



Facultad de ingeniería
Escuela de ingeniería Civil en Bioinformática

Análisis computacional de la interacción entre estatinas y la isoenzima I de la adenilato quinasa humana (hAK1): evaluación de los sitios alostéricos y estimación de la afinidad hAK1-estatina.

Estudiante: Williams Herrera

Matricula: 2016430024

Profesor Tutor: Dr. Jans Alzate-Morales

Profesor cotutor: Dr. Mauricio Bedoya Tabares

Profesor Informante: Dr. Julio Caballero

Fecha: 12 de abril del 2023

Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Bioinformática

Talca - Chile

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

Agradecimientos

Estimados,

Me siento profundamente honrado por la finalización de mi proyecto de memoria. Este es un momento muy especial para mí, ya que representa el culmen de muchos años de arduo trabajo y dedicación.

A mi familia, les agradezco por ser mi base y mi fundamento. Gracias por su amor incondicional, su comprensión y su paciencia. Ustedes han sido mi red de seguridad en los momentos difíciles y han compartido conmigo los momentos más felices de mi vida. Siempre me han brindado un hogar acogedor y un ambiente cálido y seguro en el que puedo ser yo mismo. No podría pedir una familia mejor.

A mis compañeros, les agradezco por ser una fuente de inspiración y motivación. Sus ideas, su creatividad y su espíritu colaborativo me han llevado a alcanzar metas que jamás habría logrado en solitario. Ha sido un honor trabajar con cada uno de ustedes.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis profesores por su dedicación, paciencia y sabiduría. Ustedes han sido mi guía a lo largo de mi camino educativo y profesional. Sus enseñanzas han sido fundamentales para mi crecimiento personal y académico.

Les agradezco a todos por su presencia en mi vida y por todo lo que han hecho por mí. No puedo expresar suficientemente lo afortunado que me siento de tenerlos en mi vida.

Con gratitud,

Williams Jesus Herrera Aranda

Índice

Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción	8
Estatinas y sus efectos pleiotrópicos	8
Adenilato quinasa: función y estructura.....	10
Isoenzima 1 humana del adenilato quinasa.....	13
Inhibidor Ap5A de la AK.....	14
Uso de estatinas para la inhibición de hAK1	15
Hipótesis	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos.....	18
Materiales y métodos.....	19
Preparación del modelo estructural	19
Acoplamiento Molecular (Docking)	20
Simulaciones de Dinámica Molecular (DM)	22
Cálculos de energía libre	25
Resultados y Discusión.....	27
Preparación del modelo estructural	27
Acoplamiento Molecular (Docking)	29
Simulaciones de Dinámica Molecular (DM)	39
Mapas de calor (heat map) para la interacción hAK1- estatina	45
Estudio del efecto alostérico de las estatinas en el sitio de unión a sustratos de hAK1.....	52
Cálculos de energía libre	57
Conclusión.....	61
Referencias.....	64

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura 2D de las estatinas tipo I, dibujadas con Molview.	8
Figura 2. Estructura 2D de las estatinas tipo II, dibujadas con Molview.	9
Figura 3. Representación tridimensional de la estructura de AK.	12
Figura 4. Representación estructural de Ap5A en formato 2D.	14
Figura 5. Estructura tridimensional de hAK1 con los sustratos en 2D.	27
Figura 6. Representación estructural 2D de las estatinas seleccionadas.	28
Figura 7. Representación tridimensional de las 8 cajas de docking.	29
Figura 8. Representación tridimensional de las conformaciones de docking.	31
Figura 9. Secuencia y clústeres que conforman el "Sitio 1".	32
Figura 10. Gráficos del porcentaje de interacciones con residuos destacados en el sitio 1.	33
Figura 11. Secuencia y clústeres que conforman el "Sitio 2".	35
Figura 12. Secuencia y clústeres que conforman el "Sitio 3".	37
Figura 13. RMSD del "Backbone" de la proteína hAK1 para cada estatina.	40
Figura 14. RMSD del Ligando como estatina en la proteína hAK1.	42
Figura 15. Mapa de calor de los distintos tipos de interacciones con los residuos de interés.	44
Figura 16. Mapa de calor con todos los residuos que interactúan en el sitio 1.	46
Figura 17. Representación de interacción de LYS56 con RVS, LYS63 y SVS.	47
Figura 18. Mapa de calor con todos los residuos que interactúan en el sitio 2.	48
Figura 19. Representación de interacción de TYR32 y TYR34 con PVS, LYS31 y PVS.	49
Figura 20. Mapa de calor con todos los residuos que interactúan en el sitio 3.	50
Figura 21. Representación de interacción de TYR154 y AVS, TYR153 y FVS, LYS147 y SVS.	51
Figura 22. Alineamiento Estructural del sitio activo entre hAK1 y ApADK.	53
Figura 23. Interacciones de hAK1 sin estatina, entre el ATP y LYS21, ARG138 y ARG149.	54

Índice de Tablas

Tabla 1. Valores K_b de estatinas determinados a partir de estudios de inhibición de hAK1	19
Tabla 2. Valores de energía e interacciones con las conformaciones seleccionadas en el "sitio 1".	34
Tabla 3. Valores de energía e interacciones con las conformaciones seleccionadas en el "sitio 2".	36
Tabla 4. Valores de energía e interacciones con las conformaciones seleccionadas en el "sitio 3".	38
Tabla 5. Valores de distancias de las Interacciones en hAK1 con y sin estatina.....	54
Tabla 6. Valores de energía y de desviación estándar para cada estatina en el "sitio 1".....	57
Tabla 7. Valores de energía y de desviación estándar para cada estatina en el "sitio 2".....	57
Tabla 8. Valores de energía y de desviación estándar para cada estatina en el "sitio 3"	58

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Reacción de transferencia de fosfato catalizada por AK.....	11
Ecuación 2. Reacción de unión y disociación de las moléculas del receptor y el ligando	19
Ecuación 3. Cálculo de energía libre de unión (ΔG_{Bind}).....	25
Ecuación 4. Cálculo del cambio de energía de la mecánica molecular (ΔE_{MM})	25
Ecuación 5. Cálculo del cambio de energía libre de solvatación (ΔG_{Sol}).....	25

Resumen

Las estatinas como fármacos inhiben de manera muy eficaz la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) que cataliza el paso limitante de la velocidad de reacción en la biosíntesis del colesterol, reduciendo los niveles de LDL (Lipoproteínas de baja densidad) en el organismo. Estos ligandos se clasifican por generación y origen de fabricación. Usualmente en cada generación se introducen compuestos con mejores afinidades y menores efectos secundarios, como problemas de toxicidad y dificultad en procesos de síntesis. Las estatinas se usan en patologías cardiovasculares y además provocan efectos favorables sobre las lipoproteínas, función endotelial, inflamación, trombosis, entre otros. Sin embargo, se ha reconocido que estos mismos efectos podrían generarse de forma independiente a la inhibición de la HMG-CoA reductasa, ya que las estatinas también son capaces de inhibir otros blancos moleculares desarrollando efectos alternos denominados con el concepto de pleiotropía. Un caso de especial interés es el análisis de la enzima adenilato quinasa humana (hAK) cuya relación con las estatinas se deriva de su regulación del transporte inverso del colesterol. Dentro de las funciones de este blanco molecular, se destaca su participación en la síntesis de nucleósidos de adenina y la regulación de reacciones energéticas celulares. La hAK presenta una variedad de isoformas, donde la principal es la isoenzima 1 humana (hAK1), debido a que es la isoforma que más se expresa en los diferentes tejidos humanos. Sin embargo, a partir de una revisión de la literatura reciente, se sabe que dicha enzima presenta un solo inhibidor reconocido como Ap5A, por tanto, hay una evidente falta de información sobre el desarrollo de inhibidores para este blanco molecular y el modelado estructural de las interacciones ligando-proteína. Esta información es fundamental para poder entender las relaciones estructura-actividad y diseñar nuevos ligandos selectivos y más afines para esta proteína. Por esta razón, en este proyecto de tesis se aplicaron técnicas de acoplamiento molecular (docking), dinámica molecular y cálculos de energía libre de unión para caracterizar la afinidad entre un grupo de estatinas y

hAK1, explorando sitios de unión alostéricos e interacciones que se logren establecer en la unión ligando-proteína.

Abstract

Statins as drugs are very effectively inhibiting the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA) that catalyzes the rate-limiting step in cholesterol biosynthesis, therefore reducing LDL (Low Density Lipoprotein) levels in the body. These ligands are classified by generation and origin of manufacture. Usually, in each generation, compounds with better affinities and fewer side effects are introduced, as well as toxicity problems and difficulty in synthesis processes are improved. Statins are used in cardiovascular pathologies and cause favorable effects on lipoproteins, endothelial function, inflammation, thrombosis, among others. However, it has been recognized that these same effects could be generated independently of HMG-CoA inhibition, since statins are also capable of inhibiting other molecular targets, developing alternate effects called pleiotropy. A case of special interest is the analysis of the human enzyme adenylate kinase (hAK) whose relationship with statins derives from its regulation of reverse cholesterol transport. Among the functions of this molecular target, are the participation in the synthesis of adenine nucleosides and the regulation of cellular energetic reactions. Adenylate kinase presents a variety of isoforms, where the main one is human isoenzyme 1 (hAK1), because it is the isoform that is most expressed in different human tissues. However, from a review of the recent literature, it is known that this enzyme has a single inhibitor recognized as Ap5A, therefore, there is an evident lack of information on the development of inhibitors for this molecular target and the structural modeling of ligand-protein interactions. This information is essential to be able to understand the structure-activity relationships and to design new selective and more potent ligands for this protein. For this reason, it is proposed as a thesis project to apply molecular docking techniques, molecular dynamics and binding free energy calculations between statins and hAK1, to explore the allosteric binding sites and the interactions that can be established in ligand-protein binding.

Introducción

Estatinas y sus efectos pleiotrópicos

Las estatinas se utilizan ampliamente para el tratamiento de la hipercolesterolemia, ya que inhiben competitivamente la HMG-CoA reductasa, reduciendo más que otros fármacos los niveles de LDL (Lipoproteínas de baja densidad), disminuyendo el colesterol de los hepatocitos y los niveles de triglicéridos en pacientes hipertriglicéridémicos (Maron et al., 2000).

Los ensayos clínicos en pacientes con enfermedad coronaria y colesterol alto, han demostrado consistentemente que las estatinas reducen el riesgo relativo de eventos coronarios mayores en aproximadamente un 30% y producen un mayor beneficio absoluto en pacientes con mayor riesgo basal. Los mecanismos propuestos incluyen efectos favorables sobre las lipoproteínas plasmáticas, función endotelial, arquitectura y estabilidad de la placa aterosclerótica, trombosis e inflamación (Maron et al., 2000).

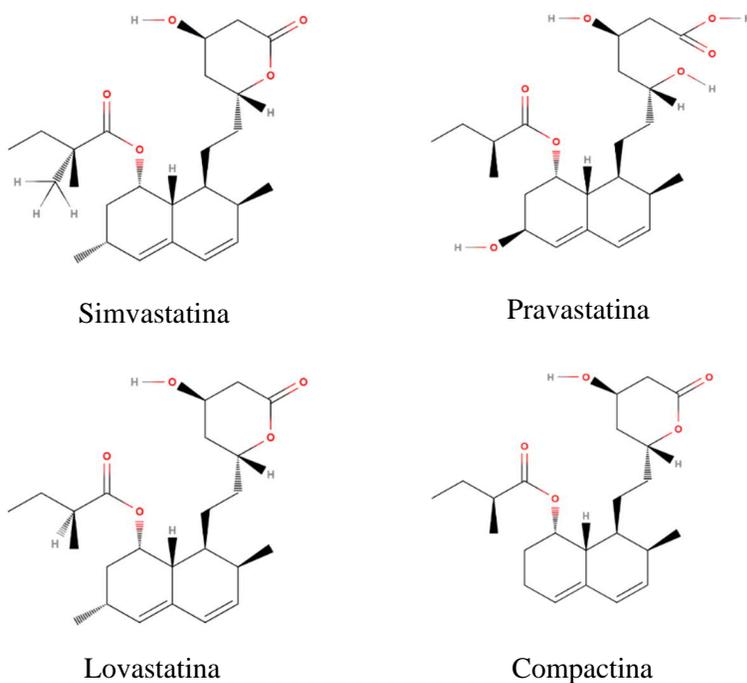


Figura 1. Estructura 2D de las estatinas tipo I, dibujadas con Molview.

Las estatinas como fármacos que se han desarrollado y utilizado durante el transcurso de los años, se dividen en dos grupos de primera y segunda generación (tipo I y tipo II). Entre las estatinas tipo I se encuentra la compactina, lovastatina, simvastatina y pravastatina (**Figura 1**). Estos fármacos se derivan de metabolitos de hongo con una estructura similar en base a un grupo sustituyente de cabeza polar y un segmento hidrofóbico que contiene un anillo decalina (Graham L. Patrick, 2013). Aunque estos fármacos presentan una buena efectividad para reducir los niveles de colesterol, también generan varios efectos secundarios, a la vez de ser difíciles de sintetizar por la cantidad de centros asimétricos que se encuentran cercanos y dentro del anillo decalina. Después del desarrollo de las estatinas tipo I, se desarrolló otro grupo de estatinas, las cuales fueron clasificadas como estatinas tipo II, encontrándose en este conjunto la fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, rosuvastatina y pitavastatina (**Figura 2**). Estas estatinas demostraron una actividad biológica mejorada, con menos efectos secundarios y una mayor facilidad para ser sintetizadas al no poseer centros asimétricos. Sus estructuras son sintéticas y con grupos hidrofóbicos que reemplazan el anillo decalina presente en las estatinas tipo I (Graham L. Patrick, 2013).

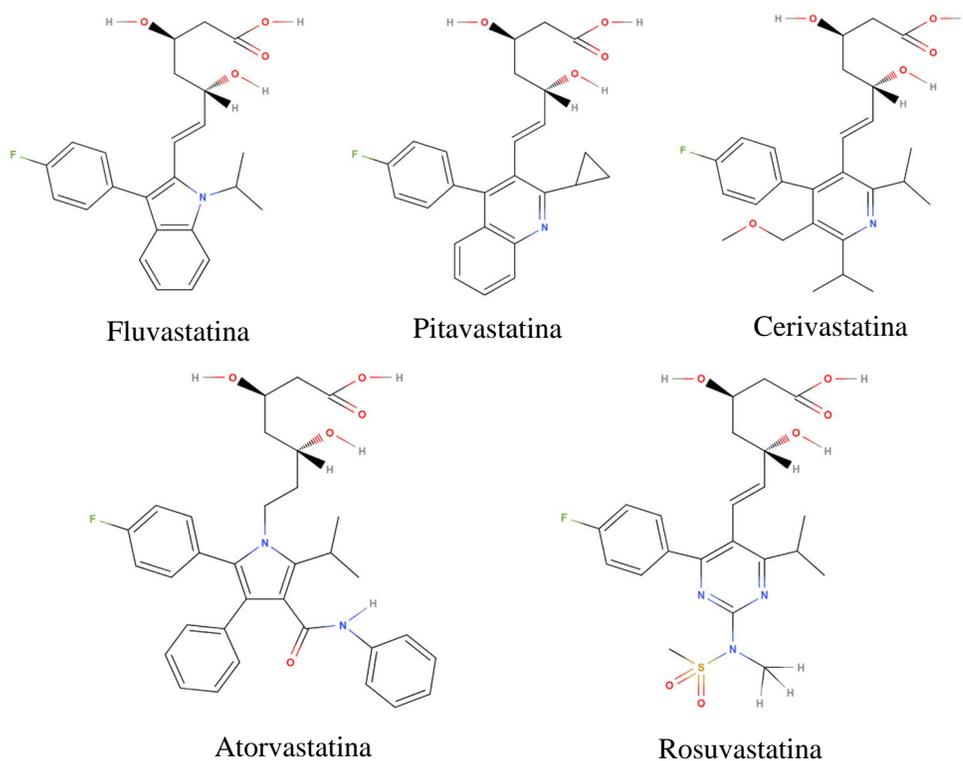


Figura 2. Estructura 2D de las estatinas tipo II, dibujadas con Molview.

En la actualidad, los descubrimientos de laboratorio con las estatinas han generado discusiones sobre la gran cantidad de efectos favorables que presentan. Estos efectos también pueden atribuirse de forma independiente a la regulación del colesterol, siendo descritos con el concepto de efectos pleiotrópicos (Kavalipati et al., 2015).

El concepto de “Pleiotropía” presenta una etimología griega formulada por palabras como “pleion”, que significa más, y “tropía”, que significa respuesta o estímulo. Dentro de este contexto, los efectos pleiotrópicos se definen como un solo gen que afecta múltiples sistemas o determina más de un fenotipo, de forma análoga, la pleiotropía en las estatinas se define como la capacidad de ejercer múltiples actividades farmacológicas en diferentes blancos moleculares (Kavalipati et al., 2015).

Los efectos pleiotrópicos relacionados con las estatinas optimizan las funciones en las células endoteliales, disminuyen la inflamación y el estrés oxidativo. También mejoran y estimulan factores de estabilización de la placa aterosclerótica, el sistema inmunológico, el sistema nervioso central y la estructura ósea (Koskinas KC et al., 2016).

La pleiotropía de las estatinas también se presenta al inhibir isoprenoides que operan como compuestos de señalización intracelular (Wang et al., 2008). Estos compuestos son pirofosfatos de geranil-geranilo y farnesilo. Los isoprenoides ejecutan modificaciones postraduccionales de proteínas, como las lamininas nucleares, Ras, Rho, Rac y Rap. Esto se genera debido a que los complejos isoprenoides permiten gestionar diferentes funciones intracelulares, permitiendo entender porque las estatinas son capaces de generar más efectos además de los ya establecidos (Diamantis et al., 2017).

Adenilato quinasa: función y estructura

La enzima adenilato quinasa (AK) es una enzima que se encuentra generalmente tanto en organismos procariotas como eucariotas, perteneciendo a la familia de las enzimas nucleósido monofosfato quinasas (NMPK). Dentro de esta familia también

se encuentran las guanilato quinasas (GUK), timidilato quinasas (dTMPK) y uridina-citidilato quinasas (UMP-CMPK) (Fukami-Kobayashi et al., 1996; Panayiotou et al., 2011).

Las AKs son fosfotransferasas que catalizan el intercambio de nucleótidos de adenina, simplificando la entrega y la utilización de los grupos β (beta) y γ (gamma) fosforilos en el ATP. La reacción que cataliza la AK realiza una transferencia de fosfato desde el ATP hacia el AMP y logra formar dos moléculas de ADP, representándose la reacción de la siguiente forma:



Por medio de esta reacción la AK duplica el potencial energético del ATP como molécula portadora de fosforilo de alta energía, al proporcionar una fuente de energía adicional en condiciones de mayor demanda energética. Al regular el procesamiento de los nucleótidos de adenina, la AK se ve implicada en la transducción de señales metabólicas. Esto permite que los sensores metabólicos y las proteínas afectadas por la AK actúen con una mejor receptibilidad a la gran cantidad de señales que se generan en los procesos metabólicos (Pucar et al., 2002).

La AK también controla la acción de las enzimas glucogenolíticas y glucolíticas suministrando un núcleo compuesto para que rápidamente puedan actuar a lo largo de diferentes rutas. Sin embargo, eso va a depender de los requisitos de energía oscilantes cuando se provoca la señalización de AMP y el traspaso de nucleótidos (Dzeja et al., 2007). Es así como la AK, al generar AMP, repercute como una señal que incrementa las etapas de estabilización de energía, actuando como un centro de mando que normaliza y organiza las distintas reacciones y los elementos asociados a esta red energética celular.

La estructura de la AK está formada por una sola cadena polipeptídica de tamaño pequeño presentando generalmente una cantidad de 200 residuos de longitud, constituida en general por estructuras alfa-beta. Esta enzima se constituye de varios dominios conservados (**Figura 3**), como el dominio de nucleósido

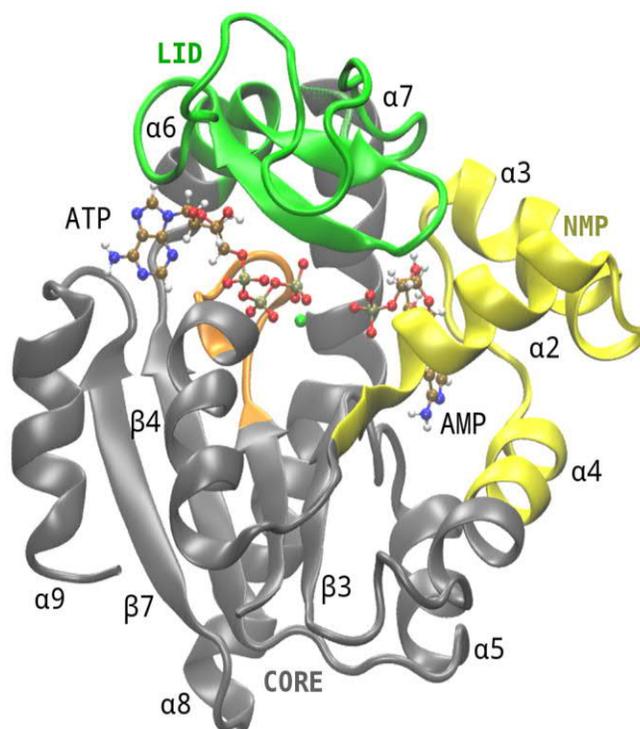


Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína AK representada en estructura secundaria. Se muestra el dominio LID, NMP y CORE en color verde, amarillo y gris respectivamente. El Loop P se muestra en color naranja y el Mg²⁺ en color verde.(Formoso et al., 2015).

monofosfato (NMP), el dominio LID, la región central (CORE) y dos sitios de unión distintos (Daily et al., 2010; Gur et al., 2013).

En un sitio se une el sustrato de ATP que interactúa con el ion Mg²⁺ ubicándose entre los dominios CORE y LID. En el segundo sitio se une el sustrato de AMP que se encuentra intercalado entre los dominios CORE y NMP. El dominio CORE presenta hojas β paralelas bordeadas por α -hélices y es más estable a nivel conformacional durante la acción de la enzima (Formoso et al., 2015). Los dominios LID y NMP realizan cambios conformacionales a gran escala, que presentan un papel estructural y funcional con respecto a la formación del sitio catalítico y protección de los sustratos de una posible hidrólisis (Daily et al., 2010). En la estructura de la AK también se encuentra el Loop P que es el componente principal para desarrollar el proceso de catálisis, debido a su interacción con los grupos fosfato (Wujak M et al., 2015).

Isoenzima 1 humana del adenilato quinasa

La AK en los humanos presenta varias isoenzimas como macromoléculas intracelulares. Estas macromoléculas forman parte del sistema de procesos sintéticos de los nucleótidos a través de dos vías reconocidas como la ruta de *novo* y la ruta de rescate. La ruta *de novo* es la fuente principal de transcripción y replicación de DNA, y la ruta de rescate es en donde se suministra trifosfato de nucleósido (NTP) a diversas células para la replicación (Reichard P, 1988).

Las isoformas que se han reportado de la AK son un total de nueve y se presentan en distintos tejidos humanos, pero la principal isoforma de AK corresponde a la isoenzima 1 humana de adenilato quinasa (AK1 o hAK1) (Khoo & Russell, 1972). hAK1 es la isoenzima más importante entre las Aks debido a que se encuentra distribuida en casi todos los tejidos humanos, especialmente en el cerebro, los eritrocitos y los músculos esqueléticos, siendo la isoforma más investigada en base a estructura, función biológica y potencial terapéutico. Su localización subcelular es en el citosol y es donante de fosfato por medio de todos los NTP presentes, para una posterior fosforilación de AMP (Panayiotou et al., 2011).

Las irregularidades funcionales relacionadas con AK1, pueden describirse específicamente según los tejidos que se vean afectados, generando diversas enfermedades o patologías. Por ejemplo, la insuficiencia de AK1 en los eritrocitos puede provocar anemia hemolítica (Matsuura et al., 1989). En el corazón los problemas se atribuyen a una rápida pérdida de la fuerza de contracción al sufrir estrés isquémico. En los músculos esqueléticos la deficiencia de esta enzima reduce la fosforilación de AMPK, limitando a la vez la elaboración de AMP (Hancock CR et al., 2006).

Inhibidor Ap5A de la AK

Las investigaciones relacionadas con la búsqueda de inhibidores de Aks, han establecido los polifosfatos de dinucleótidos como potenciales ligandos capaces de regular enzimas, canales iónicos y transportadores. Estos grupos de ligandos actúan como inhibidores enzimáticos implicados en la transferencia de nucleótidos de fosfato que es regulada por AK. Dentro de los polifosfatos de dinucleótidos, el compuesto más reconocido y estudiado en investigaciones de AK, es el ligando bisustrato Ap5A (pentafosfato de diadenosina). Ap5A tiene la capacidad de producir inhibición competitiva para generar ADP y no competitiva para generar ATP, interactuando con ambos sitios de unión de la AK (Lienhard & Secemski, 1973).

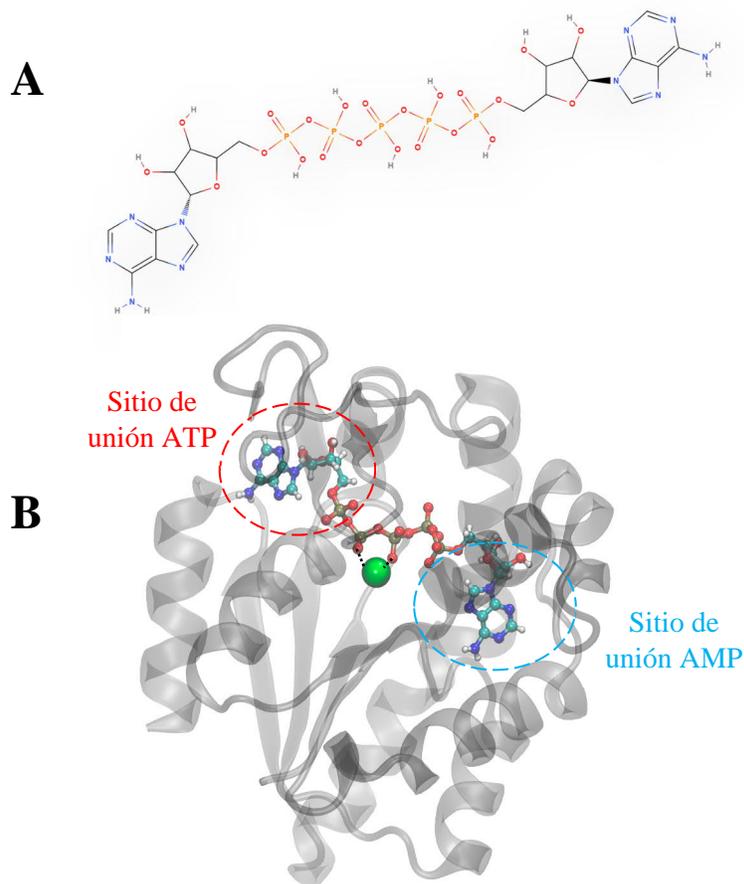


Figura 4. Representación estructural de (A) Ap5A en formato 2D diseñado con Molview. (B) Estructura tridimensional cristalográfica de la mutante de AK *E. coli*, visualizado de color gris con el software VMD en formato New Cartoon interactuando con Ap5A en ambos sitios de unión a ATP y AMP. El inhibidor en formato CPK forma un complejo con el ion Mg²⁺ representado como VDW de color verde (PDB ID: 4X8L).

A través de diversos estudios experimentales, se identificó que Ap5A, al interactuar con las AKs, desarrolla una inhibición por medio de su estructura de dímero de cola a cola (**Figura 4**). Esta interacción forma complejos con iones Mg^{2+} , ocupando ambos sitios de unión para evitar la acción del sustrato ATP y el sustrato AMP en el sistema de la AK (Kurebayashi et al., 1980; Stanojevic et al., 2008).

Dependiendo de la fuente de AK, bien sea de un líquido corporal, organismo o tipo de célula, se ha informado que Ap5A inhibe completamente la actividad del AK en un rango de concentración de 10 a 200 μM (Yegutkin et al., 2008, 2012). Entre todas las isoenzimas de Aks humanas, se encontró que la hAK1 se expresa en un alto contenido en la sangre y en la membrana plasmática. El valor de IC_{50} de Ap5A en suero y células endoteliales es de 6,3 μM y 6,0 μM respectivamente, en presencia de AMP a 0,5 mM y ATP a 0,8 mM como sustratos (Yegutkin et al., 2008, 2012).

Las AKs se pueden clasificar según el tipo de conformación que presenta el dominio LID, es decir, si la conformación se encuentra abierta (tipo corto) o si la conformación está cerrada (tipo largo) (Fukami-Kobayashi et al., 1996). Estos cambios de conformación dependiendo de si son de tipo corto o largo, pueden afectar la inhibición de la AK, ya que la apertura del dominio LID es un factor clave que determina la velocidad de la reacción catalítica generada por AK. Por esta razón se han identificado diversas evidencias en donde el ligando Ap5A como inhibidor actúa con mayor eficiencia en Aks que presentan un dominio LID de tipo corto que de tipo largo. Esto también ocurre con la isoenzima hAK1 que presenta un dominio LID con una conformación abierta (tipo corto), en donde la inhibición enzimática afecta directamente la velocidad de la reacción catalítica de este sistema (Feldhaus et al., 1975; Glaser et al., 2002).

Uso de estatinas para la inhibición de hAK1

Aun cuando se ha presentado suficiente evidencia del uso de las estatinas para regular los niveles de colesterol, hay muy pocos avances en el estudio de las posibles interacciones con otras proteínas humanas, principalmente al considerar la

pleiotropía y su relación con las interacciones entre las estatinas y la hAK1. Teniendo en cuenta que la vía de endocitosis de HDL mediada por P2Y₁₃ en hepatocitos humanos está regulada por la AK de superficie celular, lo que hace evidente que esta enzima es un objetivo potencial para la regulación inversa del transporte de colesterol (Fabre et al., 2006).

Recientemente fue reportado el primer estudio para determinar las posibles interacciones de algunas de las estatinas con hAK1, utilizando enfoques de espectroscopía de fluorescencia y docking molecular (Wujak et al., 2021). Las técnicas de espectroscopía de fluorescencia permiten determinar el impacto de las estatinas en la actividad enzimática de hAK1, las longitudes de onda de absorción, emisión y rendimientos cuánticos. El docking molecular se desarrolló como un acoplamiento a ciegas, para predecir un posible sitio de unión a la proteína hAK1, determinando también posibles conformaciones preferidas energéticamente al formar el complejo hAK1-estatina.

Para la investigación de espectroscopía de fluorescencia y docking molecular, se utilizaron cinco estatinas representantes de la primera y segunda generación, las cuales son la simvastatina y pravastatina como estatinas tipo I (**Figura 1**), y la rosuvastatina, atorvastatina y fluvastatina como estatinas tipo II (**Figura 2**). Los sistemas estudiados fueron hAK1 y AK de *Geobacillus stearothermophilus* (Akst), con el objetivo de evaluar un dominio LID de tipo corto (hAK1) y de tipo largo (Akst). Esto se debe a que la inhibición de la AK por medio de las estatinas puede verse afectada dependiendo del tipo de conformación que presente su dominio LID. Por lo tanto, este análisis permite comparar la eficiencia de las estatinas al inhibir Aks en diferentes tipos de conformación, identificando posibles regiones de unión que maximicen la afinidad entre el fármaco y la enzima (Wujak et al., 2021).

Los resultados de los experimentos con espectroscopia de fluorescencia y de docking molecular de las estatinas con hAK1, revelaron una unión fuerte en ausencia de sustratos con un posible mecanismo de unión no competitivo. Esto quiere decir que los ligandos no se ubican en el sitio activo catalítico, si no que se unen en sitios diferentes denominados sitios alostéricos. Con respecto a la actividad

de Akst no se presentó inhibición, lo que demuestra una sensibilidad diferente entre las Aks de tipo corto y largo. Los investigadores sugieren que se presenta una accesibilidad limitada, debido a la presencia de un dominio LID cerrado que se interpone entre la interacción de las estatinas y los potenciales sitios activos. En consecuencia, esto reduce significativamente el potencial inhibidor del fármaco. En el caso de la hAK1 esto es diferente, debido a que el dominio LID se encuentra abierto y los sitios activos se encuentran expuestos para una posible unión alostérica de las estatinas. Estos sitios de unión se reportaron en las regiones más cercanas al dominio LID, a través de interacciones con aminoácidos de tirosina, específicamente con los residuos Y34, Y32, Y117 y Y154 (Wujak et al., 2021).

El estudio de la actividad de las estatinas y su interacción con la hAK1 por medio de espectroscopia de fluorescencia y docking molecular nos proporciona información valiosa sobre la unión y potencial de inhibición de las estatinas utilizadas. Dicha información abre la posibilidad de desarrollar enfoques de análisis más descriptivos de la relación estructura-actividad del complejo fármaco-proteína. Al comprender la relación estructura-actividad se abre la posibilidad de proponer nuevos compuestos con afinidad por hAK1.

En el presente proyecto de tesis se aplicó una metodología computacional que abordó la simulación molecular del complejo hAK1-estatinas desde un análisis termodinámico. Se usaron herramientas computacionales para la obtención de los complejos por medio de acoplamiento molecular y la evaluación de la estabilidad y flexibilidad de los mismos por dinámica molecular (DM). Adicionalmente, la energía libre de unión de los complejos fue obtenida con cálculos de energía libre de unión usando el método de área de superficie de Born generalizada de mecánica molecular (MM-GBSA).

Estas metodologías permitieron explorar exhaustivamente los distintos modos de unión de las estatinas en los sitios alostéricos de hAK1 y determinar las afinidades respectivas de la simvastatina, pravastatina, rosuvastatina, atorvastatina y fluvastatina. El presente estudio aportó nuevas evidencias moleculares de la interacción de estatinas con un blanco molecular muy poco estudiado estructural y

molecularmente. De esta forma, se espera poder ampliar el conocimiento de estos complejos para el diseño de nuevos inhibidores de hAK1 con un potencial terapéutico mayor.

Hipótesis

Las estatinas se unen favorablemente a los potenciales sitios alostéricos en hAK1, por tanto, se puede estimar su afinidad relativa por esos sitios y describir molecularmente los efectos sobre el sitio de unión de los sustratos usando metodologías computacionales.

Objetivo General

Estudiar las interacciones intermoleculares entre la hAK1 y un grupo de estatinas de primera y segunda generación usando metodologías computacionales.

Objetivos Específicos

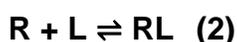
- 1.- Seleccionar y preparar el modelo estructural objetivo hAK1 y las estatinas tipo I y tipo II.
- 2.- Identificar los sitios alostéricos más favorables en complejos proteína ligando de las estatinas en interacción con hAK1, por medio de cálculos de acoplamiento molecular.
- 3.- Aplicar métodos de dinámica molecular para estudiar a través del tiempo las interacciones intermoleculares de los complejos hAK1-estatina y los efectos estructurales sobre el sitio de unión de los sustratos.
- 4.- Obtener las energías libres de unión relativas de los complejos hAK1 estatina por medio de cálculos con solvente implícito (MM-GBSA).

Materiales y métodos

Preparación del modelo estructural

El modelado molecular de la estructura de la proteína hAK1 y las estatinas permite estudiar la interacción que existe entre dichas moléculas y la enzima, identificando además aspectos claves para el posible diseño de nuevas moléculas relacionadas con las estatinas estudiadas (Farha & Hupp, 2010).

Para realizar el modelado molecular de las estructuras del complejo, el software Maestro (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) como interfaz de usuario de Schrödinger, fue utilizado para preprocesar y refinar la estructura de la proteína y de cada ligando. La proteína preparada corresponde a la hAK1 (código PDB:1Z83). Las estatinas estudiadas fueron: la simvastatina (SVS) y pravastatina (PVS) de tipo I, y la rosuvastatina (RVS), atorvastatina (AVS) y fluvastatina (FVS) de tipo II. Se seleccionaron estas estatinas para poder comparar las afinidades teóricas obtenidas en esta investigación con los valores reportados de K_b a 37°C (**Tabla 1**), como constante de unión o afinidad relacionada con la reacción de unión y disociación de las moléculas del receptor (R) y el ligando (L) (Neubig et al., 2003) como se muestra en la siguiente ecuación:



Estatinas	$K_b[L \cdot \text{Mol}^{-1}] \times 10^4$
AVS	3.4 ± 0.4
FVS	3.8 ± 0.8
PVS	3.5 ± 1.0
RVS	5.3 ± 0.9
SVS	6.6 ± 0.9

Tabla 1. Valores K_b a 37°C de estatinas determinados a partir de estudios de inhibición de hAK1 (Wujak et al., 2021).

A través de Maestro se utilizó el módulo integrado de “Protein Preparation Wizard” (Madhavi Sastry et al., 2013), para preparar la estructura de hAK1, se agregaron los átomos de hidrógeno faltantes y se eliminaron todas las aguas co-cristalizadas, excepto aquellas que interactúan con el ion de Mg^{2+} . La estructura del ligando AP5 fue modificada para construir la estructura de los sustratos de ATP y AMP. Se completaron las cadenas laterales y átomos faltantes de la proteína que no fueron resueltos durante los experimentos de cristalografía de rayos-X y, además, se conservó únicamente la cadena A que constituye la unidad biológica catalíticamente activa. Adicionalmente, y por medio de PROPKA (Hui et al., 2005), se asignaron los estados de protonación de los aminoácidos a un pH fisiológico de 7.5 de acuerdo con los experimentos del trabajo de referencia (Wujak et al., 2021).

Al finalizar el proceso de preparación y refinación, se asignaron las cargas parciales a la estructura de hAK1 y a las estructuras de cada estatina para ser exportadas en formato *.mol2*.

Acoplamiento Molecular (docking)

El acoplamiento molecular como técnica computacional permite simular y analizar la interacción entre un blanco molecular y un ligando, proteína, RNA u otras moléculas de interés. Las conformaciones obtenidas son evaluadas según la afinidad de unión de las moléculas por la proteína, utilizando funciones de puntuación para calificar cada estructura e identificar las de mayor interés (Huang & Zou, 2010).

Se utilizó el software AutoDock4.2 (Goodsell S.D et al., 1996), que presenta una serie de herramientas para la predicción de los posibles modos de unión de una molécula a un blanco molecular. También se utilizó AutoGrid (Goodsell S.D et al., 1996), como software integrado de AutoDock4.2 que calcula un conjunto de cuadrículas para establecer la grilla o caja de docking que describe el(los) sitio(s) de unión en la proteína objetivo.

Se construyeron varias cajas de docking con una zona de búsqueda que abarca en total toda la proteína. Esto permitió desarrollar un docking a ciegas, con 8 cajas de 47,25 Å de dimensión por lado, con ejes X, Y, Z de 126 x 126 x 126 puntos con un espaciado de 0.375 Å.

Con AutoDock se estableció un parámetro de búsqueda conformacional híbrido que usa un algoritmo genético y búsqueda local (GA-LS). Se utilizó una población inicial de 150 individuos al azar, con un número máximo de 25×10^6 evaluaciones de energía, un número máximo de 2.7×10^4 generaciones, un número máximo de individuos sobrevivientes igual a 1, una tasa de mutación genética y de cruce de 0.02 y 0.80, respectivamente.

Se realizaron 3 réplicas de Docking con 100 conformaciones resultantes para cada estatina por cada caja, obteniendo un total de 2400 conformaciones al sumar todos los resultados de las réplicas para las 8 cajas. Posteriormente se buscó identificar como máximo 3 posibles sitios alostéricos para cada estatina. Para identificar los posibles sitios alostéricos se realizó un proceso de clusterización de las poses resultantes con un valor de corte de 10.0 Å de RMSD con el software de MAESTRO. El clúster más poblado para cada sistema constituyó el primer sitio (Sitio 1), que está distante de los residuos de tirosinas reportados previamente. Para todos los sistemas el primer sitio fue consistente, localizado de forma similar para todas las estatinas. La segunda estrategia consistió en reducir el punto de corte a 5.0 Å de RMSD para focalizar los siguientes sitios de interés. Esta vez se ignoraron los clústeres cercanos al primer sitio y se seleccionaron los siguientes clústeres que interactuaran con alguna tirosina. El segundo (Sitio 2) y tercer sitio (Sitio 3) se reconocieron por medio de esta segunda clusterización lo que resultó en clústeres con un área más pequeña para que las conformaciones fueran más similares en base a orientación y distancia dentro de los clústeres que se formaron en estos sitios y que interactúan con las tirosinas reportadas. Para esto, se estableció que los clústeres más poblados (diferentes al primer sitio) tuvieran conformaciones que interactuaran con la TYR32 y TYR34 para el sitio 2, y para el sitio 3 que interactuaran con la TYR117 y TYR154. El script "Interaction Fingerprint" (Schrödinger Release

2020-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) implementado en MAESTRO, se utilizó para obtener e identificar todas las interacciones y tipos de interacción que se generaron entre las 2400 conformaciones para cada estatina con los residuos de la proteína hAK1.

Se establecieron tres diferentes criterios para la validación de la calidad del protocolo de docking, con el fin de fundamentar la selección de una conformación para cada estatina y en los sitios alostéricos identificados.

1. La conformación seleccionada presentó la mayor cantidad de interacciones con el residuo de interés para el sitio correspondiente.
2. La conformación seleccionada se encontró presente en el clúster más poblado ubicado en el sitio analizado.
3. La conformación seleccionada, durante la aplicación del protocolo de dinámica molecular (DM), logró mantener interacciones con los residuos de interés en una primera DM corta (50ns).

Simulaciones de Dinámica Molecular (DM)

La simulación de dinámica molecular (DM) permite predecir las posiciones de cada átomo en un sistema molecular con respecto al tiempo para comprender los fenómenos fisicoquímicos claves en su mecanismo de acción. Los movimientos que gobiernan las interacciones interatómicas desde el punto de vista clásico se basan en las leyes de Newton y la fuerza entre los átomos se estima utilizando un campo de fuerza que determina la energía global del sistema (Karplus & McCammon, 2002; McCammon et al., 1977).

Se realizaron las simulaciones de DM usando el paquete de software Desmond (Bowers et al., 2006), perteneciente a la suite de Schrödinger. Este software permite ejecutar las simulaciones de dinámica molecular, usando el campo de fuerza OPLS-2005 (Jorgensen et al., 2005), para estudiar la estabilidad conformacional de los complejos enzima-estatina.

Las conformaciones escogidas para cada estatina en los sitios alostéricos evaluados en hAK1 por el protocolo de docking, fueron solvatados utilizando una caja ortorrómbica de dimensiones de $12\text{\AA}\times 12\text{\AA}\times 12\text{\AA}$ con un modelo de solvente TIP3P, que cubre toda la superficie del sistema. Se adicionaron contraiones de cloro (Cl) para neutralizar las cargas netas positivas del sistema. Luego el complejo se minimizó energéticamente y se pre-equilibró usando la rutina de relajación predeterminada implementada en Desmond. Para ello, el programa ejecuta seis pasos compuestos de minimizaciones y simulaciones cortas (100 y 500 ps) para relajar y equilibrar el sistema del modelo antes de realizar las simulaciones de DM más prolongadas. Después se preparó una simulación de dinámica molecular corta de 50ns y se guardaron 1000 conformaciones para verificar la correcta selección de la conformación de cada estatina, a una temperatura de 300 K, una presión de 1 atm y un tipo de ensamble NPT utilizando el campo de fuerza OPLS-2005. La calidad de la conformación seleccionada se comprobó por medio de la evolución de la DM corta, al estudiar la estabilidad de la estatina en contacto con la proteína hAK1 sin perderse en el solvente o desplazarse demasiado del sitio original y logrando mantener un mínimo de un 20% de contacto (cualquier tipo de interacción) con cualquiera de los residuos de interés para cada posible sitio alostérico identificado. Cuando se cumplieron estas condiciones de estabilidad del complejo proteína-ligando, las dinámicas cortas de 50ns para cada conformación fueron extendidas en 250ns estableciendo un tiempo total de trayectoria de 300ns. Se guardaron 6000 conformaciones totales para cada sistema hAK1-estatina. El objetivo de extender la dinámica fue evaluar si la conformación seleccionada en la dinámica de 250ns mantiene o no un comportamiento estable y si logra conservar relativamente las interacciones definidas de la dinámica corta.

Las trayectorias de DM fueron analizadas para estudiar la estabilidad conformacional de cada estatina y para evaluar la interacción con los sitios de unión alostéricos escogidos según las conformaciones empleadas para este protocolo. Para el análisis de las DMs de cada estatina se utilizó el módulo "RMSD Trajectory Tool" del software de VDM (Humphrey et al., 1996), que permitió medir y graficar los cálculos de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) para el complejo hAK1

en base al backbone de la proteína y el ligando alineado a la proteína. Con estos resultados se logró estudiar la estabilidad de cada complejo proteína-ligando y las posibles fluctuaciones que se presentaron en las simulaciones. Para analizar los tipos de enlaces intermoleculares y el porcentaje de contactos que se establecen entre la enzima y las estatinas durante el tiempo de trayectoria, se utilizó la herramienta “Protein-Ligand Interaction Fingerprints” (ProLIF) (Bouysset et al., 2021).

Dentro de este mismo protocolo se examinaron los posibles efectos alostéricos generados por las estatinas dentro de las dinámicas obtenidas. Para esto se realizó un análisis de los residuos del sitio de unión que interactúan con los sustratos de ATP y AMP que han sido previamente definidos como claves para la actividad catalítica de las proteínas hAK1 y “ApADK”. La proteína “ApADK”, corresponde a una proteína del adenilato quinasa que ha sido estudiada en el microorganismo *Aeropyrum pernix*. El estudio reportó ciertos residuos que participan en el mecanismo de reacción de transferencia de fosfato desde el sustrato de ATP a la molécula objetivo AMP (Shibanuma et al., 2020). Por esta razón se aplicó un alineamiento estructural del sitio activo de la proteína “ApADK” (ID-PDB: 6LN3) y la proteína “hAK1” (ID-PDB: 1Z83) usando el módulo “Protein Structure Alignment” de Maestro, para identificar aquellos residuos de la proteína hAK1 que se alinean con los residuos de la proteína ApADK y se representaron aquellos residuos que se encontraban a una distancia máxima de 5Å del sustrato de ATP. Adicionalmente se realizó una nueva dinámica de la proteína hAK1, en ausencia de las estatinas, usando los mismos parámetros de las dinámicas anteriores de 300ns con 6000 conformaciones a generar para ser comparada con la dinámica de la proteína hAK1 con presencia de SVS en el sitio “2”. La SVS se valoró sobre las demás estatinas, porque según la literatura disponible es la estatina con mayor afinidad experimental con la proteína hAK1 y se establece en el sitio 2 al ser la región mejor clasificada al encontrarse cercana a la TYR32 y TYR34 (Wujak et al., 2021). Respecto a las distancias de los átomos de los residuos catalíticos de hAK1 que generaron las interacciones intermoleculares con el ATP en ambas simulaciones, se midieron a través del tiempo de simulación (300ns) utilizando el módulo “Simulation Event

Analysis" empleado por Maestro. De esta manera, el análisis con los residuos catalíticos de hAK1 que se lograron alinear y las distancias de las interacciones identificadas en las DMs permitieron determinar si la presencia de la SVS en el sistema hAK1 por medio de un efecto alostérico puede o no alterar la unión que se produce entre la proteína y el sustrato de ATP.

Las trayectorias o simulaciones con presencia de estatinas fueron utilizadas para ejecutar los cálculos de energía libre de unión y determinar la afinidad de las conformaciones obtenidas de cada estatina en los sitios alostéricos que se caracterizaron en hAK1.

Cálculos de energía libre

Los cálculos de energía libre de unión entre las diferentes estatinas y la proteína hAK1, permitieron determinar la afinidad teórica (ΔG_{Bind}) con la que los inhibidores pueden afectar la actividad biológica de la proteína (Pohorille et al., 2010). Por tanto, se compararon los datos computacionales de ΔG_{Bind} con los datos experimentales reportados.

Para el cálculo de energía libre se utilizó el paquete de software Prime (Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) de la suite de Schrödinger. Dentro de este paquete, los cálculos se desarrollaron por medio del método MM-GBSA (Hou et al., 2010), que combina la energía de la mecánica molecular y los modelos de solvatación implícito. Este método se describe con las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G_{\text{Bind}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S \quad (3)$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{internal}} + \Delta E_{\text{electrostatic}} + \Delta E_{\text{vdw}} \quad (4)$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{PB/GB}} + \Delta G_{\text{SA}} \quad (5)$$

Dentro de los términos representados, ΔE_{MM} corresponde al cambio de energía de la mecánica molecular que incluye cambios de energía internos (energías de enlace,

ángulo y diedro), electrostáticos y de van der Waals. ΔG_{sol} es el cambio de energía libre de solvatación, que corresponde a la suma de la energía de solvatación electrostática $\Delta G_{\text{PB/GB}}$ (contribución polar) y el componente no electrostático de solvatación ΔG_{SA} (contribución no polar). También se puede incorporar la ΔS para incluir en el cálculo el cambio de entropía conformacional del ligando al usar una temperatura T determinada.

Después de acoplar los 5 compuestos de la serie de estatinas en hAK1 y obtener las trayectorias de DM, la contribución polar se calculó utilizando el modelo de Born Generalizado, mientras que la energía no polar se obtuvo mediante el área de superficie accesible al solvente (SASA) (Adasme-Carreño et al., 2014; Rastelli et al., 2010), usando el módulo Prime. Se seleccionó un subconjunto de 500 conformaciones desde los últimos 100ns cada una de las trayectorias de DM de cada estatina para la predicción de las energías libres de unión. Se empleó el modelo de solvatación VSGB (Li et al., 2011) y el campo de fuerza OPLS-2005 para realizar los cálculos.

Los resultados de los cálculos con MM-GBSA y las comparaciones contra los datos experimentales de los valores K_b , nos permitieron validar si los modelos computacionales se ajustan y explican los antecedentes experimentales reportados. Por lo tanto, se buscó comprobar si se establece o no una misma tendencia de afinidad energética en los complejos hAK1-estatina con respecto a los sitios alostéricos reportados y en el sitio alostérico adicional que se caracterizó.

Resultados y Discusión

Preparación del modelo estructural

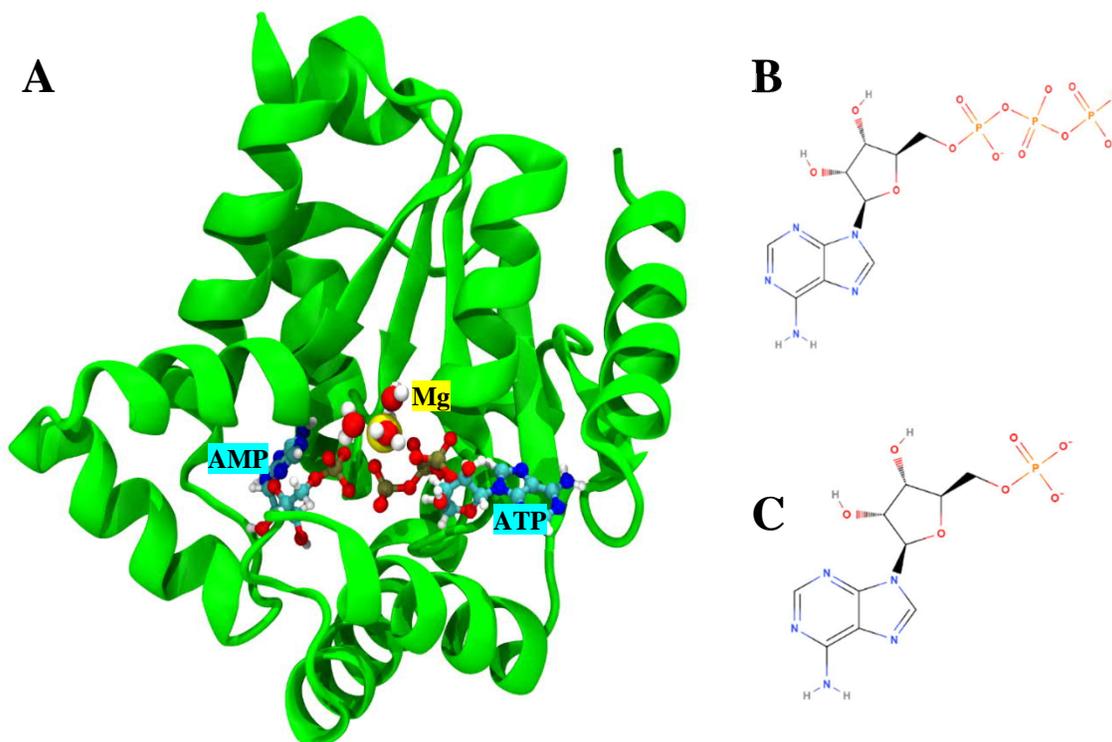


Figura 5. (A) Estructura tridimensional de hAK1 diseñada con MAESTRO en formato New Cartoon con los sustratos de AMP y ATP en representación CPK y el Ion de Mg²⁺ junto a tres moléculas de agua en formato VDW. (B) Representación estructural en 2D de adenosín trifosfato (ATP). (C) Representación estructural en 2D de Adenosín monofosfato (AMP) obtenida con Molview.

Para el estudio de la estructura de hAK1 (**Figura 5**) se utilizó el código PDB ID: 1Z83, en el cual se generaron algunos cambios como la transformación del inhibidor Ap5A por los sustratos de AMP - ATP y también el reemplazo del ion de Zn²⁺ por el ion de Mg²⁺, para así establecer las mismas características de la estructura de la enzima en su forma catalíticamente activa y que concuerdan con la literatura (Wujak et al., 2021). Con respecto a las moléculas de agua solo se mantuvieron aquellas que se ubican lo suficientemente cerca del ion de Mg²⁺ para completar su primera esfera de solvatación con coordinación octaédrica.

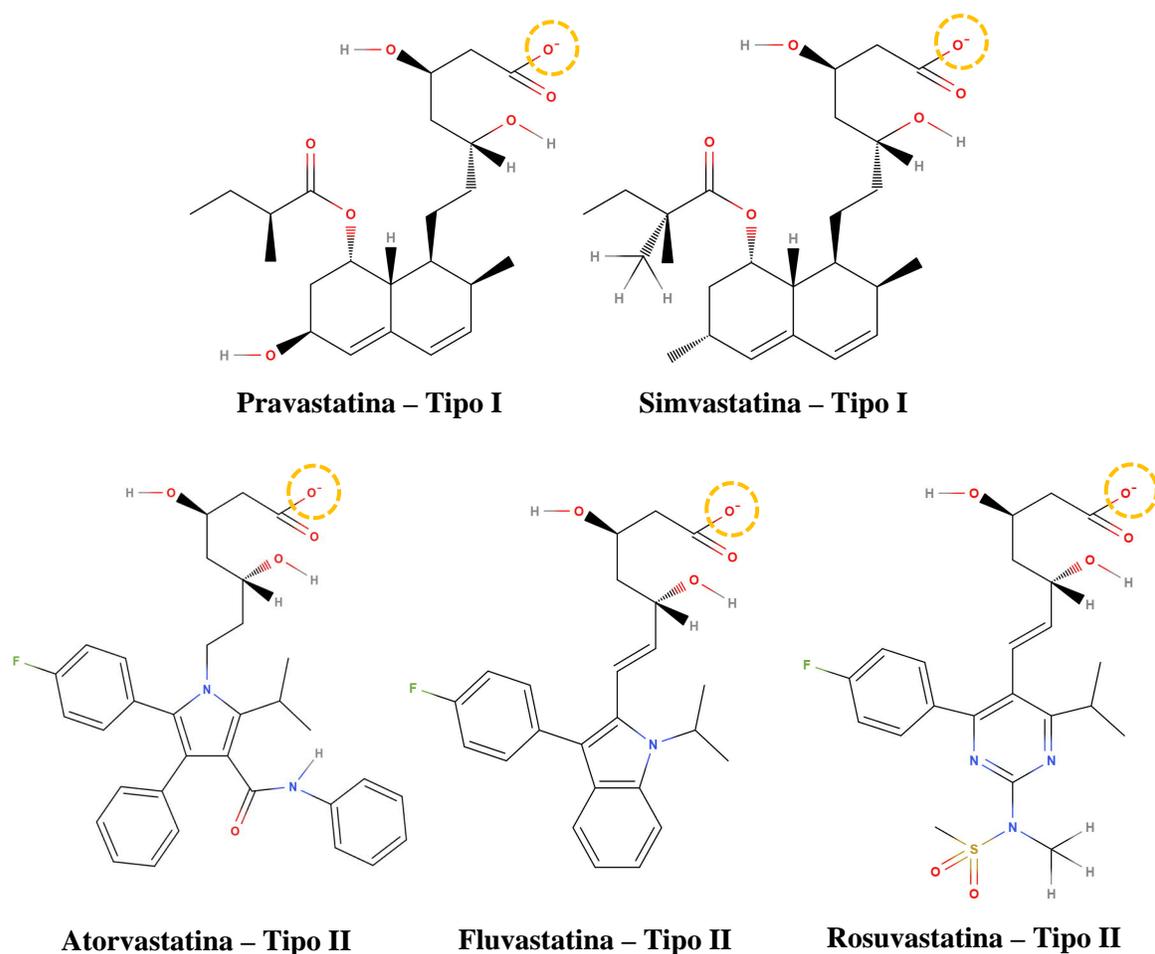


Figura 6. Representación estructural 2D de las estatinas tipo I y tipo II seleccionadas, construidas con MAESTRO y dibujadas con Molview.

Los ligandos mostrados en la **Figura 6** que corresponden a AVS, PVS, FVS, RVS y SVS, fueron construidos y preparados según la literatura (Graham L. Patrick, 2013), es decir, respetando su estructura de una cabeza polar cargada negativamente y el resto de la estructura con una naturaleza mayormente hidrofóbica en base a los anillos de decalina bicíclicos, para las estatinas tipo I, y los anillos heterocíclicos para las estatinas tipo II. Para la estructura específica de la SVS, se diseñó la forma activa del fármaco al modificar el grupo lactona por un grupo carboxílico que ocurre naturalmente por hidrólisis, cuando se rompe el enlace éster y se forma el ácido simvastatina (Endo,1992).

También se consideró que en el carboxilo terminal de todas las estructuras de las estatinas se presenta una carga negativa (-1) (Circulo amarillo) que se asigna sobre uno de los átomos de oxígeno del grupo carboxilato en la cabeza polar de cada estatina al realizar la preparación de los compuestos con PROPKA a un pH de 7.5.

Acoplamiento Molecular (docking)

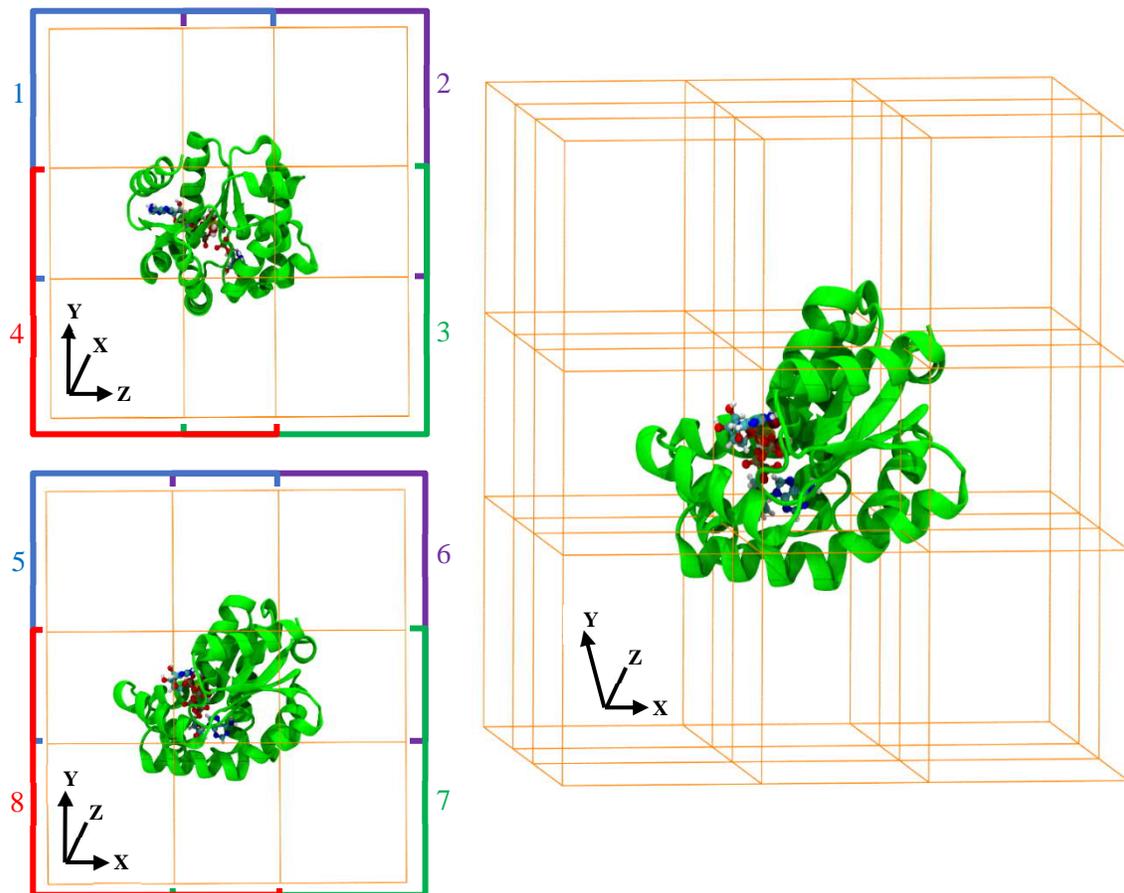


Figura 7. Representación tridimensional de las 8 cajas de docking construidas con Autogrid.

El diseño y ubicación de las 8 cajas de docking, desde diferentes ejes y que se visualiza en la **Figura 7**, dio como resultado un tamaño de 47,25 Angstrom (\AA) por lado para abordar toda la proteína, sin aumentar demasiado el espaciado de la caja

con el objetivo de no perder resolución y abarcar la exploración de las estatinas en toda la superficie de hAK1. Se construyeron las cajas de manera que cada una se sobrepone en una distancia de 20 Å por cada dimensión en forma de “cruz” entre todas las cajas evitando dejar superficies y sitios sin explorar con respecto a la proteína, donde el espaciado de 0.375 Å es suficiente para que las conformaciones de las estatinas puedan generarse en los potenciales distintos sitios alostéricos. Respecto al número de cajas, en un primer diseño solo se utilizó una caja para intentar explorar en toda la proteína posibles sitios de unión alostéricos aplicando un protocolo de docking estándar. Sin embargo, se requería de un espaciado mayor de 0.5 Å, provocando que las 100 conformaciones en 3 réplicas generadas por docking no fueran suficientes para explorar toda la proteína de forma precisa. Adicionalmente se evaluó utilizar 4 cajas de docking con los mismos parámetros de construcción definidos para las 8 cajas, pero la problemática surgió al rotar y examinar las cajas desde diferentes ejes de visualización, ya que sin la intersección de las cajas quedaban espacios sin explorar, o “puntos ciegos”. Las 4 cajas se diseñaron en base a los ejes “X” e “Y” como el largo y alto de la caja, pero para el eje “Z” como el ancho de la caja no se modificó, lo que abordaría un ancho de la caja de docking demasiado ajustada a la proteína y con un insuficiente espacio de muestreo para las conformaciones que se orienten respecto al eje “Z”. Por esta razón el diseño final consistió en utilizar 8 cajas con suficiente espacio superpuesto para evitar puntos ciegos durante el protocolo de docking de las estatinas sobre la superficie de la proteína.

Al obtener y visualizar las 2400 conformaciones desde los 24 cálculos de Docking realizados para cada estatina sobre la superficie de la hAK1, considerando las 8 cajas y las 3 réplicas, se logró explorar satisfactoriamente gran parte de la superficie de la proteína (**Figura 8**). Principalmente, se logró una buena exploración de los sitios de la TYR32, TYR34 (sitio 2) y TYR154 (sitio 3), pero más dispersamente en la TYR117. Las conformaciones de algunas estatinas se agruparon más (FVS y SVS) y en otras se encuentran más dispersas (AVS, PVS y RVS) alrededor de hAK1, pero con una reincidencia en ciertos sitios que se encuentran más ocupados por conformaciones de estatinas. Para evaluar cual de estos sitios representa la

mayor agrupación de conformaciones en las estatinas, la agrupación de estructuras (clusterización) evaluando ciertas distancias medidas por RMSD permitió analizar

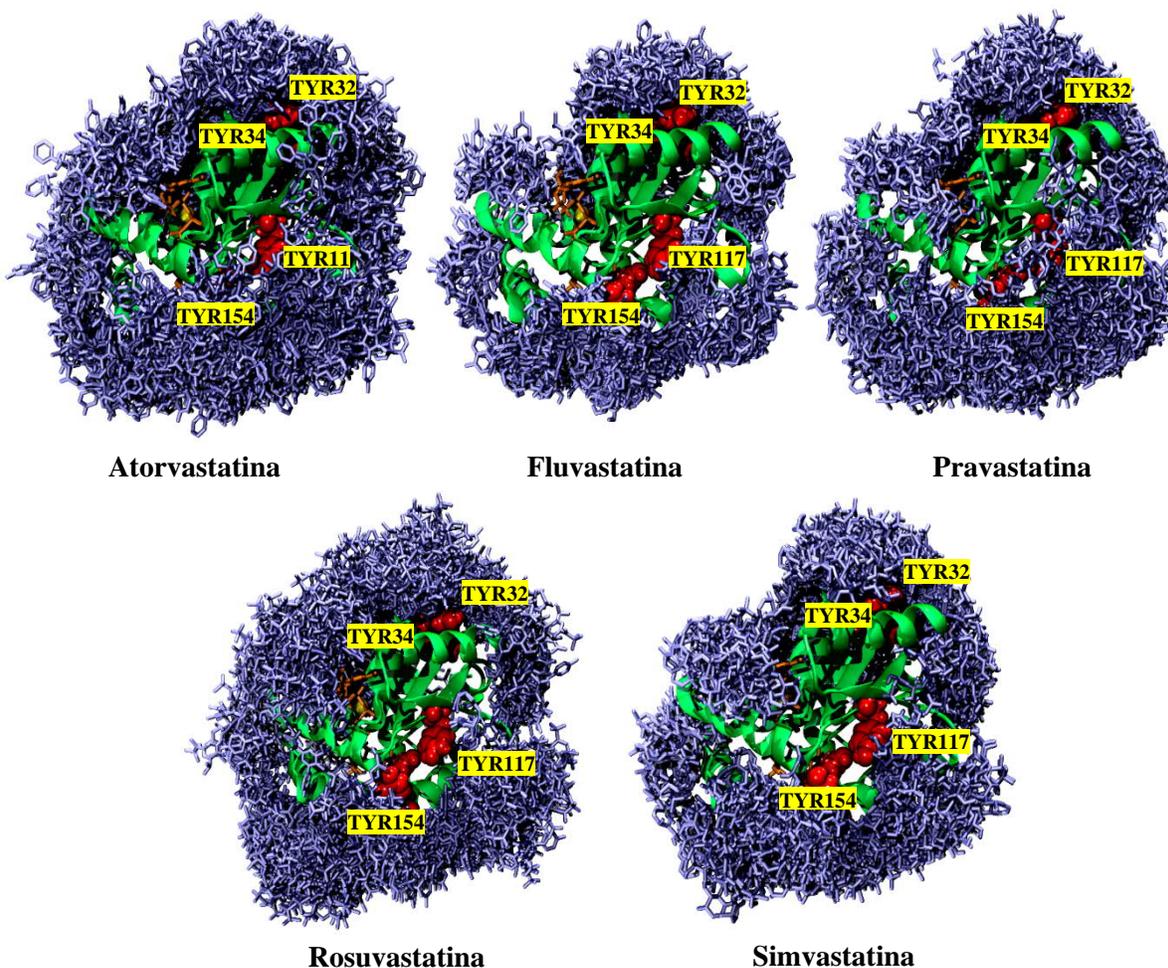


Figura 8. Representación tridimensional obtenida con VMD de las diferentes conformaciones de cada estatina en la superficie de la hAK1 y generadas con los experimentos de Docking.

estos grupos y así determinar con cuales residuos de cada sitio se genera una mayor interacción entre las estatinas y la hAK1.

Para un primer análisis se aplicó una clusterización usando un RMSD de 10Å a todas las conformaciones de las estatinas. Se encontró que, al aplicar esta distancia de corte, los clústeres más poblados para cada una de las estatinas repercuten en una misma región (**Figura 9**). Se encontró un primer sitio, que se definió como el “sitio 1” dentro de los potenciales sitios alostéricos, considerándolo como el sitio adicional porque no se encuentra cercano a las tirosinas reportadas que conforman

el “sitio 2” y “sitio 3”. Los residuos que se encuentran en una distancia de 5Å de los clústeres más poblados y que representan esta zona (residuos en color verde en la secuencia de aminoácidos de la proteína hAK1) son la GLU46, SER51, ALA52, ARG53, GLY54, LYS55, LYS56, LEU57, SER58, GLU59, ILE60, MET61, GLU62,

Secuencia de aminoácidos de la Proteína

```
SMEELKKTNIIFVVGPGSGKGTQCEKIVQKYGYTHLSTGDLLRSIVSSGSARGKKLSEIMEKG
QLVPLETVLDMLRDAMVAKVNTSKGFLIDGYPREVOQGEEFERIGQPTLLLYVDAGPETMTQR
LLKRGETSGRVDNNEETIKKRLITYYKATEPVIAFYEKRGIVRKVNAEGSVDSVFSQVCTHLDALL
```

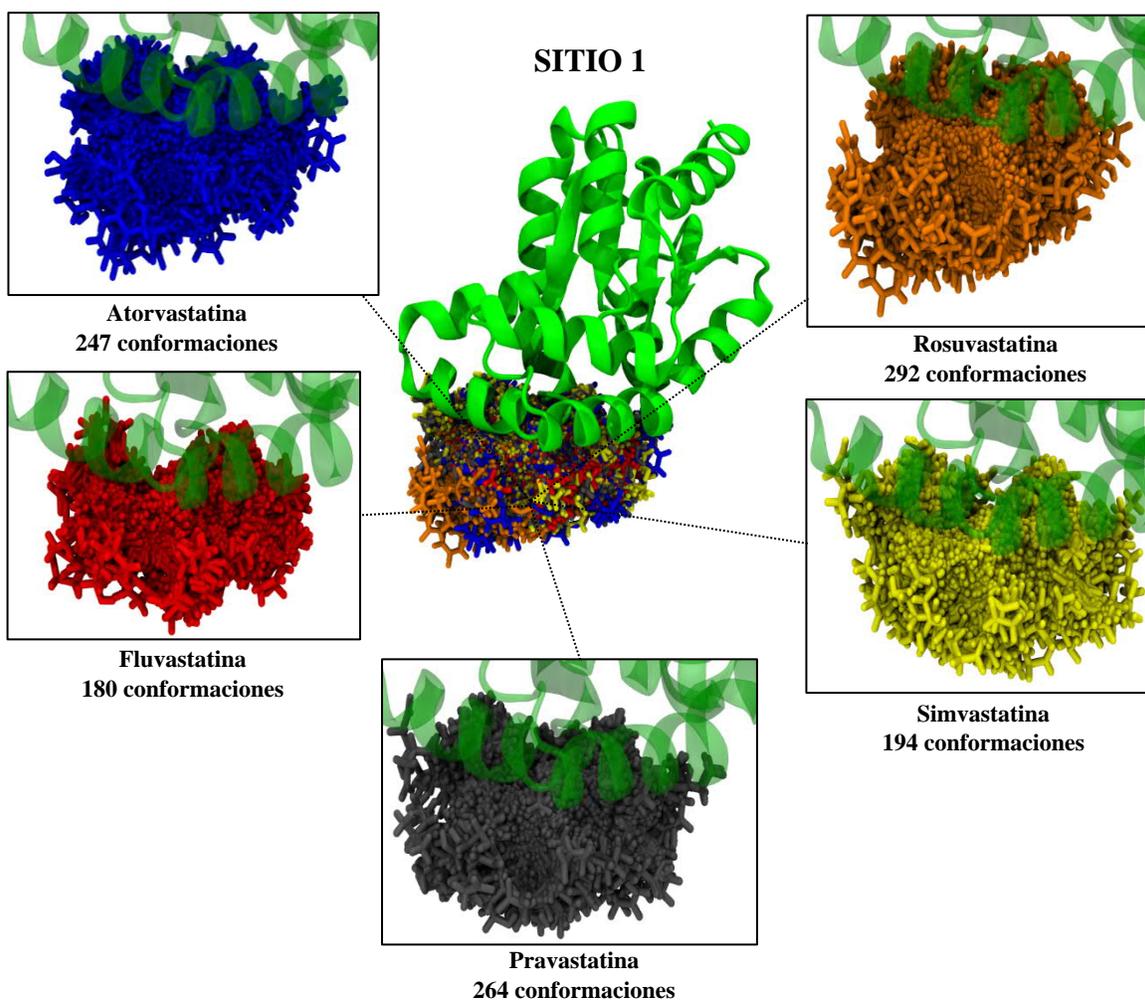


Figura 9. Secuencia de aminoácidos que conforman el “Sitio 1” y su representación tridimensional en la estructura de hAK1. Visualizando las conformaciones presentes en los clústeres (RMSD 10Å) más poblados de las estatinas obtenida con VMD.

LYS63, GLY64, GLN65, LEU66, VAL67, PRO68, LEU69, GLU70, THR71, VAL72, ASP74, MET75, ARG97, GLU98, VAL99, GLN100, GLN101, GLU103, GLU104 y ARG107.

Posteriormente, se estudiaron en mayor profundidad los residuos presentes en el “sitio 1” donde se encuentran los clústeres más poblados. Los resultados se visualizan en la **Figura 10.A**, donde se muestran los 5 residuos con mayor número de interacciones dentro de los clústeres más poblados. Así se identificó que las lisinas se destacan, debido a que su porcentaje de interacción es superior al 30% con cada estatina y además es superior a los demás residuos evaluados que abordan un porcentaje entre el 10% y 20%. También podemos destacar que la RVS, es la estatina con mayor porcentaje de interacción con las lisinas al superar el 50% total de estas. En la **Figura 10.B** nos permite determinar las lisinas que presentan este alto porcentaje de interacción con las estatinas, y que corresponden a la LYS56, LYS63 y LYS155. No obstante, los residuos de LYS56 y LYS63 son los que muestran el mayor porcentaje de interacción con un valor que supera el 30%. Por el contrario, las interacciones de la LYS155 con algunas estatinas solo supera el 10%, lo que puede deberse al hecho de que no se encuentra dentro de los residuos que definen al sitio 1.

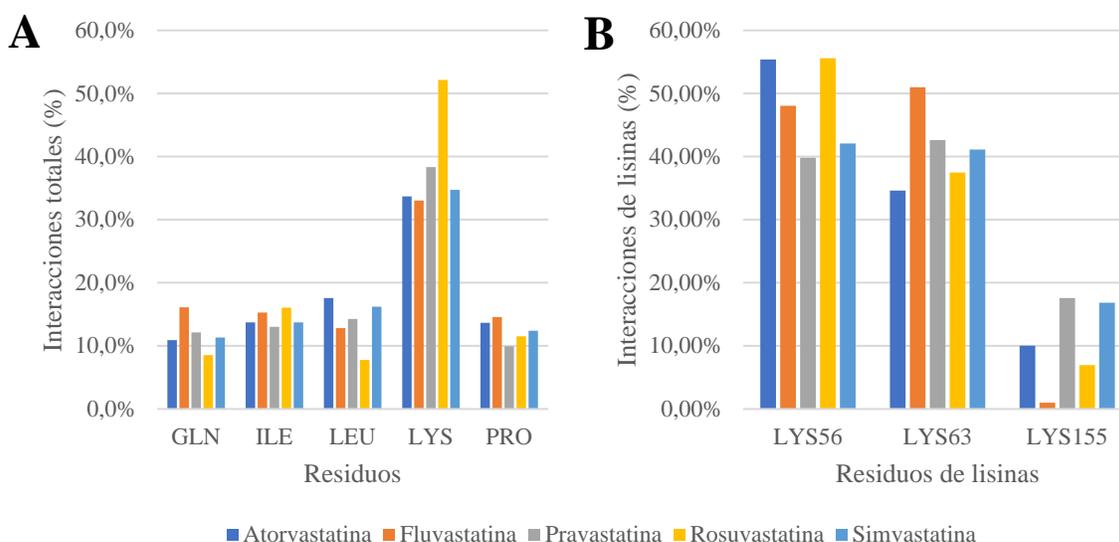


Figura 10. (A) Gráfico del porcentaje de interacciones totales de las conformaciones en el clúster más poblado (RMSD 10Å) para cada estatina Vs los residuos de la proteína hAK1. (B) Grafico del porcentaje de interacciones con las lisinas de las conformaciones en el clúster más poblado (RMSD 10Å) para cada estatina Vs los residuos de lisinas que presentan interacciones.

Al descubrir que los residuos de lisinas presentaron el mayor número de interacciones y que específicamente son los residuos de LYS56 y LYS63, se buscaron las conformaciones dentro de estos clústeres que interactuaron con estos aminoácidos y que lograron cumplir con los criterios de selección.

Estatinas	Energía (kcal/mol)	Enlaces de hidrógeno	Puentes Salinos	Interacciones π -Catión	Interacciones hidrofóbicas
AVS	-2.35	56(LYS) ² ,63(LYS)	56(LYS)	-	56(LYS) ⁴ ,59(GLU),60(ILE) ¹³ ,63(LYS)
FVS	-3.59	59(GLU) ² ,63(LYS)	63(LYS)	56(LYS)	56(LYS) ¹² ,57(LEU) ² ,59(GLU),60(ILE) ⁶ ,68(PRO) ²
PVS	-2.70	56(LYS) ² ,63(LYS)	56(LYS)	-	56(LYS) ⁸ ,59(GLU) ² ,60(ILE) ⁹ ,63(LYS),68(PRO)
RVS	-0.50	56(LYS) ²	56(LYS)	56(LYS)	56(LYS) ³ ,60(ILE) ³ ,68(PRO) ²
SVS	-1.96	56(LYS) ²	56(LYS)	-	56(LYS) ⁸ ,57(LEU),60(ILE) ⁸ ,63(LYS),68(PRO) ⁴

Nota: El superíndice representa la cantidad de interacciones con ese mismo residuo

Tabla 2. Valores de energía de Docking y residuos que establecen interacciones intermoleculares con las conformaciones seleccionadas para el “sitio 1” de cada estatina.

En la **Tabla 2** se detallan las conformaciones escogidas para cada una de las estatinas, tomando como base los valores de energía obtenidos por Autodock, donde la conformación definida para la FVS presentó la energía con mayor afinidad (-3.59 kcal/mol) y para la RVS la energía con menor afinidad (-0.50 kcal/mol). Con respecto a las interacciones, la mayoría de las conformaciones de las estatinas establecen un mínimo de 2 enlaces de hidrógeno con al menos uno de los dos residuos de LYS56 y LYS63. Estos mismos residuos interactúan adicionalmente con todas las estatinas a través de puentes salinos, y en el caso de la FVS y RVS se presentan interacciones π -cación, específicamente con la LYS56. También se puede identificar que el mayor número de interacciones hidrofóbicas se realizan con los residuos LYS56 y la ILE60.

Luego de encontrar el “sitio 1” y analizar las conformaciones que cumplen con los criterios de selección, se buscaron las conformaciones que forman interacciones con los residuos TYR32 y TYR34 reportadas, y que establecen la formación del “sitio 2”. Para este objetivo, se desarrolló la clusterización de todas las

conformaciones con un RMSD de 5Å. Al obtener los clústeres se eligieron aquellas conformaciones que cumplieron con los criterios de calidad de docking, es decir se tuvo en cuenta la interacción con los residuos y el clúster más poblado. En la **Figura 11** se pueden observar los clústeres de las conformaciones seleccionadas para cada estatina que interactúa con los residuos TYR32 y TYR34, y que se presentan en la **Tabla 3**. Los residuos que conforman el “sitio 2” a 5Å de los clústeres más

Secuencia de aminoácidos de la Proteína hAK1

SMEEKLK**K**TN**I**IFVVGPGSGKGTQCEKIV**Q**KYGY**T**HLSTGDLLRSEVSSGSARGKKLSEIMEKGQ
 LVPLETVLDMLRDAMVAKVN**T**SKGF**L**IDGYPREVQQGEFERRIGOPT**L**LLYVDAGPETMTQRL
 KRGETSGRVDDNEETIKRLE**T**YYKATEPVIAFYEKRGIVRKVNAEGSVDSV**F**SQ**V**CH**L**D**A**L**L**

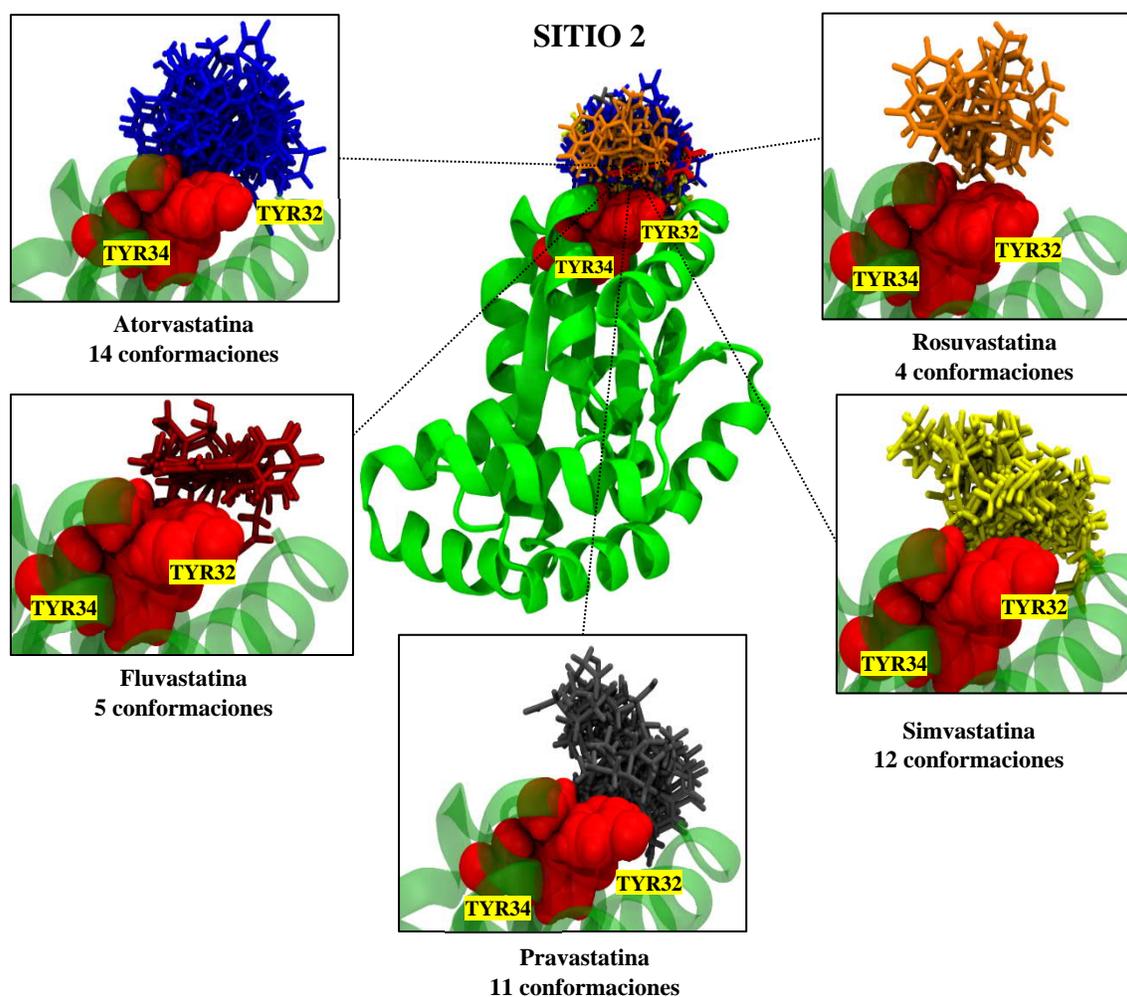


Figura 11. Secuencia de aminoácidos que conforman el “sitio 2” y su representación tridimensional en la estructura de hAK1. Visualizando las conformaciones presentes en los clústeres (RMSD 5Å) más poblados de las estatinas obtenida con VMD.

poblados para este sitio (residuos en color celeste en la secuencia de aminoácidos de la proteína hAK1) son la LYS7, THR8, ASN9, GLN30, LYS31, TYR32, GLY33, TYR34, THR86, SER87, LYS88, GLY89, PHE90, THR113, PHE183, CYS187, LEU190, ASP191, ALA192, LEU193 y LEU194.

El “sitio 2” (**Figura 11**), representado por un grupo de clústeres más pequeños, se encuentra bastante más alejado del sitio 1, por lo que las conformaciones de las estatinas que interactúan con estos dos sitios no comparten residuos. También se observa que los residuos de TYR32 y TYR34, al estar casi adyacentes, permite que los clústeres se sitúen de una manera más específica y agrupada en la zona de búsqueda. Por último, la ubicación de este sitio se encuentra más expuesta en la superficie de la proteína lo que facilita la interacción entre las conformaciones generadas por los cálculos de Docking (**Figura 8**).

Estatinas	Energía (kcal/mol)	Enlaces de hidrógeno	Puentes salinos	Interacciones π -Cación	Interacciones hidrofóbicas
AVS	-2.16	31(LYS),34(TYR),88(LYS)	88(LYS)	-	9(ASN) ² ,32(TYR) ² ,34(TYR) ⁴ ,88(LYS),194(LEU) ⁴
FVS	-2.47	34(TYR),194(LEU)	-	-	31(LYS) ² ,32(TYR) ¹⁵ ,34(TYR),191(ASP) ² ,194(LEU) ⁷
PVS	-2.30	9(ASN),34(TYR),88(LYS) ²	88(LYS)	-	32(TYR) ³ ,34(TYR) ⁵ ,88(LYS),194(LEU) ²
RVS	-0.21	31(LYS),88(LYS) ²	88(LYS)	31(LYS)	31(LYS) ⁷ ,32(TYR) ²
SVS	-0.61	34(TYR)	88(LYS)	-	32(TYR) ⁴ ,34(TYR) ² ,88(LYS),194(LEU) ³

Nota: El superíndice representa la cantidad de interacciones con ese mismo residuo

Tabla 3. Valores de energía de Docking y residuos que establecen interacciones intermoleculares con las conformaciones seleccionadas para el sitio 2 de cada estatina.

En la **Tabla 3**, se presentan las estatinas con la conformación de mayor y menor afinidad energética, que son la FVS (-2.47 kcal/mol) y RVS (-0.21 kcal/mol), respectivamente. Así, se repiten los extremos de mayor y menor afinidad que se demostraron en el “sitio 1” con las conformaciones seleccionadas para cada estatina. Dentro de los enlaces intermoleculares en su mayoría se presentan solo enlaces de hidrógeno con la TYR34, con excepción de la RVS que no presenta ningún enlace de hidrógeno con las tirosinas de interés en ese sitio. Sin embargo, la TYR32 genera interacciones hidrofóbicas con todas las estatinas. El sitio 2

también muestra que las lisinas son importantes en todos los tipos de interacción exhibidos, principalmente el residuo de LYS88 y en algunas conformaciones el residuo LYS31.

El ultimo sitio, descrito como el “sitio 3”, se investigó a través de la interacción de las estatinas con los residuos de TYR117 y TYR154, que se consideran según el estudio de referencia (Wujak et al., 2021) como el segundo conjunto de tirosinas

Secuencia de aminoácidos de la Proteína hAK1

SMEEKLKKTNIFVVGPGSGKGTQCEKIVQKYGYTHLSTGDLRSEVSSGSARGKKLSEIMEKG
 QLVPLETVLDMLRDAMVAKVNTSKGFLIDGYPREVQQGEEFERRIGQPTLLLYVDAGPETMTQR
 LLKRGETSGRVDDNEETIKKRLETTYKATEPVIAFYEKRGIVRKVNAEGSVDSVFSQVCTHLDALL

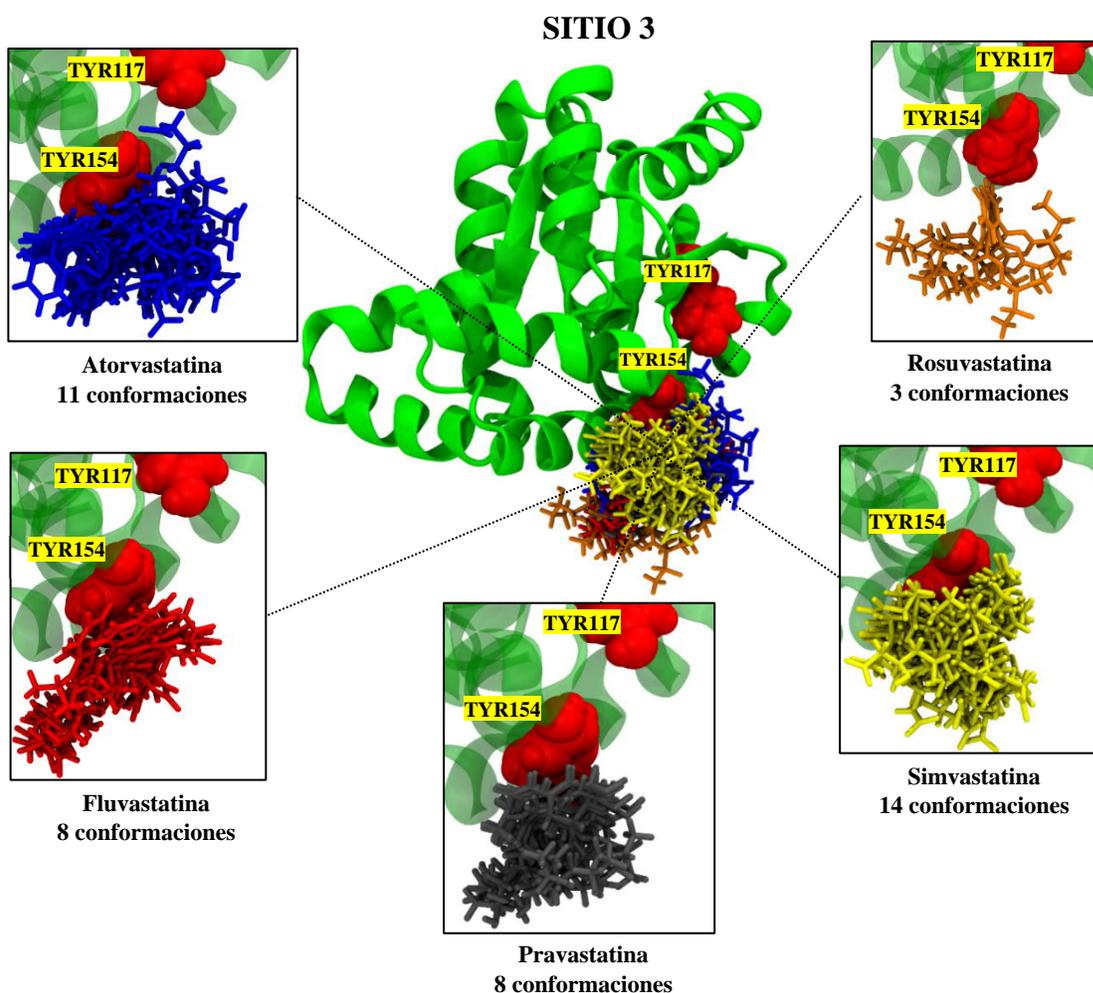


Figura 12. Secuencia de aminoácidos que conforman el “sitio 3” y su representación tridimensional en la estructura de hAK1. Visualizando las conformaciones presentes en los clústers (RMSD 5Å) más poblados de las estatinas obtenida con VMD.

importantes que lograron generar interacciones intermoleculares con las estatinas. De este modo, se mantuvo el mismo criterio asociado a una clusterización usando un RMSD de 5Å para la búsqueda de los grupos de conformaciones que se posicionen sobre este sitio alostérico. El tercer sitio es mostrado en la **Figura 12** por medio de los clústeres de cada una de las estatinas que contienen las conformaciones escogidas. Los datos relevantes de estas conformaciones se encuentran consignados en la **Tabla 4** y se establecen interacciones con los residuos que conforman el ultimo sitio alostérico investigado. Los residuos que conforman esta región a 5Å de los clústeres más poblados (residuos en color morado en la secuencia de aminoácidos de la proteína hAK1) son la GLN65, TYR117, ASP119, ALA120, GLY121, PRO122, GLU123, MET125, ILE146, LYS147, LYS148, ARG149, LEU150, GLU151, THR152, TYR153, TYR154, LYS155, ALA156, GLU158 y PRO159.

Al visualizar la **Figura 12**, es posible determinar algunos aspectos importantes. Primero, que el “sitio 3”, donde se encuentran los residuos de TYR117 y TYR154, está más cerca del “sitio 1”. Esto, podría provocar que las conformaciones analizadas de las estatinas interactúen con estos sitios y compartan residuos que ayuden en su estabilidad para mantenerse unidas en esa región de la hAK1. Segundo, que los clústeres representados para este último sitio se encuentran más cercanos a la TYR154 que a la TYR117. Esto puede ocurrir porque la TYR117 se

Estatinas	Energía (kcal/mol)	Enlaces de hidrógeno	Puentes salinos	Interacciones π -Stacking	Interacciones hidrofóbicas
AVS	-2.52	154(TYR),158(GLU) ²	-	154(TYR)	122(PRO) ² ,147(LYS) ³ ,150(LEU) ⁸ ,151(GLU) ⁷ ,154(TYR) ²²
FVS	-1.99	-	155(LYS)	154(TYR) ²	122(PRO),151(GLU) ³ ,154(TYR) ²² ,155(LYS) ²
PVS	-1.28	155(LYS)	155(LYS)	-	151(GLU) ⁶ ,154(TYR) ¹⁸ ,155(LYS) ²
RVS	-0.23	65(GLN),155(LYS) ²	155(LYS)	-	151(GLU) ⁵ ,154(TYR),155(LYS) ²
SVS	-1.30	147(LYS)	-	-	122(PRO),150(LEU) ⁶ ,151(GLU) ⁵ ,154(TYR) ¹⁵

Nota: El superíndice representa la cantidad de interacciones con ese mismo residuo

Tabla 4. Valores de energía de Docking y residuos que establecen interacciones intermoleculares con las conformaciones seleccionadas para el sitio 3 de cada estatina.

encuentra más incrustada en la proteína, y al momento de analizar los Docking (**Figura 8**) y las conformaciones generadas no logran posicionarse cerca de esta tirosina.

En la **Tabla 4** se puede observar que la estatina que presenta la mayor afinidad energética ahora es la AVS (-2.52 kcal/mol). No obstante, la estatina con menor afinidad se sigue manteniendo y es la RVS (-0.23 kcal/mol). La TYR154 ubicada en este sitio es la única tirosina que presenta interacciones en las conformaciones seleccionadas, mostrando mayormente interacciones intermoleculares del tipo hidrofóbica y también π -Stacking. Otros residuos que se repiten y se destacan son las lisinas, principalmente el residuo LYS155. Esta participa más en las conformaciones seleccionadas que interactúan con el “sitio 3” en comparación a las del “sitio 1”, al generar especialmente interacciones intermoleculares por medio de puentes salinos y enlaces de hidrógeno.

Simulaciones de Dinámica Molecular (DM)

Al finalizar el protocolo asociado al Docking molecular e identificar las conformaciones de las estatinas que se sitúan en los clústeres representativos de los 3 potenciales sitios alostéricos estudiados, se inició el tercer protocolo computacional que corresponde a las simulaciones de dinámica molecular (DM). Para esta metodología, cada conformación seleccionada del sistema hAK1-estatina fue analizada durante un breve periodo de tiempo de simulación de 50ns. Sin embargo, para validar la selección de una conformación se evaluaron en todas las estatinas las conformaciones de los clústeres más poblados que interactuaron con los residuos de interés para el sitio 1 (LYS56 y LYS63), sitio 2 (TYR32 y TYR34) y sitio 3 (TYR154). Con el propósito de obtener las conformaciones con los resultados que establecieron una mayor estabilidad estructural y lograron mantener las interacciones con los residuos de interés durante los primeros 50ns.

Por tanto, al verificarse las condiciones de estabilidad estructural e interacción con los residuos de interés de la dinámica molecular, se extendió el tiempo de simulación hasta los 300ns para evaluar si cada conformación hAK1-estatina conserva un comportamiento similar con respecto a la dinámica molecular corta. Para poder evaluar las características estructurales de estas dinámicas moleculares de producción, se graficaron y evaluaron los valores RMSD a través del tiempo de simulación en cada una de las DMs obtenidas, usando tanto el Backbone de la proteína hAK1 (**Figura 13**) y el movimiento de las estatinas con respecto a la proteína (**Figura 14**).

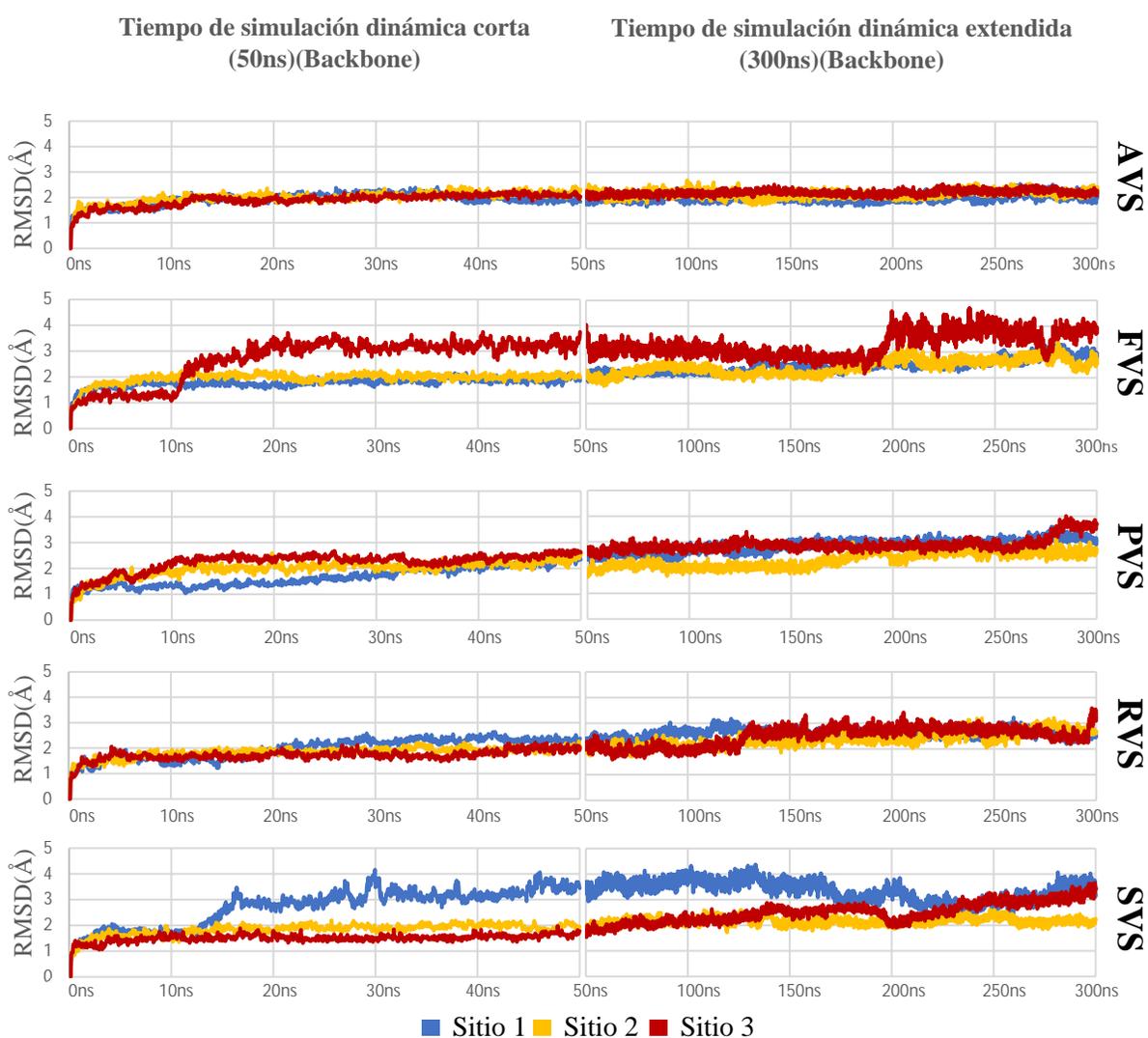


Figura 13. RMSD del Backbone de la proteína hAK1 para cada estatina con respecto a un tiempo de simulación de 50ns y 300ns para el sitio 1 (Color Azul), sitio 2 (Color Amarillo) y sitio 3 (Color Rojo).

Las trayectorias de DM muestran perfiles de RMSD con respecto al Backbone de la proteína relativamente estables en la mayoría de los casos, donde las variaciones identificadas van a depender del sitio y de la estatina.

En la **Figura 13** la AVS, PVS y RVS presentan los valores de RMSD más constantes del Backbone en los tres sitios de las dinámicas de equilibrado (50ns) y las dinámicas extendidas de producción (300ns). Se puede evidenciar que el sistema más estable es la hAK1-AVS, ya que durante las tres dinámicas se mantiene estrechamente en los 2Å. Para los sistemas de la hAK1-RVS y hAK1-PVS las distancias son estables al conservarse entre los 2Å y 3Å, no obstante, durante los últimos 25ns el sistema de la hAK1-PVS sufre un aumento de su distancia hasta los 4Å. Para los RMSD de los sistemas de la hAK1-FVS y hAK1-SVS existe mayor variación reflejada tanto en la dinámica de 50ns como en la de 300ns, mostrando ciertas diferencias más relacionadas con los sitios. Para el sistema de la hAK1-FVS los “sitio 1” y “sitio 2” son más estables durante la dinámica de 50ns al mantenerse en los 2Å y luego aumentar a 3Å en el rango de los 150ns a 300ns. En cambio, en el “sitio 3” se observan más fluctuaciones que abarcan distancias entre los 3Å a 3.5Å que inician en los 15ns de la DM corta y que supera los 4Å en la DM extendida desde los 200ns a los 300ns. Por último, en el sistema de la hAK1-SVS se presentan valores de RMSD más constantes en los “sitio 2” y “sitio 3” con 2Å y 1.5Å, respectivamente en las DMs cortas de 50ns. En la DM extendida para el “sitio 2” varía levemente hasta los 2.5Å en los 140ns y 250ns, y el “sitio 3” presenta un aumento hasta los 2.5Å entre los 100ns y 200ns, para finalizar la dinámica con un incremento que supera los 3Å.

El “sitio 1” demuestra una mayor variación en los valores del RMSD que los demás sitios tanto para la dinámica corta como también para la extendida. En el inicio, alrededor de los 10ns, la distancia de este sitio es de 2Å, pero aumenta y varía entre los 3Å y 4Å durante el resto de la dinámica que abarca hasta los 300ns.

Al visualizar los valores del RMSD, y su variación a lo largo de la trayectoria de DM, y que están relacionados con el movimiento del ligando que interactúa con hAK1 en la **Figura 14**, se alcanzan valores de distancia mucho mayores comparados con los que presentó el Backbone de la proteína. A partir de estos resultados, se puede inferir que para ciertas estatinas la estabilidad con cada sitio en donde se ubican se pierde completamente, liberándose hacia el solvente y/o cambiando de sitio para interactuar con otros residuos.

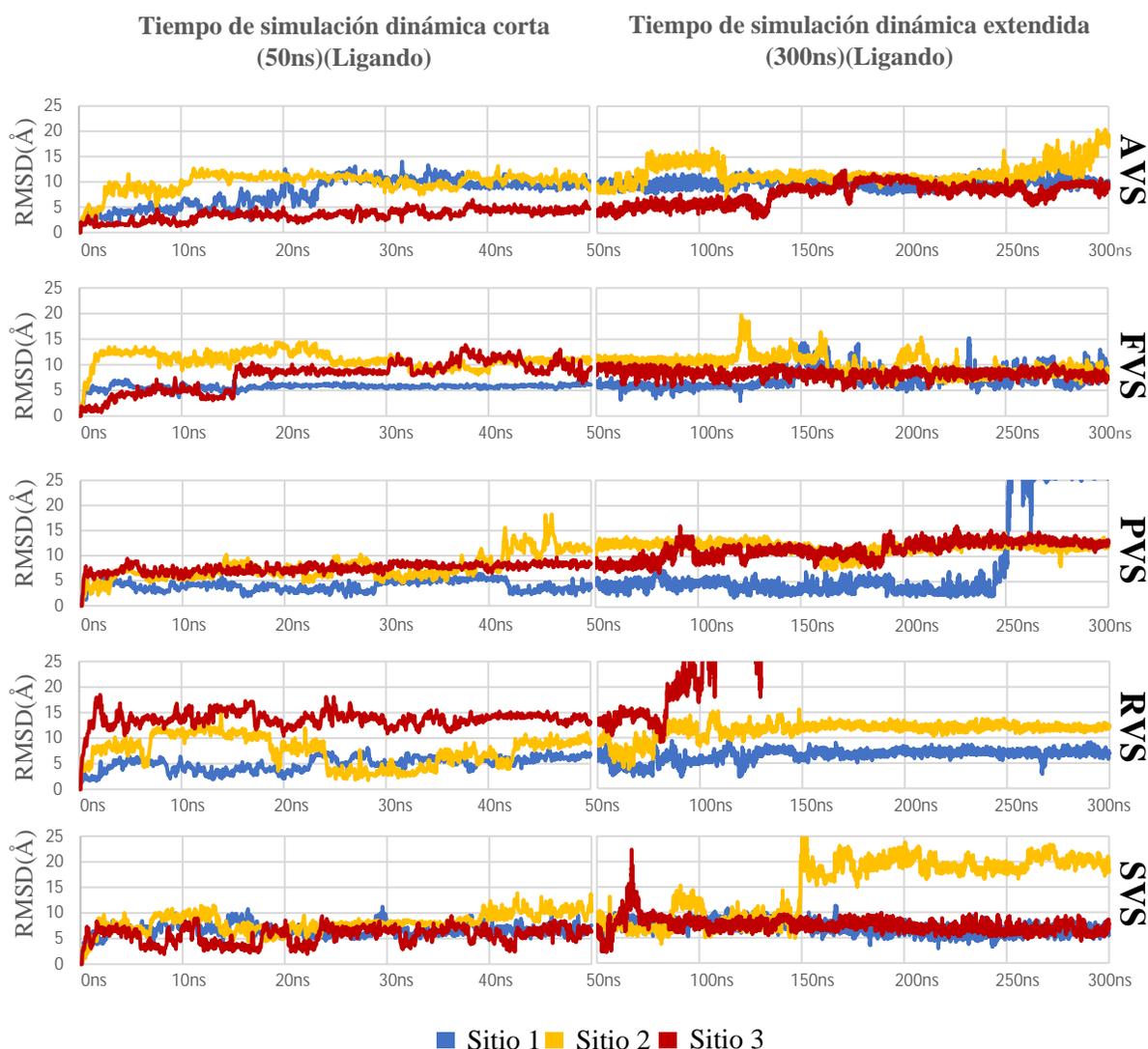


Figura 14. RMSD del Ligando como cada estatina en la proteína hAK1 en base a un tiempo de simulación de 50ns y 300ns para el sitio 1 (Color Azul), sitio 2 (Color Amarillo) y sitio 3 (Color Rojo).

En el caso de la AVS en el “sitio 1”, la dinámica corta sugiere que en los primeros 20ns hay una estabilidad de 5Å, aumentando a 10Å y manteniéndose en esa distancia dentro de toda la dinámica corta y extendida de 300ns. La misma estatina en el “sitio 2” muestra un aumento casi inmediato dentro de los 15ns iniciales a una distancia de 8Å y 12Å, sosteniendo durante la mayor parte de la dinámica conjunta de 300ns una distancia promedio de 10Å. No obstante, se generan en ciertos instantes distancias de 15Å y 20Å en tiempos que rodean los 100ns y 300ns, respectivamente, sugiriendo que el “sitio 2” es el más inestable para la unión de la AVS a la hAK1. El “sitio 3” es el más estable al mostrar, en toda la dinámica corta y parte de la dinámica extendida hasta los 125ns, una distancia entre los 2Å a los 5Å, el resto de los 300ns se eleva y permanece en los 10Å.

Por otro lado, la estatina FVS en el “sitio 1” muestra mayor estabilidad que en el “sitio 2” y “sitio 3”, porque hasta los 140ns se mantiene en los 5Å para luego tener alteraciones temporales hasta los 10Å y 15Å durante el resto de la dinámica extendida. En el “sitio 2”, en el inicio de la dinámica corta como también toda la dinámica extendida, establece una distancia constante de 10Å, donde en pequeños periodos de tiempo de 10ns sufre cambios de 15Å y 20Å de distancia. En el “sitio 3”, durante los primeros 50ns, presenta la mayor variación en las distancias que se delimitan entre los 5Å, 10Å y 15Å, nivelándose en la dinámica extendida en una distancia de 10Å hasta el final de la simulación.

Con respecto a la PVS en el “sitio 1”, es la única estatina que desde esa región de la AK1 se desplaza al solvente casi al finalizar la dinámica extendida en los 250ns al superar los 25Å de distancia, aun cuando en la dinámica corta y antes de la pérdida de estabilidad del ligando con respecto a la proteína es considerablemente estable en un rango entre los 2Å y 5Å de distancia. En el “sitio 2” la distancia varía entre los 5Å y 10Å hasta los primeros 40ns, regulando su distancia en un rango de los 5Å y 12Å durante toda la dinámica extendida de 300ns. El trayecto del “sitio 3” en la dinámica corta de 50ns se mantiene constante en los 7.5Å, generando ciertos aumentos transitorios entre los 10Å (100ns – 180ns) y 13Å (190ns – 300ns) de la dinámica extendida.

En el “sitio 1”, el RMSD de la RVS toma una distancia promedio de 5Å con mayor perturbación en la dinámica corta y mayor estabilidad en la extendida. En el “sitio 2”, RVS muestra una distancia frecuente en los 10Å durante la mayor parte de la simulación, pero con ciertos periodos donde se adapta en la dinámica corta entre los 25ns a los 42ns con una distancia de 5Å. En el “sitio 3”, los valores de RMSD para la RVS muestran una variación notoria en los primeros 50ns, ya que en ciertos momentos supera los 15Å para posteriormente observar que esta conformación se muestra inestable antes de los 100ns y la RVS se mueve al solvente, abandonando el “sitio 3” al superar los 25Å y no reducir su distancia con la proteína en el resto de la dinámica.

Por último, la SVS en dos de los sitios (“sitio 1” y “sitio 3”) conserva una distancia que se restringe entre los 5Å y 10Å durante los 300ns con un breve periodo (60ns a 75ns) en el “sitio 3” de 20Å, pero se logra normalizar y mantener en el mismo rango antes de perder estabilidad. En el “sitio 2” SVS refleja una variación similar a la de los demás sitios, pero al extenderse hasta los 150ns aumenta su distancia a los 20Å con respecto al sitio. La SVS no transita al solvente, pero se desplaza de su sitio original, lo que lo hace interactuar con residuos fuera de la región de interés.

En las dinámicas extendidas, las conformaciones hAK1-estatina seleccionadas presentan cierto grado de estabilidad con valores de RMSD similares a las dinámicas cortas. Sin embargo, se necesita analizar las interacciones intermoleculares para determinar las causas de la afinidad en los sistemas estatina-hAK1 en cada sitio alostérico.

En la **Figura 15** se presentan las interacciones intermoleculares, y su porcentaje de ocurrencia, entre el complejo estatinas-hAK1, usando los datos desde de la trayectoria de la DM corta de 50ns. En la figura, se identifican los distintos tipos de interacción intermolecular usando un identificador que reconoce por medio de un color (0% blanco - 100% azul) el porcentaje de los contactos que genera cada estatina con el grupo de residuos de interés en cada sitio.

Mapas de calor (heat map) para la interacción hAK1- estatina

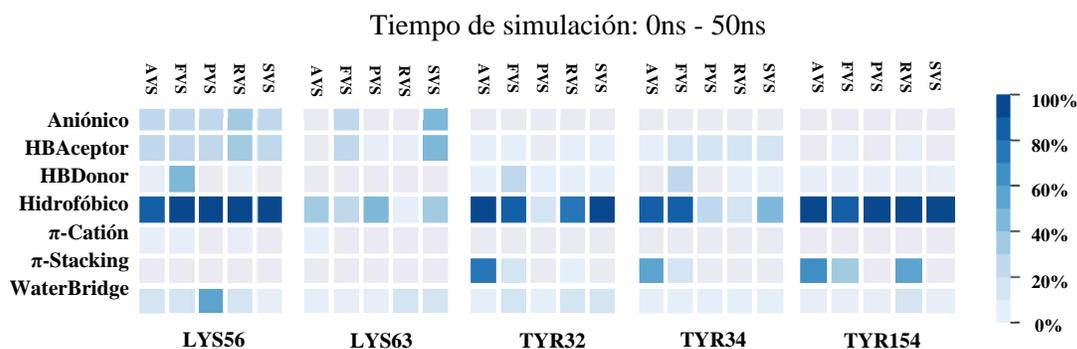


Figura 15. Mapa de calor de los distintos tipos de interacciones entre las estatinas y los residuos de interés de hAK1.

Para el “sitio 1”, todas las conformaciones seleccionadas de las estatinas presentan una mayor interacción con el residuo de LYS56 mostrando un porcentaje alto de interacciones hidrofóbicas (80% - 100%), aniónicas y de enlaces de hidrógeno (40% - 50%). El residuo LYS63 presentó el mismo tipo de interacciones que la LYS56, pero con menores porcentajes (30 % - 50%), donde la SVS muestra una mayor diferencia cuando se compara con las demás estatinas. En el “sitio 2”, conformado por la TYR32 y TYR34, las estatinas comparten un porcentaje de interacción muy similar entre las conformaciones, en el que la disparidad es un poco más definida en los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas. Todas las estatinas muestran interacciones de enlaces de hidrógeno mayores con la TYR34 (20% - 30%) que con la TYR32 (0% - 10%), pero en cuanto a las interacciones hidrofóbicas formadas por la RVS y SVS, éstas muestran una diferencia significativa entre la TYR32 (70% - 100%) y la TYR34 (10% - 40%). Adicionalmente, se observan interacciones π -stacking con mayor presencia en la AVS con la TYR 32(70% - 80%) y TYR34 (50%-60%), considerando también un mínimo contacto con la FVS y RVS en la TYR32 y TYR34 (0% - 30%). En el “sitio 3” la TYR154 establece una significativa interacción hidrofóbica (80% - 100%) con todas las estatinas, y específicamente con las estatinas tipo II, como la AVS, FVS y RVS, se evidencian interacciones π -stacking. Esto se debe a la presencia de los varios anillos heterocíclicos de las estatinas que forman estos tipos de enlaces con los residuos de tirosina al ser un aminoácido aromático que posee un grupo fenol.

Las estatinas escogidas interactúan con los residuos de interés en un porcentaje mínimo del 20%, principalmente mediante contactos hidrofóbicos, de enlaces de hidrógeno y aniónicos. Tras las dinámicas cortas y criterios de selección, se recomienda extender las DMs hasta los 300ns para evaluar el comportamiento de los complejos. Las interacciones intermoleculares generadas pueden visualizarse en el sitio 1 (**Figura 16**), sitio 2 (**Figura 17**) y sitio 3 (**Figura 18**). Los residuos destacados en verde, celeste y amarillo representan los residuos que conforman cada sitio a 5Å de los clústeres más poblados.

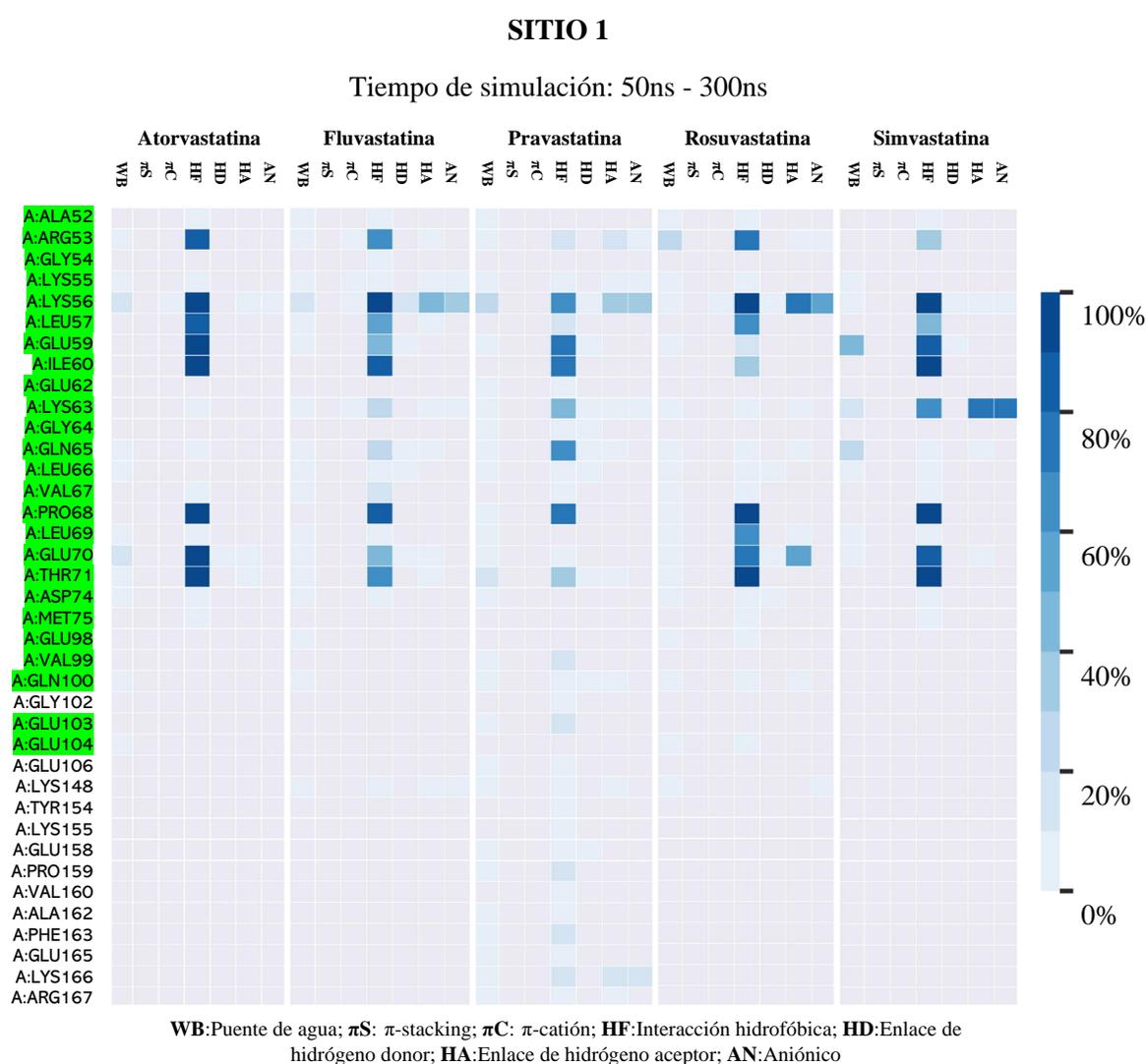


Figura 16. Mapa de calor de los distintos tipos de interacciones entre las estatinas y los residuos de hAK1 en el sitio 1, destacando en “verde” los residuos que se encuentran a 5Å de los clústeres más poblados para este sitio.

En la **Figura 16**, se presentan patrones de interacción similar entre todas las estatinas con los residuos en el sitio 1. Estos patrones de interacción se destacan en un rango de residuos que incluyen desde la LYS56 – ILE 60 y la PRO68 – THR71 con una interacción hidrofóbica significativa con la mayoría de las estatinas (50% - 100%). Adicionalmente con el residuo de LYS56 se consideran enlaces de hidrógeno y aniónicos (40% - 80%) para la FVS, PVS y RVS. La SVS muestra una tendencia particular al interactuar con la LYS63 por medio de los mismos tipos de enlace anteriormente mencionados en un porcentaje alto de contacto (60% - 80%). La PVS en los últimos 50ns de la dinámica extendida en el sitio 1 presentó inestabilidad, por lo que interactuó de forma intermitente (0% - 20%) con residuos que no se encuentran dentro del sitio o no están cercanos al compararlos con el patrón de interacción de las demás estatinas.

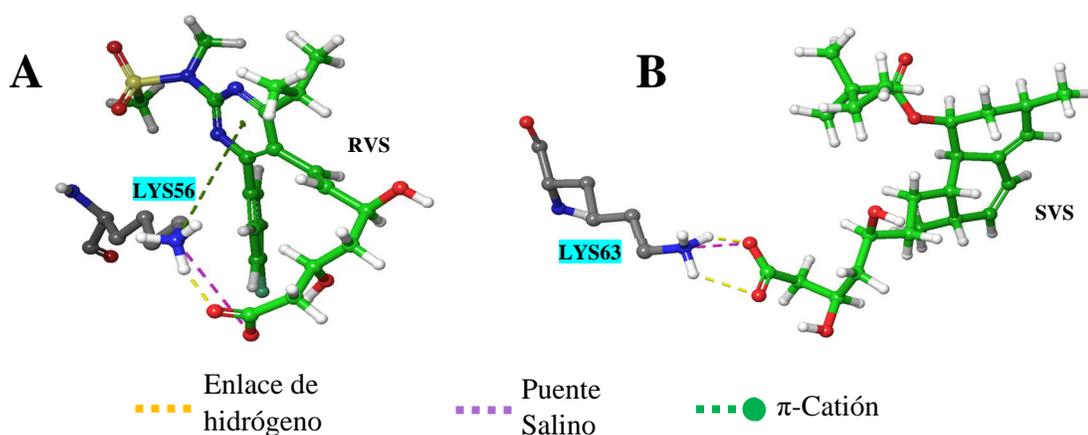


Figura 17. Representación tridimensional de (A) interacción entre la LYS56 con la RVS, (B) Interacción entre la LYS63 y la SVS.

Entre las interacciones observadas para el sitio 1 con ciertos residuos específicos, las más significativas son con los residuos de interés que corresponden a la LYS56 y LYS63. La RVS, como la estatina que presenta mayores contactos con la LYS56, muestra interacciones intermoleculares (**Figura 17.A**) por medio del grupo amino (positivo) de la lisina con el anillo pirimidina (π -Catión) y el carboxilo terminal (Enlace de hidrógeno y puente salino) de la RVS. En el caso de la SVS, (**Figura 17.B**) se generaron contactos de tipo puente salino y de enlace de hidrógeno con los mismos grupos funcionales de la LYS56, no obstante, SVS es incapaz de formar

interacciones π -stacking o π -catión al no tener un anillo aromático con forma plana, lo cual produce una diferencia en el patrón de interacciones.

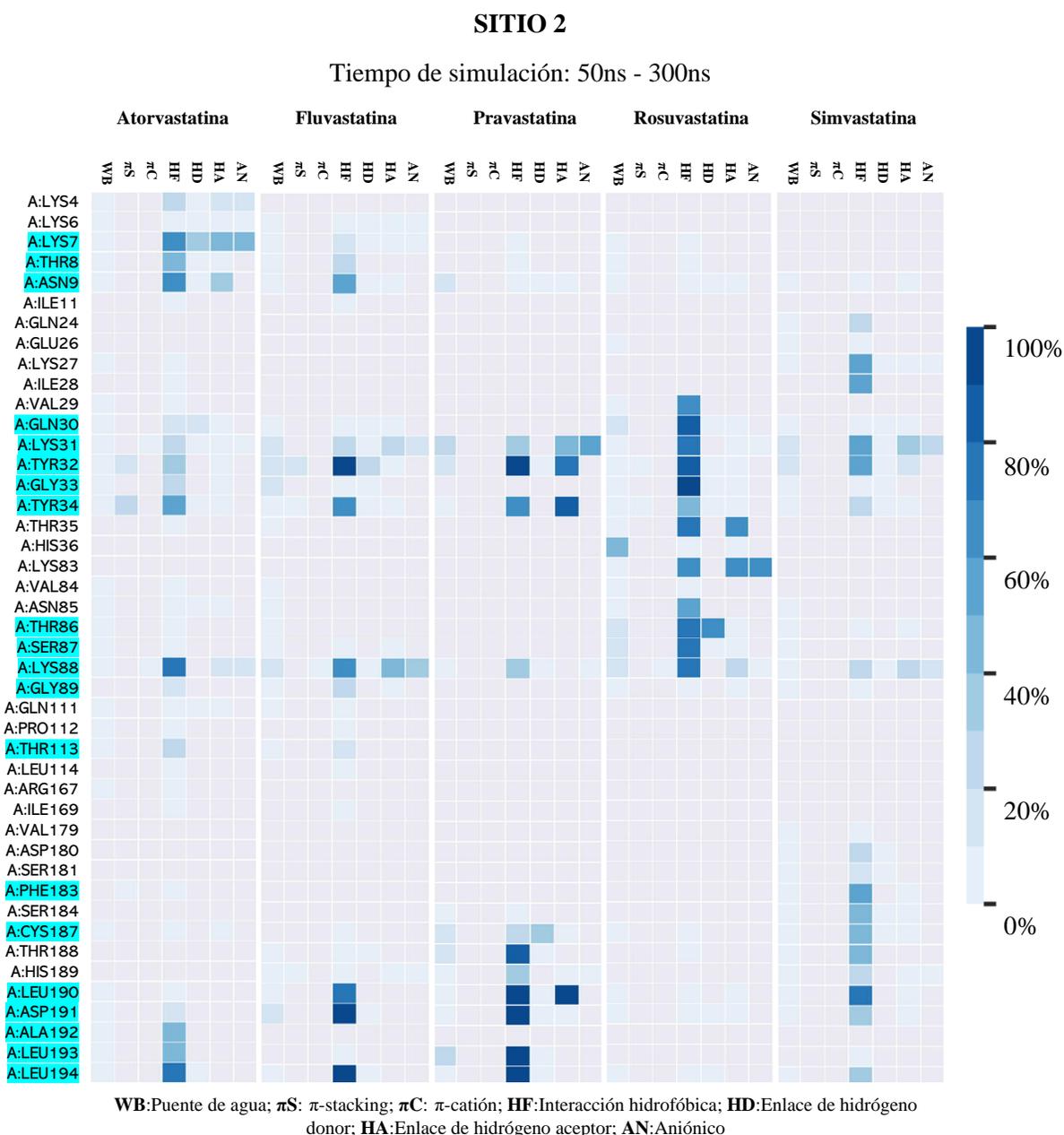


Figura 18. Mapa de calor de los distintos tipos de interacciones entre las estatinas y los residuos de hAK1 en el "sitio 2", destacando en "celeste" los residuos que se encuentran a 5Å de los clústeres más poblados para este sitio.

En la **Figura 18**, se puede observar una mayor variación entre los distintos residuos con los cuales las estatinas interactúan en el "sitio 2". En general, se observan comportamientos más variados en función de los porcentajes de interacción de las

estatinas con cada residuo del "sitio 2", pero con una predisposición a formar enlaces hidrofóbicos. Los patrones de interacción de las estatinas con ciertos residuos se pueden localizar entre los residuos GLN30 – TYR34, la LYS88, y entre la LEU190 – LEU194. Entre los residuos que logran aportar más a la estabilidad para formar el complejo hAK1-estatina, centrado la atención en las interacciones de enlaces de hidrógeno y aniónicas, encontramos la LYS7 y la LYS88, que interactúan con la AVS y la FVS, respectivamente, con un porcentaje de interacción similar (30% – 60%). Para la PVS hay una mayor variedad de residuos que aportan a su estabilidad en el sistema hAK1-estatina, que son la LYS31, TYR32, TYR34 y LEU190 (50% - 100%). Con respecto a la RVS, entre los residuos que aportan a su estabilidad con la hAK1 están la THR35, LYS83 y THR86 (60% - 70%) y para la SVS son la LYS31 y LYS88 (10% - 40%). En general, la SVS presenta un menor porcentaje de interacción, lo cual se puede relacionar con su variación en la distancia evaluada por el RMSD para este sitio, lo que representa un desplazamiento importante hacia conformaciones en la superficie de la hAK1 que interactúan con residuos más lejanos al sitio del "frame" inicial sugerido por los experimentos de docking.

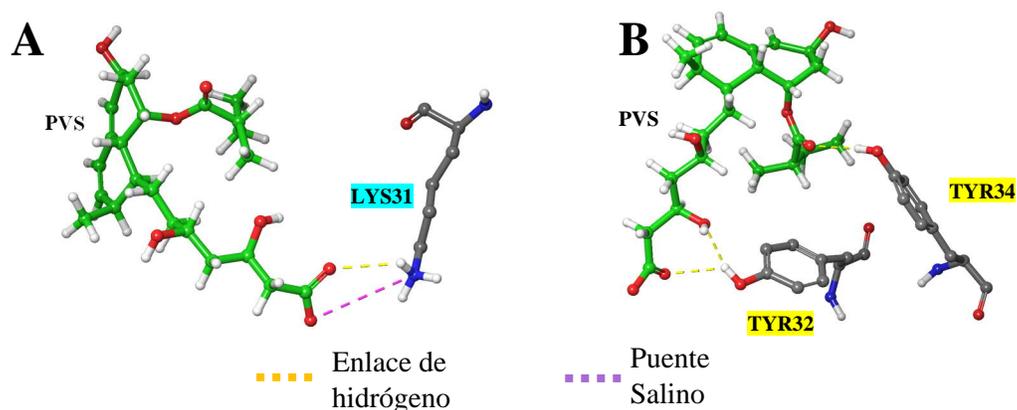


Figura 19. Representación tridimensional de (A) Interacción entre la LYS31 y la PVS, (B) interacción entre la TYR32 y TYR34 con la PVS.

Entre las interacciones intermoleculares de cada estatina con relación a los residuos del sitio 2, se destaca la PVS como la estatina con mejores porcentajes de interacción para formar enlaces de hidrógeno y puentes salinos. En los contactos visualizados con la LYS31 (**Figura 19.A**), se puede observar que la unión se produce por medio de un enlace iónico entre el carboxilo terminal (negativo) de la

estatina con el grupo amino lateral (positivo) de la lisina. Para la unión de la PVS con los residuos TYR32 y TYR34 (**Figura 19.B**), se destacan los enlaces de hidrógeno que se forman a través de los grupos OH de los residuos de Tyr con los átomos de oxígeno del ligando.

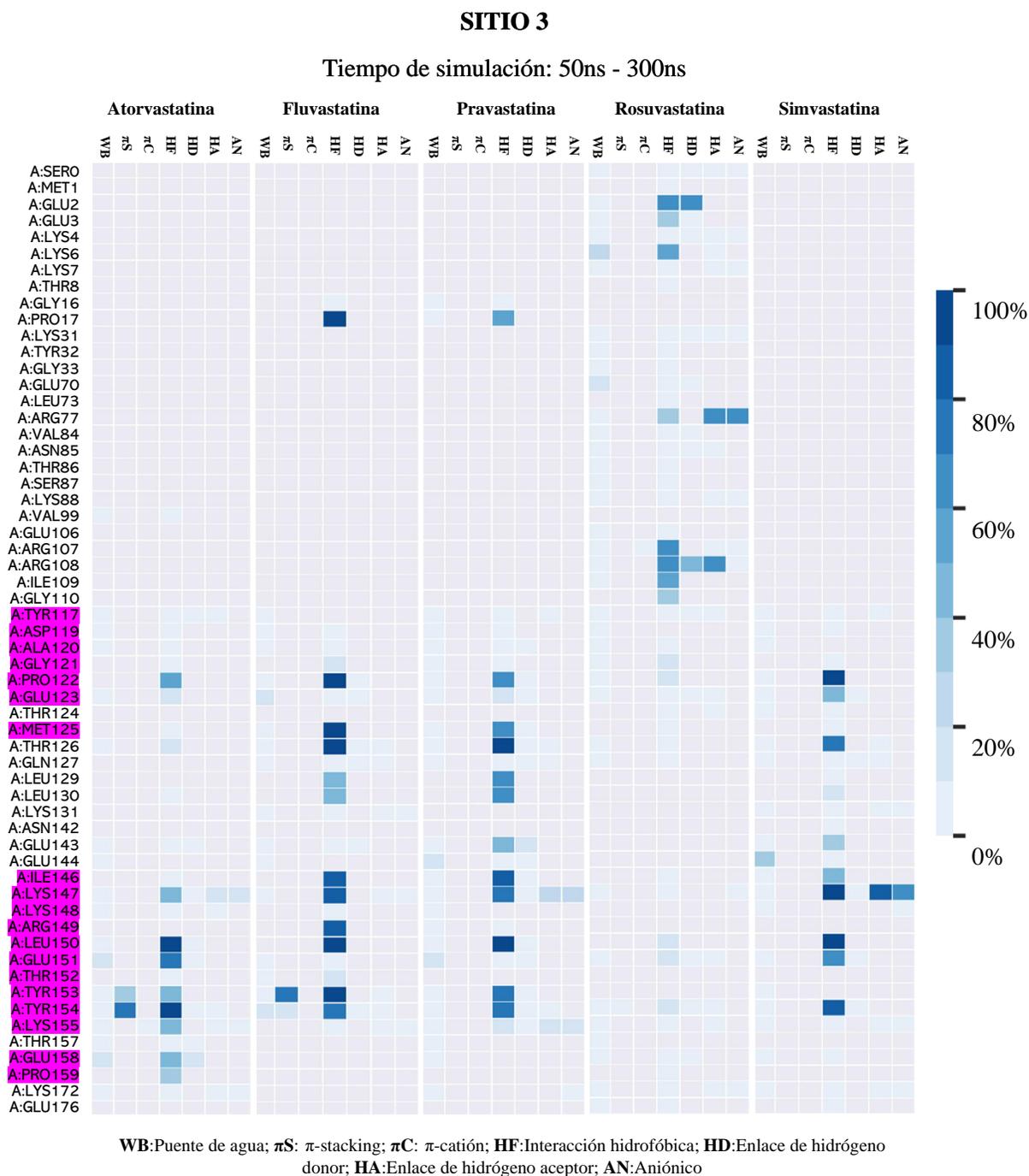


Figura 20. Mapa de calor de los distintos tipos de interacciones entre las estatinas y los residuos de hAK1 en el sitio 3, destacando en “morado” los residuos que se encuentran a 5Å de los clústeres más poblados para este sitio.

En la **Figura 20**, se muestra el análisis de las interacciones intermoleculares existentes de las estatinas en el sitio 3 durante la simulación de la dinámica molecular, donde se establecen patrones más fáciles de identificar y de menor variación entre las estatinas, a excepción de la RVS. Los patrones de interacción hAK1-estatina se generan en un rango de residuos que va desde la PRO122 - LEU130 y ILE146 - TYR154 con una clara tendencia de estos residuos a formar interacciones hidrofóbicas con la FVS (50% - 100%), PVS (60% - 100%) y SVS (20% - 100%). Los resultados muestran una participación adicional en la estabilidad de la AVS, a través de interacciones π -stacking, con los residuos TYR153(30% - 40%) y TYR154(70% - 80%), donde también en la interacción con FVS la TYR153 (70% - 80%) establece este tipo de interacción como uno de los principales enlaces para conformar y estabilizar la estatina en el sitio de unión. Otro caso particular es el residuo de LYS147 que forma enlaces de hidrógeno y puentes salinos con la SVS en un porcentaje de interacción significativo (60% - 90%), con un aporte menor del mismo residuo en la interacción con AVS y PVS (10% - 30%). No obstante, el único caso en que los resultados de la estabilidad de la estatina en el “sitio 3” a lo largo de la dinámica molecular mostró un comportamiento inestable, desde los 75ns en adelante, fue con la RVS, donde se pudieron observar interacciones con residuos que no hacen parte del “sitio 3”. Estos residuos son desde la SER0 - THR8 y LYS31 - GLY110, donde la RVS al perderse en el solvente comienza a interactuar en distintos sitios de la proteína hAK1.

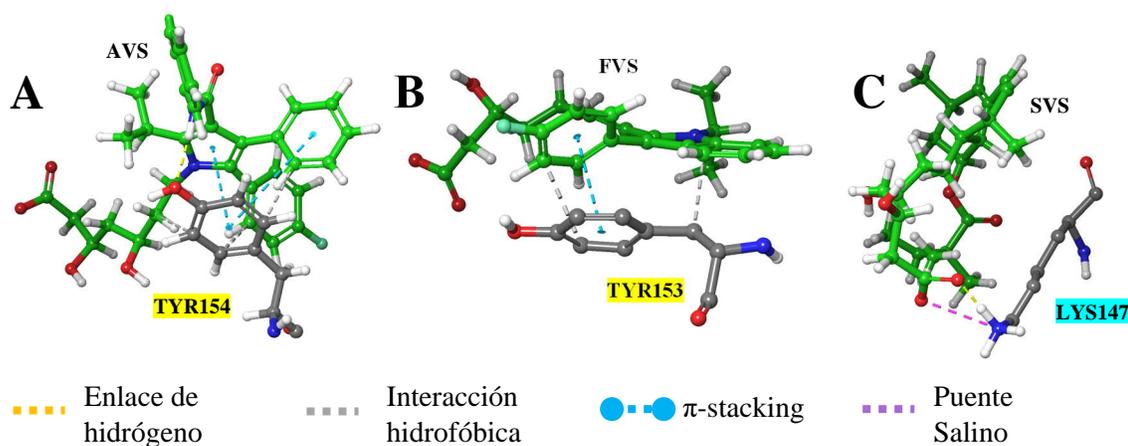


Figura 21. Representación tridimensional de (A) interacción entre la TYR154 y la AVS, (B) interacción entre la TYR153 con la FVS, (C) interacción entre la LYS147 y la SVS.

Dentro de las interacciones intermoleculares observadas entre las estatinas y los residuos presentes en el sitio 3, los aminoácidos TYR153, TYR154 y LYS147 son los que presentan una mayor participación en la estabilidad de los ligandos en el sitio correspondiente. Los contactos hAK1-estatina en las conformaciones seleccionadas fueron principalmente de tipo hidrofóbico y se mantuvieron durante la dinámica. En las **Figuras 21.A y 21.B** se muestra la AVS y FVS interactuando con la TYR154 y TYR153, respectivamente, como las estatinas con mayor contacto con estos residuos. Las uniones por interacciones hidrofóbicas se forman entre carbono-carbono con átomos mayormente pertenecientes a los anillos aromáticos de las tirosinas y estatinas. También se pueden identificar interacciones π -stacking en una orientación "face-to-face" entre los anillos aromáticos del ligando y la estatina. En el caso del residuo LYS147, su forma de unión con la SVS (**Figura 21.C**) se da a través de un enlace de hidrógeno entre el grupo amino cargado positivamente y el carboxilo terminal con el átomo de O (neutro) y, adicionalmente, un puente salino con el átomo de O cargado del carboxilato (negativo).

Estudio del efecto alostérico de las estatinas en el sitio de unión a sustratos de hAK1

Para el estudio de los posibles efectos alostéricos de las estatinas sobre la actividad catalítica de hAK1, se realizó un alineamiento estructural del sitio activo de la estructura cristalina de la AK1 humana (hAK1) (ID-PDB: 1Z83) y la proteína *ApADK*, como estructura cristalina de la AK del microorganismo *Aeropyrum pernix* (ID-PDB: 6LN3). La estructura de la proteína *ApADK* presenta un complejo de AK con ATP-Mg²⁺ y AMP en el sitio activo y han sido reportados ciertos residuos (LYS18, HIS99, ARG145 y ARG147) que participan en el mecanismo de reacción de transferencia de fosfato desde el sustrato de ATP a la molécula objetivo AMP (Shibanuma et al., 2020). De esta manera, por medio del alineamiento se buscó identificar aquellos residuos que se superponen y participan en el mecanismo de reacción para compararlos con los de la proteína humana hAK1 cercanos al sustrato de ATP.

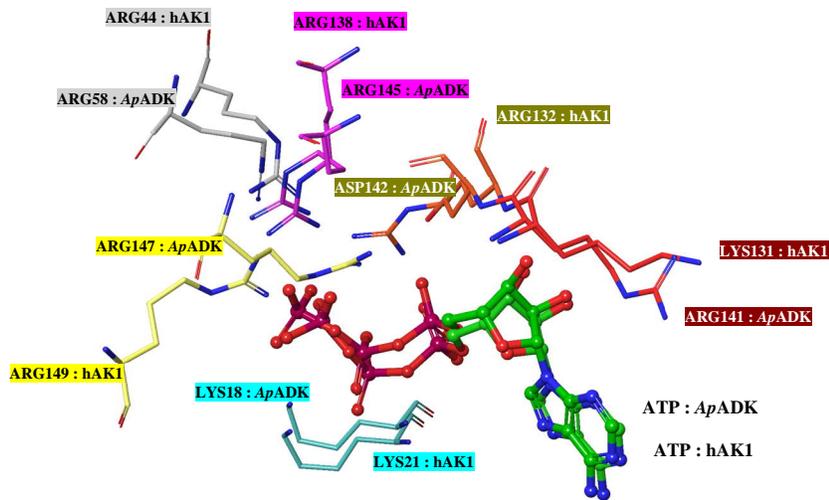


Figura 22. Alineamiento estructural del sitio activo entre la proteína hAK1 (ID-PDB:1Z83) y la proteína *ApADK* (ID-PDB:6LN3), visualizando residuos de arginina y lisina superpuestos a una distancia de 5Å del ATP usando el software de MAESTRO.

En la **Figura 22**, se muestran los residuos a una distancia de 5Å del sustrato de ATP, revelando aquellos residuos aminoacídicos circundantes que pueden generar interacciones con este mismo sustrato. Dentro de los tipos de aminoácidos identificados, las argininas y lisinas como residuos cargados son los que mayormente unen el ATP con la proteína hAK1 y se superponen con los residuos de la proteína *ApADK*. Entre los residuos de arginina y lisina visualizados, la LYS18, ARG145 y ARG147 de la proteína *ApADK* que se superponen con la LYS21, ARG138 y ARG149 de la proteína hAK1 respectivamente, son los residuos con mayor importancia reportada. Esto se debe a su función como andamio catalítico al generar y reorganizar los enlaces de hidrógeno entre el grupo fosforilo transferido del ATP hacia el AMP como sustratos unidos a la proteína *ApADK* (Shibanuma et al., 2020). Para evaluar el posible efecto alostérico de las estatinas en el sistema hAK1, y su potencial capacidad de reducción en los contactos de los residuos de LYS21, ARG138 y ARG149 con el sustrato de ATP, se evaluaron las distancias de algunas interacciones generadas entre las dos simulaciones del sistema hAK1 con presencia y ausencia de estatina. Se seleccionó para este análisis específicamente la SVS en el “sitio 2”, al ser la estatina que reporta la mayor afinidad experimental con la proteína hAK1 y el sitio mejor caracterizado en la literatura con presencia de tirosinas (TYR32 y TYR34).

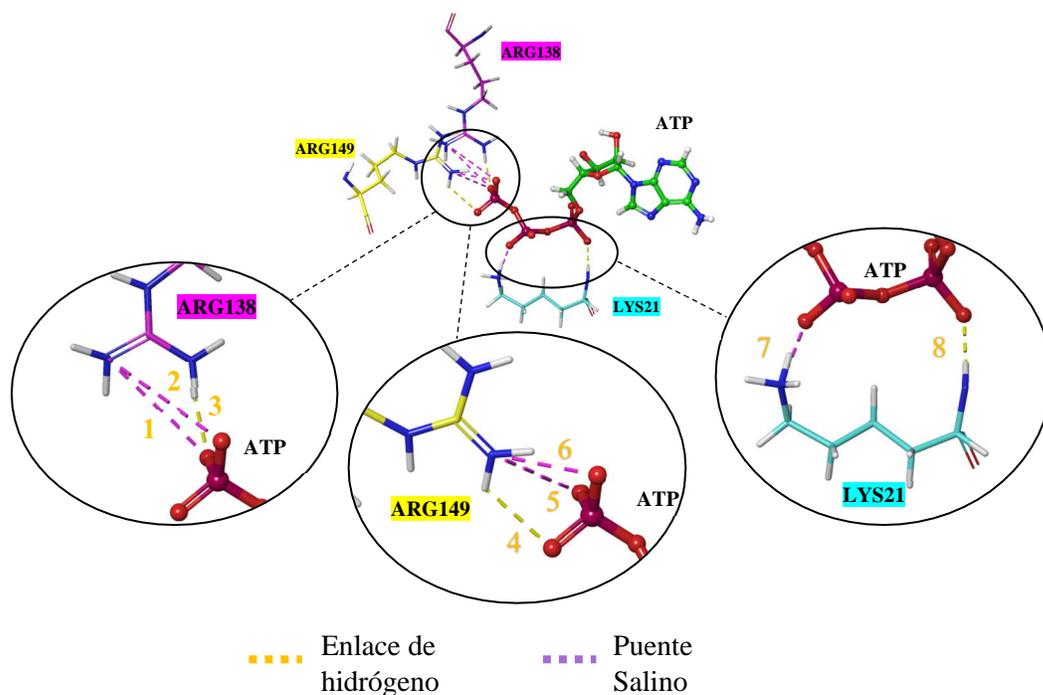


Figura 23. Interacciones entre la molécula de ATP y los residuos LYS21, ARG138 y ARG149 en el sistema hAK1 sin estatina. Las interacciones intermoleculares son enumeradas y su visualización se obtuvo con el software Maestro.

hAK1 Sin Estatina						hAK1 Con Simvastatina		
#	Residuo	Tipo de interacción	Rango Mínimo(Å)	Promedio(Å)	Desviación Estándar(Å)	Rango Mínimo(Å)	Promedio(Å)	Desviación Estándar(Å)
1	ARG138	Salt	3.524	6.555	1.172	7.133	8.882	0.560
2	ARG138	Salt	3.310	6.496	0.993	6.631	8.012	0.652
3	ARG138	Hbond	2.489	4.414	0.852	4.931	6.035	0.632
4	ARG149	Hbond	2.398	2.772	0.249	3.685	4.720	0.264
5	ARG149	Salt	2.419	3.271	0.390	5.728	6.839	0.297
6	ARG149	Salt	3.095	4.392	0.168	5.724	6.632	0.233
7	LYS21	Salt	2.434	3.722	0.384	3.596	4.774	0.568
8	LYS21	Hbond	2.451	2.757	0.231	2.387	3.405	0.669

Rango Mínimo: Distancia mínima entre los átomos durante la dinámica que generan la interacción analizada.

Tabla 5. Valores de distancias (Å) de las Interacciones enumeradas en la Figura 23 durante el tiempo (0ns – 300ns) entre la molécula de ATP y los residuos de LYS21, ARG138 y ARG149 para la dinámica del sistema hAK1 con (SVS – sitio 2) y sin estatina.

En la **Figura 23**, se muestran los residuos de LYS21, ARG138 y ARG149 del sistema hAK1 sin estatina interactuando con la molécula del ATP, y enumerando cada contacto intermolecular establecido entre los residuos y el ATP. Las distancias entre los átomos que forman estas mismas interacciones fueron registradas en la **Tabla 5**, evaluándose los valores en un tiempo de simulación de 300ns y comparando las distancias observadas en la proteína hAK1 con estatina (SVS – sitio 2) y sin estatina.

Respecto a las interacciones (**Figura 23**) de tipo enlace de hidrógeno (# 3, 4 y 8) y puente salino (# 1, 2, 5, 6 y 7), se generan entre los grupos fosfatos de la cadena terminal de la estructura del ATP con el grupo guanidina de las argininas y el grupo amino de las lisinas. Con base en el análisis de las distancias mencionadas, y al compararlas entre ambos sistemas, se puede inferir que todas las interacciones en el sistema sin estatina presentan una distancia promedio menor al sistema con SVS. Por ejemplo, las distancias promedio entre los átomos que generan el enlace de hidrógeno y puente salino en el sistema sin estatina del residuo de LYS21, son de 2.7 Å y de 3.7 Å respectivamente. En la ARG149 las distancias son similares, con una distancia de 2.7 Å en el enlace de hidrógeno y de 3.2 Å - 4.3 Å en los puentes salinos. Para la ARG138, estas distancias aumentan en el enlace de hidrógeno a 4.4 Å y en los puentes salinos a 6.4 Å - 6.5 Å. Sin embargo, en el sistema hAK1-SVS las distancias promedio de los átomos que forman estas interacciones aumentan en todos los residuos. Por ejemplo, en la LYS21 aumenta la distancia a 3.4 Å y 4.7 Å en el enlace de hidrógeno y puente salino, respectivamente. En la ARG149 las distancias aumentan significativamente en el enlace de hidrógeno a 4.7 Å y en los puentes salinos a 6.6 Å - 6.8 Å. Para la ARG138 también hay un incremento notable en las distancias promedio, donde el enlace de hidrógeno aumenta a 6.0 Å y los puentes salinos a 8.0 Å - 8.8 Å.

Por otra parte, al estudiar los rangos mínimos observados en el sistema hAK1 sin estatina, se logran formar en todos los residuos evaluados las interacciones de tipo salino y de enlace de hidrógeno con el sustrato de ATP. Esto se debe a la distancia límite requerida que es aproximadamente de 2.7 Å – 3.3 Å para formar enlaces de

hidrógeno y de 4.0 Å para formar puentes salinos (McRee, 1999). Cumpliéndose estos límites de distancia requeridos en el sistema hAK1 sin estatina, cuando se estudian las distancias de los átomos que interactúan en un rango mínimo en la LYS21, ARG138 y ARG149 para formar los enlaces de hidrógeno (Rango Min: 2.3 - 2.4 Å) y puentes salinos (Rango Min: 2.4 Å - 3.5 Å).

Por el contrario, en el sistema hAK1-SVS no se logran formar, en la mayoría de los casos, interacciones con el sustrato de ATP al visualizar los rangos mínimos de los residuos evaluados, donde el complejo hAK1-SVS solo fue capaz de generar las interacciones de enlace de hidrógeno (Rango Min: 2.6 Å) y puentes salinos (Rango Min: 3.5 Å) con la LYS21. Sin embargo, los residuos de ARG138 y ARG149 establecieron distancias entre átomos con un rango mínimo que supera el límite para formar los enlaces de hidrógeno (Rango Min: 4.9 Å (ARG138) y 3.6 Å (ARG149)) y puentes salinos (Rango Min: 6.6 Å - 7.1 Å (ARG138) y 5.7 Å (ARG149)).

Por último, la desviación estándar que nos indica la variación o dispersión de las distancias medidas durante los 300ns de DM, demuestra cierta relatividad al examinar y comparar la desviación de las distancias de interacción del sistema hAK1 con y sin presencia de SVS. Esto se puede comprender, al determinar que existe una menor desviación en la LYS21 (0.23 Å - 0.38 Å) y ARG149 (0.16 Å - 0.39 Å) en hAK1 sin estatina que en hAK1-SVS (0.56 Å - 0.66 Å) respectivamente. No obstante, en la ARG138 el sistema con SVS presentó una desviación estándar notablemente menor (0.56 Å - 0.65 Å) que el sistema sin estatina (0.85 Å - 1.17 Å).

En base a lo analizado, se logró determinar un comportamiento en la proteína hAK1, donde la presencia de las estatinas establece un posible efecto alostérico. Este se presenta debido a la perturbación de las distancias en las interacciones al distorsionarse los contactos entre los residuos catalíticos (LYS21, ARG138 y ARG149) alineados con la proteína *ApADK* y el sustrato de ATP. Nos centramos en el análisis del sistema hAK1, donde la presencia de la SVS en un potencial sitio alostérico (Sitio 2) reportado, generó alteraciones del sitio activo que se vieron presentes al medir las distancias del ATP con los residuos claves en la catálisis de

la hAK1. Por tanto, la presencia de la estatina en el sitio alostérico sugiere una distorsión de la geometría correcta del sitio catalítico y así afecta la capacidad de la AK humana para desarrollar correctamente el mecanismo de reacción catalítico. No obstante, para poder corroborar este efecto se necesitarán simulaciones de dinámica molecular más largas y además la evaluación de las mismas distancias del sitio catalítico de hAK1 en presencia de las otras estatinas.

Cálculos de energía libre

Al obtener y analizar los resultados relacionados con el Docking molecular y la dinámica molecular en los sistemas hAK1-estatina, se procedió a evaluar y estimar la afinidad relativa de las estatinas en cada uno de los potenciales sitios alostéricos identificados. Para esto se aplicaron los cálculos de energía libre de unión por medio del método de determinación de energía libre con solvente implícito, MMGBSA (“Molecular mechanics with generalised Born and surface area solvation”). Los resultados se muestran en orden descendente en la **Tabla 6** para el “sitio 1”, la **Tabla 7** para el “sitio 2” y la **Tabla 8** para el “sitio 3”.

Calculo MMGBSA: Sitio 1

Estatina	Energía (Kcal/mol)	Desviación Estándar (Kcal/mol)
AVS	-30.611	3.672
SVS	-29.116	3.943
RVS	-25.497	3.543
PVS	-22.756	12.002
FVS	-20.070	5.245

Tabla 6. Valores de energía(kcal/mol) y de desviación estándar(kcal/mol) para cada estatina en el sitio 1.

Calculo MMGBSA: Sitio 2

Estatina	Energía (Kcal/mol)	Desviación Estándar (Kcal/mol)
PVS	-50.041	6.511
RVS	-34.955	4.082
SVS	-32.074	6.476
AVS	-29.234	8.349
FVS	-23.961	4.954

Tabla 7. Valores de energía(kcal/mol) y de desviación estándar(kcal/mol) para cada estatina en el sitio 2.

Calculo MMGBSA: Sitio 3

Estatina	Energía (Kcal/mol)	Desviación Estándar (Kcal/mol)
FVS	-43.249	4.909
PVS	-42.368	6.030
RVS	-42.255	3.032
AVS	-34.247	7.351
SVS	-26.392	3.920

Tabla 8. Valores de energía(kcal/mol) y de desviación estándar(kcal/mol) para cada estatina en el sitio 3.

El orden de la afinidad obtenida con los cálculos de MMGBSA para el sitio 1 (AVS > SVS > RVS > PVS > FVS), sitio 2 (PVS > RVS > SVS > AVS > FVS) y sitio 3 (FVS > PVS > RVS > AVS > SVS), al compararse con la afinidad experimental de las estatinas con hAK1 (SVS > RVS > FVS > PVS > AVS), varía sin determinarse un resultado idéntico o similar en el orden de afinidad reportado en la literatura (Wujak et al., 2021). En los tres sitios la estatina con mayor afinidad es diferente, donde en el sitio 1 es la AVS (-30.61 kcal/mol), para el sitio 2 es la PVS (-50.04 kcal/mol) y en el sitio 3 es la FVS (-43.24 kcal/mol). En el caso de la estatina con menor afinidad, se observa la FVS en el sitio 1 (-20.07 kcal/mol) y el sitio 2 (-23.96 kcal/mol), y en el sitio 3 es la SVS (-26.39 kcal/mol). La desviación estándar (SD) es aceptable en la mayoría de las estatinas respecto a los últimos 100ns de cada dinámica, no obstante, en ciertas conformaciones es muy alta dependiendo de su estabilidad en el sitio de unión al evaluarse en ese tiempo de simulación. Por ejemplo, la AVS muestra la SD más alta entre estatinas en los sitios cercanos a la TYR32, TYR34 y TYR154 (Sitio 2: 8.35 kcal/mol y Sitio 3: 7.35 kcal/mol) y la PVS determina la SD más alta en el sitio representado principalmente por la LYS56 y LYS63 (Sitio 1: 12.00 kcal/mol).

La AVS en comparación con la mayoría de las demás estatinas presentó una afinidad más reducida para interactuar con las tirosinas (Sitio 2: -29.23 kcal/mol) (Sitio 3: -34.24 kcal/mol). Por otra parte, la AVS en el sitio 1 aun cuando es menor a la afinidad del sitio 3, muestra la mejor afinidad energética respecto a las demás estatinas (-30.61 kcal/mol) en ese mismo sitio, la cual puede relacionarse con las

interacciones hidrofóbicas de la LYS56 y la LYS63 que mantiene durante la simulación.

Para la FVS la afinidad energética obtenida es la más baja en el sitio 1 (-20.07 kcal/mol) y el sitio 2 (-23.96 kcal/mol) sin destacar una mejor interacción con lisinas o tirosinas. Pero cambia rotundamente en el sitio 3 al presentar la mayor afinidad (-43.24 kcal/mol) entre las estatinas, la cual se especifica en centrarse en interacciones hidrofóbicas y de π -stacking con la TYR153.

En el caso de la PVS, predominó una mejor afinidad con las tirosinas en el sitio 2 (-50.04 kcal/mol) y sitio 3 (-42.36 kcal/mol) que en el sitio 1 (-22.75 kcal/mol) con las lisinas. Además de establecer en el sitio 2 el valor energético con mayor afinidad entre todas las estatinas y los demás sitios, posiblemente por su interacción constante por medio de enlaces de hidrógeno con la TYR32 y TYR34.

Respecto a la RVS, se reveló un comportamiento energético menos abrupto entre los sitios al compararse con las demás estatinas. Reconociendo, que individualmente es más afín con el sitio 2 (-34.95 kcal/mol) y sitio 3 (-42.25 kcal/mol), que el sitio 1 (-25.45 kcal/mol). Interactuando principalmente con todos los residuos que conforman al sitio 2 y específicamente con la LYS83 por medio de enlaces de hidrógeno y puentes salinos.

Por último, la SVS reflejó valores energéticos con más afinidad hacia el sitio 2 (-32.07 kcal/mol) seguido con el sitio 1 (-29.11 kcal/mol) y por último el sitio 3 (-26.39 kcal/mol). Respecto al sitio 2, las interacciones determinadas se comparten tanto con tirosinas como con lisinas. Por ejemplo, mantiene contactos con la TYR32, LYS31 y LYS88.

En resumen, los sitios cercanos a las tirosinas (Sitio 2 y 3) presentaron a través de los cálculos de energía, una mayor afinidad en las estatinas, en comparación con el sitio reconocido por las lisinas (Sitio 1). También, se pueden destacar los cálculos obtenidos de la RVS, debido a su estable orden de afinidad energética con la menor SD para cada sitio al mantenerse en segunda (Sitio 2) y tercera (Sitio 1 y 3) posición respecto a las demás estatinas, además de ser similar al orden de afinidad

experimental (K_b) que se destaca como una de las estatinas con mayor afinidad en el sistema hAK1. Sin embargo, el comportamiento de las estatinas en general varía entre los sitios evaluados, donde los resultados para cada una de las estatinas presentan 2 factores que pueden alterar los cálculos de energía libre de unión considerando las conformaciones seleccionadas para cada sitio. Primero, la afinidad entre estatinas depende de las interacciones que se conformen con los residuos que se encuentren en el sitio correspondiente. Segundo, la estabilidad de las interacciones intermoleculares hAK1-estatina durante la trayectoria de la dinámica molecular obtenida afecta los valores de energía medidos durante el tiempo de simulación analizado. Adicionalmente, se debe considerar que el método MMGBSA, al realizar los cálculos de energía libre de unión rápidamente con un costo computacional reducido, se vuelve impreciso al momento de comparar sus resultados con las afinidades experimentales reportadas para las estatinas. Principalmente al abordar un sistema donde no se tiene un cristal del complejo hAK1-estatina, se hace desafiante esclarecer cuál es el sitio alostérico más probable y las interacciones de las estatinas con los residuos de ese sitio. Adicionalmente, debería evaluarse si los sitios alostéricos identificados podrían ser ocupados simultáneamente por cada una de las estatinas evaluadas, para esto se deberían realizar estudios experimentales que lo confirmen.

Conclusión

El estudio computacional realizado entre la enzima adenilato quinasa humana 1 “hAK1” y diferentes estatinas con potenciales efectos alostéricos, representa avances que validan y mejoran los enfoques previos reportados sobre el complejo hAK1 – estatina (Wujak et al., 2021). El objetivo central de este trabajo consistió en estimar la afinidad de cada estatina (AVS, FVS, PVS, RVS, SVS) sobre los tres posibles sitios alostéricos discutidos y explicar el mecanismo alostérico de estas moléculas.

Los puntos que se lograron abordar radican en el refuerzo del protocolo de Docking con el desarrollo de un acoplamiento molecular ciego que exploró de forma exhaustiva y robusta toda la proteína por medio de 8 cajas de Docking. El muestreo conformacional detectó un primer sitio alostérico (Sitio 1) con un clúster de 10Å que presentó afinidad estable para las diferentes estatinas y que está conformado principalmente por residuos de lisinas como la LYS56 y LYS63. Se debe resaltar que, además, se lograron corroborar con un clúster de 5Å los dos sitios alostéricos (Sitio 2 y Sitio 3) cercanos a las tirosinas reportadas previamente en la literatura como la TYR32, TYR34 y TYR154.

Al profundizar en el estudio de este complejo a través de las simulaciones de DM, se evaluó la estabilidad que presentaban las conformaciones seleccionadas de las estatinas en cada sitio identificado, al analizar los valores de RMSD (Root Mean Squared Deviation) y las interacciones proteína-ligando a través de los mapas de calor durante la dinámica con los residuos de interés por sitio y también la posible inactivación alostérica de la actividad catalítica de la hAK1. De allí surgió como resultado que las conformaciones varían relativamente de acuerdo con la estatina y el sitio alostérico establecido. Se observó que algunas de las estatinas se mantenían estables en los sitios, pero que otras conformaciones se desplazaban del sitio inicial o incluso se desplazaban al solvente. Esto es esperado ya que no hay un bolsillo de unión profundo en la proteína, sino que las estatinas están unidas a la hAK1 en una superficie que queda expuesta al solvente.

Respecto al análisis del efecto alostérico, se estudió usando las distancias entre el ATP y los residuos catalíticos clave obtenidos del alineamiento del sitio activo entre la proteína humana hAK1 y la proteína del microorganismo “ApADK”. Estas distancias se compararon durante la trayectoria de DM de la enzima hAK1 sin presencia de estatinas y en complejo con la estatina de mayor afinidad experimental (SVS) en el sitio “2”. A partir de estos resultados, se pudo observar una perturbación de las distancias de reactividad del sistema sin estatina entre los aminoácidos importantes en la actividad catalítica de la hAK1 como la LYS21, ARG138 y ARG149, y el grupo fosfato gamma del ATP. Esto se originó por la presencia de la SVS, provocando un posible efecto inhibitor que impide la correcta formación de las interacciones registradas de tipo puente salino y enlace de hidrógeno.

Por último, se evaluó la energía libre de unión de cada estatina en los sitios alostéricos caracterizados con docking. Los resultados obtenidos no fueron directamente similares al compararse con el correcto orden de afinidad experimental de los valores K_b reportados por literatura (Wujak et al., 2021). Sin embargo, si se logró corroborar que los sitios donde se encuentra la presencia de las tirosinas reportadas (Sitio 2 y 3) proporcionan un valor energético con mayor afinidad en todas las estatinas en comparación con el sitio descubierto que enfatiza la presencia de las lisinas (Sitio 1). Se destacó la RVS, como la estatina más estable que se asemeja al valor de afinidad de unión reportado (K_b) en base al orden de afinidad energético obtenido. Adicionalmente, se determinó que cada estatina establece en general una afinidad que cambia dependiendo del sitio alostérico en el que se evalúa y las interacciones que se definen con los residuos presentes en un sitio específico. En cuanto al uso del método MMGBSA, fue posible obtener resultados de forma rápida y sin emplear mayores recursos computacionales, pero con menos precisión en los cálculos realizados. Debido a esto, usar otro método de cálculo de energía más preciso y exigente computacionalmente podría delimitar resultados de afinidad energética más cercanos a los reportados.

Con todo lo anterior, y aplicado al análisis del complejo hAK1-estatina, se propone a futuro complementar la investigación de estos complejos proteína-ligando, al

emplear cálculos de energía libre de unión con un método más preciso que compare la afinidad entre los tres sitios estudiados y evaluar el comportamiento de los sustratos de ATP y AMP con la presencia de las demás estatinas (AVS, FVS, PVS y RVS). Adicionalmente, se sugiere investigar en profundidad los residuos identificados cerca de los sustratos (LYS21, ARG138 y ARG149) que logran generar interacciones, ya que esto podría establecer un punto clave para comprender el posible efecto alostérico que desencadenan las estatinas. Así, se pretende poder contribuir con estudios computacionales que permitan el desarrollo colectivo de nuevos compuestos bioactivos con potencial capacidad de inhibir la actividad enzimática de la proteína hAK1.

Referencias

- Adasme-Carreño, F., Muñoz-Gutierrez, C., Caballero, J., & Alzate-Morales, J. H. (2014). Performance of the MM/GBSA scoring using a binding site hydrogen bond network-based frame selection: the protein kinase case. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(27), 14047–14058. <https://doi.org/10.1039/C4CP01378F>
- Bouysset, C., & Fiorucci, S. (2021). ProLIF: a library to encode molecular interactions as fingerprints. *Journal of cheminformatics*, 13(1), 1-9.
- Bowers, K. J., Chow, D. E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., Klepeis, J. L., Kolossvary, I., Moraes, M. A., Sacerdoti, F. D., Salmon, J. K., Shan, Y., & Shaw, D. E. (2006). Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, Florida, November 11–17.
- Daily, M. D., Phillips, G. N., Jr., & Cui, Q. (2010). Many local motions cooperate to produce the adenylate kinase conformational transition. *Journal of Molecular Biology*, 400(3), 618–631. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2010.05.015>
- Diamantis, E., Kyriakos, G., Quiles-Sanchez, L. V., Farmaki, P., & Troupis, T. (2017). The Anti-Inflammatory Effects of Statins on Coronary Artery Disease: An Updated Review of the Literature. *Current Cardiology Reviews*, 13(3), 209–216. <https://doi.org/10.2174/1573403X13666170426104611>
- Dzeja, P., Chung, S., & Terzic, A. (2007). *Integration of adenylate kinase and glycolytic and clycogenolytic circuits in cellular energetics*. https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=ZPjFoEjilMkC&oi=fnd&pg=PA265&dq=Integration+of+adenylate+kinase+and+glycolytic+and+clycogenolytic+circuits+in+cellular+energetics&ots=FxkgROI6hO&sig=RGJF_SEIda28LE9x6hInN4kLThk
- Endo, A. (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, 33(11), 1569-1582.
- Fabre, A. C. S., Vantourout, P., Champagne, E., Tercé, F., Rolland, C., Perret, B., Collet, X., Barbaras, R., & Martinez, L. O. (2006). Cell surface adenylate kinase activity regulates the F1-ATPase/P2Y13-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 2006 63:23*, 63(23), 2829–2837. <https://doi.org/10.1007/S00018-006-6325-Y>
- Farha, O. K., & Hupp, J. T. (2010). Rational Design, Synthesis, Purification, and Activation of Metal–Organic Framework Materials. *Accounts of Chemical Research*, 43(8), 1166–1175. <https://doi.org/10.1021/AR1000617>
- Feldhaus, P., Frohlich, T., Goody, R. S., Isakov, M., & Schirmer, R. H. (1975). Synthetic Inhibitors of Adenylate Kinases in the Assays for ATPases and Phosphokinases.

European Journal of Biochemistry, 57(1), 197–204. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1975.TB02291.X>

- Formoso, E., Limongelli, V., & Parrinello, M. (2015). Energetics and Structural Characterization of the large-scale Functional Motion of Adenylate Kinase. *Scientific Reports*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/SREP08425>
- Fukami-Kobayashi, K., Nosaka, M., Nakazawa, A., & Gō, M. (1996). Ancient divergence of long and short isoforms of adenylate kinase molecular evolution of the nucleoside monophosphate kinase family. *FEBS Letters*, 385(3), 214–220. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00367-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00367-5)
- Glaser, P., Presecan, E., Delepierre, M., Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., Barzu, O., & Gilles, A. M. (2002). Zinc, a novel structural element found in the family of bacterial adenylate kinases. *Biochemistry*, 31(12), 3038–3043. <https://doi.org/10.1021/BI00127A002>
- Goodsell S.D, Morris M.G, & Olson J.A. (1996). Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 9(1), 1–5. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1352\(199601\)9:1<1::aid-jmr241>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1352(199601)9:1<1::aid-jmr241>3.0.co;2-6)
- Graham L. Patrick. (2013). *An Introduction to Medicinal Chemistry* (5th Edition, Vol. 5). Oxford university press. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Pj7xJRuhZxUC&oi=fnd&pg=PP1&dq=An+Introduction+To+Medicinal+Chemistry+5th+Edition&ots=I_NeOA7w6K&sig=FTGFOKnucm9qgzlVvGf4HaZmLs#v=onepage&q=An%20Introduction%20To%20Medicinal%20Chemistry%205th%20Edition&f=false
- Gur, M., Madura, J. D., & Bahar, I. (2013). Global Transitions of Proteins Explored by a Multiscale Hybrid Methodology: Application to Adenylate Kinase. *Biophysical Journal*, 105(7), 1643–1652. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2013.07.058>
- Hancock CR, Janssen E, & Terjung RL. (2006). Contraction-mediated phosphorylation of AMPK is lower in skeletal muscle of adenylate kinase-deficient mice. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 100(2), 406–413. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00885.2005>
- Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2010). Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(1), 69–82. <https://doi.org/10.1021/CI100275A>
- Huang, S.-Y., & Zou, X. (2010). Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *International Journal of Molecular Sciences 2010, Vol. 11, Pages 3016-3034*, 11(8), 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/IJMS11083016>

- Hui, L., Robertson, A. D., & Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4), 704–721. <https://doi.org/10.1002/PROT.20660>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J. (2005). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 127(8), 2964-2978.
- Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology* 2002 9:9, 9(9), 646–652. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>
- Kavalipati, N., Shah, J., Ramakrishan, A., & Vasawala, H. (2015). Pleiotropic effects of statins. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 19(5), 554.
- Khoo, J. C., & Russell, P. J. (1972). Isoenzymes of adenylate kinase in human tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 268(1), 98–101. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(72\)90202-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(72)90202-1)
- Koskinas KC, Windecker S, & Räber L. (2016). Regression of coronary atherosclerosis: Current evidence and future perspectives. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2015.05.004>
- Kurebayashi, N., Kodama, T., & Ogawa, Y. (1980). P₁,P₅-Di(Adenosine-5')Pentaphosphate(Ap₅A) as an Inhibitor of Adenylate Kinase in Studies of Fragmented Sarcoplasmic Reticulum from Bullfrog Skeletal Muscle. *The Journal of Biochemistry*, 88(3), 871–876. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A133041>
- Li, J., Abel, R., Zhu, K., Cao, Y., Zhao, S., & Friesner, R. A. (2011). The VSGB 2.0 model: A next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(10), 2794–2812. <https://doi.org/10.1002/PROT.23106>
- Lienhard, G. E., & Secemski, I. I. (1973). P₁,P₅-Di(adenosine-5')pentaphosphate, a Potent Multisubstrate Inhibitor of Adenylate Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 248(3), 1121–1123. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)44380-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)44380-9)
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2013 27:3, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/S10822-013-9644-8>
- Maron, D. J., Fazio, S., & Linton, M. F. (2000). Current Perspectives on Statins. *Circulation*, 101(2), 207–213. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.2.207>

- Matsuura, S., Igarashi, M., Tanizawa, Y., Yamada, M., Kishi, F., Kajii, T., Fujii, H., Miwa, S., Sakurai, M., & Nakazawa, A. (1989). Human adenylate kinase deficiency associated with hemolytic anemia: A single base substitution affecting solubility and catalytic activity of the cytosolic adenylate kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(17), 10148–10155. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81779-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81779-3)
- McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature* *197* 267:5612, *267*(5612), 585–590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>
- McRee, D. E. (1999). *Practical protein crystallography*. Elsevier.
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., & Christopoulos, A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological reviews*, *55*(4), 597-606.
- Panayiotou, C., Solaroli, N., Xu, Y., Johansson, M., & Karlsson, A. (2011). The characterization of human adenylate kinases 7 and 8 demonstrates differences in kinetic parameters and structural organization among the family of adenylate kinase isoenzymes. *Biochemical Journal*, *433*(3), 527–534. <https://doi.org/10.1042/BJ20101443>
- Pohorille, A., Jarzynski, C., & Chipot, C. (2010). Good Practices in Free-Energy Calculations. *Journal of Physical Chemistry B*, *114*(32), 10235–10253. <https://doi.org/10.1021/JP102971X>
- Pucar, D., Bast, P., Gumina, R. J., Lim, L., Drahl, C., Juranic, N., Macura, S., Janssen, E., Wieringa, B., Terzic, A., & Dzeja, P. P. (2002). Adenylate kinase AK1 knockout heart: energetics and functional performance under ischemia-reperfusion. <https://doi.org/10.1152/Ajheart.00116.2002>, *283*(2 52-2), 776–782. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00116.2002>
- Rastelli, G., Rio, A. del, Degliesposti, G., & Sgobba, M. (2010). Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(4), 797–810. <https://doi.org/10.1002/JCC.21372>
- Reichard P. (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *57*, 349–374. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.57.070188.002025>
- Sanner MF. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, *17*(1), 57–61. <https://europemc.org/article/med/10660911>
- Shibanuma, Y., Nemoto, N., Yamamoto, N., Sampei, G. I., & Kawai, G. (2020). Crystal structure of adenylate kinase from an extremophilic archaeon *Aeropyrum pernix* with ATP and AMP. *The Journal of Biochemistry*, *168*(3), 223-229.

- Stanojevic, V., Habener, J. F., Holz, G. G., & Leech, C. A. (2008). Cytosolic adenylate kinases regulate K-ATP channel activity in human β -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(3), 614–619. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.01.109>
- Wang, C.-Y., Liu, P.-Y., & Liao, J. K. (2008). Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends in Molecular Medicine*, 14(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2007.11.004>
- Wujak M, Czarnecka J, Gorczycka M, & Hetmann A. (2015). Human adenylate kinases - classification, structure, physiological and pathological importance. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 69, 933–945. <https://doi.org/10.5604/17322693.1165196>
- Wujak, M., Kozakiewicz, A., Ciarkowska, A., Loch, J. I., Barwiolek, M., Sokolowska, Z., Budny, M., & Wojtczak, A. (2021). Assessing the Interactions of Statins with Human Adenylate Kinase Isoenzyme 1: Fluorescence and Enzyme Kinetic Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5541. <https://doi.org/10.3390/IJMS22115541>
- Yegutkin, G. G., Jankowski, J., Jalkanen, S., Günthner, T., Zidek, W., & Jankowski, V. (2008). Dinucleotide polyphosphates contribute to purinergic signalling via inhibition of adenylate kinase activity. *Bioscience Reports*, 28(4), 189–194. <https://doi.org/10.1042/BSR20080052>
- Yegutkin, G. G., Wieringa, B., Robson, S. C., & Jalkanen, S. (2012). Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. *The FASEB Journal*, 26(9), 3875–3883. <https://doi.org/10.1096/FJ.12-205658>