuación se muestran los perfiles de energía, temperatura, volumen, presión y densidad que presentó la trayectoria de la proteína MAO-A durante las etapas de calentamiento, equilibrio y producción. El radio de giro y el RMSD se exponen en el Capítulo 5.

- Energía [kcal/mol]:

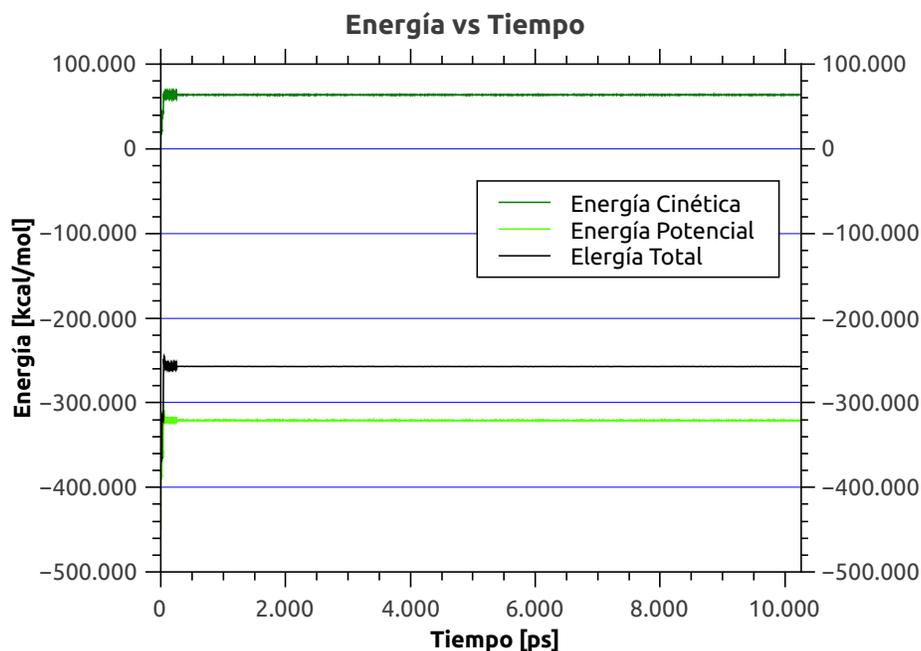


Figura D.1: Perfil de energías potencial, cinética y total durante la simulación.

- Temperatura [K]:

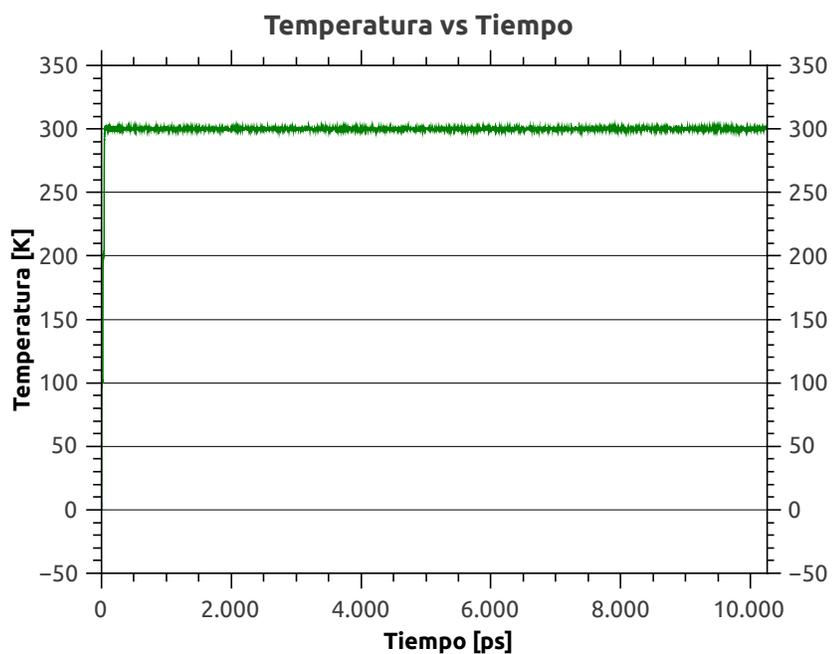


Figura D.2: Perfil de temperatura de la trayectoria.

- Volumen [*Angstrom*³]:

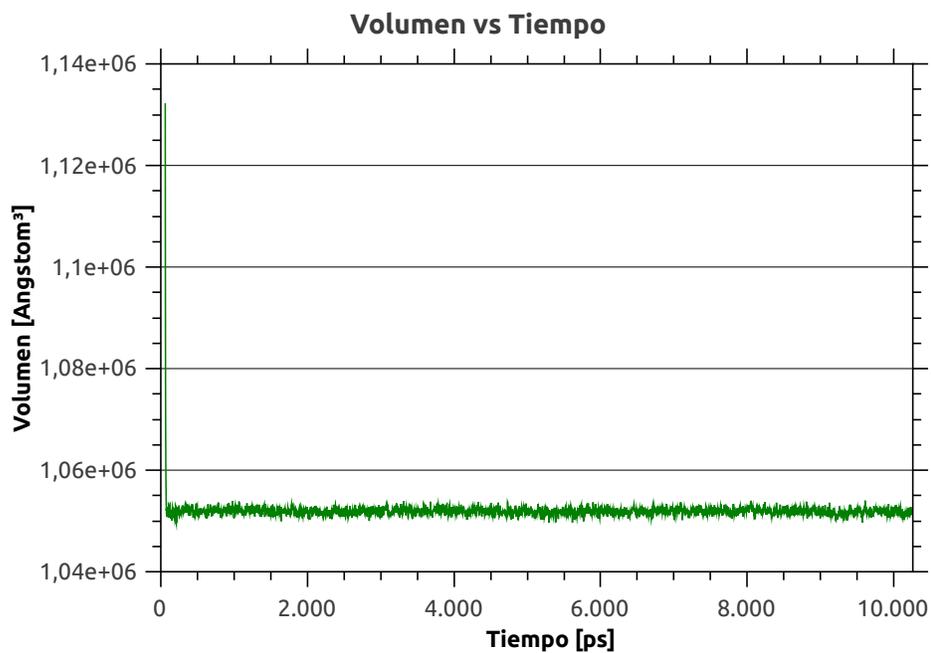


Figura D.3: Perfil del volumen presentado durante la simulación.

- Presión [bar]:

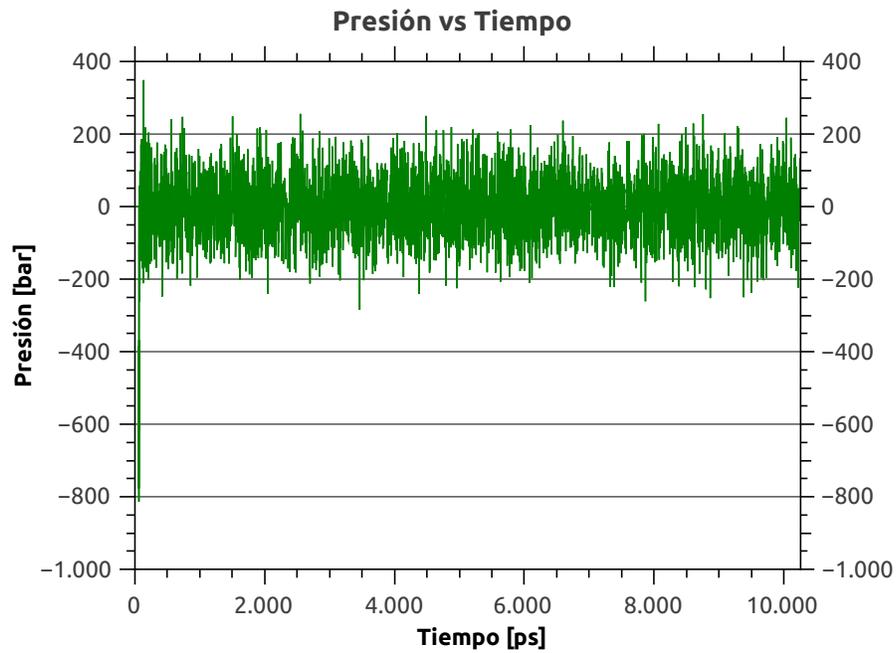


Figura D.4: Perfil de la presión presentada en la trayectoria.

- Densidad [g/cm^3]:

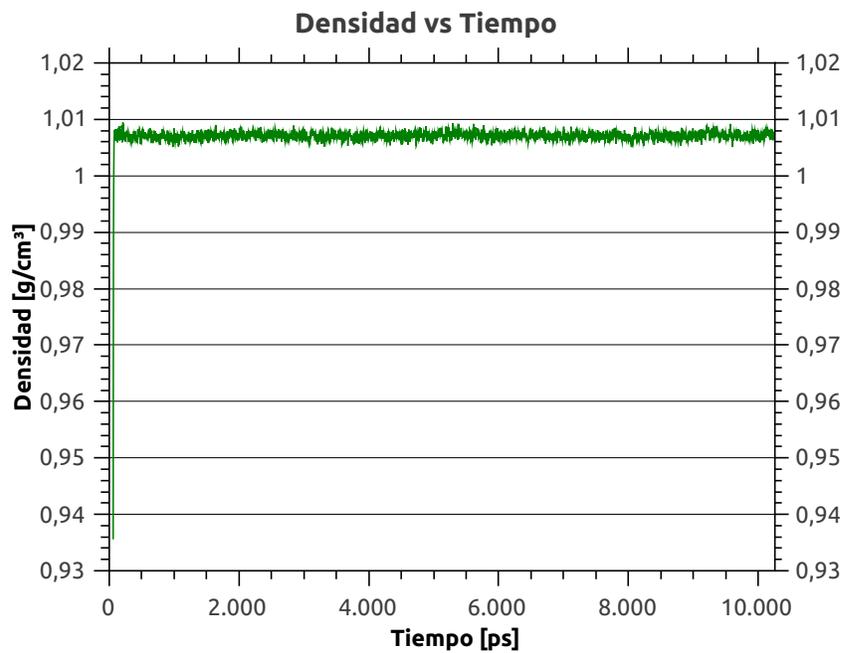


Figura D.5: Perfil de la densidad presentada durante la simulación.

Apéndice E

pKa promedio durante la simulación

El promedio y la desviación estándar del pKa de cada aminoácido se presenta en la siguiente tabla.

Tabla E.1: pKa promedio de cada aminoácido y su desviación estándar.

(a) Aminoácidos 1-79

Residuo	Nº	$pK_{a_{prom}}$	Des. Est.
N+	12	8.24	0.43
ASP	15	3.12	0.46
LYS	30	11.77	0.31
GLU	34	4.11	0.36
TYR	35	10.23	0.15
GLU	43	7.23	0.33
ARG	45	11.94	0.31
ASP	46	3.62	0.16
ARG	47	10.28	0.26
ARG	51	13.41	0.22
TYR	53	10.44	0.18
ARG	56	13.14	0.43
GLU	58	4.42	0.16
HIS	59	6.40	0.10
ASP	61	3.42	0.48
TYR	62	11.95	0.48
ASP	64	2.51	0.68
TYR	69	17.17	1.33
ARG	76	13.28	0.52
ARG	79	15.46	0.50
LYS	82	11.68	0.66
GLU	83	3.66	0.25
GLU	87	3.82	0.53
TYR	89	15.35	1.08
LYS	90	10.28	0.15

(b) Aminoácidos 84-152

Residuo	Nº	$pK_{a_{prom}}$	Des. Est.
GLU	95	3.38	0.46
ARG	96	12.64	0.24
TYR	100	10.45	0.33
LYS	102	10.45	0.33
LYS	104	10.62	0.16
TYR	106	10.14	0.16
ARG	109	12.42	0.22
TYR	121	10.82	0.51
ASP	123	3.75	0.34
TYR	124	14.06	0.37
ARG	129	11.69	0.22
ASP	132	3.37	0.50
LYS	136	10.93	0.35
GLU	137	3.85	0.22
ASP	141	3.86	0.20
GLU	145	4.74	0.08
HIS	148	7.11	0.15
ASP	150	2.99	0.36
LYS	151	10.40	0.20
ASP	153	3.78	0.40
LYS	154	11.33	0.30
LYS	158	10.92	0.73
GLU	159	3.73	0.56
ASP	162	2.87	0.51
LYS	163	10.65	0.49

Tabla E.2: pKa promedio de cada aminoácido y su desviación estándar. (Continuación 2/4)

(a) Aminoácidos 154-246

Residuo	Nº	$pK_{a_{prom}}$	Des. Est.
CYS	165	12.00	0.30
LYS	168	10.19	0.13
ARG	171	13.16	0.43
ARG	172	13.09	0.82
TYR	175	11.04	0.66
GLU	185	4.31	0.49
HIS	187	6.23	0.41
GLU	188	4.57	0.47
TYR	197	15.98	0.86
LYS	199	9.59	0.12
CYS	201	12.73	0.35
ARG	206	11.65	0.32
GLU	216	4.67	0.51
ARG	217	12.49	0.63
LYS	218	15.49	1.87
GLU	228	4.80	0.46
ARG	229	12.18	0.09
ASP	232	3.95	0.02
ASP	236	3.13	0.38
LYS	239	10.97	0.33
HIS	242	5.72	0.13
HIS	246	6.05	0.25
ASP	248	1.46	0.38
ASP	252	2.49	0.50
GLU	257	3.78	0.46

(b) Aminoácidos 250-308

Residuo	Nº	$pK_{a_{prom}}$	Des. Est.
HIS	261	6.42	0.13
GLU	262	3.75	0.30
HIS	263	7.10	0.33
TYR	264	11.80	0.24
GLU	265	4.17	0.44
CYS	266	11.91	0.26
LYS	267	10.89	0.40
TYR	268	10.39	0.25
LYS	280	10.02	0.31
HIS	282	6.22	0.18
ARG	284	13.65	0.39
GLU	286	4.43	0.26
GLU	290	3.21	0.39
ARG	291	9.92	0.19
ARG	297	12.51	0.11
LYS	305	7.38	0.22
CYS	306	12.16	0.33
TYR	309	15.31	1.49
TYR	310	14.44	0.80
LYS	311	10.50	0.15
GLU	312	3.79	0.45
LYS	316	11.04	0.32
LYS	317	11.92	0.51
LYS	318	10.34	0.14
ASP	319	3.65	0.32

Tabla E.3: pKa promedio de cada aminoácido y su desviación estándar. (Continuación 3/4)

(a) Aminoácidos 309-364

Residuo	Nº	$pK_{a_{prom}}$	Des. Est.
TYR	320	10.45	0.27
CYS	321	7.90	0.49
CYS	323	17.95	0.66
GLU	327	5.47	0.53
ASP	328	3.24	0.48
GLU	329	3.67	0.68
ASP	330	3.63	0.40
ASP	338	5.75	0.43
ASP	339	1.65	0.94
LYS	341	9.04	0.35
ASP	343	3.17	0.60
ARG	356	13.30	0.57
LYS	357	9.23	0.74
ASP	359	3.09	0.73
ARG	360	13.05	0.70
LYS	363	10.74	0.39
HIS	365	6.29	0.14
LYS	366	10.73	0.27
GLU	367	3.80	0.54
ARG	369	14.08	0.26
LYS	370	10.58	0.43
LYS	371	10.67	0.34
LYS	372	10.58	0.30
CYS	374	10.82	0.30
GLU	375	4.30	0.37

(b) Aminoácidos 366-439

Residuo	Nº	$pK_{a_{prom}}$	Des. Est.
TYR	377	15.53	0.74
LYS	379	11.03	0.41
GLU	385	3.64	0.60
HIS	388	6.18	0.11
HIS	391	5.71	0.39
TYR	392	15.27	0.95
GLU	393	4.54	0.42
GLU	394	3.23	0.44
LYS	395	10.23	0.54
CYS	398	10.69	0.31
GLU	399	4.43	0.35
GLU	400	3.42	0.48
TYR	402	10.77	0.20
CYS	406	13.79	0.20
TYR	407	13.96	1.15
TYR	410	12.22	0.59
TYR	419	10.15	0.19
ARG	421	13.86	0.41
ARG	424	10.86	0.49
ARG	429	13.04	0.70
GLU	436	3.46	0.32
LYS	440	9.90	0.27
TYR	444	15.71	1.60
GLU	446	5.65	0.66
GLU	450	4.54	0.54

Tabla E.4: pKa promedio de cada aminoácido y su desviación estándar. (Continuación 4/4)

(a) Aminoácidos 442-511

Residuo	Nº	$pK_{a_{prom}}$	Des. Est.
GLU	453	4.46	0.46
ARG	454	12.39	0.49
ARG	457	11.86	0.25
GLU	458	4.64	0.35
LYS	465	10.50	0.13
GLU	468	4.28	0.51
LYS	469	10.71	0.40
ASP	470	3.56	0.58
GLU	475	3.45	0.51
GLU	477	4.36	0.36
LYS	479	10.56	0.28
ASP	480	3.04	0.50
GLU	485	4.39	0.32
HIS	488	6.07	0.38
GLU	492	3.48	0.62
ARG	493	12.31	0.10
LYS	503	10.40	0.05
TYR	519	10.05	0.00
LYS	520	10.44	0.00
TYR	521	10.08	0.00
LYS	522	10.46	0.00

Apéndice F

Influencia del entorno en el pKa calculado por propKa

El valor de pKa en cada aminoácido puede variar en base al efecto de los puentes de hidrógeno de las cadenas laterales o principales, y por las interacciones coulómbicas. A continuación se muestran los aminoácidos que afectan en el pKa de cada residuo de la Figura 5.5 a los 9.5[ns] de simulación, la elección de este estado en la trayectoria es referencial.

Tabla F.1: Influencia del entorno en cada aminoácido - Aspartatos

(a) ASP-64

Puente de Hidrógeno Cadena Lateral		Puente de Hidrógeno Cadena Principal		Interacciones Coulómbicas	
THR-54	-0.85	ASP-64	-0.03	ARG-56	-0.06
SER-223	-0.04	SER-223	-0.81	LYS-218	-2.03
LYS-218	-0.85	-	-	LYS-305	-0.51
-	-	-	-	ASP-339	0.84
-	-	-	-	LYS-341	-0.72

(b) ASP-339

Puente de Hidrógeno Cadena Lateral		Interacciones Coulómbicas	
THR-309	-0.85	LYS-218	-2.03
LYS-218	-0.85	LYS-305	-0.27
LYS-341	-0.85	LYS-341	-2.02

Tabla F.2: Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas

(a) TYR-69

Interacciones Coulómbicas	
CYS-323	0.4
ASP-338	0.56
TYR-62	0.07
TYR-89	0.6
TYR-309	0.12
TYR-377	0.07
LYS-218	-1.54
ASP-64	0.41
ASP-339	1.3

(b) TYR-89

Puente de Hidrógeno Cadena Lateral		Interacciones Coulómbicas	
THR-62	0.11	ASP-61	0.06
-	-	ASP-64	0.27
-	-	ASP-338	0.61
-	-	ASP-343	0.02
-	-	TYR-62	0.73
-	-	LYS-218	-1.26
-	-	ASP-339	0.84

Tabla F.3: Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas (Continuación 2/5)

(a) TYR-197

Puente de Hidrógeno Cadena Lateral		Interacciones Coulómbicas	
CYS-201	0.78	CYS-201	2.03
-	-	TYR-444	1.23
-	-	GLU-436	0.09
-	-	TYR-407	0.14

(b) TYR-310

Puente de Hidrógeno Cadena Lateral		Interacciones Coulómbicas	
CYS-374	0.66	CYS-374	1.15
-	-	TYR-377	1.18

Tabla F.4: Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas (Continuación 3/5)

(a) TYR-309

Puente de Hidrógeno Cadena Lateral		Interacciones Coulómbicas	
ASP-339	0.85	ASP-61	0.09
-	-	ASP-64	0.19
-	-	ASP-338	0.13
-	-	TYR-62	0.17
-	-	LYS-218	-0.6
-	-	ASP-339	1.79
-	-	TYR-69	0.22
-	-	TYR-89	0.18

(b) TYR-392

Puente de Hidrógeno Cadena Lateral		Interacciones Coulómbicas	
CYS-306	0.85	CYS-106	1.49
ARG-369	-0.31	ARG-369	-0.4
GLU-394	0.85	CYS-374	0.17
-	-	GLU-393	0.08
-	-	TYR-377	0.09
-	-	GLU-394	0.77

Tabla F.5: Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas (Continuación 4/5)

(a) TYR-377

Interacciones Coulómbicas	
CYS-306	0.34
CYS-323	0.03
CYS-373	0.67

(b) TYR-407

Interacciones Coulómbicas	
CYS-306	0.46
TYR-69	0.21
TYR-444	1.23

Tabla F.6: Influencia del entorno en cada aminoácido - Tirosinas (Continuación 5/5) y Lisina

(b) LYS-218

(a) TYR-444

Interacciones Coulómbicas	
CYS-201	0.68

Puente de Hidrógeno Cadena Lateral		Interacciones Coulómbicas	
ASP-64	0.85	ASP-338	0.28
ASP-339	0.85	TYR-62	0.79
-	-	TYR-69	1.54
-	-	TYR-89	1.26
-	-	TYR-309	0.60
-	-	ASP-64	2.03
-	-	ASP-339	2.03

Apéndice G

Detalle de los aminoácidos con pKa mayor al pKa de la serotonina

A continuación se muestran los aminoácidos que presentaron un pKa superior al de la serotonina, al menos una vez, durante la simulación molecular. Además se incluye el valor de pKa máximo ($pK_{a_{max}}$) observado en cada uno.

Tabla G.1: Aminoácidos y su pKa máximo

(a) Aminoácidos 19-140

Residuo	Nº	$pK_{a_{max}}$
LYS	30	12.29
TYR	35	10.77
ARG	45	12.59
ARG	47	11.95
ARG	51	14.08
TYR	53	11.30
ARG	56	14.28
TYR	62	16.27
TYR	69	20.13
ARG	76	15.00
ARG	79	17.31
LYS	82	12.57
TYR	89	19.85
LYS	90	11.15
ARG	96	13.90
TYR	100	11.35
LYS	102	11.63
LYS	104	11.50
TYR	106	10.48
ARG	109	14.23
TYR	121	12.89
TYR	124	15.21
ARG	129	12.89
LYS	136	11.56
LYS	151	11.53

(b) Aminoácidos 143-295

Residuo	Nº	$pK_{a_{max}}$
LYS	154	12.41
LYS	158	12.57
LYS	163	12.54
CYS	165	13.34
LYS	168	10.44
ARG	171	14.63
ARG	172	15.66
TYR	175	12.79
TYR	197	19.22
LYS	199	10.13
CYS	201	13.79
ARG	206	13.47
ARG	217	14.82
LYS	218	19.26
ARG	229	12.48
LYS	239	11.70
TYR	264	12.49
CYS	266	12.64
LYS	267	11.56
TYR	268	11.01
LYS	280	11.19
ARG	284	14.34
ARG	291	10.52
ARG	297	13.32
CYS	306	14.1

Tabla G.2: Aminoácidos y su pKa máximo (Continuación)

(a) Aminoácidos 298-387

Residuo	Nº	$pK_{a_{max}}$
TYR	309	18.56
TYR	310	17.57
LYS	311	11.67
LYS	316	11.59
LYS	317	12.59
LYS	318	10.91
TYR	320	11.26
CYS	321	11.92
CYS	323	19.21
LYS	341	11.41
ARG	356	15.20
LYS	357	11.39
ARG	360	15.28
LYS	363	12.29
LYS	366	11.54
ARG	369	14.81
LYS	370	11.58
LYS	371	11.77
LYS	372	11.75
CYS	374	12.17
TYR	377	18.19
LYS	379	13.03
TYR	392	18.08
LYS	395	12.06
CYS	398	11.47

(b) Aminoácidos 391-511

Residuo	Nº	$pK_{a_{max}}$
TYR	402	11.36
CYS	406	14.46
TYR	407	17.82
TYR	410	13.82
TYR	419	10.58
ARG	421	14.30
ARG	424	12.92
ARG	429	14.84
LYS	440	11.02
TYR	444	19.03
ARG	454	13.40
ARG	457	13.02
LYS	465	11.51
LYS	469	11.54
LYS	479	11.54
ARG	493	13.46
LYS	503	10.46
TYR	519	10.06
LYS	520	10.44
TYR	521	10.09
LYS	522	10.46

Apéndice H

Intensidad de restricción en la estructura intermembrana

Se comprobó la libertad de movimiento de la región de inserción en la membrana (Residuos: 495-513) a $1[\text{kcal}/(\text{mol} \cdot \text{a}^2)]$ y $10[\text{kcal}/(\text{mol} \cdot \text{a}^2)]$, para definir la fuerza de restricción que se utilizaría en este trabajo (estudio previo). El RMSd presentado por ambas estructuras se muestra en la Figura H.1.

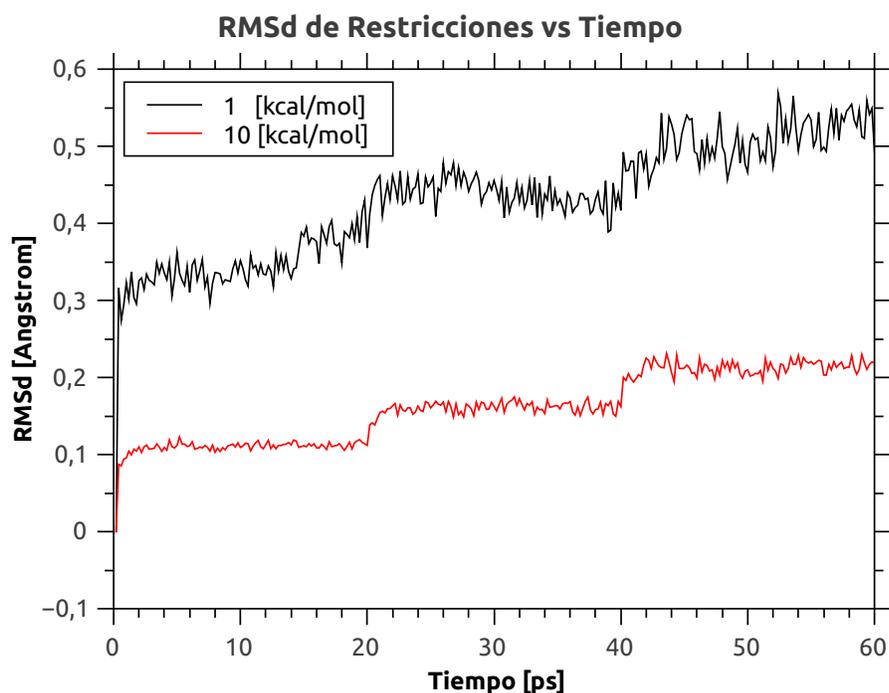


Figura H.1: RMSd de la restricción en región de anclaje a membrana (Residuos 496 – 513)